

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURKA KLUN

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JURKA KLUN

**VPLIV POLIMORFIZMOV V GENIH, KATERIH PRODUKTI
SODELUJEJO PRI PRIVZEMU, POLIGLUTAMACIJI IN
REDUKCIJI FOLNE KISLINE, NA POJAVNOST OROFACIALNIH
SHIZ V SLOVENSKI POPULACIJI**

**THE INFLUENCE OF POLYMORPHISMS IN GENES, WHOSE
PRODUCTS ARE INVOLVED IN UPTAKE, POLYGLUTAMATION
AND REDUCTION OF FOLIC ACID, ON THE OCCURRENCE OF
OROFACIAL CLEFTS IN THE SLOVENIAN POPULATION**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Nataše Karas Kuželički, mag. farm.

Ob tej priložnosti bi se rada iskreno zahvalila mentorici doc. dr. Nataši Karas Kuželički, mag. farm. in asist. Alenki Šmid, mag. farm. za pomoč pri izdelavi magistrske naloge, vse strokovne nasvete in nenazadnje za vzpodbudno besedo v trenutkih, ko stvari niso tekle tako, kot bi morale. Lepa hvala tudi vsem tistim, ki so mi v laboratoriju Katedre za klinično biokemijo na kakršenkoli način pomagali pri izvedbi praktičnega dela magistrske naloge. Zahvala gre nenazadnje moji družini in prijateljem, ki so vseskozi verjeli vame in mi stali ob strani.

»Scientia est potentia.«

Francis Bacon

IZJAVA

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

Jurka Klun

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	II
KAZALO SLIK	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
POVZETEK	VII
ABSTRACT	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1. UVOD	1
1.1 OROFACIALNE SHIZE	1
1.1.1 Nastanek, delitev in klasifikacija OFC.....	1
1.1.2 Funkcionalne posledice OFC	3
1.2 DEJAVNIKI TVEGANJA ZA OFC	3
1.2.1 Demografski dejavniki	3
1.2.2 Dejavniki okolja	4
1.2.3 Genetski dejavniki.....	5
1.3 FOLATI IN FOLNA KISLINA	6
1.3.1 Kemijska struktura in viri.....	6
1.3.2 Biokemična vloga.....	7
1.3.3 Absorpcija in privzem v celice.....	8
1.3.3.1 Prenašalni protein SLC19A1	8
1.3.4 Metabolizem znotraj celic	9
1.3.4.1 Poliglutamacija s FPGS	10
1.3.4.2 Redukcija z DHFR	10
1.3.4.3 Cikel presnove folatov	11
1.4 FOLATI IN OFC	11
1.4.1 Vpletenost folatov v etiologijo OFC	11
1.4.1.1 Živila, obogatena s folno kislino	12
1.4.1.2 Genski polimorfizmi encimov v presnovni poti folatov.....	12
1.5 POLIMORFIZMI V GENU <i>SLC19A1</i>	13
1.5.1 Polimorfizem rs1051266G>A	13
1.6 POLIMORFIZMI V GENU <i>FPGS</i>	14
1.6.1 Polimorfizem rs1544105C>T.....	14

1.7 POLIMORFIZMI V GENU <i>DHFR</i>	15
1.7.1 Polimorfizem rs1677693C>A	15
2. NAMEN	17
3. PREISKOVANCI IN METODE	18
3.1 PREISKOVANCI	18
3.2 IZOLACIJA DNA.....	18
3.2.1 Materiali in oprema	18
3.2.2 Izolacija DNA s »QIAamp DNA Mini Kit« (QIAGEN)	19
3.2.3 Izolacija DNA z »MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit« (Epicentre, an Illumina company)	19
3.3 MERJENJE KONCENTRACIJE IZOLIRANE DNA	19
3.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	20
3.4.1 Materiali in oprema	20
3.4.2 Genotipizacija <i>FPGS</i> rs1544105 in <i>DHFR</i> rs1677693 s TaqMan® hidrolizirajočimi sondami	20
3.4.3 Genotipizacija <i>SLC19A1</i> rs1051266 z analizo talilne krivulje DNA pri visoki ločljivosti ob uporabi SimpleProbe® tehnologije	23
3.5 STATISTIČNA ANALIZA	27
3.5.1 Anketni vprašalnik	27
3.5.2 Rezultati genotipizacije	28
4. REZULTATI.....	29
4.1 ANALIZA CELOTNE POPULACIJE MATER IN OTROK Z IN BREZ OFC	29
4.1.1 Analiza anketnega vprašalnika.....	29
4.1.1.1 Osnovni statistični pristopi	29
4.1.1.2 Model logistične regresije	32
4.1.2 Analiza rezultatov genotipizacije	34
4.1.2.1 Hardy-Weinbergovo ravotežje	34
4.1.2.2 Osnovni statistični pristopi	34
4.1.2.3 Modeli logistične regresije	37
4.2 ANALIZA SELEKCIONIRANE POPULACIJE MATER IN OTROK Z IN BREZ OFC	40
4.2.1 Analiza rezultatov genotipizacije	40

4.2.1.1 Osnovni statistični pristopi	40
5. RAZPRAVA.....	44
5.1 Demografski dejavniki	44
5.2 Okoljski dejavniki.....	45
5.3 Genetski dejavniki	50
5.3.1 <i>SLC19A1</i> rs1051266G>A.....	50
5.3.2 <i>FPGS</i> rs1544105C>T.....	52
5.3.3 <i>DHFR</i> rs1677693C>A	53
6. SKLEPI	55
7. LITERATURA IN VIRI	57
8. PRILOGE.....	68

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz normalne anatomske strukture orofacialnega področja (zgoraj) in strukture pri različnih vrstah shiz (spodaj).	2
Slika 2: Struktura folne kisline (A) in v naravi prisotnih folatov (B)..	6
Slika 3: Prikaz vstopa folatov v celico, poliglutamacije ter redukcije folatov (zelena podlaga), cikla presnove folatov (modra podlaga) in remetilacijskega cikla (vijolična podlaga).	9
Slika 4: Princip genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami TaqMan®.....	21
Slika 5: Graf alelne diskriminacije za polimorfizem <i>FPGS</i> rs1544105.	23
Slika 6: Shematski prikaz delovanja SimpleProbe® probe v primeru, ko je ta v reakcijski mešanici prosta (A) oziroma vezana na tarčno DNA (B)..	24
Slika 7: Različne talilne krivulje pri različnih genotipih za <i>SLC19A1</i> rs1051266..	25
Slika 8: Različni talilni vrhovi pri različnih genotipih za <i>SLC19A1</i> rs1051266.....	25
Slika 9: Tortna diagrama prikazujeta, kako so razporejeni <i>FPGS</i> genotipi otrok v kontrolni in preiskovani skupini mater z genotipom <i>FPGS</i> (TT).	36
Slika 10: Tortna diagrama prikazujeta, kako so porazdeljeni genotipi <i>SLC19A1</i> v kontrolni in preiskovani skupini mater s kombinacijo genotipov <i>FPGS</i> (CC)/ <i>DHFR</i> (CC).	37
Slika 11: Tortna diagrama prikazujeta deleže genotipov za <i>DHFR</i> rs1677693C>A pri otrocih v kontrolni in preiskovani skupini.....	41
Slika 12: Tortna diagrama prikazujeta, kako so razporejeni genotipi <i>DHFR</i> v kontrolni in preiskovani skupini otrok z genotipom <i>FPGS</i> (CT).	43

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Uporabljena testna kompleta TaqMan®.	22
Preglednica II: Sestava PCR-reakcijske zmesi enega vzorca.	22
Preglednica III: Program izvedbe PCR s TaqMan® sondami.	22
Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi enega vzorca za PCR in HRM analizo.	26
Preglednica V: Program izvedbe PCR in HRM analize.	27
Preglednica VI: Prikaz srednjih vrednosti preučevanih numeričnih spremenljivk in rezultatov osnovne statistične analize.	30
Preglednica VII: Prikaz števila in frekvenc izidov v posameznih kategorijah preučevanih kategoričnih spremenljivk ter prikaz rezultatov osnovne statistične analize.	31
Preglednica VIII: Prikaz logističnega regresijskega modela 1.	33
Preglednica IX: Število in frekvence genotipov za preučevane polimorfizme ter rezultati osnovne statistične analize.	35
Preglednica X: Preučevane kombinacije polimorfizmov pri materi in/ali otroku.	35
Preglednica XI: Prikaz logističnega regresijskega modela 2.	38
Preglednica XII: Prikaz logističnega regresijskega modela 3.	39
Preglednica XIII: Število in frekvence genotipov za preučevane polimorfizme ter rezultati osnovne statistične analize.	41
Preglednica XIV: Preučevane kombinacije polimorfizmov pri materi in/ali otroku.	42

POVZETEK

Folna kislina je vodotopen vitamin B9, ki je nujno potreben za sintezo DNA. Igra ključno vlogo pri rasti celic, kar je še posebej pomembno v času embrionalnega razvoja. Pomanjkanje folne kisline v zgodnji nosečnosti se lahko pri plodu klinično izrazi v obliki različnih prirojenih okvar, tudi orofacialnih shiz (ang. *orofacial clefts*, OFC), ki so najpogostejše prirojene razvojne nepravilnosti obraza in ustne votline. Gre za okvare s kompleksno etiologijo, pri čemer naj bi sodelovali tako okoljski kot tudi genetski dejavniki. Namen magistrskega dela je bil ugotoviti, kako na pojavnost OFC v slovenski populaciji, ob upoštevanju vpliva izbranih demografskih in okoljskih dejavnikov, vplivajo polimorfizmi v genih, katerih produkti sodelujejo pri privzemu (*SLC19A1* rs1051266G>A), poliglutamaciji (*FPGS* rs1544105C>T) in redukciji (*DHFR* rs1677693C>A) folne kisline. V raziskavo je bilo vključenih 179 parov mater in otrok z OFC, ki so predstavljali preiskovano skupino (PS), ter 200 parov mater in otrok brez klinično potrjene prirojene okvare, ki so predstavljali kontrolno skupino (KS). Genotipe mater in otrok za *FPGS* rs1544105 in *DHFR* rs1677693 smo določili s TaqMan® hidrolizirajočimi sondami, genotipe za *SLC19A1* rs1051266 pa z analizo talilne krivulje DNA pri visoki ločljivosti ob uporabi SimpleProbe® tehnologije. Z modeloma logistične regresije smo dokazali, da je materin ali otrokov genotip *DHFR*(AA) (glede na genotip CC) na meji statistične značilnosti povezan s približno 3-krat večjim tveganjem za nastanek OFC pri plodu. Delež mater in njihovih otrok s hkratno prisotnostjo genotipa *FPGS*(TT) je bil 1,7-krat večji v PS v primerjavi s KS ($p = 0,052$), kar kaže na vpletenost mutiranega alela T v razvoj OFC. Delež mater s prisotno kombinacijo genotipov *FPGS*(CC)/*DHFR*(CC)/*SLC19A1*(AA) je bil 2,5-krat večji v KS glede na PS ($p = 0,045$), kar kaže na zaščitno vlogo omenjenih genotipov pri nastanku OFC. Vpliv izbranih polimorfizmov smo preučili tudi v populaciji otrok in njihovih mater, ki v času nosečnosti niso uživale pripravkov s folno kislino (72 parov mati-otrok). V tej skupini je bil delež otrok z genotipom *DHFR*(CC) kar 1,8-krat večji v KS v primerjavi s PS ($p = 0,042$), kar kaže na zaščitno vlogo alela C v odsotnosti materinega jemanja folatnih pripravkov. V selekcionirani populaciji frekvence genotipov kažejo tudi na to, da imajo otroci s kombinacijo genotipov *FPGS*(CT)/*DHFR*(CA) oziroma *FPGS*(CT)/*DHFR*(AA) višje tveganje za OFC ($p = 0,016$).

KLJUČNE BESEDE: orofacialne shize, *SLC19A1*, *FPGS*, *DHFR*, polimorfizmi.

ABSTRACT

Folic acid is a water-soluble vitamin B9 that is essential for DNA synthesis. It plays a crucial role in cell growth and is therefore particularly important in early embryogenesis. Folic acid deficiency in early pregnancy can cause formation of different types of birth defects, including orofacial clefts (OFC), the most common birth defects of orofacial region. The etiology of these congenital anomalies is complex and thought to result from an interplay of genetic and environmental factors. The aim of this Master's thesis was to examine the influence of polymorphisms in genes, whose products are involved in uptake (*SLC19A1* rs1051266G>A), polyglutamation (*FPGS* rs1544105C>T) and reduction (*DHFR* rs1677693C>A) of folic acid, on the occurrence of orofacial clefts in the Slovenian population, taking into account the influence of selected demographic and environmental factors. The case (CAG) and control (COG) groups consisted of 179 children with OFC and their mothers, and 200 children without congenital abnormalities and their mothers, respectively. Maternal and child genotypes for *FPGS* rs1544105 and *DHFR* rs1677693 were determined using TaqMan® hydrolysis probes, whereas genotypes for *SLC19A1* rs1051266 were determined using High-resolution melting analysis with SimpleProbe® technology. Logistic regression models showed marginally significant association between maternal or child genotype *DHFR*(AA) and 3 times higher risk for OFC formation (as compared to genotype CC). The proportion of mothers and their children with concurrent presence of *FPGS*(TT) genotype was 1,7 times higher in CAG, as compared to COG ($p = 0,052$), indicating involvement of mutant T allele in OFC etiology. The proportion of mothers with genotype combination *FPGS*(CC)/*DHFR*(CC)/*SLC19A1*(AA) was 2,5 times higher in COG, in comparison to CAG ($p = 0,045$), showing protective role of these genotypes. We also evaluated the influence of selected polymorphisms in children and their mothers who did not use folic acid supplements during pregnancy (72 mother-child pairs). The proportion of children with *DHFR*(CC) genotype was 1,8 times higher in COG, as compared to CAG ($p = 0,042$), indicating protective role of C allele in children whose mothers did not use folic acid supplements. Genotype frequencies in the selected population also showed that children with genotype combination *FPGS*(CT)/*DHFR*(CA) or *FPGS*(CT)/*DHFR*(AA) are at higher risk of developing OFC ($p = 0,016$).

KEY WORDS: orofacial clefts, *SLC19A1*, *DHFR*, *FPGS*, polymorphisms.

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	adenozin trifosfat	MTR	metionin sintaza
CHD	prirojene srčne okvare	MTRR	metionin sintaze reduktaza
CL	razcep ustnice	NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
CLP	razcep ustnice in neba	NTD	napake nevrnalne cevi
CL/P	razcep ustnice z ali brez razcepa neba	OFC	orofacialne shize
CPO	izoliran razcep neba	PCR	verižna reakcija s polimerazo
DHF	dihidrofolat	PS	preiskovana skupina
DHFR	dihidrofolat reduktaza	RNA	ribonukleinska kislina
<i>DHFR</i>	gen za dihidrofolat reduktazo	RO	razmerje obolevnosti
DNA	deoksiribonukleinska kislina	SAH	S-adenozinhomocistein
dTMP	deoksitimidin monofosfat	SAHH	S-adenozilhomocistein hidrolaza
FPGS	folilpoliglutamata sintetaza	SAM	S-adenozilmetionin
<i>FPGS</i>	gen za folilpoliglutamata sintetazo	SES	socialno-ekonomski status
HRM analiza	analiza talilne krivulje DNA pri visoki ločljivosti	SHMT	serin hidrosimetiltransferaza
HWE	Hardy-Weinbergovo ravnotežje	SLC19A1	folatni prenašalec
ITM	indeks telesne mase	<i>SLC19A1</i>	gen za folatni prenašalec
KS	kontrolna skupina	<i>TGFα</i>	gen za transformirajoči rastni faktor alfa
MAT	metionin adenoziltransferaza	THF	tetrahidrofolat
MT	metiltransferaza	Tm	temperatura taljenja
MTHFD1	metilentetrahidrofolat dehidrogenaza 1	t. n.	teden nosečnosti
MTHFR	metiletetrahidrofolat reduktaza		

1. UVOD

1.1 OROFACIALNE SHIZE

Orofacialne shize (ang. *orofacial clefts*, OFC) so najpogostejše prirojene razvojne nepravilnosti obraza in ustne votline. Okvara, ki je bolj poznana kot »volčje žrelo« ali »zajčja ustnica«, v Evropi prizadene 1/1000 živorojenih otrok, medtem ko je pojavnost v Sloveniji nekoliko višja od evropskega povprečja (1/600) (1–3). V Sloveniji se tako vsako leto rodi med 30 in 40 otrok z omenjeno anomalijo. Razdvojenost kože, mišičja, kosti in hrustanca predstavlja estetski in funkcionalni problem, katerega zdravljenje je dolgotrajno in vključuje več medicinskih specialističnih vej. Zaradi lokalizacije so te nepravilnosti pri rojstvu lahko prepoznavne, posamezniki pa so zaradi spremenjenega izgleda, govora, zobovja in sluha prepoznavani tudi kasneje (4).

1.1.1 Nastanek, delitev in klasifikacija OFC

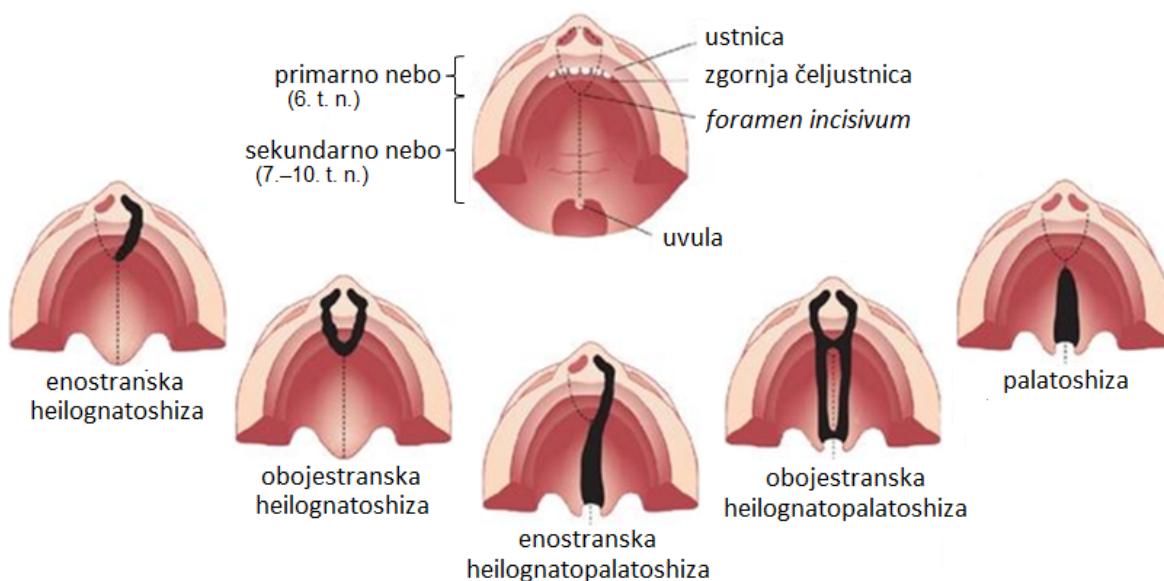
Shize nastanejo zaradi nepopolnega zraščanja orofacialnih embrionalnih izboklin med 5. in 10. tednom nosečnosti (t. n.). Vzrok za neuspešno zraščanje je lahko pomankljiva mezenhimska rast ali nepravilnost pri delovanju epitelija. Shize primarnega neba so posledica nepopolnega zraščanja maksilarnih in srednjih nosnih izboklin, medtem ko gre pri shizah sekundarnega neba za moteno zraščanje nebni izboklin in nosnega pretina (5).

Razcep ustnice (heiloshiza, ang. *cleft lip*, CL) je razcep primarnega neba (ustnica, čeljustni greben in del trdega neba do incizivnega foramna), razcep neba (palatoshiza, ang. *cleft palate only*, CPO) je razcep sekundarnega neba (mehko in trdo nebo do incizivnega foramna), medtem ko razcep ustnice in neba (heilognatopalatoshiza, ang. *cleft lip and palate*, CLP) označuje razcep primarnega in sekundarnega neba hkrati (Slika 1). Glede na to, ali je prizadeta ena ali obe strani ust oziroma ustne votline, razcepe delimo na enostranske in obojestranske, glede na obseg pa na popolne in delne (4). Enostranski razcepi so devetkrat bolj pogosti kot obojestranski in se dvakrat pogosteje pojavljajo na levi strani v primerjavi z desno (6). Pojavljajo se tudi razlike med vrstami razcepov. CLP predstavljajo 35–55% vseh razcepov, CPO 30–40%, CL pa 10–30% vseh razcepov.

Razcepi ustnice z ali brez razcepa neba (ang. *cleft lip with or without cleft palate*, CL/P) so pogostejši pri moških, medtem ko so CPO nekoliko pogostejši pri ženskah (4).

Mednarodno združenje za plastično in rekonstruktivno kirurgijo je leta 1967 sprejelo klasifikacijo shiz, ki temelji na embriološkem razvoju. Po njej delimo shize v 4 skupine:

- 1. Skupina:** *razcepi primarnega neba*. Razcepljena je ustnica (heiloshiza) ali ustnica in čeljustni greben (heilognatoshiza) na eni ali na obeh straneh.
- 2. Skupina:** *razcepi primarnega in sekundarnega neba*. Razcepljena je ustnica, čeljustni greben in nebo na eni ali na obeh straneh (heilognatopalatoshiza).
- 3. Skupina:** *razcepi sekundarnega neba*. Razcepljeno je samo nebo (palatoshiza). Shiza cepi nebo od zadaj naprej. Obsega lahko vse stopnje od razcepljene uvule, do popolne palatoshize, ki sega navzpred do incizivnega foramna.
- 4. Skupina:** združuje redke oblike razcepov na drugih predelih obraza (3).



Slika 1 (prirejeno po 7): Shematski prikaz normalne anatomске strukture orofacialnega področja (zgornaj) in strukture pri različnih vrstah shiz (spodaj).

OFC se večinoma pojavljajo kot izolirane nepravilnosti, lahko pa se kažejo tudi kot eden od kliničnih znakov različnih sindromov (npr. sindrom Van der Woude, sekvenca Pierre Robin sekvenca, sindrom Treacher Collins, trisomija 13, trisomija 18 ...). Glede na to, razcepe delimo na sindromske in nesindromske. Okrog 70 % CL/P in 50 % CPO je nesindromskih, kar kaže na to, da je v sklopu sindromov pogosteje prisoten CPO (8, 9).

1.1.2 Funkcionalne posledice OFC

Poleg estetske malformacije shize povzročajo tudi funkcionalne motnje, med katere sodijo: motnje hranjenja, dihanja, sluha, govora, moteno izražanje zob in motena mimika obraza (1). Novorojenci z nekaterimi oblikami shiz, kot sta CP in CLP, ne morejo sesati mleka, saj v ustni votlini ne uspejo ustvariti potrebnega podtlaka (3). Pri CLP je nosni pretin pogosto ukrivljen, posledično pa je dihanje skozi nos oteženo. Otrok ima zato usta tudi v mirovanju in ponoči odprta, kar pogojuje nenormalen razvoj čeljusti ter nenormalen ugriz. Razcep čeljustnega grebena pogosto spremljajo manjkajoči zobje v zobni vrsti, kar skupaj z malokluzijo (napačen ugriz) povzroča artikulacijske motnje (težave v izgovorjavi glasov). Otroci s CP in CLP se pogosto srečujejo tudi s težavami z ušesi in prevodno naglušnostjo. Mišica napenjalka mehkega neba, ki odpira Evstahijevo trobljo, je namreč pri otrocih s shizo neba lahko slabše kakovosti in zaradi razcepa nima pravega narastišča v mehkem nebu. Posledično je odpiranje troblje oteženo, slabša prehodnost pa lahko ostane tudi po operaciji shize. Disfunkcija troblje povzroča ponavljajoča izlivna in akutna vnetja srednjega ušesa, ki lahko vodijo v razvoj kroničnega vnetja. Navedena stanja so povezana s pojavom prevodne naglušnosti, ki znatno ovira razvoj govora pri otroku in komunikacijo otroka z okolico (1).

1.2 DEJAVNIKI TVEGANJA ZA OFC

Etiološko ozadje sindromskih OFC je relativno dobro poznano, medtem ko so nesindromske OFC okvare s kompleksno in dosedaj še vedno precej nepojasnjeno etiologijo. Zdi se, da pri nastanku nesindromskih OFC sodelujejo tako genetski kot tudi okoljski dejavniki. Pomemben dejavnik tveganja predstavljajo tudi nekateri demografski vplivi (10). Preden se lotimo opredeljevanja dejavnikov tveganja je potrebo vedeti, da na razvoj embrija vplivajo njegove genetske lastnosti in intrauterino okolje, ki pa je odvisno od materinih genetskih faktorjev in okoljskih dejavnikov, katerim je izpostavljena (11).

1.2.1 Demografski dejavniki

Med demografske dejavnike, ki jih stroka povezuje s pojavnostjo OFC, sodijo rasa, materina starost in socialno-ekonomski status (izobrazba, zaposlitev, prihodek). Pojavnost OFC se med **rasami** bistveno razlikuje. Največje tveganje za OFC je prisotno med Azijci

(1/500), sledi kavkazijska rasa (1/1000) in nato afriška z najmanjšim tveganjem (1/2500) (2, 8). Znotraj kavkazijske rase se pojavnost OFC giblje med 0,69 in 2,35 na 1000 rojstev (12).

Rezultati študij, ki so preučevale **vpliv starosti** matere na pojavnost OFC pri otroku, so si nasprotujoči. V kalifornijski študiji so ugotovili, da imajo ženske, ki so stare 39 let ali več, dvakrat večjo verjetnost za rojstvo otroka z OFC v primerjavi s tistimi, ki so stare med 25 in 29 let (13). V večjih študijah vpliva starosti matere na pojavnost OFC niso dokazali (14–15). DeRoo in sodelavci so v svoji raziskavi celo opazili, da imajo mlade matere značilno višje tveganje za OFC (16).

Že v 18. stoletju so pojavnost prirojenih napak povezovali tudi z nižjim **socialno-ekonomskim statusom** (SES), ki se mu navadno pripisuje slabša izobrazbena struktura staršev, nižji dohodki in poklici, ki zaradi narave dela lahko predstavljajo določeno tveganje (17). Nekatere študije poročajo o večji pojavnosti OFC v populaciji z nižjim SES (18–21), medtem ko kar nekaj raziskav omenjene povezave ni dokazalo (22–24).

1.2.2 Dejavniki okolja

Kajenje in uživanje alkohola med nosečnostjo številne raziskave opredeljujejo kot dejavnik tveganja za OFC (25). Med kajenjem se sproščata ogljikov monoksid in nikotin, ki naj bi zniževala raven kisika in na ta način povzročala tkivno hipoksijo ter tako negativno vplivala na razvoj ploda. Pri ženskah, ki kadijo v zgodnji nosečnosti, je možnost, da se otrok rodi z razcepom zgornje ustnice, dvakrat večja kakor pri nekadilkah (5).

Študije na ljudeh in živalih v zadnjih 50 letih kažejo, da je **povišana telesna temperatura** v nosečnosti teratogen dejavnik (26). Raziskave poročajo o 2–3-krat večjem tveganju za OFC ploda v povezavi s hipertermijo v prvem trimestru nosečnosti (27). Pojavnost OFC je signifikantno večja tudi med materami, ki so v nosečnosti doživele vsaj en močno **stresen dogodek** (smrt v družini, izguba službe, ločitev) (28).

Sladkorna bolezen v obdobju nosečnosti lahko ovira normalen razvoj ploda in povzroči takoimenovano diabetično embriopatijo. Gre za kongenitalne malformacije ploda, ki nastanejo kot posledica materine sladkorne bolezni, pri tem pa naj bi ključno vlogo igrala

hiperglikemija (29). Izsledki raziskav na živalskih modelih in pri ljudeh potrjujejo obstoj pozitivne korelacije med materino sladkorno boleznijo in pojavnostjo OFC (30).

Uživanje določenih vrst zdravil, predvsem antiepileptikov, strokovnjaki povezujejo z etiologijo prirojenih okvar. Antiepileptiki, kot so fenobarbital, karbamazepin, valproat in fenitoin, so že nekaj časa poznani kot potencialni teratogeni (31). Leta 1966 je Massey dokazal, da intrauterine injekcije fenitoina inducirajo razvoj CL/P pri mišjih fetusih (32).

Med okoljske dejavnike, ki so vpleteni v etiologijo OFC, sodijo tudi **prehranski vplivi**, med katerimi se najpogosteje omenja uživanje folatov in pripravkov folne kisline, ki naj bi, za razliko od prej navedenih dejavnikov, zmanjšali tveganje za nastanek OFC (10, 25).

1.2.3 Genetski dejavniki

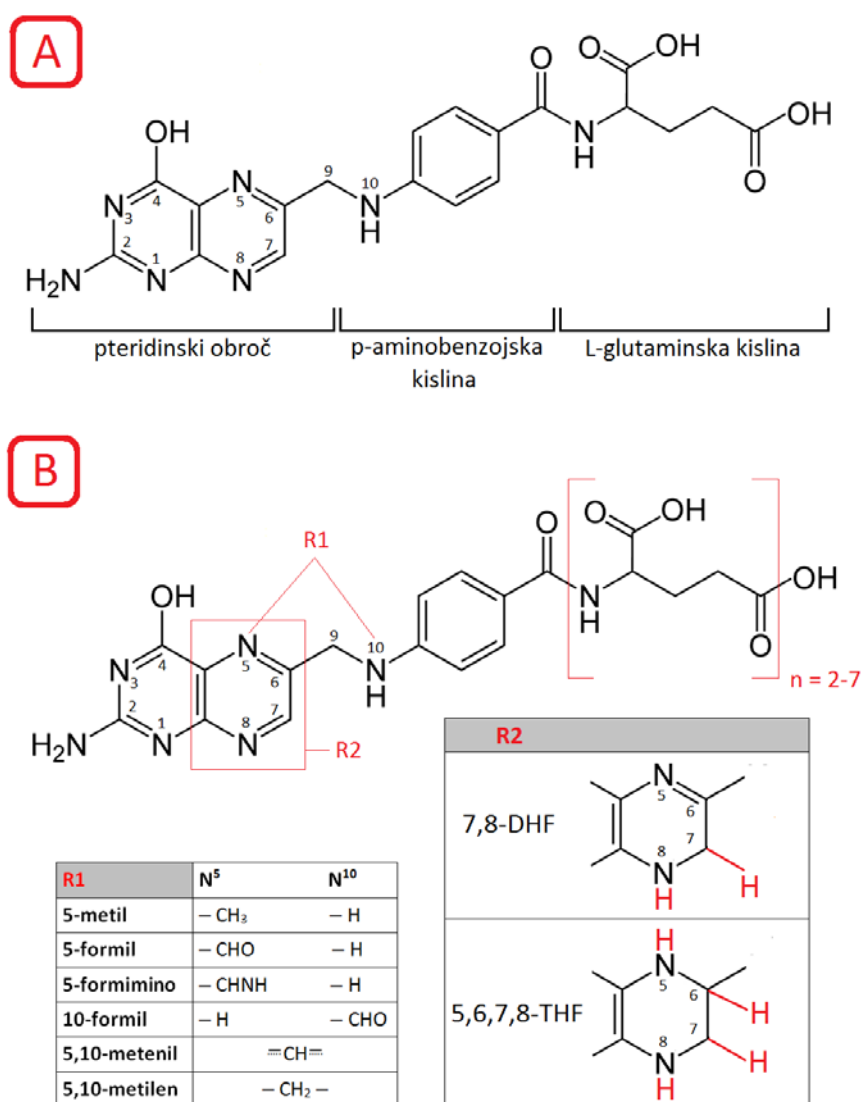
Genetsko ozadje sindromskih OFC je dokaj dobro poznano, medtem ko pri nesindromskih OFC temu ni tako (10). 20 % posameznikov z nesindromskimi OFC ima prisotno pozitivno družinsko anamnezo, kar kaže na etiološko vpletenost genetskih dejavnikov (33). To potrjujejo tudi študije dvojčkov, saj se konkordanca (ujemanje) pri enojajčnih dvojčkih giblje med 50 % in 60 %, medtem ko pri dvojajčnih znaša okrog 5 %. Odsotnost 100 % ujemanja hkrati nakazuje, da genska predispozicija ni edina, ki prispeva k razvoju OFC (8).

V zadnjih 20 letih je bilo identificiranih kar nekaj kromosomskih regij in njim pripadajočih genov, ki naj bi bili vpleteni v etiologijo nesindromskih OFC (8). Meta analiza 13 študij je pokazala, da se s CL/P povezani lokusi nahajajo na kar 16 kromosomih (34). Prvi gen, ki so ga povezali s pojavnostjo CL/P, je gen za transformirajoči rastni faktor alfa (*TGF α*). Poleg *TGF α* se v literaturi najpogosteje omenjenjajo še kromosomske regije/geni: 14q24 (*TGF β 3*), 4p16 (*MSX1*), 11q23 (*PVRL1*), 17q21 (*RAR α*), 1p36 (*MTHFR*) (8, 33–35). V primerjavi s CL/P je genetsko ozadje CPO precej manj raziskano. Izsledki opravljenih študij sicer kažejo na etiološko vpletenost kromosomske regije 2q32 in gena *TBX22* na kromosomu X (33). Od odkritja, da je nezadostno uživanje folatov v nosečnosti vzročno povezano s pojavnostjo različnih prirojenih okvar, se je dobršen del študij usmeril v raziskovanje vpliva polimorfizmov v genih, katerih produkti sodelujejo pri transportu in presnovi folatov. Med njimi je do sedaj najbolj preučevan gen za metilentetrahidrofolat reduktazo (*MTHFR*) in njemu pripadajoča polimorfizma 677C>T in 1298A>C (36).

1.3 FOLATI IN FOLNA KISLINA

1.3.1 Kemijska struktura in viri

Folat je vodotopen vitamin B9, v osnovi zgrajen iz aromatskega pteridinskega obroča, p-aminobenzojske kisline in molekul glutaminske kisline (Slika 2). Sesalci, za razliko od bakterij in višjih rastlin, folata niso sposobni sintetizirati sami, saj pteridinskega obroča ne morejo konjugirati z ostalimi enotami (37). Človek mora tako telesu folate zagotoviti s hrano.



Slika 2: Struktura folne kisline (A) in v naravi prisotnih folatov (B). DHF = dihidrofolat, THF = tetrahydrofolat.

Glavni naravni vir folatov v hrani so predvsem špinača in ostala zelena listnata zelenjava, stročnice in nekatere vrste sadja. Priporočen dnevni vnos za odrasle je 200–400 μg , za noseče ženske pa 400–600 μg . V naravi prisotni folati se nahajajo v obliki poliglutamata z 2 do 7 vezanimi molekulami glutaminske kisline. Poleg števila molekul glutaminske kisline se med seboj razlikujejo tudi v stopnji reduciranosti in vezanih substituentih na pteridinskem obroču (Slika 2). V hrani naravno prisotni obliki folata sta predvsem 5-metiltetrahidrofolat in 10-formiltetrahidrofolat (38). Izraz folna kislina se v splošnem nanaša na bolj stabilno sintetično obliko vitamina, ki je prisotna v prehranskih dopolnilih in obogatenih živilih (npr. dodana žitaricam). Gre za oksidirano obliko folata, ki ima vezano le eno molekulo glutaminske kisline (17).

1.3.2 Biokemična vloga

Folati v različnih celičnih biokemičnih reakcijah služijo kot donorji ali akceptorji funkcionalnih skupin z enim ogljikovim atomom. Za normalno rast in razvoj celic so nujno potrebni, saj imajo ključno vlogo pri sintezi deoksiribonukleinske kisline (DNA) in metilaciji bioloških molekul. Poleg tega so vpleteni tudi v metabolizem aminokislin, kot so serin, glicin in histidin (39–40).

Folati sodelujejo tako pri *de novo* sintezi deoksitimidin monofosfata (dTMP) kot tudi purinov. V procesu ***de novo* sinteze dTMP** kot vir metilne skupine služi 5,10-metilentetrahidrofolat, ki lahko deluje tudi kot donor metilne skupine v procesu **sinteze serina** iz glicina. 10-formiltetrahidrofolat in 5,10-metentetrahidrofolat sodelujeta v procesu ***de novo* sinteze purinov**, pri čemer prvi prispeva ogljikov atom C2, drugi pa atom C8 purinskega obroča. Izjemno pomembna oblika tetrahidrofolata je prav tako 5-metiltetrahidrofolat, ki prispeva metilno skupino za **remetilacijo homocisteina v metionin**. Regeneracija metionina je potrebna za normalen potek metilacijskih reakcij, saj metionin deluje kot substrat za sintezo S-adenozilmetionina, ki pa je glavni donor metilne skupine za metilacijo različnih bioloških molekul, kot so: DNA, ribonukleinska kislina (RNA), neurotransmiterji, lipidi in proteini (37, 39–40).

1.3.3 Absorpcija in privzem v celice

V hrani prisotni folati se primarno nahajajo v poliglutamati obliki in zato ne morejo prehajati celične membrane. V tankem črevesju encim glutamat karboksipeptidaza II katalizira hidrolizo poliglutamatov v monoglutamate, ki se absorbirajo preko črevesne sluznice v kri, od koder prehajajo v celice na dva načina: s folatnimi receptorji ali folatnim prenašalnim proteinom SLC19A1. Folatni receptorji so membranski proteini, ki prenašajo folate v celico z receptorsko posredovano endocitozo in imajo visoko afiniteto predvsem za transport folne kisline. Prenašalni protein SLC19A1, ki deluje kot anionski antiporter, ima za razliko od folatnih receptorjev, večjo afiniteto za transport reduciranih oblik folatov (prisotni v hrani) kot pa folne kisline (39).

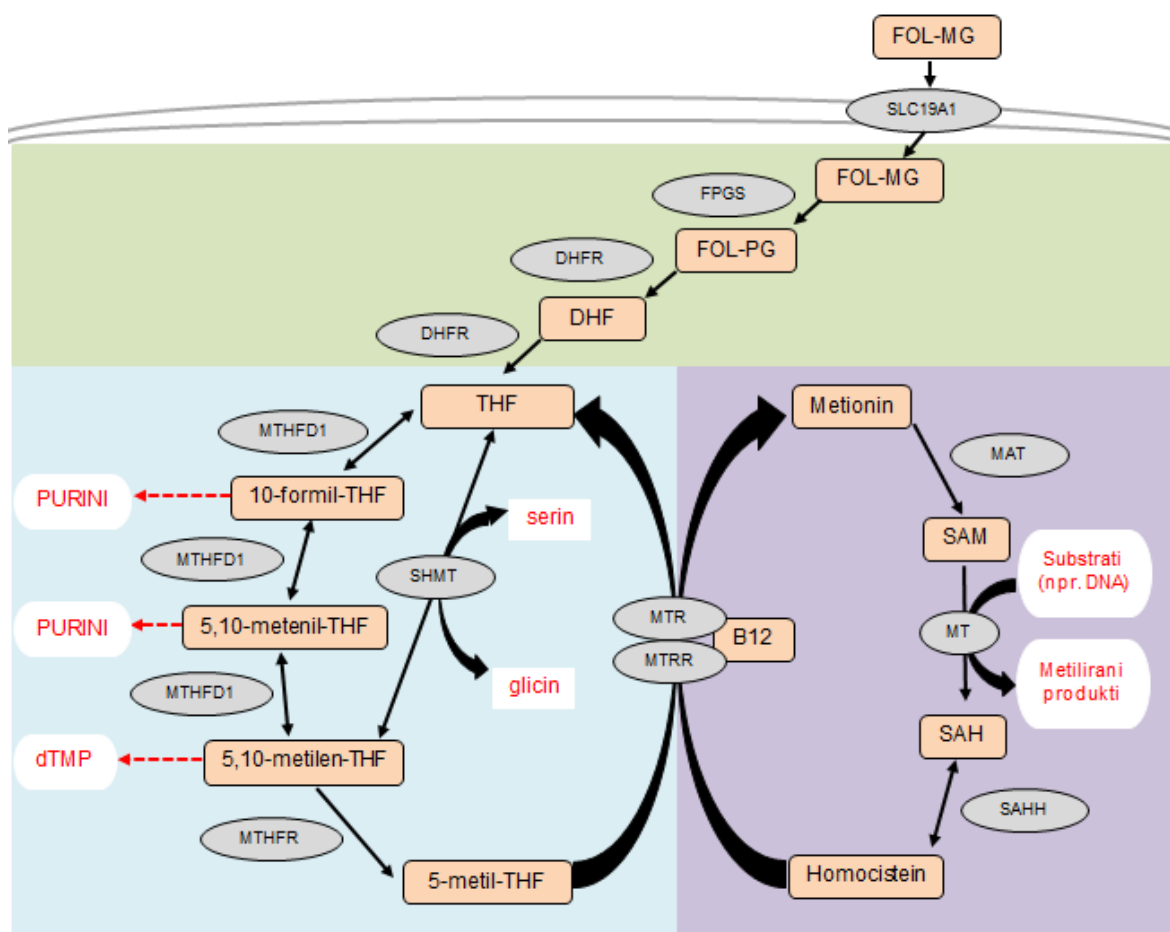
1.3.3.1 Prenašalni protein SLC19A1

Prenašalni protein SLC19A1 (oziroma RFC1) je izražen na vseh sesalskih celicah in je znan kot poglavitni prenašalec folatov iz sistemske cirkulacije v celice in tkiva. Sestavljen je iz 591 aminokislin, ki so urejene v 12 transmembranskih domen, pri tem pa se N- in C-terminalni del nahajata v citoplazmi. N-glikoliziran je na mestu Asn58 v zunajcelični zanki, ki povezuje prvo in drugo transmembransko domeno. Najbolj se izraža v jetrih in placenti, pa tudi ledvicah, pljučih, možganih in črevesju (41).

Prenašalec SLC19A1 deluje kot anionski antiporter, ki izkorišča gradient organskih fosfatov za prenos molekul folata v celico. Vezava organskih fosfatov na SLC19A1 in njihov prenos v smeri koncentracijskega gradienta, torej iz celice, omogoča prenos folatov v nasprotni smeri koncentracijskega gradienta, to je v celico. Čeravno sam transport ne potrebuje energije oziroma ni neposredno povezan s hidrolizo adenozin trifosfata (ATP), pa se energija porablja v procesu znotrajcelične sinteze organskih fosfatov, ki omogoča vzdrževanje gradienta. Humani SLC19A1 se nahaja v obliki homo-oligomera, pri čemer vsak monomer deluje kot neodvisna prenašalna enota. Transportna aktivnost proteina je pogojena, med drugim tudi s temperaturo in pH. Optimalen pH za delovanje SLC19A1 je 7,4. Padeč pH pod 7 pomeni drastično znižanje transportne aktivnosti. Prenašalec SLC19A1 je, kot že rečeno, izražen na enterocitih, vendar kljub temu nima poglavitne vloge pri transportu folatov preko sluznice tankega črevesja, saj je pH v tem delu prebavnega trakta še pretežno kisel. Ta del transporta je vezan predvsem na prenašalni protein SLC46A1 (41–42).

1.3.4 Metabolizem znotraj celic

Folati oziroma folna kislina so po vstopu v celico podvrženi reakcijam poliglutamacije in redukcije, ki jih katalizirata encim folilpoliglumat sintetaza (FPGS) in dihidrofolat reduktaza (DHFR). Poliglutamirani in reducirani metaboliti nato vstopajo v takoimenovani cikel presnove folatov, ki je sklopljen z metabolizmom vitamina B12 in remetilacijskim ciklom (Slika 3) (39).



Slika 3: Prikaz vstopa folatov v celico, poliglutamacije ter redukcije folatov (zelena podlaga), cikla presnove folatov (modra podlaga) in remetilacijskega cikla (vijolična podlaga). FOL-MG: folat monoglumat; FOL-PG: folat poliglumat; SLC19A1: folatni prenašalec; FPGS: folilpoliglumat sintetaza; DHFR: dihidrofolat reduktaza; DHF: dihidrofolat; THF: tetrahydrofolat; MTHFD1: metilentetrahydrofolat dehidrogenaza 1 /meteniltetrahydrofolat ciklohidrolaza/formiltetrahydrofolat sintetaza; MTHFR: 5,10-metilentetrahydrofolat reduktaza; MTRR: metionin sintaze reduktaza; B12: kobalamin; MTR: metionin sintaza; SAM: S-adenozilmetionin; SAH: S-adenozilhomocistein; MAT: metionin adenziltransferaza; MT: metiltransferaza; SAHH: S-adenozilhomocistein hidrolaza; dTMP: deoksitimidin monofosfat; SHMT: serin hidrosimetiltransferaza.

1.3.4.1 Poliglutamacija s FPGS

Folati so v krvi prisotni izključno v monoglutamadni obliki in v takšni obliki tudi vstopajo v celice. Znotraj celic pa se nahajajo pretežno v obliki poliglutamata. Poliglutamacijo katalizira encim FPGS, produkt gena *FPGS* (39). Gre za od ATP odvisno reakcijo, pri kateri FPGS na folat doda 2 do 7 molekul glutaminske kisline. Ločimo dve obliki encima: citosolno in mitohondrijsko, ki se od prve razlikuje po tem, da ima na aminoterminalnem delu dodatnih 42 aminokislinskih ostankov. Kristalna struktura humane FPGS še ni dokončno razrešena. 3D-struktura encima se zgolj predvideva in je bila modelirana na podlagi homologije z *L. Casei* in z uporabo posebnih algoritmov (43).

Poliglutamacija je celični mehanizem, ki omogoča zadrževanje folatov znotraj celic, saj v takšni obliki ne morejo prehajati iz celic. Poleg tega so poliglutamirani folati v primerjavi z monoglutamiranimi boljši substrati, ker imajo večjo afiniteto do encimov v nadaljnji presnovni poti folatov. FPGS katalizira tudi poliglutamacijo strukturnih analogov folne kisline, kot sta antifolatni učinkovini metotreksat in pemetreksed, ter jih na ta način pretvarja v aktivno obliko (43).

1.3.4.2 Redukcija z DHFR

DHFR, produkt gena *DHFR*, je relativno majhen monomerni protein, sestavljen iz 186 aminokislinskih ostankov in molekulske teže okrog 22 kDa. Glavno polipeptidno ogrodje proteina sestavlja 8 beta nagubanih ploskev in 4 alfa vijačnice. Je eden ključnih encimov v presnovi folatov, saj katalizira redukcijo dihidrofolata (DHF) v biološko aktivno obliko, to je tetrahidrofolat (THF). Poleg DHF in njegovih poliglutamiranih derivatov DHFR katalizira tudi dvostopenjsko redukcijo oksidirane folne kisline do THF. V reakciji kot kofaktor sodeluje nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), ki se ob redukciji DHF oksidira do NADP^+ . Okrnjena aktivnost encima vodi v zmanjšanje zaloge THF v celici, posledica česar je motena sinteza purinov, dTMP in motena metilacija bioloških molekul. DHFR je zaradi pomembne vloge, ki jo opravlja, tudi tarča za delovanje različnih učinkovin. Protitumorna učinkovina metotreksat inhibira delovanje DHFR, kar vodi v inhibicijo sinteze DNA in posledično celično smrt. Dedno pomanjkanje encima zaradi mutacije c.458A>T se kaže v obliki megaloblastne anemije in hudih nevroloških motenj (44–46).

1.3.4.3 Cikel presnove folatov

Folati v obliki THF vstopajo v cikel presnove folatov, znotraj katerega se z različnimi encimi pretvarjajo v oblike, ki jih celica lahko uporabi na različne načine, opisane v podpoglavju 1.3.2. Ključni encimi v presnovi folatov so: 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR), metionin sintaza (MTR), metionin sintaze reduktaza (MTRR) in metilentetrahidrofolat dehidrogenaza 1 (MTHFD1) (Slika 3) (39).

1.4 FOLATI IN OFC

Abnormalen folatni status do sedanjih raziskave povezujejo z različnimi vrstami rakavih obolenj, s kardiovaskularnimi obolenji, z nevrodegenerativnimi in psihiatričnimi boleznimi, z Downovim sindromom, z napakami nevralne cevi (ang. *neural tube defects*, NTD), s prirojenimi srčnimi okvarami (ang. *congenital heart disease*, CHD) in tudi z OFC (39).

1.4.1 Vpletenost folatov v etiologijo OFC

Folati so nujno potrebni za sintezo DNA in igrajo ključno vlogo pri rasti in razvoju celic. Tako nezadosten vnos folatov kot tudi motnja v katerikoli stopnji presnove ali transporta potencialno lahko povzročijo pomanjkanje omenjenega vitamina v organizmu, kar je še posebej kritično v obdobju intenzivnega embrionalnega razvoja. Nezadostno uživanje folatov pred in med nosečnostjo je vzročno povezano z večjo pojavnostjo različnih prirojenih razvojnih napak, še posebej NTD. Tako nevralna cev kot kraniofacialna regija izvirata iz celic nevralnega grebena, kar je vodilo v hipotezo, da pomanjkanje folne kisline lahko prispeva tudi k razvoju OFC (47).

Little je s sodelavci leta 2008 poročal, da imajo matere z višjimi vrednostmi folatov v serumu in eritrocitih značilno manjše tveganje za rojstvo otroka s CL/P (48), čeprav nekatere študije tovrstne povezave niso potrdile (49–50). Eden bolj uporabnih metabolnih markerjev okrnjenega folatnega statusa je hiperhomocisteinemija, saj pomanjkanje folatov v organizmu povzroči zvišanje ravni homocisteina v krvi. V nizozemski raziskavi so ugotovili, da imajo matere, ki so rodile otroka z OFC, statistično značilno višje vrednosti homocisteina v plazmi v primerjavi z materami otrok brez prirojenih okvar (51). Da je višji

nivo homocisteina v materini krvi povezan z višjim tveganjem za OFC ploda, je potrdila tudi ena od raziskav Veliki Britaniji 8 let kasneje (52). Novejše študije domnevajo, da imajo visoke koncentracije homocisteina neposreden teratogen učinek, saj motijo gibljivost in s tem migracijo celic nevralnega grebena, ki imajo ključno vlogo v embrionalnem razvoju kraniofacialne regije (25, 47, 53). Vpletenost folatov v etiologijo OFC nedvoumno potrjuje tudi dejstvo, da je uživanje antagonistov folne kisline (npr. nekateri antiepileptiki) povezano z večjo pogostostjo OFC (54).

1.4.1.1 Živila, obogatena s folno kislino

Leta 1998 so v ZDA pod okriljem Ameriškega vladnega urada za prehrano in zdravila prvi sprejeli zakonsko podlago o obveznem dodajanju folne kisline žitaricam in nekaterim drugim osnovnim živilom. Kasneje so ZDA sledile še Kanada, Avstralija in večina južnoameriških držav, medtem ko Evropa temu ukrepu ni sledila. Dodajanje folne kisline živilom je v populaciji žensk v rodni dobi povzročilo znatno zvišanje koncentracije serumskih folatov. Številne študije so preučevale vpliv tega ukrepa na pojavnost NTD. Večina izmed njih je dokazala 10–80 % upad pojavnosti NTD (17). Za razliko od NTD pri OFC populacijske študije niso potrdile tako izrazitega upada pojavnosti (55). Yazdy s sodelavci poroča o statistično značilnem 6 % upadu pojavnosti OFC (56), nekatere druge študije o statistično neznačilnem 5 % (57) in 14 % (58) upadu, medtem ko spet druge razlik niso zaznale (59). Izsledki meta analize tovrstnih študij, izvedenih v ZDA in Kanadi, sicer kažejo na 7 % in 8 % upad pojavnosti CPO oziroma CL/P (60).

1.4.1.2 Genski polimorfizmi encimov v presnovni poti folatov

Ugotovitev, da je pojavnost OFC povezana z uživanjem folatov, je vodila v razvoj domneve, da lahko tudi genski polimorfizmi encimov v presnovni poti folatov vplivajo na folatni status in s tem na pojavnost OFC. V povezavi z OFC je daleč najbolj raziskan gen v presnovi folatov *MTHFR* in njemu pripadajoča polimorfizma 677C>T in 1298A>C (36). Rezultati novejše meta analize kažejo na pozitivno korelacijo med materinim genotipom 677TT in večjo pojavnostjo OFC (61). Ugotovitve raziskav o vpletenosti ostalih »folatnih« genov (*MTHFD1*, *MTRR*, *MTR*, *SLC19A1*) v etiologijo OFC so precej neskladni, medtem ko so nekateri geni (*DHFR*, *FPGS*) tudi razmeroma neraziskani, kar kaže na potrebo po nadaljnjih študijah na tem področju (36).

1.5 POLIMORFIZMI V GENU *SLC19A1*

Gen za folatni prenašalec *SLC19A1* se nahaja na kromosomu 21 in je pri ljudeh zelo polimorfen. Kot najbolj pomembni in pogosto preučevani polimorfizmi se v povezavi z genom *SLC19A1* omenjajo predvsem: rs1051266, rs1131596, rs12659, rs1051296 in rs1051298 (62).

1.5.1 Polimorfizem rs1051266G>A

Polimorfizem rs1051266G>A (*SLC19A1* 80G>A) je najbolj obširno preučevana različica gena *SLC19A1*, ki na mestu 80 v kodirajoči regiji, natančneje eksonu 2, povzroči zamenjavo gvanina z adeninom. Posledica tega je zamenjava arginina s histidinom v kodonu 27 transmembranske domene 1 (62). Baslund je s sodelavci preučeval vpliv polimorfizma na privzem metotreksata v limfocite B in CD4+ limfocite T. Ugotovili so, da v primerjavi z nosilci genotipov GA in AA, celice pri nosilcih genotipa GG privzamejo značilno manj metotreksata, čeprav se ekspresija *SLC19A1* med različnimi genotipi ni značilno razlikovala (63).

Stanisławska-Sachadyn in sodelavci ugotavljajo, da imajo ženske z genotipom AA ali GA v primerjavi z ženskami z genotipom GG prisotne višje koncentracije folatov v eritrocitih (64), čeprav nekatere druge študije tega niso potrdile (65). Izsledki raziskav o vplivu polimorfizma rs1051266G>A na plazemske koncentracije folatov so si nasprotujoči. Švedski raziskovalci poročajo, da imajo homozigoti za alel A v primerjavi s homozigoti za alel G prisotne značilno nižje plazemske koncentracije folatov (66), medtem ko druge raziskave vpliva rs1051266G>A na plazemsko koncentracijo folatov niso odkrile (64, 67). Chango s sodelavci dokazuje obstoj interakcije polimorfizma rs1051266G>A v *SLC19A1* z 677C>T v *MTHFR*. V primerjavi z nosilci genotipa *MTHFR*(677CT)/*SLC19A1*(80GG) so pri nosilcih genotipa *MTHFR*(677CT)/*SLC19A1*(80AA) izmerili znatno višje plazemske koncentracije folatov. To v nasprotju s prej navedenim kaže na povezavo alela A (rs1051266G>A) z višjimi plazemskimi koncentracijami folatov (65). Omenjeno interakcijo med polimorfizmoma so v dveh študijah opazili tudi pri merjenju serumskih vrednosti homocisteina. Značilno višje serumske koncentracije homocisteina so bile prisotne pri nosilcih genotipa *MTHFR*(677TT)/*SLC19A1*(80GG) (65, 67).

Obstajajo tudi dokazi o povezavi polimorfizma rs1051266G>A s pojavnostjo prirojenih okvar, vendar je tovrstnih študij malo. De Marco s sodelavci ugotavlja, da je pri otrocih z genotipom GG ali GA prisotno značilno višje tveganje za pojav NTD in da imajo matere, ki so homozigotne za alel G, prisotno znatno večje tveganje za rojstvo otroka z omenjeno anomalijo (68). Zdi se, da obstaja interakcija med materinim jemanjem folatnih pripravkov in otrokovim genotipom za polimorfizem rs1051266G>A. V kalifornijski študiji so v skupini mater, ki niso jemale folatnih pripravkov, opazili, da imajo otroci z genotipom GG večje tveganje za CHD v primerjavi z otroki z genotipom AA. V skupini mater, ki so jemale folatne pripravke, je bilo pri otrocih z genotipom GG povečano tveganje za CHD prisotno, vendar je bilo manjše kot v skupini mater, ki niso jemale folatnih pripravkov (69).

1.6 POLIMORFIZMI V GENU *FPGS*

Gen za *FPGS* se nahaja na kromosomu 9. Dolg je približno 11,4 kb in sestavljen iz 15 eksonov in 14 intronov. Do sedaj je bilo v genu odkritih preko 40 polimorfizmov. Za nekatere eksonske različice je dokazano, da vplivajo na kinetiko encima ali njegovo ekspresijo (43). V literaturi se v povezavi z genom *FPGS* najpogosteje omenjajo polimorfizmi rs10106A>G, rs10760502A>G in rs1544105C>T. Polimorfizem rs10106A>G se nahaja v 3' neprevedeni regiji gena, natančneje eksonu 15. Vpliva omenjenega polimorfizma na plazemsko koncentracijo folatov in homocisteina niso dokazali (70). Prav tako niso potrdili njegove povezave s pojavnostjo spine bifide (71).

1.6.1 Polimorfizem rs1544105C>T

Polimorfizem rs1544105C>T se nahaja v promotorju gena *FPGS*. Liu in sodelavci so dokazali, da je pri nosilcih genotipa CC količina *FPGS* mRNA prepisov 1,5-krat večja od tiste pri nosilcih genotipov CT in TT, kar kaže na povezavo alela T z zmanjšano ekspresijo *FPGS* (72). Alel C je pri bolnikih z revmatoidnim artritisom povezan s slabšim odzivom na zdravljenje z metotreksatom (73). Pri bolnikih z akutno limfoblastno levkemijo, ki se zdravijo z metotreksatom, je genotip CC povezan s slabšim preživetjem brez ponovitve bolezni (72). Vpliva rs1544105C>T na pojavnost prirojenih napak dosedanje študije niso preučevale.

1.7 POLIMORFIZMI V GENU *DHFR*

Gen za *DHFR* se nahaja na kromosomu 5 in je dolg približno 30 kb. Sestavljen je iz šestih eksonov, ki so med seboj ločeni s petimi introni (74). V genu je bilo odkritih precej polimorfizmov, vendar večina izmed njih ni bila nadalje analizirana, zato njihov morebitni vpliv na delovanje encima ali njegovo izražanje ni znan. Do sedaj še ni bil odkrit polimorfizem v kodirajoči regiji encima, kar priča o njegovi kritični in hkrati pomembni vlogi (45).

Najbolj preučevan polimorfizem v genu *DHFR* je insercija/delecija 19 baznih parov (*DHFR* 19-bp ins/del, rs70991108) v intronu 1 (75). Ta polimorfizem naj bi vplival na ekspresijo proteina. Xu in sodelavci poročajo, da je pri nosilcih alela 19-bp del prisotna tudi do 5-krat večja količina *DHFR* mRNA prepisov, ki pozitivno korelira s številom prisotnih alelov 19-bp del (76). Gellekink in sodelavci so dokazali, da imajo nosilci genotipa 19bp-del/del v primerjavi s homozigoti za divji tip alela značilno nižje plazemske koncentracije homocisteina (77). Na drugi strani Stanisławska-Sachadyn s sodelavci ugotavlja, da imajo ženske z genotipom 19bp-del/del v primerjavi z nosilkami genotipov 19bp-ins/del in 19bp-ins/ins značilno višje koncentracije folatov v serumu in eritrocitih (78). Izsledki študij vpliva polimorfizma *DHFR* 19-bp ins/del na pojavnost NTD so si nasprotujoči. Johnson s sodelavci v manjši študiji ugotavlja, da je materin genotip *DHFR* 19-bp del/del povezan z značilno višjim tveganjem za rojstvo otroka s spino bifido (79). Parle-Mcdermott v nasprotju s Johnsonom poroča o značilno nižjem tveganju za pojav NTD ploda pri materah, ki so nosilke alela *DHFR* 19-bp del. Ta protektivni učinek alela *DHFR* 19-bp del so Parle-Mcdermott in sodelavci, v skladu s prej omenjeno raziskavo, pripisali večji ekspresiji gena in tudi sami dokazali, da je alel 19-bp del, sicer statistično neznačilno, povezan z večjo količino mRNA prepisov (80). Van der Linden s sodelavci povezave med genotipom 19-bp del/del, tveganjem za spino bifido ter količino *DHFR* mRNA prepisov ni našel (81).

1.7.1 Polimorfizem rs1677693C>A

Polimorfizem rs1677693C>A se nahaja v intronu 3 gena *DHFR*. Njegov vpliv na ekspresijo ali aktivnost encima je do sedaj neraziskan (75). V novejši italijanski študiji so na meji statistične značilnosti opazili, da je alel A povezan z zmanjšanim tveganjem za

razvoj CL/P. Kot so poročali, naj bi imel alel A protektivno vlogo, asociacijska analiza haplotipov pa je potrdila, da je povezava še močnejša v primeru kombinacije alelov rs1677693 A in rs1650723 G (82). V ameriški študiji povezave med polimorfizmom rs1677693C>A in pojavnostjo NTD niso uspeli dokazati (83).

2. NAMEN

Folati so nujno potrebni za sintezo DNA in igrajo ključno vlogo pri rasti ter razvoju celic, kar je še posebej pomembno v času intenzivega embrionalnega razvoja. Pomanjkanje folne kisline v zgodnji nosečnosti se lahko pri plodu klinično izrazi v obliki različnih prirojenih okvar, tudi OFC. Nesindromske OFC so pogoste prirojene anomalije, ki poleg estetske malformacije povzročajo tudi funkcionalne motnje, zdravljenje pa je navadno dolgotrajno in zahteva sodelovanje različnih strokovnjakov. Gre za okvare s kompleksno etiologijo, pri čemer naj bi sodelovali tako okoljski kot tudi genetski dejavniki. V nekaterih dosedanjih raziskavah so že dokazali, da polimorfizmi v genih za encime, ki sodelujejo pri presnovi folatov, lahko vplivajo na pojavnost OFC, vendar je število omenjenih študij nizko, njihovi rezultati pa so si včasih nasprotujoči.

Namen našega dela bo:

1. Ugotoviti vpliv posameznih polimorfizmov in kombinacij polimorfizmov v genih, katerih produkti sodelujejo pri privzemu (*SLC19A1* rs1051266G>A), poliglutamaciji (*FPGS* rs1544105C>T) in redukciji (*DHFR* rs1677693C>A) folne kisline, na pojavnost OFC v slovenski populaciji ob upoštevanju vpliva izbranih demografskih in okoljskih dejavnikov tveganja za OFC (starost, izobrazba, kajenje, telesna teža ob zanositvi, prednosečniški diabetes, gestacijski diabetes, druga kronična obolenja, povišana telesna temperatura, obisk savne, uživanje antiepileptikov, uživanje drugih zdravil, jemanje pripravkov s folno kislino in drugih prehranskih dopolnil, vnos folatov in metionina s hrano).
2. Ugotoviti vpliv posameznih polimorfizmov in kombinacij polimorfizmov *SLC19A1* rs1051266G>A, *FPGS* rs1544105C>T in *DHFR* rs1677693C>A na pojavnost OFC v populaciji otrok in njihovih mater, ki v času nosečnosti niso uživale pripravkov s folno kislino.

S tem namenom bomo izolirali DNA in za izbrane polimorfizme določili genotipe mater in otrok tako v kontrolni skupini kot tudi v preiskovani skupini mater in otrok z OFC. Z uporabo ustreznih statističnih pristopov bomo analizirali podatke, pridobljene z genotipizacijo in anketnim vprašalnikom, ki ga bodo izpolnile matere.

3. PREISKOVANCI IN METODE

3.1 PREISKOVANCI

V študijo smo vključili 179 parov mater in otrok z OFC. Pridobivanje vzorcev preiskovane skupine (PS) je potekalo v okviru ambulantnih pregledov na Kliničnem oddeleku za maksilofacialno in oralno kirurgijo v UKC Ljubljana. Kontrolno skupino (KS) je predstavljala skupina 200 parov mater in otrok brez klinično potrjene prirojene okvare. Pridobivanje vzorcev KS je potekalo na oddelkih B, C in D Porodnišnice Ljubljana. Biološki vzorec izbora za genetske analize je bil pri materah in otrocih bris bukalne sluznice, ob tem pa so matere izpolnile še anketni vprašalnik (Priloga 1). Raziskava je bila odobrena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. 57/02/13).

3.2 IZOLACIJA DNA

Za izolacijo DNA iz brisov bukalne sluznice smo v naši študiji uporabili dva reagenčna kompleta različnih proizvajalcev, ki sta se razlikovala v načinu izolacije DNA.

3.2.1 Materiali in oprema

Uporabili smo:

- komplet reagentov »QIAamp DNA Mini Kit« (QIAGEN),
- komplet reagentov »MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit« (Epicentre, an Illumina company),
- PBS pufer (1X),
- 96–100 % etanol,
- 96–100 % izopropanol,
- 70 % etanol,
- sterilne 1,5 in 2 mL epruvete,
- pipete in ustrezne nastavke,
- vibracijski mešalnik (Bio Vortex V1, Biosan),
- centrifugo (Centrifuge 5430 R, Eppendorf),
- minicentrifugo (Mini Centrifuge MCF-2360, LMS),

- vodno kopel (WB-4MS, Biosan).

3.2.2 Izolacija DNA s »QIAamp DNA Mini Kit« (QIAGEN)

Z reagenčnim kompletom QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) smo izolirali DNA otrok in mater iz PS. Osamitev DNA z navedenim kompletom reagentov temelji na uporabi kolon z membrano iz silikagela. Izolacijo DNA smo izvedli po natančnih navodilih, podanih s strani proizvajalca reagenčnega kompleta (84).

3.2.3 Izolacija DNA z »MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit« (Epicentre, an Illumina company)

Z reagenčnim kompletom MasterPure™ smo izolirali DNA otrok in mater iz KS. Osamitev DNA z navedenim reagenčnim kompletom temelji na metodi izolacije z izsoljevanjem, ki jo je leta 1988 opisal Miller (85). Izolacijo smo izvedli po navodilih proizvajalca (86), pri tem pa izpustili korak, ki narekuje uporabo encima RNaze. RNA je namreč v primerjavi z DNA zelo nestabilna ter podvržena razgradnji z endogenimi in eksogenimi RNazami, ki so prisotne praktično povsod. Do razgradnje RNA tako pride tudi v primeru, da omenjeni korak v postopku izolacije DNA izpustimo. To smo potrdili tudi na ta način, da smo pri nekaj vzorcih izolacijo DNA izvedli z uporabo in brez uporabe RNaze, pri tem pa nismo opazili bistvenih razlik v izmerjeni koncentraciji izoliranih nukleinskih kislin.

3.3 MERJENJE KONCENTRACIJE IZOLIRANE DNA

Koncentracijo izolirane DNA v vzorcih smo določili s spektrofotometrom NanoDrop® ND-100, ki ima območje merjenja med 220 in 750 nm (87). 1 µL vzorca smo odpipetirali na spodnje optično merilno mesto, pod katerim se nahaja CCD detektor. Nato smo zgornjo optično ročico, ki zagotavlja vir svetlobe, položili na spodnjo optično enoto. Ob stiku obeh optičnih enot z vzorcem je aparat iz vzorca oblikoval 1 mm stolpec, skozi katerega je potovala svetloba, CCD detektor pa je posnel intenziteto prepuščene svetlobe pri 260 nm. Najprej smo opravili meritev slepega, nato preiskovanega vzorca. Na podlagi dobljenih koncentracij smo vzorce redčili do končne koncentracije 4 ng/µL.

3.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

Pri večini metod genotipizacije je potrebno odsek DNA, ki ga analiziramo, predhodno pomnožiti, kar lahko storimo z verižno reakcijo s polimerazo (ang. *polymerase chain reaction*, PCR). PCR je metoda *in vitro* sinteze nukleinskih kislin, s katero lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij določenega odseka DNA. PCR v realnem času je nadgradnja klasičnega PCR. Sinonim zanj je kinetični PCR, saj omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo (88).

3.4.1 Materiali in oprema

Uporabili smo:

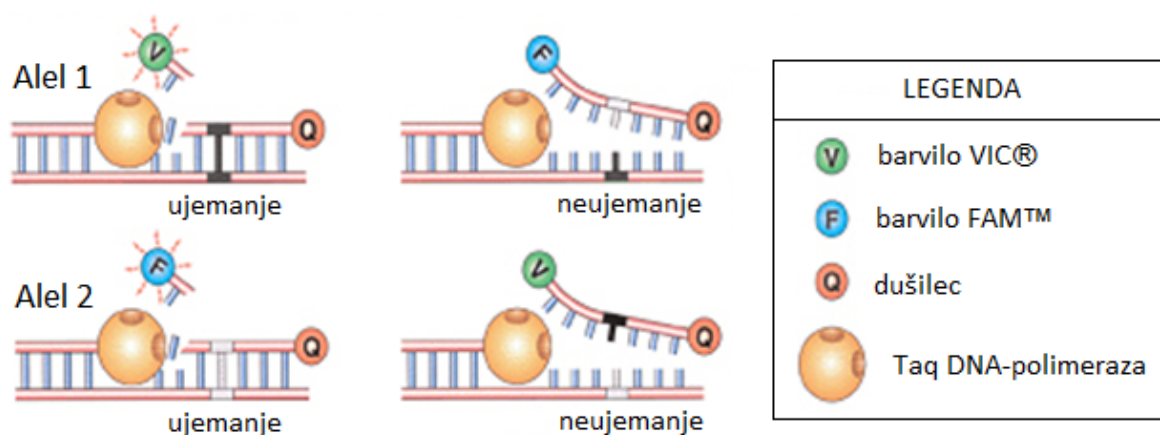
- TaqMan® SNP Genotyping Assay: C_8342611_10 (Applied BioSystems);
- TaqMan® SNP Genotyping Assay: C_3103231_10 (Applied BioSystems);
- TaqMan® Universal Master Mix II with UNG (2X) (Applied BioSystems);
- LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (10X) (Roche);
- LightSNiP rs1051266 Genotyping Assay (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);
- pipete in ustrezne nastavke.

3.4.2 Genotipizacija *FPGS* rs1544105 in *DHFR* rs1677693 s TaqMan® hidrolizirajočimi sondami

Princip

Pri genotipizaciji s hidrolizirajočimi sondami izkoriščamo 5'-3' eksonukleazno aktivnost nekaterih DNA polimeraz, najpogosteje Taq DNA-polimeraze. V PCR-reakcijsko

mešanico poleg vseh potrebnih komponent vključimo še dve fluorescentno označeni sondi, pri čemer se ena popolnoma prilega na mutirano zaporedje, druga pa na nemutirano zaporedje. Obe sondi imata na 3' koncu vezan dušilec, na 5' koncu pa reportersko barvilo, ki se med sondama razlikuje. Ena sonda ima, na primer, na 5' koncu vezano barvilo VIC® in se popolnoma prilega na normalno zaporedje, druga sonda pa ima vezano reportersko barvilo FAM™ in se popolnoma prilega na mutirano zaporedje. Zaradi prisotnosti dušilca intaktni sondi ne fluorescirata. Tekom PCR 5' eksonukleazna aktivnost Taq DNA-polimeraze v fazi podaljševanja povzroči hidrolizo samo popolnoma prilegajoče sonde. Razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem se zaradi hidrolize sonde poveča in tako je onemogočeno prestrežanje fluorescence barvila VIC® oziroma FAM™ z dušilcem. Fluorescenca reporterskega barvila posledično poraste. Če poraste samo fluorescenca enega barvila, je preiskovanec homozigot bodisi za normalno ali mutirano zaporedje, če pa porasteta obe fluorescenci, je preiskovanec heterozigot (Slika 4) (88).



Slika 4 (prirejeno po 89): Princip genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami TaqMan®.

Postopek

V delovni komori smo za vsakega izmed dveh polimorfizmov v dveh ločenih 0,5 mL epruvtkah pripravili reakcijsko zmes brez vzorčne DNA. Reakcijski zmesi v obeh epruvtah sta se razlikovali le v uporabljenih parih sond in oligonukleotidnih začetnikih. Pri vsakem polimorfizmu je bila ena sonda na 5' koncu označena z reporterskim barvilom VIC®, druga pa z barvilom FAM™ (Preglednica I).

Preglednica I: Uporabljena testna kompleta TaqMan®.

Gen	Polimorfizem	Testni komplet	VIC®	FAM™
<i>FPGS</i>	rs1544105	C__8342611_10	C – nemutirano zaporedje	T – mutirano zaporedje
<i>DHFR</i>	rs1677693	C__3103231_10	C – nemutirano zaporedje	A – mutirano zaporedje

Glede na število vzorcev, ki smo jih genotipizirali, smo količino posameznih sestavin reakcijske zmesi pomnožili s številom vzorcev in prišteli še 10 % pribitek zaradi izgub pri pipetiranju. Pripravljeno reakcijsko zmes smo premešali na vrtnčastem mešalu in kratko centrifugirali. Po 3,5 μL reakcijske zmesi smo napipetirali v mikroepruvetke na ploščici za genotipizacijo. Nato smo dodali še 1,5 μL vzorčne DNA s koncentracijo 4 ng/ μL . Sestava PCR-reakcijske zmesi enega vzorca je navedena v Preglednici II.

Preglednica II: Sestava PCR-reakcijske zmesi enega vzorca.

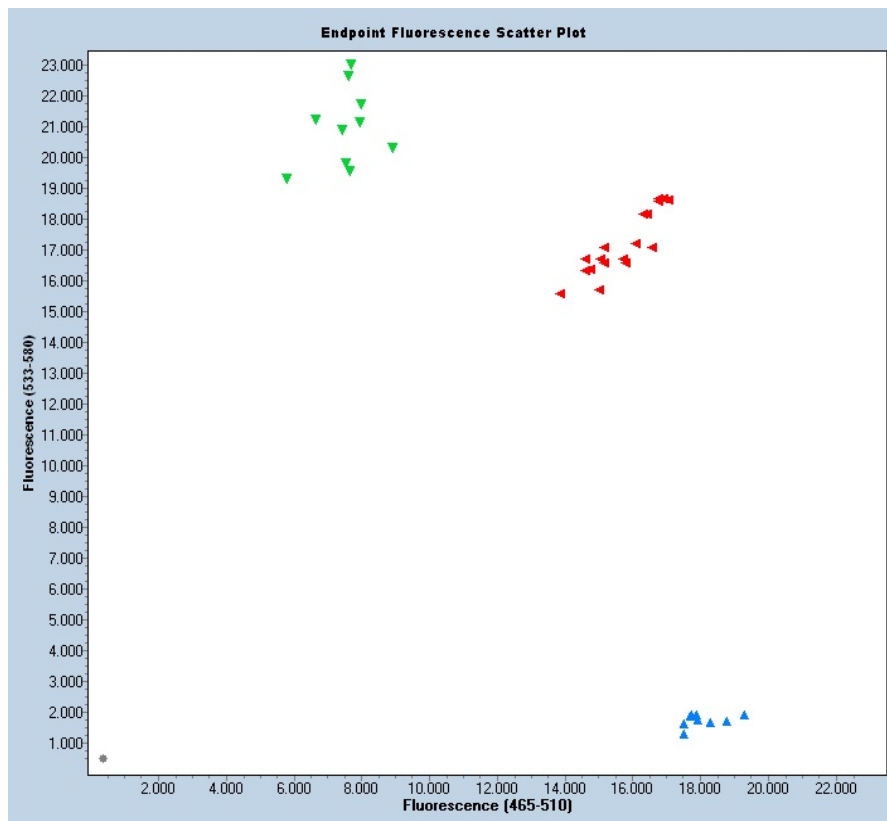
Sestavina	Volumen (μL)
TaqMan® Universal Master Mix II with UNG (2X)	2,5
Mešanica ustreznih sond in oligonukleotidnih začetnikov TaqMan® (40X)	0,125
Ultra čista voda	0,875
Vzorčna DNA (4 ng/ μL)	1,5
Skupni volumen reakcijske zmesi enega vzorca	5

Ploščico smo na koncu prekrili s folijo, jo centrifugirali 2 min pri 2000 obratih/min in nato vstavili v aparat LightCycler® 480 System (Roche), ki je izvedel PCR v realnem času po vnaprej določenem programu, navedenem v Preglednici III.

Preglednica III: Program izvedbe PCR s TaqMan® sondami.

Stopnja	Temperatura	Čas
UNG inkubacija	50 °C	2 min
Aktivacija polimeraze	95 °C	10 min
PCR (50 ciklov)	Denaturacija	95 °C
	Prileganje/podaljševanje	60 °C

Po končani verižni reakciji s polimerazo aparat na podlagi izmerjene fluorescence v končni točki poda točkasti graf alelna diskriminacije. Na grafu se med seboj ločijo tri skupine, ki predstavljajo tri različne genotipe, pri čemer vsaka točka predstavlja en vzorec (Slika 5).



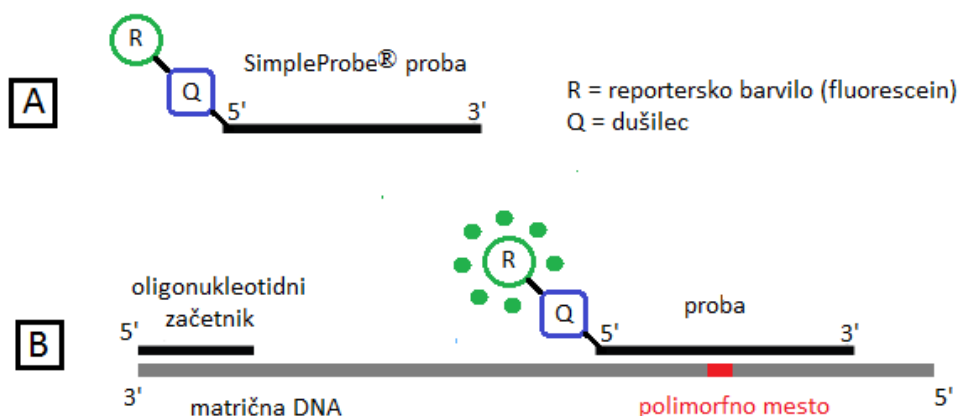
Slika 5: Graf alelna diskriminacije za polimorfizem *FPGS* rs1544105. X-os predstavlja fluorescenco barvila FAM™, y-os pa barvila VIC®. Z modro barvo so prikazani homozigoti za mutirano zaporedje (TT), z zeleno homozigoti za nemutirano zaporedje (CC), z rdečo pa heterozigoti (CT).

3.4.3 Genotipizacija *SLC19A1* rs1051266 z analizo talilne krivulje DNA pri visoki ločljivosti ob uporabi SimpleProbe® tehnologije

Analiza talilne krivulje DNA pri visoki ločljivosti (ang. *High-resolution melting analysis*, HRM analiza) je post-PCR tehnika, ki se široko uporablja za genotipizacijo enonukleotidnih polimorfizmov. V ta namen se uporabljajo različne vrste specifičnih oligonukleotidnih prob, med njimi tudi SimpleProbe® tehnologija. Genotipizacija s HRM analizo in SimpleProbe® probo temelji na razliki v temperaturni stabilnosti med duplexi s popolnim in nepopolnim prileganjem probe in tarčne enoverižne DNA (90–91).

Princip HRM analize s SimpleProbe® probo

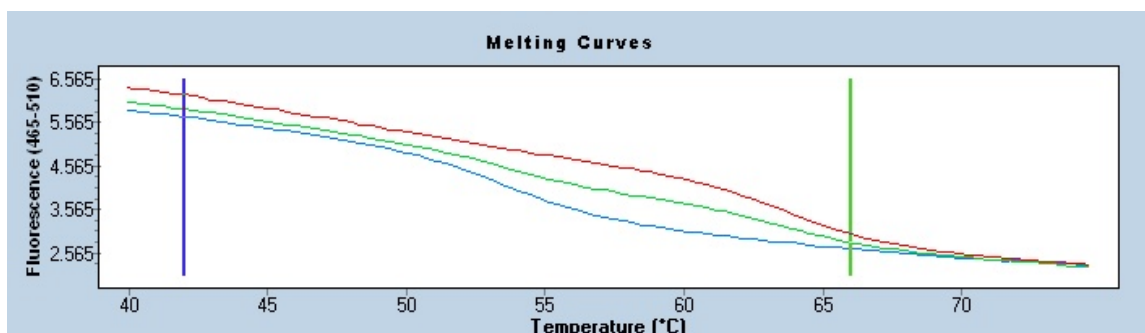
Tarčni odsek DNA, ki vsebuje polimorfno mesto, je potrebno pred HRM analizo pomnožiti s PCR v realnem času. Reakcijska mešanica poleg vseh potrebnih sestavin za PCR vsebuje še SimpleProbe® probo, ki je na 5' ali 3' koncu označena z nefluorescenčnim dušilec in reporterskim fluoroforom, ponavadi fluoresceinom. Kadar je proba v reakcijski mešanici prosta, dušilec v večji meri prestreza fluorescenco ekscitiranega reporterskega barvila. Ko se v fazi prileganja proba veže na tarčni odsek DNA, to povzroči porast fluorescence reporterskega barvila, saj se z vezavo probe zmanjša prestrezanje fluorescence s strani dušilca (Slika 6) (90–91).



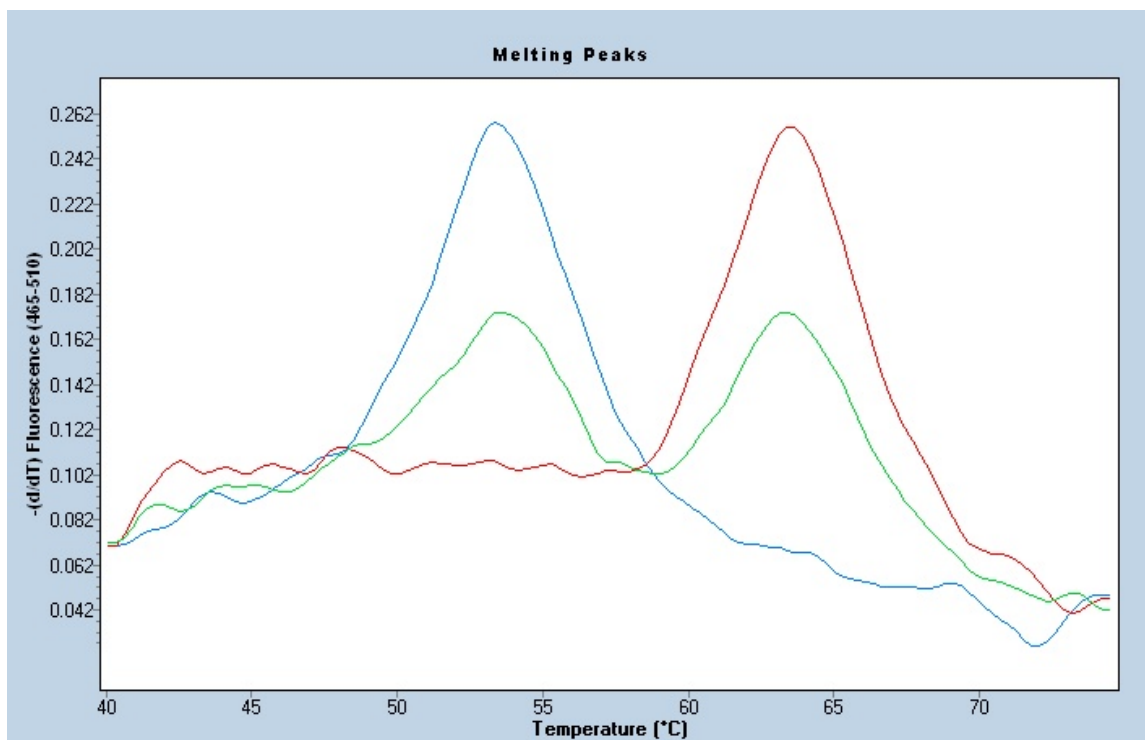
Slika 6: Shematski prikaz delovanja SimpleProbe® probe v primeru, ko je ta v reakcijski mešanici prosta (A) oziroma vezana na tarčno DNA (B).

HRM analiza poteka v treh stopnjah, pri čemer v prvi stopnji z dvigom temperature na 95 °C povzročimo denaturacijo dvoverižnih ampliconov DNA v enoverižne amplikone DNA. Sledi prileganje probe in v tretjem koraku postopno dvigovanje temperature, v našem primeru iz 40 °C na 75 °C. V stopnji prileganja se tvorijo takoimenovani duplesi med probo in tarčno enoverižno DNA. Postopen dvig temperature povzroči razklenitev probe in tarčne enoverižne DNA, kar povzroči postopen upad fluorescence, ki je razviden iz talilne krivulje (Slika 7). Temperaturi, pri kateri se razkrene polovica duplesov, pravimo temperatura taljenja (ang. *melting temperature*, T_m) in jo lahko odčitamo iz grafa, ki prikazuje negativni odvod fluorescence. Talilna krivulja v tem primeru dobi obliko talilnega vrha (Slika 8). SimpleProbe® proba je oblikovana tako, da se popolnoma prilega bodisi mutiranemu bodisi nemutiranemu zaporedju, zaradi česar so talilne krivulje oziroma vrhovi pri različnih genotipih različni (Sliki 7 in 8). Pri enem tipu homozigota je namreč v

dupleksu prisotno popolno ujemanje probe in tarčne enoverižne DNA, pri drugem tipu homozigota pa ne. Dupleks z nepopolnim ujemanjem so temperaturno manj stabilni, posledica česar je nižja T_m v primerjavi z dupleks, pri katerih je prisotno popolno ujemanje. Pri heterozigotu se tvorita oba tipa duplesov, zato lahko na grafu vidimo dva talilna vrhova, ki predstavljata dve T_m (90–91).



Slika 7: Različne talilne krivulje pri različnih genotipih za *SLC19A1* rs1051266. Modra krivulja prikazuje homozigota za nemutirano zaporedje (GG), rdeča homozigota za mutirano zaporedje (AA), zelena pa heterozigota (GA).



Slika 8: Različni talilni vrhovi pri različnih genotipih za *SLC19A1* rs1051266. Moder talilni vrh ima T_m pri 53,92 °C in prikazuje homozigota GG; rdeči talilni vrh ima T_m pri 63,92°C in prikazuje homozigota AA; zelena talilna vrhova prikazujeta heterozigota GA.

Postopek

V delovni komori smo v 1,5 mL epruvetki pripravili reakcijsko zmes brez vzorčne DNA. Najprej smo po navodilih proizvajalca pripravili mešanico LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (10X). To smo storili tako, da smo v vialo, ki je vsebovala DNA polimerazo, prenesli vsebino vial z reakcijskim pufrom, 10 mM MgCl₂ in deoksinukleozidtrifosfati. Tako pripravljene mešanice smo nato dodali še oligonukleotidna začetnika in probo (LightSNiP rs1051266 Genotyping Assay) ter ultra čisto vodo in MgCl₂ (25 mM). Glede na število vzorcev, ki smo jih genotipizirali, smo količino posameznih sestavin reakcijske zmesi pomnožili s številom vzorcev in prišteli še 10 % pribitek zaradi izgub pri pipetiranju. Pripravljeno reakcijsko zmes smo premešali in kratko centrifugirali. Po 7,5 µL reakcijske zmesi brez vzorčne DNA smo napipetirali v mikroepuvetke na ploščici za genotipizacijo. Nato smo dodali še 2,5 µL vzorčne DNA s koncentracijo 4 ng/µL. Sestava reakcijske zmesi enega vzorca je navedena v Preglednici IV.

Preglednica IV: Sestava reakcijske zmesi enega vzorca za PCR in HRM analizo.

Sestavina	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 na koncu prekrili s folijo, jo centrifugirali 2 min 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 (Preglednica V). Po končani analizi aparat rezultate poda v obliki talilnih krivulj in vrhov (Sliki 7 in 8).

Preglednica V: Program izvedbe PCR in HRM analize.

Stopnja		Temperatura	Čas
Preinkubacija		95 °C	10 min
PCR (45 ciklov)	Denaturacija	95 °C	10 s
	Prileganje začetnikov	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

3.5 STATISTIČNA ANALIZA

Za statistično analizo podatkov, ki smo jih pridobili z anketnim vprašalnikom in genotipizacijo, smo uporabili program SPSS, verzija 22 (SPSS Inc., Chicago, ZDA).

3.5.1 Anketni vprašalnik

Za lažjo obdelavo podatkov, pridobljenih z anketnim vprašalnikom, smo preučevane spremenljivke najprej razdelili na numerične in kategorične. Z uporabo deskriptivne statistike smo izračunali srednje vrednosti numeričnih spremenljivk in nato s Shapiro-Wilkovim testom preverili normalnost porazdelitve spremenljivk. Ugotavljanje normalnosti porazdelitve je pomembno zaradi nadaljne izbire statističnih testov. Za normalno porazdeljene numerične spremenljivke smo uporabili parametrični neodvisni t-test, za tiste z nenormalno porazdelitvijo pa neparametrični Mann-Whitney U-test. Kategoričnim spremenljivkam smo z uporabo deskriptivne statistike v prvi stopnji določili frekvence izidov v posamezni kategoriji, nato pa za statistično analizo vsake spremenljivke uporabili Fisherjev natančni test. Spremenljivke (tako kategorične kot tudi numerične), ki so ob uporabi osnovnih statističnih testov pokazale statistično značilne razlike ($p < 0,05$) med KS in PS, smo želeli vključiti v logistični regresijski model, ki omogoča opredelitev takoimenovanega »čistega« vpliva posameznih neodvisnih spremenljivk na odvisno spremenljivko, ki je bila v našem primeru prisotnost oziroma odsotnost OFC pri otroku. Pred vključitvijo spremenljivk v model logistične regresije smo s Spearmanovim

koeficientom korelacije preverili, kakšna je korelacija med vsemi možnimi pari preučevanih neodvisnih spremenljivk. Predpogoj za oblikovanje dobrega regresijskega modela je namreč odsotnost signifikantne korelacije med neodvisnimi spremenljivkami v modelu. Pri parih spremenljivk s statistično značilnim koeficientom korelacije smo za vključitev v model izbrali eno izmed spremenljivk v paru. V regresijski model smo imeli vključene prave in neprave (ang. *dummy*) spremenljivke. Vrednost pravih (numeričnih) spremenljivk je izražena v absolutnih številkah, medtem ko smo morali nepravim (kategoričnim) spremenljivkam določiti referenčno kategorijo, glede na katero smo nato primerjali vse ostale kategorije določene spremenljivke. Kakovost oblikovanega logističnega regresijskega modela smo ocenili na podlagi treh kazalcev: Omnibus testa, vrednosti Nagelkerke R^2 in Hosmer-Lemeshowega testa. Omnibus test napoveduje, če je model kot celota statistično značilen. Vrednost $p < 0,05$ pomeni, da izbrane spremenljivke kot celota dobro ločujejo med preiskovano in kontrolno skupino. Iz vrednosti Nagelkerke R^2 ugotovimo, kolikšen % variance v odvisni spremenljivki lahko pojasnimo z neodvisnimi spremenljivkami v modelu. Hosmer-Lemeshow test opredeljuje, kako dobro se oblikovani model prilega dejanskim podatkom. Vrednost $p > 0,05$ pomeni, da so razlike med dejanskimi podatki in podatki, ki so generirani z modelom, majhne in statistično neznačilne. To pomeni, da ima model dobro prilagajanje in ga lahko sprejmemo.

3.5.2 Rezultati genotipizacije

Za ugotavljanje odstopanja populacije od Hardy-Weinbergovega ravnotežja (ang. *Hardy-Weinberg equilibrium*, HWE) smo uporabili Fisherjev natančni test. V prvi stopnji nadaljnje analize rezultatov genotipizacije smo želeli ugotoviti, ali je med KS in PS (pri materah oziroma otrocih) prisotna statistično značilna razlika v razporeditvi genotipov za posamezen polimorfizem. V ta namen smo uporabili Fisherjev natančni test. Ta test smo prav tako uporabili pri preučevanju vpliva kombinacij polimorfizmov pri materi in/ali otroku. Vpliv posameznih polimorfizmov in kombinacij smo želeli opredeliti tudi v modelu logistične regresije. S tem namenom smo oblikovali več modelov, tako da smo v model, ki smo ga oblikovali na podlagi anketnega vprašalnika, kot spremenljivko vključili še genotip enega ali več polimorfizmov oziroma kombinacij polimorfizmov pri materi ali otroku.

4. REZULTATI

4.1 ANALIZA CELOTNE POPULACIJE MATER IN OTROK Z IN BREZ OFC

V prvi del analize podatkov, pridobljenih z genotipizacijo in anketnim vprašalnikom, smo vključili vse matere in njihove otroke, brez dodatnega selekcioniranja vzorčne populacije.

4.1.1 Analiza anketnega vprašalnika

Z anketnim vprašalnikom, ki so ga izpolnile matere, smo pridobili podatke o spremenljivkah, za katere smo iz predhodnih študij domnevali, da bi morebiti lahko bile povezane s pojavom OFC. Za lažjo obdelavo podatkov smo spremenljivke razdelili na numerične (Preglednica VI) in kategorične (Preglednica VII).

4.1.1.1 Osnovni statistični pristopi

V nasprotju s pričakovanji je bila povprečna starost mater ob zanositvi statistično značilno višja v KS. Število nosečnosti in živorojenih otrok je bilo značilno višje v PS, medtem ko med obema skupinama nismo opazili statistično značilnih razlik v indeksu telesne mase (ITM) ob zanositvi, količini s hrano zaužite folne kisline na mesec in številu splavov. Količina s hrano zaužitega metionina na mesec je bila pomembno višja v KS glede na PS (Preglednica VI).

Sledila je analiza kategoričnih spremenljivk (Preglednica VII). Materin status kajenja (kadilka, nekadila, bivša kadilka) se je med KS in PS statistično značilno razlikoval. Delež žensk, ki so se opredelile kot kadilke, je v KS znašal 11,5 %, v PS pa kar 30,2 %. Matere so odgovarjale tudi na vprašanje o kajenju v času nosečnosti (DA, NE). Čeprav je bil delež žensk, ki so v nosečnosti kadile, nekoliko večji v PS, pa samo kajenje v nosečnosti, presenetljivo, ni bilo signifikantno povezano s pojavom OFC. Raven materine izobrazbe se je med KS in PS statistično pomembno razlikovala. Frekvence posameznih ravni izobrazbe kažejo na to, da imajo matere v KS višjo raven izobrazbe. Pomembno povezavo z OFC je predstavljala tudi družinska anamneza, saj je bil delež mater s pozitivno družinsko anamnezo prirojenih okvar kar 8-krat večji v PS. Vpliva prednosečniškega diabetesa na

pojav OFC nismo mogli oceniti, saj tako v PS kot KS ni bilo nobene matere, ki bi imela ob zanositvi prisotno sladkorno bolezen. Pri preučevanju gestacijskega diabetesa smo odkrili statistično pomembno povezavo, vendar pri tem v nasprotju s pričakovanji opazili, da je delež mater z gestacijskim diabetesom večji v KS. Statistično značilna razlika med KS in PS je bila opazna tudi za prisotnost kroničnega obolenja pri materi. Delež mater s kroničnimi obolenji je bil 2-krat večji v PS. Zvišanje telesne temperature v prvem trimestru nosečnosti ($> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$) je bilo pomembno povezano s pojavom OFC, saj je tovrstni dogodek doživelo 2-krat več mater v PS kot pa v KS, medtem ko se uporaba savne v prvem trimestru nosečnosti med obema skupinama ni pomembno razlikovala. Ugotovili smo tudi, da se med KS in PS pojavljajo statistično značilne razlike glede uživanja folatnih pripravkov in drugih prehranskih dopolnil v času nosečnosti. V PS je bil delež mater, ki niso uživale folatnih pripravkov, 3-krat večji kot pa v KS. Vpliva antiepileptične terapije in uživanja drugih zdravil na razvoj OFC v naši študiji nismo dokazali. Spol otroka se med obema skupinama prav tako ni statistično značilno razlikoval.

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

Spremenljivka	Srednja vrednost ⁺		p*
	Kontrolna skupina	Preiskovana skupina	
Starost ob zanositvi [leta]	30,80 ± 4,82	28,75 ± 5,16	0,001
Indeks telesne mase ob zanositvi [kg/m²]	22,22 (16,44; 44,75)	22,34 (16,42; 36,96)	0,651
Število nosečnosti	2 (1; 6)	2 (1; 5)	<0,001
Število živorojenih otrok	1 (1; 4)	2 (1; 5)	<0,001
Število splavov	0 (0; 3)	0 (0; 3)	0,427
Metionin [g/mesec]	47 (18; 847)	42 (12; 172)	0,028
Folna kislina [mg/mesec]	22,96 (7,77; 511,39)	20,58 (5,37; 163,75)	0,075

⁺Pri starosti (normalna porazdelitev) smo kot mero srednje vrednosti uporabili povprečno vrednost ± standardna deviacija, za vse ostale spremenljivke (nenormalna porazdelitev) pa mediano z navedeno minimalno in maksimalno vrednostjo.

*Za testiranje vpliva starosti (normalna porazdelitev) smo uporabili parametrični neodvisni t-test, za vse ostale spremenljivke (nenormalna porazdelitev) pa Mann-Whitney U-test.

Preglednica VII: Prikaz števila in frekvenc izidov v posameznih kategorijah preučevanih kategoričnih spremenljivk ter prikaz rezultatov osnovne statistične analize. KS = kontrolna skupina, PS = preiskovana skupina.

Spremenljivka	Izid	KS n (%)	PS n (%)	p*
Kajenje	Nekadilka	113 (56,5)	88 (49,2)	<0,001
	Kadilka	32 (11,5)	54 (30,2)	
	Bivša kadila	64 (32,0)	37 (20,7)	
Kajenje v nosečnosti	NE	177 (88,9)	150 (84,7)	0,283
	DA	22 (11,1)	27 (15,3)	
Izobrazba	Osnovna šola	3 (1,5)	15 (8,4)	<0,001
	Srednja poklicna šola	63 (31,5)	86 (48,0)	
	Gimnazija	12 (6,0)	6 (3,4)	
	Višja šola	24 (12,0)	6 (3,4)	
	Univerzitetna izobrazba	83 (41,5)	65 (36,3)	
	Magisterij/doktorat	15 (7,5)	1 (0,6)	
Družinska anamneza	Negativna	192 (96,0)	121 (67,6)	<0,001
	Pozitivna	8 (4,0)	58 (32,4)	
Spol otroka	Moški	113 (56,5)	104 (58,1)	0,756
	Ženski	87 (43,5)	75 (41,9)	
Prednosečniški diabetes	NE	200 (100)	179 (100)	1
	DA	0 (0,0)	0 (0,0)	
Nosečniški diabetes	NE	172 (86,0)	167 (93,3)	0,029
	DA	28 (14,0)	12 (6,7)	
Druga kronična bolezen	NE	185 (92,5)	149 (83,2)	0,007
	DA	15 (7,5)	30 (16,8)	
Antiepileptična terapija v nosečnosti	NE	199 (99,5)	178 (99,4)	1
	DA	1 (0,5)	1 (0,6)	
Druga zdravila med nosečnostjo	NE	107 (53,5)	107 (60,1)	0,213
	DA	93 (46,5)	71 (39,9)	
Vročina > 38 °C v prvem trimestru	NE	187 (93,5)	154 (86)	0,017
	DA	13 (6,5)	25 (14)	
Savna v prvem trimestru	NE	195 (97,5)	175 (97,8)	1
	DA	5 (2,5)	4 (2,2)	

Pripravki s folno kislino	NE	18 (9,3)	54 (30,2)	<0,001
	Pred 3. tednom po zanositvi	114 (58,8)	81 (45,3)	
	Več kot 3 tedne po zanositvi	62 (32,0)	44 (24,6)	
Druga prehranska dopolnila	NE	159 (79,5)	165 (92,2)	<0,001
	Multivitamini	21 (10,5)	2 (1,1)	
	Minerali (Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	12 (6,0)	1 (0,6)	
	Omega 3	6 (3,0)	6 (3,4)	
	Ostalo	2 (1,0)	5 (2,8)	

* Fisherjev natančni test

4.1.1.2 Model logistične regresije

Spremenljivke, ki so ob uporabi osnovnih statističnih testov pokazale statistično značilne razlike ($p < 0,05$) med KS in PS, smo želeli vključiti v model logistične regresije. Še pred tem smo z izračunom Spearmanovega koeficienta korelacije preverili, kakšna je korelacija med vsemi možnimi pari preučevanih neodvisnih spremenljivk. Spearmanov koeficient korelacije je bil statistično značilen za dva para spremenljivk. Izobrazba je močno negativno korelirala s statusom kajenja, družinska anamneza pa pozitivno s prisotnostjo kroničnih obolenj. Za vključitev v regresijski model smo nato iz vsakega para izbrali eno spremenljivko. Odločili smo se za status kajenja in družinsko anamnezo. V končni logistični regresijski model 1 smo tako vključili naslednje spremenljivke: uživanje pripravkov s folno kislino, uživanje drugih prehranskih dopolnil, količina s hrano zaužitega metionina na mesec, status kajenja, nosečniški diabetes, družinska anamneza, vročina v prvem trimestru nosečnosti ($> 38\text{ °C}$) (Preglednica VIII).

Model, ki smo ga oblikovali, je kot celota statistično značilen (Omnibus test, $p < 0,001$) in se dobro prilega podatkom, saj je vrednost Hosmer-Lemeshowega testa visoka ($p = 0,846$). Vrednost Negelkerke R^2 znaša 0,414, kar pomeni, da z modelom lahko pojasnimo 41,4 % tveganja za nastanek OFC. Iz samega modela je razvidno, da imajo matere, ki so v nosečnosti uživale folatne pripravke, približno 4-krat manjše tveganje za rojstvo otroka z OFC v primerjavi s tistimi, ki v nosečnosti niso uživale folatnih pripravkov. Protektivni učinek je bil prisoten tako pri tistih, ki so začele uživati pripravke pred 3. tednom po zanositvi, kakor tudi pri tistih, ki so jih začele uživale več kot tri tedne po zanositvi. V skupini ostalih prehranskih dopolnil, ki so jih matere uživale v času nosečnosti, je bilo

uživanje multivitaminov povezano s kar 11-krat manjšim tveganjem za razvoj OFC pri plodu, medtem ko uživanje mineralov, pripravkov omega 3 maščobnih kislin in ostalih pripravkov ni pomembno vplivalo na pojav OFC. Protektivno vlogo je, poleg uživanja folatnih pripravkov in multivitaminov, predstavljala tudi večja količina s hrano zaužitega metionina. Matere, ki so imele v prvem trimestru nosečnosti epizode povišane telesne temperature nad 38 °C, so imele približno 3-krat večje tveganje za OFC ploda v primerjavi s tistimi, ki v času nosečnosti telesne temperature niso imele višje od 38 °C. Iz modela je prav tako razvidno, da imajo matere, ki so se opredelile kot kadilke, približno 5-krat večje tveganje za OFC ploda (glede na nekadilke). Kot najpomembnejši dejavnik tveganja se je v modelu logistične regresije izkazala pozitivna družinska anamneza prirojenih okvar (OFC, NTD, CHD), ki je pri materi predstavljala kar 16-krat večje tveganje za OFC ploda. Nosečniška sladkorna bolezen se v regresijskem modelu ni izkazala kot pomemben faktor, povezan z razvojem OFC (Preglednica VIII).

Preglednica VIII: Prikaz logističnega regresijskega modela 1.

Model		Razmerje obetov (RO)	95% interval zaupanja za RO	p
¹ Pripravki s folno kislino	Pred 3. tednom po zanositvi	0,247	0,113–0,541	<0,001
	Več kot 3 tedne po zanositvi	0,272	0,115–0,645	0,003
*Metionin [g/mesec]		0,988	0,977–0,999	0,040
² Druga prehranska dopolnila	Multivitamini	0,091	0,016–0,505	0,006
	Minerali	0,143	0,011–1,912	0,142
	Omega 3	2,306	0,587–9,050	0,231
	Ostalo	0,888	0,122–6,449	0,906
³ Kajenje	Kadilka	4,682	2,106–10,410	<0,001
	Bivša kadilka	0,905	0,482–1,699	0,757
⁴ Gestacijski diabetes		0,694	0,260–1,857	0,467
⁵ Vročina v prvem trimestru > 38 °C		3,170	1,133–8,863	0,028
⁶ Pozitivna družinska anamneza		15,627	5,528–44,174	<0,001

Vpliv glede na matere, ki: ¹niso uživale pripravkov s folno kislino; ²niso uživale drugih prehranskih dopolnil; ³so nekadilke; ⁴niso imele gestacijskega diabetesa; ⁵v prvem trimestru niso imele vročine > 38 °C; ⁶imajo negativno družinsko anamnezo.

*Količina zaužitega metionina je v modelu obravnavana numerično.

4.1.2 Analiza rezultatov genotipizacije

4.1.2.1 Hardy-Weinbergovo ravotežje

Z uporabo Fisherjevega natančnega testa smo za vse tri polimorfizme preverili, če opazovane frekvence genotipov odstopajo od frekvenc, ki jih napoveduje HWE. Glede na to da je predpogoj za testiranje HWE naključna izbira posameznikov iz populacije (neodvisnost vzorcev), smo morali v skupini mater in njihovih otrok Fisherjev natančni test narediti ločeno, za matere in otroke posebej. Določali smo torej tri polimorfizme v štirih populacijah (otroci v KS, otroci v PS, matere v KS, matere v PS), zato smo morali narediti 12 testov. Vrednost p je bila pri vseh večja od 0,05, kar pomeni, da lahko sprejmemo ničelno hipotezo, ki predvideva, da je vzorčna populacija v HWE. Iz tega lahko sklepamo, da smo iz populacije izbrali primeren vzorec za genetsko študijo, ki sledi predpostavkam HWE.

4.1.2.2 Osnovni statistični pristopi

V prvi stopnji analize rezultatov genotipizacije smo želeli ugotoviti, ali je med KS in PS (pri materah ali otrocih) prisotna statistično značilna razlika v porazdelitvi genotipov za posamezen polimorfizem. V ta namen smo uporabili Fisherjev natančni test. Neodvisno spremenljivko je v tem primeru predstavljal genotip matere oziroma otroka za določen polimorfizem, odvisno pa prisotnost oziroma odsotnost OFC pri otroku. Pri vseh treh polimorfizmih smo ugotovili, da se razporeditev genotipov med KS in PS, tako pri materah kot tudi otrocih, ne razlikuje statistično značilno (Preglednica IX).

V drugem koraku smo želeli preučiti, ali je med KS in PS prisotna statistično značilna razlika v razporeditvi genotipov za različne kombinacije preučevanih polimorfizmov. Pri tem smo prav tako uporabili Fisherjev natančni test. Preučevane kombinacije so navedene v Preglednici X.

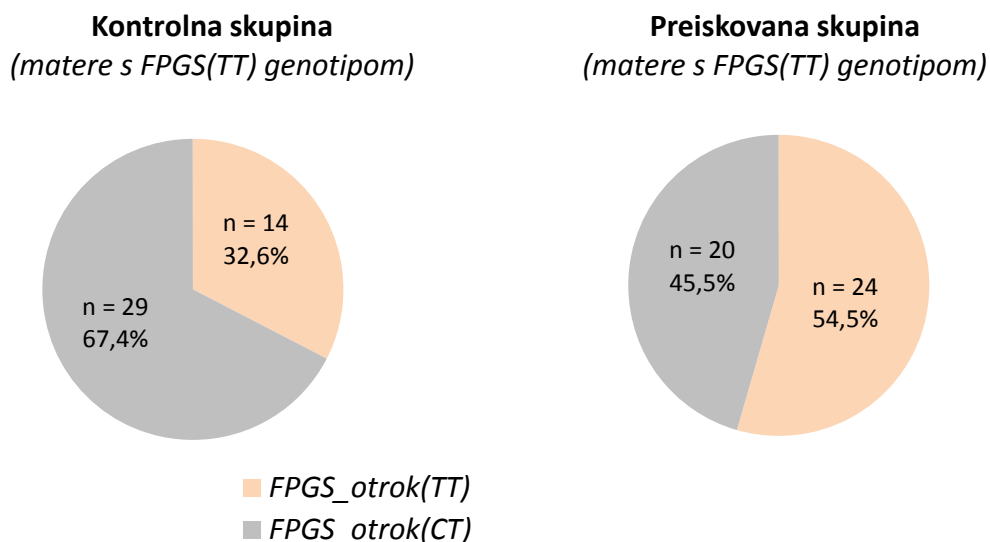
Preglednica IX: Število in frekvence genotipov za preučevane polimorfizme ter rezultati osnovne statistične analize. KS = kontrolna skupina, PS = preiskovana skupina.

Gen	Genotip	MATERE n (%)		OTROCI n (%)	
		KS	PS	KS	PS
SLC19A1 Rs1051266 G>A	GG	70 (35,0)	54 (30,3)	54 (27,0)	54 (30,3)
	AA	43 (21,5)	33 (18,5)	34 (17,0)	34 (19,1)
	GA	87 (43,5)	91 (51,1)	112 (56,0)	90 (50,6)
		p = 0,340		p = 0,590	
FPGS Rs1544105 C>T	CC	71 (35,5)	50 (27,9)	70 (35,0)	62 (34,6)
	TT	43 (21,5)	44 (24,6)	30 (15,0)	33 (18,4)
	CT	86 (43,0)	85 (47,5)	100 (50,0)	84 (46,9)
		p = 0,288		p = 0,657	
DHFR Rs1677693 C>A	CC	110 (55,0)	99 (55,3)	111 (55,5)	88 (49,7)
	AA	13 (6,5)	15 (8,4)	14 (7,0)	15 (8,5)
	CA	77 (38,5)	65 (36,3)	75 (37,5)	74 (41,8)
		p = 0,753		p = 0,515	

Preglednica X: Preučevane kombinacije polimorfizmov pri materi in/ali otroku. Obarvano polje pomeni, da se pri tej kombinaciji razporeditev genotipov med KS in PS (mejno) statistično značilno razlikuje.

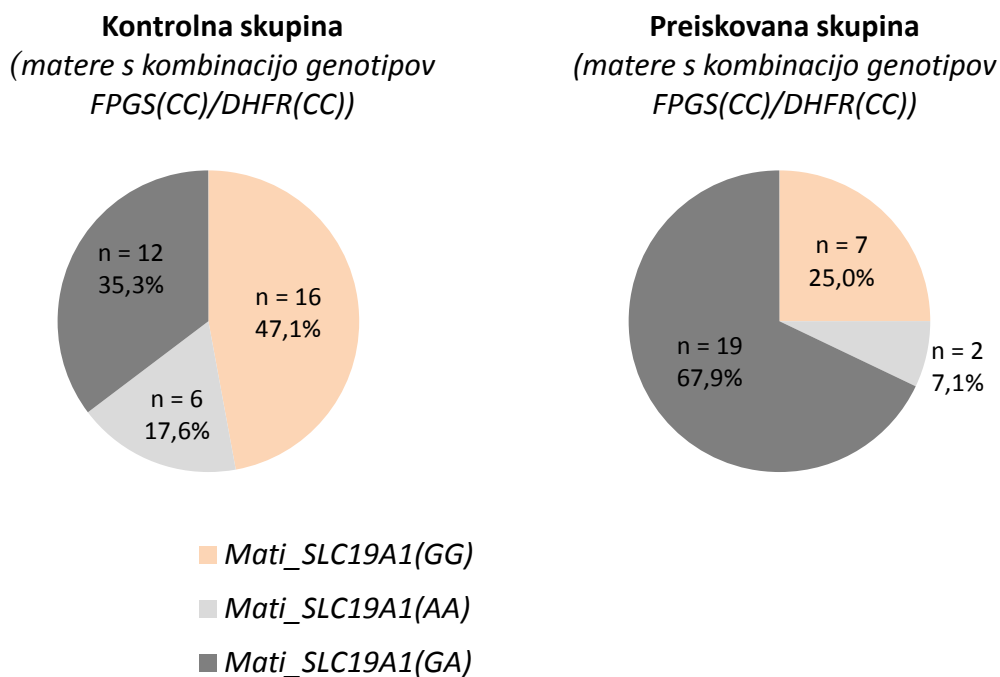
	Rs1051266G>A SLC19A1	Rs1544105C>T FPGS	Rs1677693C>A DHFR
Preučevana kombinacija polimorfizmov	mati, otrok		
		mati, otrok	
			mati, otrok
	otrok	otrok	
	otrok		otrok
		otrok	otrok
	mati	mati	
	mati		mati
		mati	mati
		mati	mati
	otrok	otrok	otrok

Pri statistični analizi hkratne prisotnosti polimorfizma *FPGS* rs1544105C>T pri materi in otroku ugotavljamo, da se razporeditev kombinacij genotipov med KS in PS mejno statistično značilno razlikuje ($p = 0,052$). Delež mater in njihovih otrok s hkratno prisotnostjo genotipa TT je bil 1,7-krat večji v PS v primerjavi s KS, kar bi lahko kazalo na povezavo mutiranega alela T z večjo pojavnostjo OFC (Slika 9).



Slika 9: Tortna diagrama prikazujeta, kako so razporejeni *FPGS* genotipi otrok v kontrolni in preiskovani skupini mater z genotipom *FPGS*(TT).

V statistični analizi kombinacij polimorfizmov smo prav tako opazili, da je med materami v KS in PS prisotna statistično značilna razlika v razporeditvi kombinacij genotipov: *FPGS*(CC)/*DHFR*(CC)/*SLC19A1*(GG), *FPGS*(CC)/*DHFR*(CC)/*SLC19A1*(AA) in *FPGS*(CC)/*DHFR*(CC)/*SLC19A1*(GA) ($p = 0,045$). Delež mater s prisotno kombinacijo genotipov *FPGS*(CC)/*DHFR*(CC)/*SLC19A1*(AA) je bil kar 2,5-krat večji v KS glede na PS, kar bi lahko kazalo na protektivno vlogo alela C pri rs1544105(*FPGS*), alela C pri rs1677693C>A(*DHFR*) in alela A pri rs1051266(*SLC19A1*) (Slika 10).



Slika 10: Tortna diagrama prikazujeta, kako so porazdeljeni genotipi *SLC19A1* v kontrolni in preiskovani skupini mater s kombinacijo genotipov *FPGS(CC)/DHFR(CC)*.

4.1.2.3 Modeli logistične regresije

Vpliv posameznih polimorfizmov in njihovih kombinacij smo želeli opredeliti tudi v modelu logistične regresije. S tem namenom smo oblikovali več modelov, tako da smo v model, ki smo ga oblikovali na podlagi anketnega vprašalnika, kot spremenljivko vključili še genotip enega ali več polimorfizmov oziroma kombinacij polimorfizmov pri materi ali otroku.

V logistični regresijski model 2 (Preglednica XI) smo vključili materin genotip za vse tri preiskovane polimorfizme. Vključitev materinega in otrokovega genotipa za isti gen v en model ni možna, saj sta odvisna drug od drugega. Za *DHFR* rs1677693C>A smo ugotovili, da je materin genotip *DHFR(AA)* v primerjavi z genotipom *DHFR(CC)* na meji statistične značilnosti ($p = 0,053$) povezan s približno 3-krat večjim tveganjem za pojav OFC ploda.

Preglednica XI: Prikaz logističnega regresijskega modela 2.

Model		Razmerje obetov (RO)	95% interval zaupanja za RO	p
¹ Pripravki s folno kislino	Pred 3. tednom po zanositvi	0,243	0,109–0,538	<0,001
	Več kot 3 tedne po zanositvi	0,279	0,116–0,672	0,004
*Metionin [g/mesec]		0,987	0,975–0,999	0,032
² Druga prehranska dopolnila	Multivitamini	0,089	0,016–0,484	0,005
	Minerali	0,103	0,009–1,165	0,066
	Omega 3	2,220	0,544–9,059	0,266
	Ostalo	0,787	0,102–6,079	0,818
³ Kajenje	Kadilka	5,265	2,317–11,964	<0,001
	Bivša kadilka	0,953	0,498–1,826	0,885
⁴ Gestacijski diabetes		0,753	0,276–2,053	0,579
⁵ Vročina v prvem trimestru > 38 °C		3,193	1,128–9,036	0,029
⁶ Pozitivna družinska anamneza		16,785	5,782–48,727	<0,001
⁷ <i>SLC19A1</i> rs1051266G>A materin genotip	AA	1,286	0,570–2,901	0,544
	GA	1,547	0,811–2,951	0,186
⁸ <i>DHFR</i> rs1677693C>A materin genotip	AA	3,174	0,985–10,227	0,053
	CA	0,932	0,520–1,670	0,813
⁹ <i>FPGS</i> rs1544105C>T materin genotip	TT	1,442	0,661–3,148	0,358
	CT	1,127	0,589–2,155	0,718

Vpliv glede na matere, ki: ¹niso uživale pripravkov s folno kislino; ²niso uživale drugih prehranskih dopolnil; ³so nekadilke; ⁴niso imele gestacijskega diabetesa; ⁵v prvem trimestru niso imele vročine > 38 °C; ⁶imajo negativno družinsko anamnezo.

Vpliv glede na matere z genotipom: ⁷GG; ⁸CC; ⁹CC.

V logistični regresijski model 3 (Preglednica XII) smo vključili otrokov genotip za vse tri preiskovane polimorfizme. Pri *DHFR* rs1677693C>A smo ugotovili, da je otrokov genotip *DHFR*(AA) v primerjavi z genotipom *DHFR*(CC) na meji statistične značilnosti (p = 0,051) povezan s približno 3-krat večjim tveganjem za pojav OFC ploda.

Preglednica XII: Prikaz logističnega regresijskega modela 3.

Model		Razmerje obetov (RO)	95% interval zaupanja za RO	p
¹ Pripravki s folno kislino	Pred 3. tednom po zanositvi	0,246	0,109–0,551	0,001
	Več kot 3 tedne po zanositvi	0,241	0,099–0,587	0,002
[*] Metionin [g/mesec]		0,988	0,977–1,000	0,047
² Druga prehranska dopolnila	Multivitamini	0,099	0,018–0,532	0,007
	Minerali	0,118	0,010–1,461	0,096
	Omega 3	2,407	0,595–9,744	0,218
	Ostalo	0,945	0,118–7,559	0,957
³ Kajenje	Kadilka	5,263	2,323–11,924	<0,001
	Bivša kadilka	0,926	0,484–1,773	0,817
⁴ Gestacijski diabetes		0,719	0,256–2,015	0,530
⁵ Vročina v prvem trimestru > 38 °C		2,976	1,034–8,559	0,043
⁶ Pozitivna družinska anamneza		16,165	5,617–46,518	<0,001
⁷ <i>SLC19A1</i> rs1051266G>A otrokov genotip	AA	1,112	0,480–2,573	0,805
	GA	0,186	0,416–1,604	0,556
⁸ <i>DHFR</i> rs1677693C>A otrokov genotip	AA	3,105	0,994–9,694	0,051
	CA	1,494	0,814–2,745	0,195
⁹ <i>FPGS</i> rs1544105C>T otrokov genotip	TT	1,104	0,493–2,474	0,809
	CT	0,950	0,507–1,779	0,872

Vpliv glede na matere, ki: ¹niso uživale pripravkov s folno kislino; ²niso uživale drugih prehranskih dopolnil; ³so nekadilke; ⁴niso imele gestacijskega diabetesa; ⁵v prvem trimestru niso imele vročine > 38 °C; ⁶imajo negativno družinsko anamnezo.

Vpliv glede na otroke z genotipom: ⁷GG; ⁸CC; ⁹CC.

4.2 ANALIZA SELEKCIONIRANE POPULACIJE MATER IN OTROK Z IN BREZ OFC

V drugi del statistične analize smo vključili le otroke in njihove matere (72 parov), ki v času nosečnosti niso uživale pripravkov s folno kislino, saj smo želeli ugotoviti, kakšen je vpliv izbranih polimorfizmov na pojav OFC v primeru, če mati v času nosečnosti ni uživala folatnih pripravkov. Gre namreč za genske polimorfizme encimov (DHFR, FPGS) in prenašalnega proteina (SLC19A1), ki sodelujejo v začetni stopnji presnove folatov, iz česar lahko sklepamo, da na učinkovitost njihovega delovanja pomembno vpliva količina vnešenih folatov. Iz tega prav tako sledi, da bi vpliv genske variante lahko potencialno bolj prišel do izraza v primeru neuživanja folatnih pripravkov. Takšna selekcija je bila tudi posledica ugotovitev nekaterih dosedanjih študij, ki so vpliv polimorfizma *SLC19A1* rs1051266G>A na pojav NTD že dokazale v primeru materinega neuživanja folatnih pripravkov, medtem ko vpliv genske variante ni prišel do izraza pri preučevanju polimorfizma rs1051266G>A neodvisno od vnosa folatnih pripravkov (92).

4.2.1 Analiza rezultatov genotipizacije

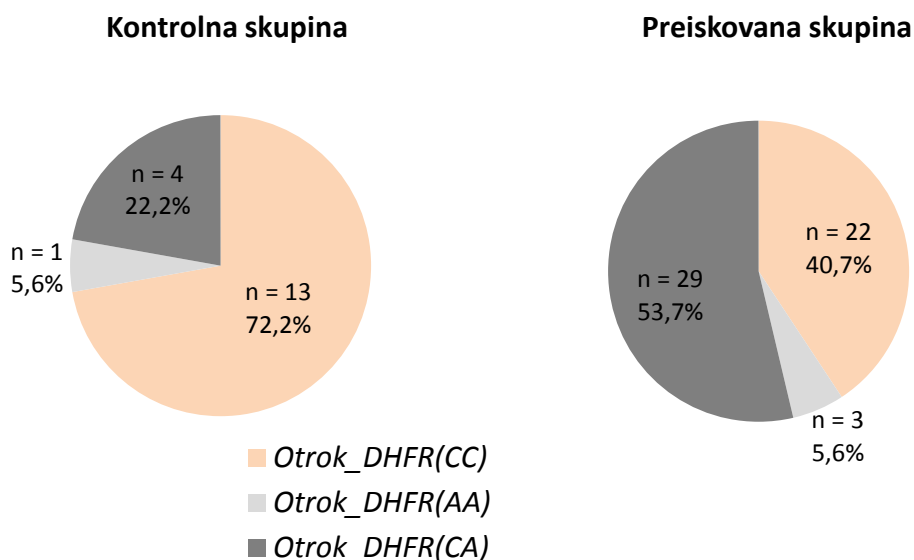
4.2.1.1 Osnovni statistični pristopi

V prvi stopnji analize rezultatov genotipizacije smo, tako kot v celotni populaciji, želeli ugotoviti, ali je med KS in PS (pri materah ali otrocih) prisotna statistično značilna razlika v razporeditvi genotipov za posamezen polimorfizem. V ta namen smo uporabili Fisherjev natančni test (Preglednica XIII).

Rezultati statistične analize v selekcionirani populaciji kažejo na to, da je med otroki iz KS in PS prisotna statistično značilna razlika ($p = 0,042$) v razporeditvi genotipov za polimorfizem *DHFR* rs1677693C>A. Delež otrok z genotipom *DHFR*(CC) je bil kar 1,8-krat večji v KS v primerjavi s PS, kar kaže na protektivno vlogo nemutiranega alela C pri razvoju OFC (Slika 11).

Preglednica XIII: Število in frekvence genotipov za preučevane polimorfizme ter rezultati osnovne statistične analize. Obarvano polje pomeni, da se pri tem polimorfizmu razporeditev genotipov med KS in PS statistično značilno razlikuje. KS = kontrolna skupina, PS = preiskovana skupina.

Gen	Genotip	MATERE n (%)		OTROCI n (%)	
		KS	PS	KS	PS
SLC19A1 Rs1051266 G>A	GG	7 (38,9)	21 (38,9)	6 (33,3)	16 (29,6)
	AA	5 (27,8)	9 (16,7)	7 (38,9)	10 (18,5)
	GA	6 (33,3)	24 (44,4)	5 (27,8)	28 (51,9)
		p = 0,530		p = 0,128	
FPGS Rs1544105 C>T	CC	2 (11,1)	13 (24,1)	3 (16,7)	19 (35,2)
	TT	8 (44,4)	13 (24,1)	2 (11,1)	8 (14,8)
	CT	8 (44,4)	28 (51,9)	13 (72,2)	27 (50,0)
		p = 0,232		p = 0,256	
DHFR Rs1677693 C>A	CC	12 (66,7)	28 (51,9)	13 (72,2)	22 (40,7)
	AA	0 (0,0)	6 (11,1)	1 (5,6)	3 (5,6)
	CA	6 (33,3)	20 (37,0)	4 (22,2)	29 (53,7)
		p = 0,389		p = 0,042	



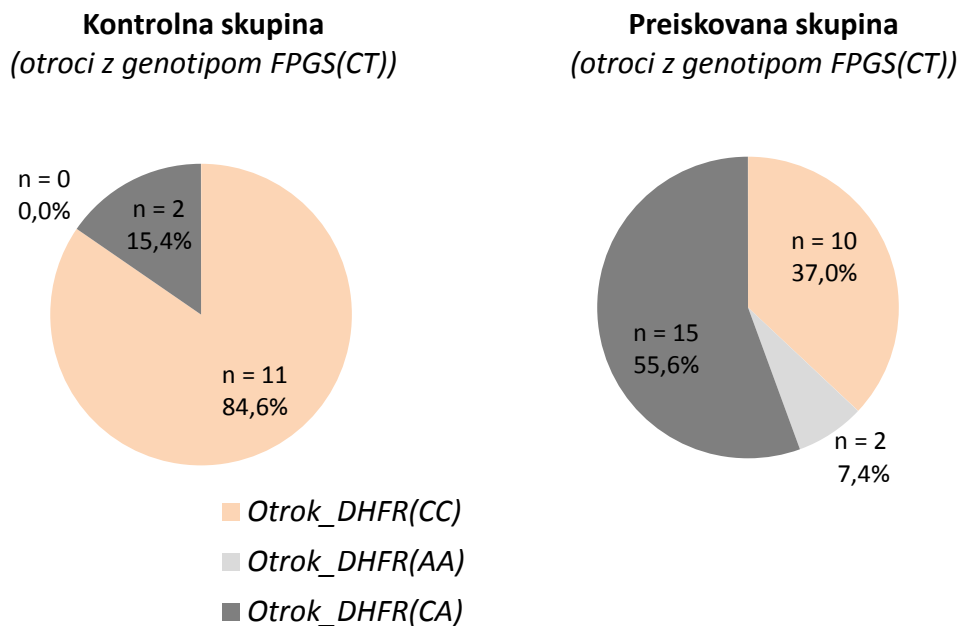
Slika 11: Tortna diagrama prikazujeta deleže genotipov za *DHFR* rs1677693C>A pri otrocih v kontrolni in preiskovani skupini.

V drugem koraku smo želeli preučiti, ali je med KS in PS prisotna statistično značilna razlika v razporeditvi genotipov za različne kombinacije preučevanih polimorfizmov. Pri tem smo prav tako uporabili Fisherejev natančni test. Preučevane kombinacije so navedene v Preglednici XIV.

Preglednica XIV: Preučevane kombinacije polimorfizmov pri materi in/ali otroku. Obarvano polje pomeni, da se pri tej kombinaciji razporeditev genotipov med KS in PS statistično značilno razlikuje.

	Rs1051266G>A SLC19A1	Rs1544105C>T FPGS	Rs1677693C>A DHFR
Preučevana kombinacija polimorfizmov	mati, otrok		
	mati, otrok		
	mati, otrok		
	otrok	otrok	
	otrok		otrok
		otrok	otrok
	mati	mati	
	mati		mati
		mati	mati
	mati	mati	mati
	otrok	otrok	otrok

V selekcionirani populaciji smo pri testiranju kombinacij polimorfizmov opazili, da je med otroki v KS in PS prisotna statistično značilna razlika v porazdelitvi genotipov za kombinacijo polimorfizmov *FPGS* rs1544105C>T in *DHFR* rs1677693C>A ($p = 0,016$). Delež otrok s kombinacijo genotipov *FPGS*(CT)/*DHFR*(CA) oziroma *FPGS*(CT)/*DHFR*(AA) je bil bistveno večji v PS kot pa v KS, kar nakazuje na povezavo alela T (rs1544105C>T v *FPGS*) in alela A (rs1677693C>A v *DHFR*) z večjim tveganjem za razvoj OFC (Slika 12).



Slika 12: Tortna diagrama prikazujeta, kako so razporejeni genotipi *DHFR* v kontrolni in preiskovani skupini otrok z genotipom *FPGS(CT)*.

Vpliv posameznih polimorfizmov in kombinacij polimorfizmov na pojav OFC smo želeli opredeliti tudi v modelu logistične regresije. Zaradi premajhnega števila sodelujočih v selekcionirani populaciji (72 parov) in zaradi prevelikega števila spremenljivk nam ni uspelo oblikovati logističnega regresijskega modela, ki bi dobro opredelil vpliv posameznih polimorfizmov in njihovih kombinacij na pojav OFC.

5. RAZPRAVA

V naši raziskavi smo želeli opredeliti vpliv izbranih genetskih, okoljskih in demografskih dejavnikov na pojavnost OFC v slovenski populaciji. OFC so okvare, ki so za posameznika obremenjujoče zaradi psiholoških, fizičnih in funkcionalnih posledic. Otroci morajo običajno prestati kar nekaj zaporednih operativnih posegov in drugih medicinskih obravnav, ki trajajo tudi do 18. leta ali še dlje, če je to potrebno. Opredelitev dejavnikov, ki lahko prispevajo k razvoju OFC, je zato pomembna tako z vidika posameznika kot tudi z javnozdravstvenega vidika, saj gre za pogoste prirojene okvare, katerih zdravljenje je precej drago.

5.1 Demografski dejavniki

Znano je, da incidenca prirojenih okvar narašča z naraščanjem materine starosti ob zanositvi (93). V naši študiji smo želeli opredeliti, v kakšni meri starost matere ob zanositvi vpliva na pojav OFC. V nasprotju s pričakovanji smo opazili, da je v KS starost mater ob zanositvi statistično značilno višja od starosti mater v PS. Ta nepričakovan rezultat je najverjetneje posledica razlik v načinu zbiranja KS in PS. V KS so bile namreč vključene matere, ki so otroka rodile leta 2014, medtem ko so PS predstavljale matere, ki so otroka z OFC rodile v različnih obdobjih, tudi pred desetimi ali več leti. V današnjem času se ženske kasneje odločajo za naraščaj, kot pa so se v preteklosti, zato je tudi povprečna starost žensk ob zanositvi višja, kot pa je bila pred desetimi in več leti. To je tudi najverjetnejši razlog za višjo povprečno starost pri materah v KS. S tega vidika naša ocena starosti matere ob zanositvi kot dejavnika tveganja za OFC ni bila relevantna in je zato tudi nismo vključili v regresijski model. Rezultati študij, ki so preučevale vpliv starosti matere na pojavnost OFC pri otroku, so sicer neskladni. V kalifornijski študiji so ugotovili, da imajo ženske, ki so stare 39 let ali več, dvakrat večjo verjetnost za rojstvo otroka z OFC v primerjavi s tistimi, ki so stare med 25 in 29 let (13). V večjih študijah pa vpliva starosti matere na pojavnost OFC niso dokazali (14–15).

Med demografske dejavnike tveganja, ki se jih povezuje s pojavnostjo prirojenih okvar, poleg materine starosti sodi tudi SES. Kot indikator SES smo v naši študiji uporabili raven materine izobrazbe, ki se je med KS in PS statistično pomembno razlikovala. Frekvence

posameznih ravni izobrazbe kažejo na to, da imajo matere otrok brez OFC višjo raven izobrazbe. Iz tega bi lahko sklepali, da so višje izobražene matere bolj ozaveščene o dejavnikih, ki lahko prispevajo k razvoju prirojenih okvar, in morda bolj pogosto načrtujejo nosečnost. Vse to bi lahko pripomoglo k manjši pojavnosti OFC v skupini višje izobraženih mater. Tudi Krapels in sodelavci so, tako kot mi, opazili, da imajo matere otrok brez OFC v povprečju višjo raven izobrazbe (94).

5.2 Okoljski dejavniki

Kajenje

V naši študiji ugotavljamo, da imajo kadilke v primerjavi z nekadilkami kar 5-krat večje tveganje za rojstvo otroka z OFC. Povedano drugače, če se prevalenca OFC v populaciji giblje okrog 1/600 živorojenih otrok, potem ta v populaciji kadilk znaša približno 1/150. Boj kot sam materin status kajenja nas je zanimal vpliv kajenja mater v času nosečnosti na pojav OFC. Čeprav je bil delež žensk, ki so v nosečnosti kadile, nekoliko večji v PS kot v KS, pa ta razlika ni bila statistično značilna. Meta analiza kar 24 študij je pokazala konsistentno, statistično pomembno, vendar šibko povezavo med CL/P oziroma CPO in materinim kajenjem. Po izsledkih te meta analize naj bi kajenje med nosečnostjo za 1,3-krat povečalo tveganje za CL/P in za 1,2-krat tveganje za razvoj CPO pri plodu (95). Zaradi premajhnega števila sodelujočih je bila statistična moč v naši študiji najverjetneje prenizka, da bi to šibko povezavo zaznali kot statistično značilno.

Do sedaj je bilo predlaganih precej mehanizmov, preko katerih naj bi kajenje povzročalo OFC. V preteklosti so na živalskih modelih že dokazali, da materina izpostavljenost kadmiju, ki je prisoten v cigaretnem dimu, vodi v razvoj CP. Kot pomemben mehanizem teratogenosti se sicer omenja predvsem hipoksija. Med kajenjem se namreč sproščata ogljikov monoksid in nikotin, ki znižujeta raven kisika v organizmu in na ta način povzročata embrionalno tkivno hipoksijo, za katero so že poročali, da inducira nastanek OFC pri miših. Po drugi strani nikotin in hipoksija povzročita vazokonstrikcijo materinih in plodovih krvnih žil, kar zmanjša oskrbo ploda s potrebnimi hranili za rast in razvoj. Domnevajo, da bi v patogenezi kajenja lahko imeli pomembno vlogo tudi folati. Ugotovili so, da imajo aktivni in močno izpostavljeni pasivni kadilci pomembno znižane vrednosti

serumskih in eritrocitnih koncentracij folatov, ki pa so jih že povezali s pojavnostjo OFC (25, 96).

Prednosečniški in gestacijski diabetes

Sladkorna bolezen v nosečnosti je znan dejavnik tveganja za prirojene nepravilnosti ploda pri človeku in živalih. Pri otrocih mater z diabetesom se prirojene okvare pojavljajo približno trikrat bolj pogosto kot pri otrocih nediabetičnih mater. Ker prevalenca sladkorne bolezni narašča, posledično narašča tudi število žensk v rodni dobi s to boleznijo. To dejstvo vzbuja pomisleke o morebitnem pomembnem doprinosu diabetesa k razvoju okvar, kot so OFC (30, 97). Vpliva prednosečniške sladkorne bolezni (tip 1 in 2) na pojav OFC v naši študiji nismo mogli oceniti, saj tako v PS kot KS ni bilo nobene matere, ki bi imela ob zanositvi prisotno sladkorno bolezen. Za razliko od nas so Correa in sodelavci uspeli dokazati, da prednosečnostna sladkorna bolezen podvoji tveganje za CPO in potroji tveganje za CL/P (30). O povečanem tveganju za OFC ploda poročajo tudi Aberg in sodelavci v študiji na ravni švedske populacije (98) ter Spilson in sodelavci v ameriški raziskavi (99). Čeprav natančen mehanizem teratogenega vpliva diabetesa ni znan, pa je jasno, da ključno vlogo igra hiperglikemija, saj obstaja pozitivna korelacija med materino hiperglikemijo v obdobju organogeneze in pojavom prirojenih okvar ploda (30, 97). Zdi se, da imata v teratogenezi pomembno vlogo hipoksija in oksidativni stres, ki ju izzove hiperglikemija (29).

Bistveno manj je prepričljivih dokazov o teratogenem učinku gestacijskega diabetesa (98). V naši študiji smo pri preučevanju povezanosti gestacijskega diabetesa s pojavom OFC odkrili statistično pomembno povezavo, vendar pri tem v nasprotju s pričakovanji opazili, da je delež mater z nosečniško sladkorno boleznijo signifikantno večji v KS. Ta nepričakovan rezultat je, tako kot pri preučevanju vpliva starosti, najverjetneje posledica razlik v načinu zbiranja KS in PS. Danes so programi za presejalno odkrivanje nosečniške sladkorne bolezni izredno dobro razviti, saj praktično vsaki nosečnici med 24. in 28. tednom nosečnosti opravijo takoimenovani oralni glukozi tolerančni test, namen katerega je odkrivanje gestacijskega diabetesa (100). Ravno to je verjetno prispevalo k večjemu deležu žensk z gestacijskim diabetesom v KS, medtem ko je bilo v PS po vsej verjetnosti tudi kar nekaj mater, ki so imele gestacijski diabetes, vendar neodkrit. S tega vidika naša ocena gestacijskega diabetesa kot dejavnika tveganja za OFC ni bila relevantna. Za razliko

od nas Correa in sodelavci poročajo, da imajo matere z gestacijskim diabetesom 1,5-krat večje tveganje za razvoj OFC ploda (30), medtem ko Miller in sodelavci povezave gestacijskega diabetesa s pojavom OFC niso dokazali (101). Slednji so mnenja, da gestacijski diabetes nima pomembne vloge v etiologiji OFC, saj se navadno razvije v drugi polovici nosečnosti, ko je kritično obdobje za razvoj kraniofacialne regije že mimo (101).

Povišana telesna temperatura med nosečnostjo

Povišana telesna temperatura med nosečnostjo je dokaj pogost dogodek, saj naj bi ji bila vsaj enkrat izpostavljena približno vsaka peta nosečnica. Že v 60. letih prejšnjega stoletja so raziskave na živalih pokazale, da hipertermija v zgodnji fazi razvoja zarodka deluje teratogeno. Izsledki študij na živalih so najbolj konsistentni ravno na področju malformacij kraniofacialne regije in centralnega živčnega sistema (27, 102). Hipertermija v telesu inducira takoimenovani odgovor na vročinski šok, ki okrepi odpornost celic na termični stres s povečano ekspresijo proteinov toplotnega šoka. Odgovor na toplotni šok lahko prevlada nad normalno celično aktivnostjo, kar povzroči inhibicijo sinteze ostalih proteinov in zaviranje celične proliferacije. Preko takšnega mehanizma nosečnostna hipertermija potencialno lahko vodi v nastanek prirojenih okvar ploda (27).

V naši študiji ugotavljamo, da imajo matere, ki so imele v prvem trimestru nosečnosti telesno temperaturo vsaj enkrat višjo od 38 °C, približno 3-krat večje tveganje za OFC ploda v primerjavi s tistimi, pri katerih v času nosečnosti telesna temperatura ni presegla 38 °C. Naši rezultati so v skladu z ugotovitvami novejša meta analize, v kateri poročajo, da povišana telesna temperatura v prvem trimestru nosečnosti podvoji tveganje za razvoj OFC pri plodu. Smiselno bi bilo, da bi naše preiskovanke povprašali tudi, ali so povišano telesno temperaturo zniževale. V splošnem se namreč zdi, da ima znižanje telesne temperature protektivni učinek na nastanek prirojenih okvar. Hashmi in sodelavci ugotavljajo, da v skupini mater, ki ob hipertermiji uživajo antipiretike, ni prisotnega povečanega tveganja za rojstvo otroka z OFC, medtem ko je povečano tveganje prisotno v skupini mater, ki so izpostavljene hipertermiji in ne jemljejo antipiretikov (26). Vendar pa je tudi varnost uporabe antipiretikov v času nosečnosti vprašljiva, saj naj bi nekatere antipiretične učinkovine škodljivo delovale na razvoj ploda (103). V tej smeri bi bile potrebne nadaljnje študije, s katerimi bi ugotovili, kakšno je razmerje med tveganjem in koristjo, ki ga prinaša uporaba določenega antipiretika.

Telesna teža matere ob zanositvi

Materino prekomerno telesno težo oziroma debelost dosedanje študije povezujejo s pojavnostjo širokega spektra prirojenih okvar, predvsem NTD (104). Glede na to, da število ljudi s prekomerno telesno težo po celem svetu zaskrbljujoče narašča, je smiselno pojasniti vlogo materine telesne teže v etiologiji OFC. Izsledki naše raziskave kažejo na to, da v slovenski populaciji telesna teža ne predstavlja dejavnika tveganja za razvoj OFC, saj med materami v KS in PS ni bilo prisotne statistično značilne razlike v ITM ob zanositvi. Do podobnih ugotovitev je prišel tudi Shaw s sodelavci v študiji kalifornijske populacije (105), pa tudi Watkins in sodelavci (106). Na drugi strani Cedrgren in Källén ugotavljata, da $ITM > 29$ v švedski populaciji žensk poveča tveganje za CPO in CL (107). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Queisser-Luft in sodelavci v študiji nemške populacije (108). Rezultati študij glede vpliva materine telesne teže na razvoj OFC so torej precej nekonsistentni.

Predlaganih je kar nekaj mehanizmov, preko katerih naj bi debelost negativno vplivala na razvoj ploda. Nekateri avtorji predpostavljajo, da na nastanek OFC lahko vpliva samo prekomerno kopičenje maščobe, in sicer direktno z vzpostavitvijo kroničnega vnetja. Debelost namreč povzroči patološki porast v izločanju vnetnih citokinov iz adipocitov, zaradi česar pride do infiltracije imunskih celic v adipozno tkivo in razvoja nizke stopnje kroničnega vnetja v telesu. Poleg tega naj bi debelost na razvoj OFC lahko vplivala tudi posredno, preko akumulacije toksinov, kot so na primer dioksini, za katere je dokazano, da povzročajo CP pri miših. Dioksini in nekateri ostali organski polutanti se kopičijo v adipoznem tkivu, posledica česar je večja obremenitev debelih oseb z omenjenim polutantom. V času nosečnosti sproščanje takšnih toksinov iz maščobnega tkiva lahko prizadene razvoj ploda (101).

Antiepileptična terapija in druga zdravila v nosečnosti

Vpliva materine antiepileptične terapije in uživanja drugih zdravil na razvoj OFC v naši študiji nismo uspeli dokazati. Predvsem pri preučevanju vpliva antiepileptične terapije je to najverjetneje posledica premajhnega števila sodelujočih v študiji in posledično premajhne statistične moči testiranja. Tako v KS kot tudi v PS je bila namreč prisotna le po ena mati z uvedeno antiepileptično terapijo v nosečnosti.

Antiepileptiki so sicer dobro poznani teratogeni, ki tveganje za razvoj večjih prirojenih nepravilnosti (tudi OFC) iz običajnih 1–2 % povečajo na 4–9 % (109). Številne raziskave potrjujejo predvsem teratogenost tradicionalnih antiepileptikov (fenobarbital, fenitoin, valproat, karbamazepin), medtem ko novejša študije pod vprašaj postavljajo tudi varnost uporabe novejših antiepileptikov (31). V obsežni severnoameriški raziskavi ugotavljajo, da imajo ženske, ki v prvem trimestru nosečnosti uživajo lamotrigin, kar 10-krat večje tveganje za rojstvo otroka z nesindromskimi OFC (110). Tudi uživanje topiramata, ki je prav tako antiepileptik novejša generacije, poveča tveganje za razvoj OFC (109). Čeprav natančni mehanizmi teratogenosti antiepileptikov še niso v celoti pojasnjeni, pa je bilo do sedaj predlaganih kar nekaj različnih teorij, ki teratogeno delovanje antiepileptikov pripisujejo dejavnikom, kot so: tvorba reaktivnih toksičnih intermediatov, indukcija apoptoze, nastanek hipoksije, genetska predispozicija in antifolatno delovanje (31).

Prehrana in prehranska dopolnila v nosečnosti

V naši študiji v skladu s pričakovanji ugotavljamo, da ima uživanje folatnih in multivitaminskih pripravkov protektivno vlogo pri razvoju OFC. Matere, ki so v času nosečnosti uživale folatne pripravke, so imele približno 4-krat manjše tveganje za rojstvo otroka z OFC v primerjavi s tistimi, ki v nosečnosti niso uživale folatnih pripravkov. Protektivni učinek je bil prisoten tako pri tistih, ki so začele uživati folatne pripravke pred 3. tednom po zanositvi, kakor tudi pri tistih, ki so jih začele uživati več kot tri tedne po zanositvi. Takšna ugotovitev ne preseneča, saj kritično obdobje za razvoj orofacialne regije traja tja do 9. t. n. V skupini ostalih prehranskih dopolnil, ki so jih matere uživale v času nosečnosti, je bilo uživanje multivitaminov povezano s kar 11-krat manjšim tveganjem za razvoj OFC pri plodu. Protektivno vlogo je predstavljala tudi večja količina s hrano zaužitega metionina.

V skladu z rezultati naše raziskave tudi Shaw in sodelavci ugotavljajo, da je večja količina s hrano zaužitega metionina povezana z manjšim tveganjem za nastanek OFC pri plodu (111). Pomembno vlogo pri vzdrževanju znotrajceličnih zalog metionina ima poleg samega vnosa metionina tudi vnos folatov, saj 5-metiltetrahidrofolat prispeva metilno skupino za remetilacijo homocisteina v metionin, ki pa je potreben za normalen potek različnih metilacijskih reakcij (39). Izsledke dosedanjih študij, ki so preučevale vpliv materinega vnosa folatov na pojav OFC, je težko poenotiti, saj se raziskave med seboj razlikujejo v

tem, ali so preučevale izključno vpliv jemanja pripravkov s folno kislino, multivitaminskih pripravkov, uživanja folatov s hrano in/ali kombinacije omenjenih dejavnikov. V primeru jemanja multivitaminskih pripravkov se pojavlja tudi dvom o tem, ali k protektivnemu učinku prispeva folna kislina ali je učinek morebiti posledica drugih prisotnih komponent (55). Van Rooji in sodelavci so na ravni nizozemske populacije preučevali, kako na pojavnost OFC vpliva materino jemanje pripravkov s folno kislino (4 mg) in uživanje folatov s hrano. Ugotovili so, da uživanje 4 mg folatnih pripravkov pred in med nosečnostjo za 47 % zmanjša tveganje za CL/P ter za kar 74 % v primeru, da je poleg tega prisotna še s folati bogata prehrana (112). Wilcox je prišel do podobnih zaključkov, hkrati pa je ugotovil, da folati oziroma folna kislina nimajo protektivne vloge v primeru CPO (113). V naši študiji so bili folatni pripravki, ki so jih uživale matere, različni, zato protektivne vloge ne moremo pripisati točno določenemu odmerku. OFC prav tako nismo razdelili v CL/P in CPO, zato lahko govorimo le o splošnem protektivnem učinku na razvoj OFC.

5.3 Genetski dejavniki

Kar 32,4 % mater, ki so rodile otroka z OFC, je v naši študiji navedlo prisotnost pozitivne družinske anamneze vsaj ene izmed prirojenih okvar (NTD, OFC, CHD), kar kaže na etiološko vpletenost genetskih dejavnikov v razvoj OFC. V logističnem regresijskem modelu je pozitivna družinska anamneza pri materi predstavljala kar 16-krat večje tveganje za OFC ploda. V naši raziskavi smo želeli preučiti, kako na pojav OFC vplivajo polimorfizmi *SLC19A1* rs1051266G>A, *FPGS* rs1544105C>T in *DHFR* rs1677693C>A.

5.3.1 *SLC19A1* rs1051266G>A

Prenašalni protein *SLC19A1* je znan kot poglavitni prenašalec folatov iz sistemske cirkulacije v celice in tkiva in je pomemben predvsem za transport reduciranih oblik folatov, ki predstavljajo v hrani prisotno obliko folatov (41). Izsledki študije, ki so jo opravili Baslund in sodelavci, kažejo na to, da polimorfizem vpliva na samo transportno aktivnost *SLC19A1*. Ugotovili so, da v primerjavi z nosilci genotipov GA in AA celice pri nosilcih genotipa GG privzamejo značilno manj metotreksata (63). V skladu s to študijo Stanisławska-Sachadyn in sodelavci poročajo, da so pri ženskah z genotipom AA ali GA, glede na ženske z genotipom GG, prisotne višje koncentracije folatov v eritrocitih (64). Na

podlagi tega smo domnevali, da bi rs1051266G>A v *SLC19A1* lahko pomembno vplival na nivo folatov v celici in s tem na razvoj OFC.

Čeprav so v nekaterih raziskavah materin oziroma otrokov genotip GG že povezali z večjim tveganjem za razvoj NTD (68), pa nam vpliva rs1051266G>A na pojav OFC ni uspelo dokazati. V skladu z našo študijo povezave polimorfizma rs1051266G>A s pojavom OFC prav tako niso dokazali v kalifornijski (69), poljski (114), južnoameriški (115) in kitajski populaciji (116), medtem ko v novejši indijski raziskavi poročajo o povezavi alela G z večjim tveganjem za razvoj OFC (117). V študiji smo želeli preučiti tudi, kako rs1051266G>A na pojav OFC vpliva v kombinaciji z rs1677693C>A v *DHFR* in/ali rs1544105C>T v *FPGS*. Gre za do sedaj še nepreučevane kombinacije. Z osnovnimi statističnimi testi (ne pa z logistično regresijo) smo ugotovili, da bi materin genotip *SLC19A1*(AA) morda lahko bil povezan z manjšim tveganjem za OFC, in sicer v kombinaciji z genotipoma *DHFR*(CC) in *FPGS*(CC). Morebiti bi boljšo povezavo lahko našli, če bi poleg rs1051266G>A v *SLC19A1* v analizo vključili še 1289C>A v *MTHFR*. V dosedanjih raziskavah se namreč omenja predvsem interakcija rs1051266G>A v *SLC19A1* s polimorfizmi v *MTHFR*. De Marco in sodelavci so ugotovili, da kombinacija polimorfizmov rs1051266G>A v *SLC19A1* in 1289A>C v *MTHFR* pri otroku poveča tveganje za NTD v primeru, da so prisotni vsaj trije tvegani aleli (G pri *SLC19A1* rs1051266G>A oz. C pri *MTHFR* 1289A>C) (68).

Vpliv rs1051266G>A na razvoj OFC smo želeli opredeliti tudi v selekcionirani populaciji. Domnevali smo, da bi vpliv genetske variante morda lahko bolj prišel do izraza v skupini mater, ki v času nosečnosti niso uživale folatnih pripravkov. Shaw in sodelavci so že dokazali, da imajo otroci z genotipom GG v skupini mater, ki ne uživajo folatnih pripravkov, povečano tveganje za razvoj spine bifide, medtem ko vpliv genotipa ni prišel do izraza pri preučevanju vpliva polimorfizma rs1051266G>A neodvisno od vnosa folatnih pripravkov (92). Kljub navedenemu nam vpliva rs1051266G>A na razvoj OFC v selekcionirani skupini ni uspelo dokazati. V skladu z našo raziskavo so tudi izsledki kalifornijske (69) in kitajske (116) študije, kjer v skupini mater, ki niso uživale folatnih pripravkov, prav tako niso dokazali povezave rs1051266G>A s pojavom OFC.

Če povzamemo, lahko rečemo, da so izsledki naše študije v skladu z rezultati večine ostalih raziskav, ki kažejo na to, da polimorfizem rs1051266G>A v večini populacij najverjetneje nima pomembne vloge v etiologiji OFC, medtem ko obstaja nekaj več

dokazov za njegovo vpletenost pri NTD in CHD. Razlog za to, da vpliva rs1051266G>A na pojav OFC nismo dokazali ne v celotni ne v selekcionirani populaciji, bi lahko bil tudi ta, da so matere že samo s prehrano zaužile zadostno količino folatov, in posledično vpliv genske variante ni prišel do izraza. To dokazuje tudi dejstvo, da v naši KS in PS mediana za mesečni vnos folne kisline s hrano presega priporočeni mesečni vnos za noseče ženske (18 mg/mesec) (Preglednica VI). Enako velja tudi za selekcionirano populacijo, kjer je mediana vnosa folne kisline s hrano znašala 24 mg/mesec v KS in 22 mg/mesec v PS.

5.3.2 *FPGS* rs1544105C>T

FPGS je ključni encim v presnovni poti folatov. Katalizira poliglutamacijo v celico vstopajočih folatov in na ta način omogoča njihovo zadrževanje znotraj celic, hkrati pa poveča njihovo afiniteto do encimov v nadaljnji presnovni poti (43). Domnevali smo, da bi polimorfizem rs1544105C>T preko vpliva na poliglutamacijo lahko pomembno vplival na količino folatov v celicah in s tem na razvoj OFC.

Dosedanje študije vpliva rs1544105C>T in drugih sprememb v *FPGS* na pojavnost OFC niso preučevale. V kitajski študiji sicer predvidevajo, da bi bile spremembe v genu *FPGS* lahko vzrok za razvoj CL. Ugotovili so namreč, da imajo osebe s CL navadno prisotno krvno skupino A. Gen za antigen A se nahaja le 5,5 cM od gena za *FPGS*. Zaradi izredno majhne razdalje med genoma je zelo verjetno, da se dedujeta vezano, iz česar sledi domneva, da večja prisotnost krvne skupine A pri osebah s CL hkrati kaže na prisotnost spremembe v genu za *FPGS*, ki bi lahko vplivala na pojavnost CL (118). V naši študiji zaradi relativno majhnega števila sodelujočih OFC nismo razdelili v posamezne podtipе. Vpliva preučevanega polimorfizma v *FPGS* tako nismo mogli povezati direktno s pojavom CL. Kljub temu pa kot prvi ugotavljamo, da bi *FPGS* rs1544105C>T lahko bil vpleten v etiologijo OFC. V celotni populaciji smo z osnovnimi statističnimi pristopi (ne pa z regresijskim modelom) ugotovili, da se razporeditev genotipov med KS in PS mejno statistično značilno razlikuje ($p = 0,052$), in sicer v primeru hkratne prisotnosti polimorfizma *FPGS* rs1544105C>T pri materi in otroku. Delež mater in njihovih otrok s hkratno prisotnostjo genotipa *FPGS*(TT) je bil 1,7-krat večji v PS v primerjavi s KS, kar kaže na vpletenost mutiranega alela T v razvoj OFC. Vpliv otrokovega mutiranega alela T je v kombinaciji z *DHFR* rs1677693C>A prišel do izraza tudi v selekcionirani populaciji mater, ki v času nosečnosti niso uživale folatnih pripravkov. V tej populaciji je bila med

otroki v KS in PS prisotna statistično značilna razlika ($p = 0,016$) v razporeditvi genotipov za kombinacijo polimorfizmov *FPGS* rs1544105C>T in *DHFR* rs1677693C>A. Delež otrok s kombinacijo genotipov *FPGS*(CT)/*DHFR*(AA) je bil bistveno večji v PS kot pa KS, kar zopet nakazuje na povezavo alela T z večjim tveganjem za pojav OFC. Verjetno bi do podobnih ugotovitev prišli tudi v primeru kombinacije genotipov *FPGS*(TT)/*DHFR*(AA) pri otroku, vendar pa tega nismo mogli oceniti, saj tako v KS kot PS ni bilo nobenega otroka s takšno kombinacijo genotipov.

Izsledki naše študije glede na zgoraj navedeno kažejo na možnost povezave alela T z večjo pojavnostjo OFC. Vpliv mutiranega alela T pri polimorfizmu *FPGS* rs1544105C>T je mogoče pojasniti tudi na molekularnem nivoju. Polimorfizem se nahaja v promotorju gena *FPGS* in dokazano vpliva na ekspresijo *FPGS*. Liu in sodelavci so ugotovili, da je količina *FPGS* mRNA prepisov pri nosilcih genotipa CC 1,5-krat večja v primerjavi s tisto pri nosilcih genotipov CT in TT, kar kaže na povezavo alela T z zmanjšano ekspresijo *FPGS* (72). Panetta in sodelavci so pri otrocih z ALL preučevali vpliv polimorfizma rs1544105C>T na aktivnost *FPGS* in ugotovili, da imajo tisti z genotipom CC kar 2,6-krat večjo aktivnost encima v primerjavi z nosilci genotipa TT (119). Rezultati obeh študij so skladni, saj je znano, da aktivnost *FPGS* močno korelira s količino *FPGS* mRNA prepisov (120). Če ugotovitve teh študij prenesemo na našo, bi lahko sklepali, da mutiran alel T preko zmanjšane ekspresije *FPGS* povzroči zmanjšanje celokupne aktivnosti *FPGS*. Posledica tega bi lahko bila manjša stopnja poliglutamacije folatov in večje prehajanje folatov iz celic. To bi lahko povzročilo pomanjkanje folatov v celicah ter s tem prispevalo k razvoju OFC.

5.3.3 *DHFR* rs1677693C>A

DHFR je eden ključnih encimov v presnovi folatov, saj katalizira redukcijo DHF v biološko aktivno obliko, to je THF. Poleg DHF in njegovih poliglutamiranih derivatov katalizira tudi dvostopenjsko redukcijo oksidirane folne kisline do THF (44–45). Domnevali smo, da bi polimorfizem *DHFR* rs1677693C>T lahko pomembno vplival na količino biološko aktivne oblike folatov v celicah in s tem na razvoj OFC.

Pri preučevanju celotne populacije smo ugotovili, da je materin oziroma otrokov genotip polimorfizma *DHFR* rs1677693C>T povezan s pojavom OFC. Iz logističnega

regresijskega modela 2 (Preglednica XI) je razvidno, da je materin genotip *DHFR*(AA) v primerjavi z *DHFR*(CC) na meji statistične značilnosti povezan s 3-krat večjim tveganjem za razvoj OFC ploda. V regresijskem modelu 3 (Preglednica XII) smo, prav tako na meji signifikantnosti, dokazali, da je otrokov genotip *DHFR*(AA) v primerjavi z *DHFR*(CC) povezan s skoraj 3-krat večjim tveganjem za razvoj OFC. Vpliv otrokovega genotipa je prišel do izraza tudi v selekcionirani populaciji otrok in njihovih mater, ki v času nosečnosti niso uživale folatnih pripravkov. V tej populaciji smo zaradi majhnega števila sodelujočih uporabili le osnovne statistične teste in ugotovili, da je med otroki iz KS in otroki iz PS prisotna statistično značilna razlika ($p = 0,042$) v razporeditvi genotipov za polimorfizem *DHFR* rs1677693C>A. Delež otrok z genotipom *DHFR*(CC) je bil kar 1,8-krat večji v KS v primerjavi s PS, kar kaže na protektivno vlogo nemutiranega alela C. V selekcionirani populaciji smo opazili tudi, da je med otroki v KS in PS prisotna statistično značilna razlika v razporeditvi genotipov za kombinacijo polimorfizmov *FPGS* rs1544105C>T in *DHFR* rs1677693C>A ($p = 0,016$). Delež otrok s kombinacijo genotipov *FPGS*(CT)/*DHFR*(CA) oziroma *FPGS*(CT)/*DHFR*(AA) je bil bistveno večji v PS kot pa v KS, kar kaže na povezavo alela A (*DHFR* rs1677693C>A) z večjim tveganjem za razvoj OFC.

Izsledki naše študije torej kažejo na vpletenost polimorfizma rs1677693C>A v etiologijo OFC, pri čemer ugotavljamo povezavo mutiranega alela A z večjo pojavnostjo OFC. Naši rezultati so v nasprotju z ugotovitvami novejšje italijanske študije, v kateri so na meji statistične značilnosti opazili, da ima alel A protektivno vlogo in je povezan z zmanjšanim tveganjem za CL/P (82). Naša in italijanska študija sta do sedaj edini, ki sta preučevali vpliv polimorfizma *DHFR* rs1677693C>A na pojavnost OFC in prirojenih okvar nasploh. Do določenih manjših odstopanj med študijama bi lahko prišlo, ker so v italijansko študijo vključeni le otroci s CL/P, medtem ko smo v našo vključili tudi otroke s CPO. Etiološko gledano sta namreč ti dve skupini različni (4). Vpliv polimorfizma *DHFR* rs1677693C>A na aktivnost in/ali ekspresijo encima ni znan. Prav tako ni raziskan njegov vpliv na plazemske oziroma eritrocitne koncentracije folatov in homocisteina (75). Zaradi precejšnje neraziskanosti polimorfizma ne moremo sklepati, rezultati katere od študij gredo v pravo smer. V prihodnosti bi bilo smiselno oblikovati večjo raziskavo, v kateri bi ugotavljali vpliv polimorfizma rs1677693C>A na aktivnost encima, njegovo ekspresijo in folatni status.

6. SKLEPI

V naši študiji smo želeli opredeliti vpliv izbranih genetskih, demografskih in okoljskih dejavnikov na pojavnost OFC v slovenski populaciji. Vpliv omenjenih genetskih dejavnikov smo želeli preučiti tako v celotni populaciji kot tudi v populaciji otrok in njihovih mater, ki v času nosečnosti niso uživale folatnih pripravkov.

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

- ❖ V slovenski populaciji je najpomembnejši dejavnik tveganja za OFC pozitivna družinska anamneza prirojene okvare, ki pri materi predstavlja kar 16-krat večje tveganje za OFC ploda.
- ❖ Matere, ki v času nosečnosti uživajo folatne pripravke, imajo približno 4-krat manjše tveganje za rojstvo otroka z OFC v primerjavi s tistimi, ki jih ne uživajo. V skupini ostalih prehranskih dopolnil je uživanje multivitaminov povezano s kar 11-krat manjšim tveganjem za razvoj OFC pri plodu. Protektivno vlogo predstavlja tudi večja količina s hrano zaužitega metionina.
- ❖ Matere, ki so v prvem trimestru nosečnosti izpostavljene telesni temperaturi višji od 38 °C, imajo približno 3-krat večje tveganje za OFC ploda v primerjavi s tistimi, ki v času nosečnosti telesne temperature nimajo višje od 38 °C.
- ❖ Matere, ki svoj status kajenja opredeljujejo kot kadilke, imajo v primerjavi z nekadilkami približno 5-krat večje tveganje za rojstvo otroka z OFC.
- ❖ Materin ali otrokov genotip AA za polimorfizem *DHFR* rs1677693C>A je (glede na genotip CC) na meji statistične značilnosti povezan s približno 3-krat večjim tveganjem za OFC pri plodu.
- ❖ Delež mater in njihovih otrok s hkratno prisotnostjo genotipa *FPGS* rs1544105(TT) je 1,7-krat večji v PS v primerjavi s KS, kar kaže na vpletenost mutiranega alela T v razvoj OFC.

- ❖ Delež mater s prisotno kombinacijo genotipov *FPGS(CC)/DHFR(CC)/SLC19A1(AA)* je 2,5–krat večji v KS glede na PS, kar kaže na protektivno vlogo omenjenih genotipov pri nastanku OFC.
- ❖ V skupini parov mati-otrok, ki med nosečnostjo niso prejeli folatnih pripravkov, je delež otrok z genotipom *DHFR rs1677693(CC)* kar 1,8-krat večji v KS v primerjavi s PS, kar kaže na protektivno vlogo alela C v odsotnosti jemanja folatnih pripravkov.
- ❖ V skupini parov mati-otrok, ki med nosečnostjo niso prejeli folatnih pripravkov, imajo otroci s kombinacijo genotipov *FPGS(CT)/DHFR(CA)* oziroma *FPGS(CT)/DHFR(AA)* višje tveganje za razvoj OFC.

7. LITERATURA IN VIRI

- (1) Hočevar Boltežar I. Fiziologija in patologija glasu ter izbrana poglavja iz patologije govora. Pedagoška fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 2008: 173–179.
- (2) Farral M, Holder S. Familial Recurrence-Pattern Analysis of Cleft Lip with or without Cleft Palate. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 270–277.
- (3) Koželj V. Zdravljenje prirojenih anomalij obraza. In: Smrkolj V. Zbornik predavanj XXXVI. podiplomskega tečaja kirurgije. Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2000: 9–16.
- (4) Bagatin M, Virag M. Maksilofacijalna kirurgija. Školska knjiga, Zagreb, 1991: 43–65.
- (5) Gašperšič D, Košir N, Jevnikar N. Razvoj obraza, ustne votline in zobnega aparata. Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2002: 7–20.
- (6) Thorne CH. *Grabb and Smith's Plastic Surgery*, 6th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007: 201–225.
- (7) Brito LA, Meira JG, Kobayashi GS et al. Genetics and management of the patient with orofacial cleft. *Plast Surg Int* 2012; 2012 :782821.
- (8) Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin Genet* 2002; 61: 248–256.
- (9) Venkatesh R. Syndromes and anomalies associated with cleft. *Indian J Plast Surg* 2009; 42(Suppl): S51–S55.
- (10) Michael J, Dixon MJ, Marazita ML et al. Cleft lip and palate: synthesizing genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet* 2011; 12(3): 167–178.
- (11) Shi M, Wehby GL, Murray JC. Review on Genetic Variants and Maternal Smoking in the Etiology of Oral Clefts and Other Birth Defects. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2008; 84(1): 16–29.
- (12) Gundlach KH, Maus C. Epidemiological studies on the frequency of clefts in Europe and world-wide. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2006; 34 (Suppl. S2): 1–2.
- (13) Shaw GM, Croen LA, Curry CJ. Isolated oral cleft malformations: associations with maternal and infant characteristics in a California population. *Teratology* 1991; 43(3): 225–228.

- (14) Baird PA, Sadovnick AD, Yee IM. Maternal age and oral cleft malformations: data from a population based series of 576,815 consecutive livebirths. *Teratology* 1994; 49(6): 448–451.
- (15) Vallino-Napoli RD, Riley MM, Halliday J. An epidemiologic study of isolated cleft lip, palate, or both in Victoria, Australia from 1983 to 2000. *Cleft palate Craniofac J* 2004; 41(2): 185–194.
- (16) DeRoo LA, Gaudino JA, Edmonds LD. Cleft Malformations: Associations With Maternal and Infant Characteristics in Washington State. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2003; 67(9): 637–642.
- (17) Imbard A, Benoist JF, Blom HJ. Neural Tube Defects, Folic Acid and Methylation. *Int J Environ Res Public Health* 2013; 10: 4352–4389.
- (18) Puho E, Metneki J, Czeizel AE. Maternal employment status and isolated orofacial clefts in Hungary. *Cent Eur J Public Health* 2005; 13: 144–148.
- (19) Chevrier C, Dananche B, Bahuau M et al. Occupational exposure to organic solvent mixtures during pregnancy and the risk of non-syndromic oral clefts. *Occup Environ Med* 2006; 63: 617–623.
- (20) Clark JD, Mossey PA, Sharp L et al. Socioeconomic status and orofacial clefts in Scotland, 1989 to 1998. *Cleft Palate Craniofac J* 2003; 40: 481–485.
- (21) Yang J, Carmichael SL, 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(2): 145–154.
- (22) M Vrijheid, H Dolk, D Stone et al. Socioeconomic inequalities in risk of congenital anomaly. *Arch Dis Child* 2000; 82(5): 349–352.
- (23) Morales-Suárez Varela MM, Aagaard Nohr E, Llopis-González A et al. Socio-occupational status and congenital anomalies *Eur J Public Health* 2009; 19(2): 161–167.
- (24) Carmichael SL, Nelson V, Shaw GM et al. Socio-economic status and risk of conotruncal heart defects and orofacial clefts. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2003; 17(3): 264–271.
- (25) Prescott NJ, Malcolm S. Folate and the Face: Evaluating the Evidence for the Influence of Folate Genes on Craniofacial Development. *Cleft Palate Craniofac J* 2002; 39(3): 327–331.

- (26) Shahrukh Hashmi S, Gallaway MS, Waller DK et al. Maternal fever during early pregnancy and the risk of oral clefts. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010; 88(3): 186–194.
- (27) Werenberg Dreier J, Nybo Andersen AM, Berg-Beckhoff G. Systematic Review and Meta-analyses: Fever in Pregnancy and Health Impacts in the Offspring. *Pediatrics* 2014; 133(3): e674–e688.
- (28) Carmichael SL, GM Shaw. Maternal life event stress and congenital anomalies. *Epidemiology* 2000; 11(1): 30–35.
- (29) Pavlinkova G, Salbaum JM, Kappen C. Maternal diabetes alters transcriptional programs in developing embryo. *BMC Genomics* 2009; 10: 274.
- (30) Correa A, Gilboa SM, Besser LM et al. Diabetes mellitus and birth defects. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199: 237.e1–237.e9.
- (31) Etemad L, Mohammad Moshiri, Adel Moallem S. Epilepsy drugs and effects on fetal development: Potential mechanisms. *J Res Med Sci* 2012; 17(9): 876–881.
- (32) Webster WS, Howe AM, Abela D et al. The Relationship Between Cleft Lip, Maxillary Hypoplasia, Hypoxia and Phenytoin. *Current Pharmaceutical Design* 2006; 12: 1431–1448.
- (33) Carinci, Scapoli L, Palmieri A et al. Human genetic factors in nonsyndromic cleft lip and palate: An update. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007; 71(10): 1509–1519.
- (34) Marazita ML, Murray JC, Lidral AC et al. Meta-Analysis of 13 Genome Scans Reveals Multiple Cleft Lip/Palate Genes with Novel Loci on 9q21 and 2q32–35. *Am J Hum Genet* 2004; 75(2): 161–173.
- (35) Krapels IP, Vermeij-Keers C, Müller M et al. Nutrition and genes in the development of orofacial clefting. *Nutr Rev* 2006; 64(6): 280–288.
- (36) Bhaskar LVKS, Murthy J, Venkatesh Babu G. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and orofacial clefts. *Arch Oral Biol* 2011; 56(8): 723–737.
- (37) Bohanec P, Dolžan V. Genetski polimorfizmi encimov v presnovni poti folata v zdravi slovenski populaciji. *Zdrav vestn* 2004; 73: 807–813.
- (38) LeBlanc JG, Savoy de Giori G, Smid EJ et al. Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms. In: Méndez-Vilas A. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Formatex, Badajoz, Spain, 2007: 329–339.

- (39) Nazki FH, Sammer AS, Ganaie BA. Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene* 2014; 533: 11–20.
- (40) Burtis CA, Ashwood ER, Burns DE. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Fifth Edition*. Elsevier Saunders, St. Louis, USA, 2012: 929–934.
- (41) Hou Z, Matherly L. Biology of the Major Facilitative Folate Transporters SLC19A1 and SLC46A1. *Curr Top Membr* 2014; 73: 175–204.
- (42) Zhao R, Diop-Bove N, Visentin M et al. Mechanisms of Membrane Transport of Folates into Cells and Across Epithelia. *Annu Rev Nutr* 2011; 31: 1–31.
- (43) Leil TA, Endo C, Adjei AA et al. Identification and characterization of genetic variation in the folylpolyglutamate synthase gene. *Cancer Res* 2007; 67(18): 8772–8782.
- (44) Klon AE, Heroux A, Larry J. Ross LJ et al. Atomic Structures of Human Dihydrofolate Reductase Complexed with NADPH and Two Lipophilic Antifolates at 1.09 Å and 1.05 Å Resolution. *J Mol Biol* 2002; 320: 677–693.
- (45) Abali EE, Skacel NE, Celikkaya H, Hsieh YC. Regulation of human dihydrofolate reductase activity and expression. *Vitam Horm* 2008; 79: 267–292.
- (46) Banka S, Blom HJ, Walter J et al. Identification and characterization of an inborn error of metabolism caused by dihydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet* 2011; 88(2): 216–225.
- (47) Blanton SH, Henry RR, Yuan Q et al. Folate Pathway and Nonsyndromic Cleft Lip and Palate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011; 91(1): 50–60.
- (48) Little J, Gilmour M, Mossey PA, Fitzpatrick D et al. Folate and clefts of the lip and palate--a U.K.-based case-control study: Part II: Biochemical and genetic analysis. *Cleft Palate Craniofac J* 2008; 45(4): 428–438.
- (49) van Rooij IA, Swinkels DW, Blom HJ et al. Vitamin and homocysteine status of mothers and infants and the risk of nonsyndromic orofacial clefts. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189(4): 1155–1160.
- (50) Niebyl JR, Blake DA, Rocco LE et al. Lack of maternal metabolic, endocrine and environmental influences in etiology of cleft lip with or without cleft palate. *Cleft Palate J* 1985; 22(1): 20–28.

- (51) Wong WY, Eskes TK, Kuijpers-Jagtman AM et al. Nonsyndromic Orofacial Clefts: Association With Maternal Hyperhomocysteinemia. *Teratology* 1999; 60(5): 253–257.
- (52) Little J, Gilmour M, Mossey PA, Fitzpatrick D et al. Folate and clefts of the lip and palate--a U.K.-based case-control study: Part II: Biochemical and genetic analysis. *Cleft Palate Craniofac J* 2008; 45(4): 428–438.
- (53) Brauer PR, Tierney BJ. Consequences of elevated homocysteine during embryonic development and possible modes of action. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 2719–2732.
- (54) Hernandez-Diaz S, Werler MM, Walker AM et al. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *N Engl J Med* 2000; 343(22): 1608–1614.
- (55) GL Wehby, JC Murray. Folic acid and orofacial clefts: a review of the evidence. *Oral Diseases* 2010; 16: 11–19.
- (56) Yazdy MM, Honein MA, Xing J. Reduction in orofacial clefts following folic acid fortification of the U.S. grain supply. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2007; 79: 16–23.
- (57) Canfield MA, Collins JS, Botto LD et al. Changes in the birth prevalence of selected birth defects after grain fortification with folic acid in the United States: findings from a multi-state population-based study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005; 73: 679–689.
- (58) Simmons CJ, Mosley BS, Fulton-Bond CA et al. Birth defects in Arkansas: is folic acid fortification making a difference? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004; 70: 559–564.
- (59) Castilla EE, Orioli IM, Lopez-Camelo JS et al. Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations (ECLAMC). Preliminary data on changes in neural tube defect prevalence rates after folic acid fortification in South America. *Am J Med Genet A* 2003; 123: 123–128.
- (60) Johnson CY, Little J. Folate intake, markers of folate status and oral clefts: is the evidence converging? *Int J Epidemiol* 2008; 37: 1041–1058.
- (61) Luo YL, Cheng YL, Ye P et al. Association between MTHFR polymorphisms and orofacial clefts risk: a meta-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012; 94(4): 237-44.

- (62) Yee SW, Gong L, Badagnani I et al. SLC19A1 Pharmacogenomics Summary. *Pharmacogenet Genomics* 2010; 20(11): 708–715.
- (63) Baslund B, Gregers J, Nielsen CH. Reduced folate carrier polymorphism determines methotrexate uptake by B cells and CD4+ T cells. *Rheumatology* 2008; 47(4): 451–453.
- (64) Stanisławska-Sachadyn A, Mitchell LE, Woodside JV 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(5): 484–491.
- (65) Chango A, Emery-Fillon N, Potier de Courcy G et al. A Polymorphism (80G->A) in the Reduced Folate Carrier Gene and Its Associations with Folate Status and Homocysteinemia. *Mol Genet Metab* 2000; 70(4): 310–315.
- (66) Eklöf V, Van Guelpen B, Hultdin J. The reduced folate carrier (RFC1) 80G>A and folate hydrolase 1 (FOLH1) 1561C>T polymorphisms and the risk of colorectal cancer: A nested case-referent study. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68(5): 393–401.
- (67) Devlin AM, Clarke R, Birks J et al. Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocystein concentrations in a healthy elderly population. *Am J Clin Nutr* 2006; 83(3): 707–713.
- (68) De Marco P, Calevo MG, Morroni A et al. Reduced folate carrier polymorphism (80A>G) and neural tube defects. *Eur J Pediatr Surg* 2001; 11(Suppl 1): S14–S17.
- (69) Shaw GM, Zhu H, Lammer EJ et al. Genetic Variation of Infant Reduced Folate Carrier (A80G) and Risk of Orofacial and Conotruncal Heart Defects. *Am J Epidemiol* 2003; 158(8): 747–752.
- (70) DeVos L, Chanson A, Liu Z et al. Associations between single nucleotide polymorphisms in folate uptake and metabolizing genes with blood folate, homocysteine, and DNA uracil concentrations. *Am J Clin Nutr* 2008; 88(4): 1149–1158.
- (71) Franke B, Vermeulen SH, Steegers-Theunissen RP et al. An Association Study of 45 Folate-Related Genes in Spina Bifida: Involvement of Cubilin (CUBN) and tRNA Aspartic Acid Methyltransferase 1 (TRDMT1). *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2009; 85(3): 216–226.

- (72) Liu SG, Gao C, Zhang RD et al. *FPGS* rs1544105 polymorphism is associated with treatment outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell Int* 2013; 13(1): 107.
- (73) Sharma S, Das M, Kumar A et al. Purine biosynthetic pathway genes and methotrexate response in rheumatoid arthritis patients among north Indians. *Pharmacogenet Genomics* 2009; 19(10): 823–828.
- (74) Anagnou NP, O'Brien SJ, Shimada T et al. Chromosomal organization of the human dihydrofolate reductase genes: Dispersion, selective amplification, and a novel form of polymorphism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 5170–5174.
- (75) Askari SA, Krajinovic M. Dihydrofolate Reductase Gene Variations in Susceptibility to Disease and Treatment Outcome. *Current Genomics* 2010; 11: 578–583.
- (76) Xu X, Gammon MD, Wetmur JG et al. A functional 19-base pair deletion polymorphism of dihydrofolate reductase (DHFR) and risk of breast cancer in multivitamin users. *Am J Clin Nutr* 2007; 85(4): 1098–1102.
- (77) Gellekink H, Blom HJ, van der Linden IJ et al. Molecular genetic analysis of the human dihydrofolate reductase gene: relation with plasma total homocysteine, serum and red blood cell folate levels. *Eur J Hum Genet* 2007; 15: 103–109.
- (78) Stanislawska-Sachadyn A, Brown KS, Mitchell LE et al. An insertion/deletion polymorphism of the dihydrofolate reductase (DHFR) gene is associated with serum and red blood cell folate concentrations in women. *Hum Genet* 2008; 123: 289–295.
- (79) Johnson WG, Stenroos ES, Spychala JR et al. New 19 bp Deletion Polymorphism in Intron-1 of Dihydrofolate Reductase (DHFR): A Risk Factor for Spina Bifida Acting in Mothers During Pregnancy? *Am J Med Genet A* 2004; 124A(4): 339–345.
- (80) Parle-McDermott A, Pangilinan F, Mills JL et al. The 19 bp deletion polymorphism in intron-1 of dihydrofolate reductase (DHFR) may decrease rather than increase risk for spina bifida in the Irish population. *Am J Med Genet A* 2007; 143A(11): 1174–1180.
- (81) van der Linden IJ, Nguyen U, Heil SG et al. Variation and expression of dihydrofolate reductase (DHFR) in relation to spina bifida. *Mol Genet Metab* 2007; 91(1): 98–103.

- (82) Martinelli M, Girardi A, Cura F et al. Evidence of the involvement of the *DHFR* gene in nonsyndromic cleftlip with or without cleft palate. *Eur J Med Genet* 2014; 57: 1–4.
- (83) 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): 2439–2446.
- (84) QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook, 3th Edition. QIAGEN, Hilden, Germany, 6/2012.
- (85) Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.
- (86) MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit. Epicentre, an Illumina company, California, USA, 6/2012.
- (87) NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer User's Manual. NanoDrop Technologies Inc., Rev 9/2006.
- (88) Černe D, Ostanek B. Biomedicinska analitika I. Učbenik za študente laboratorijske biomedicine. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012: 108–145.
- (89) SNP Genetics Incorporation. Dostop: 20.1.2015
http://www.snp-genetics.com/sertec/sertec_genotaqman.htm
- (90) Ha BK, Boerma HR. High-throughput SNP Genotyping by Melting Curve Analysis for Resistance to Southern Root-knot Nematode and Frogeye Leaf Spot in Soybean. *J Crop Sci Biotech* 2008; 11(2): 9–100.
- (91) Roche Life Science. Technical Note No. LC 18/2004: Assay Formats for Use in Real-Time PCR. Dostop: 10.3.2015.
<http://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/Assay%20Formats%20for%20use%20in%20Real-Time%20PCR.pdf>
- (92) Shaw GM, Lammer EJ, Zhu H et al. Periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G), and risk of spina bifida. *Am J Med Genet* 2002; 108(1): 1–6.
- (93) Hollier LM, Leveno KJ, Kelly MA et al. Maternal age and malformations in singleton births. *Obstet Gynecol* 2000; 96(5 Pt 1): 701–706.
- (94) Krapels IP, van Rooij IA, Ocké MC et al. Maternal Nutritional Status and the Risk for Orofacial Cleft Offspring in Humans. *J Nutr* 2004; 134(11): 3106–3113.

- (95) Little J, Cardy A, Munger RG. Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *Bull World Health Organ* 2004; 82: 213–218.
- (96) Honein MA, Rasmussen SA, Reefhuis J et al. Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. *Epidemiology* 2007; 18: 226–233.
- (97) Correa A, Gilboa SM, Botto LD et al. Lack of periconceptional vitamins or supplements that contain folic acid and diabetes mellitus-associated birth defects. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 206: 218.e1–13.
- (98) Aberg A, Westbom L, Källén B. Congenital malformations among infants whose mothers had gestational diabetes or preexisting diabetes. *Early Hum Dev* 2000; 61(2): 85–95.
- (99) Spilson SV, Kim HJ, Chung KC. Association Between Maternal Diabetes Mellitus and Newborn Oral. *Ann Plast Surg* 2001; 47(5): 477–481.
- (100) EndoDiab. Slovenske smernice in priporočila iz področja endokrinologije in diabetologije: sladkorna bolezen v nosečnosti. Dostop: 13.3.2015
<http://www.endodiab.si/dotAsset/7234.pdf>
- (101) Stott-Miller M, Heike CL, Kratz M. 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.
- (102) Chambers CD, Johnson KA, Dick LM et al. Maternal fever and birth outcome: a prospective study. *Teratology* 1998; 58(6): 251–257.
- (103) Thiele K, Kessler T, Arck P et al. Acetaminophen and pregnancy: short- and long term consequences for mother and child. *J Reprod Immunol* 2013; 97(1): 128–139.
- (104) Stothard KJ, Tennant PW, Bell R et al. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2009; 301(6): 636–650.
- (105) Shaw GM, Todoroff K, Schaffer DM et al. Maternal height and prepregnancy body mass index as risk factors for selected congenital anomalies. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2000; 14(3): 234–239.
- (106) Watkins ML, Rasmussen SA, Honein MA et al. Maternal obesity and risk for birth defects. *Pediatrics* 2001; 111(5 Pt 2): 1152–1158.

- (107) Cedergren M, Källén B. Maternal obesity and the risk for orofacial clefts in the offspring. *Cleft Palate Craniofac J* 2005; 42(4): 367–371.
- (108) Queisser-Luft A, Kieninger-Baum D, Menger H et al. Does maternal obesity increase the risk of fetal abnormalities? Analysis of 20,248 newborn infants of the Mainz Birth Register for detecting congenital abnormalities. *Ultraschall Med* 1998; 19(1): 40–44.
- (109) Hunt S, Russell A, Smithson WH et al. Topiramate in pregnancy: preliminary experience from the UK epilepsy and pregnancy register. *Neurology* 2008; 71: 272–276.
- (110) Holmes LB, Baldwin EJ, Smith CR. Increased frequency of isolated cleft palate in infants exposed to lamotrigine during pregnancy. *Neurology* 2008; 70(22 Pt 2): 2152–2158.
- (111) Shaw GM, Carmichael SL, Laurent C et al. Maternal nutrient intakes and risk of orofacial clefts. *Epidemiology* 2006; 17(3): 285–291.
- (112) van Rooij IA, Ocke MC, Straatman H et al. Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Prev Med* 2004; 39: 689–694.
- (113) Wilcox AJ, Lie RT, Solvoll K et al. Folic acid supplements and risk of facial clefts: national population based case-control study. *BMJ* 2007; 334: 464.
- (114) 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.
- (115) Vieira AR, Murray JC, Trembath D et al. Studies of reduced folate carrier 1 (RFC1) A80G and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphisms with neural tube and orofacial cleft defects. *Am J Med Genet A* 2005; 135(2): 220–223.
- (116) 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.
- (117) 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.

- (118) Long H, Liang Q, Zhong C et al. FPGS gene is a novel causative gene for cleft lip in China. *Med Hypotheses* 2011; 76(3): 371–373.
- (119) Panetta JC, Sparreboom A, Pui CH et al. Modeling mechanisms of in vivo variability in methotrexate accumulation and folate pathway inhibition in acute lymphoblastic leukemia cells. *PLoS Comput Biol* 2010; 6(12): e1001019.
- (120) Galpin AJ, Schuetz JD, Masson E et al. Differences in folylpolyglutamate synthetase and dihydrofolate reductase expression in human B-lineage versus T-lineage leukemic lymphoblasts: mechanisms for lineage differences in methotrexate polyglutamylation and cytotoxicity. *Mol Pharmacol* 1997; 52(1): 155–163.

8. PRILOGE

Priloga 1: Anketni vprašalnik, ki so ga izpolnile matere v kontrolni in preiskovani skupini.

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

Vprašalnik 1 - vse preiskovanke

Ime in Priimek oz. šifra preiskovanke _____

Datum: _____

Datum rojstva: _____

1. Označite ustrezno polje:

Trenutno sem noseča, predvideni datum poroda: _____.

Dojim

Ne dojim

2. Demografski podatki

a. Število nosečnosti (če ste trenutno noseči, napišite število nosečnosti pred to nosečnostjo): _____

b. Število živorojenih otrok: _____

c. Število spontanih splavov: _____

d. Telesna višina (cm): _____ Telesna teža (kg): _____

e. Ali imate otroka z (ustrezno označite):

Napako nevralne cevi

Prirojeno srčno okvaro

Orofacilano shizo

Kakšno drugo prirojeno napako: _____

Nič od navedenega

f. Ali se je v vaši družini že rodil otrok z eno izmed prirojjenih motenj navedenih v prejšnji točki?

Da Ne

Če ste odgovorili z da, za katero izmed motenj je šlo: _____

Vaše sorodstveno razmerje s prizadetim otrokom: _____

g. Kadilski status:

- Kadim
- Ne kadim:
- Nikoli nisem kadila
- Sem bivši kadilec, ne kadim že _____

h. Stopnja izobrazbe:

- Osnovna šola
- Srednja poklicna šola
- Gimnazija
- Višja šola
- Univerzitetna izobrazba
- Magisterij ali doktorat

Vprašalnik 2 – Samo preiskovanke DS 7 – matere zdravih otrok

3. Vprašanja se nanašajo na vašo zadnjo nosečnost:

a. Telesna teža pred zanositvijo (kg): _____

b. Spol otroka: Moški Ženski

c. Sladkorna bolezen pred nosečnostjo: Da Ne

d. Nosečniška sladkorna bolezen: Da Ne

e. Ali imate katero drugo kronično bolezen: Da Ne Če da, katero:

f. Ali ste med nosečnostjo uporabljali zdravila za zdravljenje epilepsije? Da Ne

g. Ali ste med nosečnostjo uporabljali katera druga zdravila? Da Ne Če da, napišite katera:

h. Ali ste imeli kdaj v prvem trimestru nosečnosti povišano telesno temperaturo nad 38°C?

Da Ne

i. Ali ste v prvem trimestru nosečnosti uporabljali savno? Da Ne

j. Ali ste pred zanositvijo jemali folno kislino? Da Ne

Če da, kateri pripravek oz. pripravke: _____

k. Ali ste v prvem trimestru nosečnosti jemali folno kislino? Da Ne

Če da, kateri pripravek oz. pripravke: _____

l. Kdaj ste začeli jemati folno kislino:

- Pred izostankom menstruacije
 Takoj po izostanku menstruacije
 Več kot 1 teden po izostanku menstruacije

m. Ali ste folno kislino jemali redno (vsak dan)?

- Da
 Ne, občasno sem pozabila vzeti tabletko
 Ne, ker mi je bilo po tabletah slabo

n. Ali ste poleg pripravkov folne kisline pred in med nosečnostjo jemali še kakšne (multi)vitaminske pripravke? Da Ne

Če da,
katere: _____

o. Ali ste kdaj imeli umetno prekinitvev nosečnosti zaradi okvare ploda? Da Ne

Za kakšno vrsto okvare je šlo: _____

p. Ali ste kdaj rodili otroka z okvaro nevralne cevi? Da Ne

r. Ali ste kdaj rodili otroka s srčno okvaro? Da Ne

s. Ali ste kdaj rodili otroka z orofacialno shizo? Da Ne

t. Na lestvici od 1 do 5 označite, kako podobna je bila vaša prehrana v obdobju 2-3 mesecev pred zanositvijo vaši sedANJI prehrani (1-popolnoma različna, 5-praktično enaka):

1 2 3 4

Vprašalnik 3 – Samo preiskovanke DS 7 – matere otrok z okvaro nevralne cevi / srčno ovaro / orofacialno shizo

3. Vprašanja se nanašajo na nosečnost v kateri ste rodili otroka z okvaro nevralne cevi / srčno ovaro / orofacialno shizo:

a. Telesna teža pred zanositvijo (kg): _____

b. Spol otroka: Moški Ženski

c. Sladkorna bolezen pred nosečnostjo: Da Ne

d. Nosečniška sladkorna bolezen: Da Ne

e. Ali imate katero drugo kronično bolezen: Da Ne Če da, katero:

f. Ali ste med nosečnostjo uporabljali zdravila za zdravljenje epilepsije? Da Ne

g. Ali ste med nosečnostjo uporabljali katera druga zdravila? Da Ne Če da, napišite katera:

h. Ali ste imeli kdaj v prvem trimestrju nosečnosti povišano telesno temperaturo nad 38°C?

Da Ne

i. Ali ste v prvem trimestrju nosečnosti uporabljali savno? Da Ne

j. Ali ste pred zanositvijo jemali folno kislino? Da Ne

Če da, kateri pripravek oz. pripravke: _____

k. Ali ste v prvem trimestrju nosečnosti jemali folno kislino? Da Ne

Če da, kateri pripravek oz. pripravke: _____

l. Kdaj ste začeli jemati folno kislino:

- Pred izostankom menstruacije
 Takoj po izostanku menstruacije
 Več kot 1 teden po izostanku menstruacije

m. Ali ste folno kislino jemali redno (vsak dan)?

- Da
 Ne, občasno sem pozabila vzeti tabletko
 Ne, ker mi je bilo po tabletah slabo

n. Ali ste poleg pripravkov folne kisline pred in med nosečnostjo jemali še kakšne (multi)vitaminske pripravke? Da Ne

Če da, katere: _____

o. Ali ste kdaj imeli umetno prekinitvev nosečnosti zaradi okvare ploda? Da Ne

Za kakšno vrsto okvare je šlo: _____

p. Ali ste kdaj rodili otroka z okvaro nevralne cevi? Da Ne

r. Ali ste kdaj rodili otroka s srčno okvaro? Da Ne

s. Ali ste kdaj rodili otroka z orofacialno shizo? Da Ne

t. Na lestvici od 1 do 5 označite, kako podobna je bila vaša prehrana v obdobju 2-3 mesecev pred zanositvijo vaši sedANJI prehrani (1-popolnoma različna, 5-praktično enaka):

1 2 3 4 5

Vprašalnik 4 - vse preiskovanke – Prehrana v zadnjih 4 tednih

Označite, kako pogosto ste v zadnjih 4 tednih uživali določena živila:

4. Mleko in mlečni izdelki

Kolikokrat ste zaužili določeno živilo?	mesečno			tedensko			dnevno		
	0	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6 +
Mleko									
Jogurt									
Sir									
Parmezan									

5. Sadje in sadni sokovi

Kolikokrat ste zaužili določeno živilo?	mesečno			tedensko			dnevno		
	0	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6 +
Pomarančni sok									
Sok grenivke									
Pomaranče									
Grenivke									
Banane									
Ananas									
Melone									
Jagode									
Maline									

6. Zelenjava

Kolikokrat ste zaužili določeno živilo?	mesečno			tedensko			dnevno		
	0	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6 +
Koruza									
Grah									
Paradižniki									
Paradižnikov sok									
Paradižnikova omaka									
Brokoli									
Špinača									
Koleraba									
Zelena solata									

Šparglji									
Leča									
Redkvice									
Brstični ohrovt									
Kitajsko zelje									

7. Žitarice, stročnice in oreški

	mesečno			tedensko			dnevno		
Kolikokrat ste zaužili določeno živilo?	0	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6 +
Fižol									
Riž									
Sezam (semena, olje, tahini omaka)									
Brazilski oreški									
Soja (tudi sojina omaka)									
Pšenični kalčki									
Oves (kosmiči, piškoti)									
Arašidi									
Čičerika									
Mandlji									
Sončnična semena									
Kruh (vse vrste)									

8. Meso

	mesečno			tedensko			dnevno		
Kolikokrat ste zaužili določeno živilo?	0	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6 +
Ribe									
Tuna									
Piščanec									
Svinjina									
Slanina									
Govedina									
Jetra									
Školjke									

9. Ostalo

	mesečno			tedensko			dnevno		
Kolikokrat ste zaužili določeno živilo?	0	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6 +
Jajca (cela)									
Rumenjak									
Beljak									
Pivo									

10. Prehranska dopolnila

	mesečno			tedensko			dnevno		
Kolikokrat ste zaužili prehransko dopolnilo?	0	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-5	6 +
Multivitaminska prehranska dopolnila									
Pripravki folne kisline									
Pripravki, ki vsebujejo vitamine B kompleksa									

Priloga 2: Genotipi mater in otrok v preiskovani in kontrolni skupini za polimorfizme rs1051266G>A (*SLC19A1*), rs1677693C>A (*DHFR*) in rs1544105C>T (*FPGS*). Oranžno obarvano polje pomeni, da genotipizacija ni uspela. M v identifikacijski številki označuje mater, C pa otroka.

Kontrolna skupina				Preiskovana skupina			
Ident. št.	SLC19A1 Rs1051266 G>A	DHFR Rs1677693 C>A	FPGS Rs1544105 C>T	Ident. št.	SLC19A1 Rs1051266 G>A	DHFR Rs1677693 C>A	FPGS Rs1544105 C>T
KS_001_M	AA	AA	CT	OFC_001_M	GG	CC	CC
KS_001_C	GA	CA	CC	OFC_001_C	GA	CC	CC
KS_002_M	GA	CA	CT	OFC_002_M	GA	CA	CC
KS_002_C	GA	CA	CC	OFC_002_C	GA	CA	CT
KS_003_M	GA	CA	TT	OFC_003_M	GG	CC	CT
KS_003_C	GA	CA	TT	OFC_003_C	GA	CA	CC
KS_004_M	GG	CC	CC	OFC_004_M	GG	CA	CT
KS_004_C	GG	CC	CT	OFC_004_C	GA	CC	CC
KS_005_M	GG	CA	CT	OFC_005_M	GA	CC	CT
KS_005_C	GA	CC	CC	OFC_005_C	AA	CC	CC
KS_006_M	GA	CA	CT	OFC_006_M	GA	CC	CT
KS_006_C	GG	CA	CT	OFC_006_C	GA	CA	CC
KS_007_M	AA	CC	CC	OFC_007_M	GA	CC	CT
KS_007_C	GA	CC	CC	OFC_007_C	AA	CA	CT
KS_008_M	AA	CC	CT	OFC_008_M	AA	CC	CT
KS_008_C	AA	CC	CC	OFC_008_C	AA	CC	CT
KS_009_M	GG	CA	TT	OFC_009_M	GA	CA	CT
KS_009_C	GG	CA	TT	OFC_009_C	GA	CA	CT
KS_010_M	GG	CC	CC	OFC_010_M	GG	CA	CC
KS_010_C	GG	CC	CC	OFC_010_C	GG	AA	CC
KS_011_M	AA	CC	CT	OFC_011_M	GG	CC	CC
KS_011_C	GA	CA	TT	OFC_011_C	GG	CC	CC
KS_012_M	GG	CC	TT	OFC_012_M	AA	CC	CT
KS_012_C	GG	CA	CT	OFC_012_C	GA	CC	CT
KS_013_M	GG	CA	CC	OFC_013_M	GG	CA	TT
KS_013_C	GG	CA	CT	OFC_013_C	GA	AA	TT
KS_014_M	GG	CA	CC	OFC_014_M	GG	AA	CT
KS_014_C	GG	CC	CC	OFC_014_C	GA	CA	CT
KS_015_M	GA	CC	CT	OFC_015_M	AA	CC	TT
KS_015_C	AA	CC	CC	OFC_015_C	AA	CC	TT
KS_016_M	GG	CC	CT	OFC_016_M	GG	AA	TT
KS_016_C	GA	CC	CT	OFC_016_C	GA	CA	TT
KS_017_M	AA	CC	CC	OFC_017_M	GG	CC	TT
KS_017_C	GA	CC	CC	OFC_017_C	GA	CC	TT

KS_018_M	GG	CA	CC	OFC_019_M	GG	CC	TT
KS_018_C	GG	CC	CC	OFC_019_C	GA	CA	TT
KS_019_M	GA	CC	CT	OFC_020_M	GA	CC	CC
KS_019_C	GA	CC	CT	OFC_020_C	GA	CC	CC
KS_020_M	GA	CA	TT	OFC_021_M	GG	CC	TT
KS_020_C	GG	CA	CT	OFC_021_C	GG	CC	TT
KS_021_M	GG	CC	TT	OFC_022_M	GA	CC	TT
KS_021_C	GA	CC	TT	OFC_022_C	GA	CC	TT
KS_022_M	GA	CA	CC	OFC_023_M	GA	CC	CC
KS_022_C	GA	CC	CT	OFC_023_C	GA	CA	CT
KS_023_M	GG	CC	CC	OFC_024_M	GG	CA	TT
KS_023_C	GA	CC	CC	OFC_024_C	GG	CA	CT
KS_024_M	GA	CC	CC	OFC_025_M	AA	CC	TT
KS_024_C	GA	CA	CT	OFC_025_C	AA	CC	TT
KS_025_M	GG	CA	TT	OFC_026_M	GA	CA	CT
KS_025_C	GA	CC	CT	OFC_026_C	GA	AA	CC
KS_026_M	AA	CA	CT	OFC_027_M	GG	CA	CC
KS_026_C	AA	AA	CC	OFC_027_C	GG	CA	CC
KS_027_M	GG	CA	CC	OFC_028_M	GA	CA	TT
KS_027_C	GA	CC	CC	OFC_028_C	GG	CC	CT
KS_028_M	GG	CC	CC	OFC_029_M	GA	CC	CT
KS_028_C	GA	CC	CC	OFC_029_C	AA	CC	CT
KS_029_M	GG	CC	CT	OFC_030_M	GA	CC	CT
KS_029_C	GG	CC	CT	OFC_030_C	GA	CA	CC
KS_030_M	GG	CC	TT	OFC_031_M	GA	CC	CC
KS_030_C	GG	CA	TT	OFC_031_C	GG	CC	CC
KS_031_M	GA	CA	TT	OFC_032_M	AA	CC	CT
KS_031_C	GA	CC	CT	OFC_032_C	AA	CA	CT
KS_032_M	AA	CA	CT	OFC_033_M	GA	CC	CT
KS_032_C	AA	CA	CC	OFC_033_C	GA	CA	CT
KS_033_M	AA	CC	CT	OFC_034_M	GA	CC	CC
KS_033_C	GA	CC	CT	OFC_034_C	GG	CC	CC
KS_034_M	GA	CA	CT	OFC_035_M	GA	AA	CT
KS_034_C	GA	AA	CT	OFC_035_C	GA	CA	TT
KS_035_M	GG	CC	CT	OFC_036_M	AA	AA	CT
KS_035_C	GG	CA	CT	OFC_036_C	GA	CA	CT
KS_036_M	AA	CC	TT	OFC_037_M	AA	CC	CT
KS_036_C	AA	CC	CT	OFC_037_C	AA	CC	CC
KS_037_M	AA	CC	CT	OFC_038_M	GG	CA	CT
KS_037_C	GA	CC	CT	OFC_038_C	GG	CC	CC
KS_038_M	GA	CC	TT	OFC_039_M	GG	CC	CT
KS_038_C	GA	CA	CT	OFC_039_C	GA	CC	CC
KS_039_M	GG	CA	CC	OFC_040_M	GA	CA	CC
KS_039_C	GA	CC	CC	OFC_040_C	AA	CA	CC

KS_040_M	GA	CC	CC	OFC_041_M	GA	CA	CC
KS_040_C	GA	CC	CC	OFC_041_C	GA	CA	CC
KS_041_M	GA	CC	CT	OFC_042_M	AA	CC	CT
KS_041_C	GA	CA	TT	OFC_042_C	GA	CA	CT
KS_042_M	AA	CC	TT	OFC_043_M	GA	CC	TT
KS_042_C	GA	CC	TT	OFC_043_C	GG	CA	CT
KS_043_M	GA	CA	CC	OFC_044_M	GA	CA	TT
KS_043_C	GA	CC	CT	OFC_044_C	GG	AA	TT
KS_044_M	GG	CC	CT	OFC_045_M	GA	CA	CT
KS_044_C	GG	CC	CT	OFC_045_C	GA	CC	CT
KS_045_M	GA	CA	CC	OFC_046_M	GA	CC	CT
KS_045_C	GA	CA	CC	OFC_046_C	GA	CA	CT
KS_046_M	GA	CC	TT	OFC_047_M	AA	CC	CT
KS_046_C	AA	CC	TT	OFC_047_C	AA	CC	CC
KS_047_M	AA	CA	CT	OFC_048_M	AA	CC	CT
KS_047_C	GA	CC	TT	OFC_048_C	AA	CA	CT
KS_048_M	GA	CC	CC	OFC_049_M	GA	CA	CT
KS_048_C	GA	CC	CT	OFC_049_C	GA	AA	CC
KS_049_M	GA	CC	CT	OFC_050_M		CA	CC
KS_049_C	AA	CC	CT	OFC_050_C		CA	CT
KS_050_M	GG	CC	TT	OFC_051_M	AA	CC	CT
KS_050_C	GG	CA	CT	OFC_051_C	AA	CC	CC
KS_051_M	GA	CC	TT	OFC_052_M	GA	CC	CT
KS_051_C	AA	CC	CT	OFC_052_C	GG	CC	CC
KS_052_M	GG	CA	CC	OFC_053_M	GA	CC	CC
KS_052_C	GG	CA	CT	OFC_053_C	GA	CA	CC
KS_053_M	GG	CC	CC	OFC_054_M	GA	CC	CC
KS_053_C	GA	CC	CC	OFC_054_C	GG		CT
KS_054_M	GA	CC	CT	OFC_055_M	GA	CC	TT
KS_054_C	GG	CA	CC	OFC_055_C	GA	CC	TT
KS_055_M	AA	CC	CT	OFC_056_M	GA	AA	TT
KS_055_C	GA	CC	CT	OFC_056_C	GA	CA	CT
KS_056_M	GG	CC	CC	OFC_057_M	GA	CC	CT
KS_056_C	GA	CA	CC	OFC_057_C	GA	CC	TT
KS_057_M	AA	CA	CT	OFC_058_M	GA	CC	TT
KS_057_C	AA	CC	TT	OFC_058_C	GA	CC	CT
KS_058_M	GA	CC	TT	OFC_059_M	GG	CC	CT
KS_058_C	GA	CC	CT	OFC_059_C	GA	CC	CC
KS_059_M	GA	CC	CC	OFC_060_M	GA	CA	CT
KS_059_C	AA	CC	CC	OFC_060_C	AA	AA	TT
KS_060_M	AA	CA	CT	OFC_061_M	GA	CA	CT
KS_060_C	GA	CA	CC	OFC_061_C	GA	CC	CT
KS_061_M	GG	CC	CT	OFC_062_M	GG	CC	TT
KS_061_C	GG	CC	CT	OFC_062_C	GA	CC	CT

KS_062_M	GA	CC	CT	OFC_063_M	GG	CA	CC
KS_062_C	GA	CC	TT	OFC_063_C	GA	CC	CT
KS_063_M	GA	CC	CT	OFC_064_M	GA	CC	TT
KS_063_C	GG	CC	CT	OFC_064_C	GA	CC	CT
KS_064_M	AA	CC	CT	OFC_065_M	GA	CC	CT
KS_064_C	AA	CC	CC	OFC_065_C	GA	CC	CT
KS_065_M	AA	CC	TT	OFC_066_M	GG	CA	CC
KS_065_C	AA	CC	CT	OFC_066_C	GG		CC
KS_066_M	GA	CA	CC	OFC_067_M	GA	CA	TT
KS_066_C	GG	CA	CC	OFC_067_C	GA	CC	TT
KS_067_M	GG	CC	CC	OFC_068_M	GA	CA	TT
KS_067_C	GA	CC	CC	OFC_068_C	GA	AA	TT
KS_068_M	GA	CA	CT	OFC_069_M	AA	CC	CT
KS_068_C	GA	CA	CC	OFC_069_C	GA	CC	CT
KS_069_M	GG	CA	CC	OFC_070_M	GA	CC	CC
KS_069_C	GA	CC	CT	OFC_070_C	GA	CC	CT
KS_070_M	GG	CC	CT	OFC_071_M	GA	CA	CT
KS_070_C	GG	CC	CC	OFC_071_C	AA	CA	CT
KS_071_M	GA	CC	CT	OFC_072_M	GG	CC	CC
KS_071_C	GG	CA	CC	OFC_072_C	GA	CC	CC
KS_072_M	AA	CC	CC	OFC_073_M	GG	CC	CT
KS_072_C	GA	CC	CT	OFC_073_C	GA	CA	CT
KS_073_M	GA	CC	CT	OFC_074_M	GG	CA	CC
KS_073_C	GG	CA	CT	OFC_074_C	GG	CA	CC
KS_074_M	AA	CA	CT	OFC_075_M	AA	CA	CT
KS_074_C	GA	CA	CT	OFC_075_C	GA	CA	CC
KS_075_M	GA	CC	TT	OFC_076_M	GG	CA	CC
KS_075_C	GA	CC	CT	OFC_076_C	GA	AA	CC
KS_076_M	GA	AA	CC	OFC_077_M	GA	CC	CC
KS_076_C	AA	AA	CC	OFC_077_C	GA	CA	CT
KS_077_M	AA	AA	CC	OFC_078_M	GA	CC	CT
KS_077_C	GA	CA	CT	OFC_078_C	GG	CC	TT
KS_078_M	GA	CA	TT	OFC_079_M	GA	CA	CT
KS_078_C	GA	CA	TT	OFC_079_C	AA	CA	CT
KS_079_M	AA	CA	TT	OFC_080_M	GA	CA	CT
KS_079_C	AA	CA	CT	OFC_080_C	GA	CA	TT
KS_080_M	GG	CC	CC	OFC_081_M	GA	AA	CT
KS_080_C	GA	CC	CT	OFC_081_C	GA	CA	CT
KS_081_M	GA	CA	CC	OFC_082_M	GA	CA	CT
KS_081_C	GA	CA	CT	OFC_082_C	GA	AA	CT
KS_082_M	AA	CA	CT	OFC_083_M	AA	CC	CC
KS_082_C	GA	CA	CT	OFC_083_C	GA	CC	CC
KS_083_M	AA	CA	CC	OFC_084_M	GG	CA	CT
KS_083_C	AA	CC	CC	OFC_084_C	GG	CC	CC

KS_084_M	GG	CA	CT	OFC_085_M	AA	CC	CT
KS_084_C	GA	CC	TT	OFC_085_C	AA	CC	CT
KS_085_M	GG	CA	CC	OFC_086_M	GA	CC	CC
KS_085_C	GA	CA	CC	OFC_086_C	GA	CC	CC
KS_086_M	AA	CC	CC	OFC_087_M	AA	CA	CC
KS_086_c	GA	CA	CT	OFC_087_C	GA	CC	CC
KS_087_M	GA	CC	CT	OFC_088_M	AA	AA	TT
KS_087_C	GA	CA	CT	OFC_088_C	AA	CA	CT
KS_088_M	GG	CC	CT	OFC_089_M	AA	CA	CC
KS_088_C	GG	CA	TT	OFC_089_C	GA	CA	CC
KS_089_M	GA	CC	CT	OFC_090_M	GA	CC	TT
KS_089_C	AA	CA	CT	OFC_090_C	AA	CC	TT
KS_090_M	AA	CA	CC	OFC_091_M	AA	CC	TT
KS_090_C	AA	CA	CT	OFC_091_C	AA	CC	CT
KS_091_M	GG	CC	TT	OFC_092_M	GG	CA	CT
KS_091_C	GA	CA	CT	OFC_092_C	GG	CC	CT
KS_092_M	GA	CA	TT	OFC_093_M	AA	CC	CT
KS_092_C	GA	CC	CT	OFC_093_C	GA	CC	CT
KS_093_M	GG	CC	TT	OFC_094_M	GA	CA	CT
KS_093_C	GA	CC	CT	OFC_094_C	GG	CC	CT
KS_094_M	GG	CA	CC	OFC_095_M	GA	CA	TT
KS_094_C	GA	CA	CC	OFC_095_C	GG	CA	CT
KS_095_M	GA	AA	CT	OFC_096_M	GA	CC	TT
KS_095_C	GG	CA	CT	OFC_096_C	AA	CC	CT
KS_096_M	GG	CA	CC	OFC_097_M	AA	CA	CT
KS_096_C	GG	CA	CC	OFC_097_C	AA	CA	CT
KS_097_M	GG	CC	TT	OFC_098_M	GA	CA	CC
KS_097_C	GG	CC	TT	OFC_098_C	GG	CA	CC
KS_098_M	GA	CC	CT	OFC_099_M	GA	CC	CT
KS_098_C	GG	CA	CC	OFC_099_C	AA	CC	CT
KS_099_M	AA	CA	TT	OFC_100_M	GA	CC	CC
KS_099_C	GA	CC	CT	OFC_100_C	GG	CA	CC
KS_100_M	GA	CC	CT	OFC_101_M	GG	CC	TT
KS_100_C	GA	CA	CC	OFC_101_C	GG	CC	CT
KS_101_M	GA	CC	CT	OFC_102_M	GA	CC	CC
KS_101_C	GA	CC	TT	OFC_102_C	GA	CC	CT
KS_102_M	GA	CC	TT	OFC_103_M	AA	CA	CT
KS_102_C	GG	CA	CT	OFC_103_C	GA	AA	CC
KS_103_M	GA	CA	CT	OFC_104_M	GA	CA	CT
KS_103_C	GA	CA	CT	OFC_104_C	GA	CA	CC
KS_104_M	GG	CA	CT	OFC_105_M	GA	CA	CC
KS_104_C	GA	CA	CC	OFC_105_C	GG	CA	CC
KS_105_M	GA	AA	CC	OFC_106_M	GG	AA	CT
KS_105_C	GA	AA	CT	OFC_106_C	GG	CA	CC

KS_106_M	GA	CA	CC	OFC_107_M	GA	CA	CT
KS_106_C	AA	CA	CT	OFC_107_C	AA	CC	CC
KS_107_M	GA	CA	CT	OFC_108_M	GG	CC	CT
KS_107_C	GA	CA	CT	OFC_108_C	GA	CC	CT
KS_108_M	GG	CA	TT	OFC_109_M	GA	CC	CC
KS_108_C	GA	CC	CT	OFC_109_C	GG	CA	CT
KS_109_M	GA	AA	CT	OFC_110_M	GG	CA	CT
KS_109_C	GA	CA	TT	OFC_110_C	GG	CA	TT
KS_110_M	AA	AA	CT	OFC_111_M	GA	CA	CT
KS_110_C	GA	CA	TT	OFC_111_C	GG	CA	CT
KS_111_M	GG	CC	CT	OFC_112_M	GA	CC	CC
KS_111_C	GA	CC	CC	OFC_112_C	GA	CC	CT
KS_112_M	GA	CA	CT	OFC_113_M	AA	CA	CT
KS_112_C	GA	AA	TT	OFC_113_C	GA	CA	CT
KS_113_M	AA	CC	CT	OFC_114_M	GG	CA	TT
KS_113_C	GA	CC	CC	OFC_114_C	GG	CA	TT
KS_114_M	GA	CA	CT	OFC_115_M	AA	CC	CC
KS_114_C	GA	AA	CT	OFC_115_C	GA	CA	CC
KS_115_M	GA	CC	CT	OFC_116_M	GG	CA	TT
KS_115_C	GA	CC	TT	OFC_116_C	GG	CC	CT
KS_116_M	GA	CA	TT	OFC_117_M	GA	CC	TT
KS_116_C	AA	CC	TT	OFC_117_C	GG	CC	CT
KS_117_M	GG	CA	CT	OFC_118_M	GG	CC	CT
KS_117_C	GG	CC	CT	OFC_118_C	GA	CA	CT
KS_118_M	GA	CA	TT	OFC_119_M	AA	CC	CT
KS_118_C	GA	CC	CT	OFC_119_C	AA	CC	CC
KS_119_M	GA	CC	CT	OFC_120_M	AA	AA	CT
KS_119_C	GG	CC	TT	OFC_120_C	GA	CA	CT
KS_120_M	GA	CC	CC	OFC_121_M	GG	CC	CC
KS_120_C	GA	CA	CT	OFC_121_C	GG	CC	CC
KS_121_M	GG	CC	CT	OFC_122_M	GA	CC	TT
KS_121_C	GG	CC	CT	OFC_122_C	GG	CA	CT
KS_122_M	GG	CC	TT	OFC_123_M	GA	CA	CC
KS_122_C	GA	CC	CT	OFC_123_C	AA	CC	CT
KS_123_M	GG	CC	CT	OFC_124_M	GG	CC	CC
KS_123_C	GA	CC	CC	OFC_124_C	GA	CC	CC
KS_124_M	GA	CC	CT	OFC_125_M	GA	CA	TT
KS_124_C	GA	CC	CT	OFC_125_C	GA	CC	TT
KS_125_M	GG	CA	CT	OFC_126_M	GA	CA	TT
KS_125_C	GG	CC	CT	OFC_126_C	GA	CC	TT
KS_126_M	AA	CA	TT	OFC_127_M	GA	CC	CC
KS_126_C	AA	CC	CT	OFC_127_C	GA	CC	CC
KS_127_M	GG	AA	CT	OFC_128_M	GA	AA	CC
KS_127_C	GG	CA	CC	OFC_128_C	GA	CA	CC

KS_128_M	GA	CA	TT	OFC_129_M	GG	CA	CC
KS_128_C	GG	CA	CT	OFC_129_C	GA	CA	CT
KS_129_M	AA	CA	CC	OFC_130_M	GG	CC	CT
KS_129_C	AA	CC	CC	OFC_130_C	GA	CA	CT
KS_130_M	GA	CC	CT	OFC_131_M	GA	CA	CT
KS_130_C	AA	CC	CT	OFC_131_C	GA	CC	CT
KS_131_M	GG	AA	CC	OFC_132_M	GA	CC	CC
KS_131_C	GA	AA	CC	OFC_132_C	AA	CC	CT
KS_132_M	AA	CA	TT	OFC_133_M	GA	CA	CC
KS_132_C	GA	CA	CT	OFC_133_C	GA	CA	CC
KS_133_M	GA	CA	TT	OFC_134_M	GA	CC	CC
KS_133_C	GG	CA	TT	OFC_134_C	GA	CC	CC
KS_134_M	GA	CC	CT	OFC_135_M	GG	CC	CT
KS_134_C	GA	CC	CT	OFC_135_C	GG	CC	TT
KS_135_M	GA	CA	CT	OFC_136_M	GA	CC	TT
KS_135_C	GA	CA	CT	OFC_136_C	GG	CC	CT
KS_136_M	GA	CC	CT	OFC_137_M	GA	CA	CT
KS_136_C	AA	CA	CT	OFC_137_C	GA	AA	CT
KS_137_M	GA	AA	CC	OFC_138_M	GG	AA	CC
KS_137_C	GG	CA	CC	OFC_138_C	GG	CA	CT
KS_138_M	GA	AA	TT	OFC_139_M	AA	CA	CT
KS_138_C	GA	AA	TT	OFC_139_C	AA	CA	CT
KS_139_M	GA	CC	CC	OFC_140_M	GA	CC	CC
KS_139_C	AA	CC	CT	OFC_140_C	GA	CC	CC
KS_140_M	GA	CC	CC	OFC_141_M	GG	CC	TT
KS_140_C	AA	CC	CC	OFC_141_C	GA	CC	TT
KS_141_M	GG	CC	CC	OFC_142_M	AA	CA	TT
KS_141_C	GA	CA	CT	OFC_142_C	GA	CA	TT
KS_142_M	AA	CC	CT	OFC_143_M	GA	CC	CT
KS_142_C	GA	CC	CC	OFC_143_C	GG	CA	CT
KS_143_M	GA	CA	CC	OFC_144_M	GA	CC	TT
KS_143_C	GG	CC	CC	OFC_144_C	GA	CC	CT
KS_144_M	GA	CA	CC	OFC_145_M	GG	CC	CC
KS_144_C	AA	AA	CT	OFC_145_C	GG	CC	CT
KS_145_M	AA	CC	CT	OFC_146_M	GG	CA	CT
KS_145_C	GA	CC	CT	OFC_146_C	GG	CA	CC
KS_146_M	GA	CA	CC	OFC_147_M	GA	CC	CT
KS_146_C	GG	CC	CC	OFC_147_C	GA	CA	CT
KS_147_M	GA	CA	CC	OFC_148_M	GA	CC	CT
KS_147_C	GA	AA	CC	OFC_148_C	AA	CA	CC
KS_148_M	GA	CC	TT	OFC_149_M	GG	CA	CT
KS_148_C	AA	CC	CT	OFC_149_C	GG	CA	CC
KS_149_M	GG	CA	TT	OFC_150_M	GA	CC	CT
KS_149_C	GG	CC	TT	OFC_150_C	AA	CA	CC

KS_150_M	GA	CC	CT	OFC_151_M	GG	CC	CC
KS_150_C	AA	CC	CT	OFC_151_C	GG	CA	CT
KS_151_M	GA	CA	CC	OFC_152_M	GA	CA	CC
KS_151_C	GA	AA	CC	OFC_152_C	GA	CA	CC
KS_152_M	AA	CA	CT	OFC_153_M	GG	CC	CT
KS_152_C	GA	CA	CC	OFC_153_C	GG	CC	CT
KS_153_M	GG	CC	CT	OFC_154_M	GG	CA	CT
KS_153_C	GA	CC	CT	OFC_154_C	GA	AA	TT
KS_154_M	GG	CC	CC	OFC_155_M	GG	CC	CT
KS_154_C	GA	CC	CC	OFC_155_C	GG	CC	CC
KS_155_M	AA	CC	CT	OFC_156_M	AA	AA	CC
KS_155_C	GA	CA	CT	OFC_156_C	GA	CA	CT
KS_156_M	GA	CC	CC	OFC_157_M	GA	CC	TT
KS_156_C	GG	CC	CC	OFC_157_C	AA	CC	TT
KS_157_M	GG	CA	CT	OFC_158_M	GA	CC	CT
KS_157_C	GG	CA	TT	OFC_158_C	GA	CC	CT
KS_158_M	GG	CC	CT	OFC_159_M	GG	CA	CT
KS_158_C	GA	CC	CC	OFC_159_C	GG	CA	CT
KS_159_M	GA	AA	CC	OFC_160_M	GA	CC	CC
KS_159_C	GG	CA	CC	OFC_160_C	GA	CA	CC
KS_160_M	GA	CA	CT	OFC_161_M	GG	CC	CT
KS_160_C	GA	CC	CT	OFC_161_C	GG	CC	CT
KS_161_M	GG	CC	TT	OFC_162_M	AA	CC	TT
KS_161_C	GA	CC	CT	OFC_162_C	GG	CC	TT
KS_162_M	GG	CC	CT	OFC_163_M	GG	CA	CT
KS_162_C	GA	CC	CT	OFC_163_C	GG	CC	CT
KS_163_M	GA	CC	CT	OFC_164_M	GA	CC	TT
KS_163_C	GG	CC	CC	OFC_164_C	GG	CA	TT
KS_164_M	AA	CA	CT	OFC_165_M	GA	CC	CT
KS_164_C	GA	CA	CT	OFC_165_C	GG	CC	CT
KS_165_M	AA	CA	CC	OFC_166_M	GA	CC	CT
KS_165_C	AA	CA	CC	OFC_166_C	GA	CC	CC
KS_166_M	GG	CA	CC	OFC_167_M	AA	CA	CT
KS_166_C	GG	AA	CC	OFC_167_C1	AA	AA	CT
KS_167_M	GA	CC	CC	OFC_167_C2	GA	CC	TT
KS_167_C	GA	CA	CT	OFC_168_M	GG	CA	CT
KS_168_M	GA	CC	CC	OFC_168_C	GG	AA	CT
KS_168_C1	GA	CA	CT	OFC_169_M	AA	CA	TT
KS_168_C2	GG	CA	CC	OFC_169_C	GA	CA	TT
KS_169_M	AA	CA	CC	OFC_170_M	GG	CC	CT
KS_169_C	GA	AA	CT	OFC_170_C	GA	CC	CC
KS_170_M	GA	CA	CC	OFC_171_M	GA	CC	CC
KS_170_C	AA	CC	CT	OFC_171_C	GA	CC	CC
KS_171_M	GA	CC	CT	OFC_172_M	GA	AA	CT

KS_171_C	GG	CC	CT	OFC_172_C	GA	CA	CT
KS_172_M	GA	CC	CT	OFC_173_M	GG	AA	CC
KS_172_C	GA	CC	CC	OFC_173_C	GG	AA	CC
KS_173_M	GG	CA	CC	OFC_174_M	GG	AA	CT
KS_173_C	GG	CC	CC	OFC_174_C	GG	CA	CC
KS_174_M	GA	CC	CC	OFC_175_M	GA	CC	TT
KS_174_C	AA	CC	CT	OFC_175_C	GA	CC	TT
KS_175_M	GG	CC	TT	OFC_176_M	AA	CC	CT
KS_175_C	GA	CC	TT	OFC_176_C	AA	CC	TT
KS_176_M	GA	CA	TT	OFC_177_M	GA	CC	TT
KS_176_C	GA	CA	TT	OFC_177_C	GG	CC	TT
KS_177_M	GG	CC	CC	OFC_178_M	GA	CC	TT
KS_177_C	GA	CC	CC	OFC_178_C	AA	CC	CT
KS_178_M	GG	CA	CT	OFC_179_M	GA	CC	TT
KS_178_C	GG	CC	CT	OFC_179_C	AA	CC	CT
KS_179_M	GG	CC	CT	OFC_180_M	GG	CA	TT
KS_179_C	GA	CC	CT	OFC_180_C	GG	CA	CT
KS_180_M	GG	CC	CC				
KS_180_C	GG	CA	CC				
KS_181_M	GG	CC	TT				
KS_181_C	GG	CC	CT				
KS_182_M	GG	CC	CT				
KS_182_C	GG	CA	CC				
KS_183_M	AA	CC	CC				
KS_183_C	AA	CC	CC				
KS_184_M	GG	CC	CC				
KS_184_C	GG	CA	CC				
KS_185_M	GG	CC	CC				
KS_185_C	GA	CC	CC				
KS_186_M	GA	CA	CC				
KS_186_C	GA	CA	CC				
KS_187_M	GA	CC	CC				
KS_187_C	GA	CC	CC				
KS_188_M	GA	CA	CT				
KS_188_C	GG	AA	CT				
KS_189_M	GA	CC	CT				
KS_189_C	AA	CC	TT				
KS_190_M	GG	CC	CT				
KS_190_C	GG	CC	CT				
KS_191_M	GG	CC	CC				
KS_191_C	GG	CC	CT				
KS_192_M	AA	CA	TT				
KS_192_C	AA	CC	CT				
KS_193_M	GA	CC	CT				

KS_193_C	GA	CC	CC				
KS_194_M	AA	CC	CC				
KS_194_C	GA	CC	CT				
KS_195_M	GG	AA	CT				
KS_195_C	GA	CA	TT				
KS_196_M	GA	CC	TT				
KS_196_C	GA	CC	CT				
KS_197_M	AA	CC	TT				
KS_197_C	GA	CC	CT				
KS_198_M	GG	CC	CC				
KS_198_C	GA	CC	CT				
KS_199_M	GG	CC	CT				
KS_199_C	GA	CA	CT				
KS_200_M	AA	CA	CC				
KS_200_C	GA	CA	CC				