

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Rozprawa doktorska

**Polimorfizm genów kodujących enzymy szlaku remetylacji
homocysteiny do metioniny jako czynnik ryzyka
wystąpienia wady cewy nerwowej**

Bibl. Medyczna CM UJ



Lek. med. Mirosław Bik-Muśtanowski

Promotor: Prof. dr hab. med. Jacek J. Pietrzyk

Kraków 2001

*Serdecznie dziękuję
Panu Profesorowi Jackowi J. Pietrzykowi
oraz wszystkim, którzy okazali mi życzliwość
i pomoc w trakcie powstawania pracy*

SPIS TREŚCI

1. Wstęp.....	5
1.1. Fizjologia i patologia wczesnego okresu rozwoju układu nerwowego człowieka	6
1.1.1. Pierwotna neurulacja	6
1.1.2. Wtórna neurulacja.....	8
1.2. Topografia i elementy kliniki wad cewy nerwowej	9
1.2.1. Wady powstające w wyniku zaburzenia procesu pierwotnej neurulacji:.....	9
1.2.2. Wady powstające w wyniku zaburzenia procesu wtórnej neurulacji	14
1.2.3. Tamr dwudzielna (spina bifida occulta) i ukryte stany dysraficzne.....	15
1.3. Zarys diagnostyki i leczenia wad cewy nerwowej.....	16
1.3.1. Diagnostyka prenatalna wad cewy nerwowej.....	16
1.3.2. Leczenie wad cewy nerwowej.....	18
1.3.3. Profilaktyka wystąpienia wad cewy nerwowej	22
1.4. Epidemiologia wad cewy nerwowej.....	23
1.5. Etiologia wad cewy nerwowej	25
1.5.1. Koncepcja folianozależności wad cewy nerwowej.....	26
1.5.2. Polimorfizmy genów kodujących enzymy szlaku remetylacji homocysteiny do metioniny.....	30
1.5.3. Folianoniezależne wady cewy nerwowej.....	34
2. Cel pracy	35
3. Materiały i metodyka.....	36
3.1. Badana populacja.....	36
3.2. Metodyka badań	40
3.2.1. Odczynniki stosowane w trakcie badania.....	41
3.2.2. Izolacja DNA.....	43
3.2.3. Analiza polimorfizmu 677 C→T genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej	45
3.2.4. Analiza polimorfizmu 1298 A→C genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej	47
3.2.5. Analiza polimorfizmu 2756 A→G genu syntazy metioniny.....	50
3.2.6. Analiza polimorfizmu 66 A→G genu reduktazy syntazy metioniny	52
3.2.7. Statystyczne opracowanie wyników	55

4. Wyniki	56
4.1. Charakterystyka badanej populacji	56
4.2. Analiza rozkładu polimorfizmu 677C→T genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej w badanych populacjach.....	62
4.4. Analiza rozkładu jednoczesnej heterozygotyczności w zakresie polimorfizmów 677C→T i 1298A→C genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej (genotyp 677CT/1298AC) w badanych populacjach.	70
4.5. Analiza rozkładu polimorfizmu 2756A→G genu syntazy metioniny w badanych populacjach	72
4.6. Analiza rozkładu polimorfizmu 66A→G genu reduktazy syntazy metioniny w badanych populacjach	76
4.7. Wyniki genotypowania u matek chorych na padaczkę lub cukrzycę.....	81
5. Dyskusja.....	82
6. Wnioski.....	93
7. Streszczenie.....	95
8. Piśmiennictwo	101

1. WSTĘP

Wady cewy nerwowej (zespół dysrafii) stanowią szczególną grupę anomalii, które ze względu na anatomiczną lokalizację i rozległość zmian już w momencie urodzenia przesądzają o dalszych losach dziecka. W sensie klinicznym obejmują one zaburzenia o różnym stopniu ciężkości - od bezmózgowia i całkowitego rozszczepu czaszki i kręgosłupa do przepuklin oponowo - rdzeniowych, oponowych i tami dwudzielnej. Pomimo znacznego udoskonalenia technik leczenia, zwłaszcza w dziedzinie neurochirurgii oraz intensywnej terapii noworodka, ta grupa wad nadal posiada znaczący udział w śmiertelności noworodków i niemowląt, lub stanowi przyczynę ciężkiego, nieuleczalnego kalectwa. Analiza wyników leczenia - śmiertelność wynosząca w zależności od regionu świata od 10% do prawie 100% przypadków, bardzo często brak możliwości poruszania się o własnych siłach u tych, którzy przeżyli, inteligencja w wielu przypadkach poniżej przeciętnej - [8, 11], zmusza do poszukiwania metod skutecznego zapobiegania wystąpieniu wad cewy nerwowej. Podstawowe znaczenie dla profilaktyki ma określenie etiologii tych wad.

1.1. Fizjologia i patologia wczesnego okresu rozwoju układu nerwowego człowieka

1.1.1. Pierwotna neurulacja

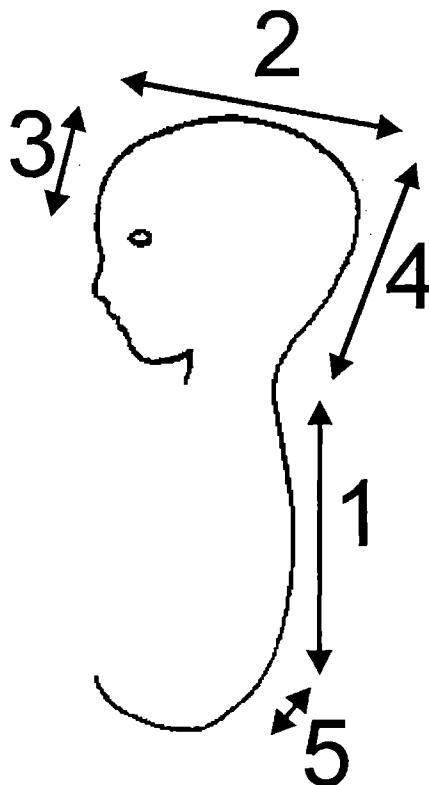
Proces rozwoju układu nerwowego człowieka rozpoczyna się około 17 dnia życia zarodka. W tym czasie pierwotna ektoderma położona między węzłem pierwotnym (Hansena) a płytką przedstrunową w części grzbietowo - przyśrodkowej zarodka ulega pogrubieniu, tworząc płytkę nerwową (lamina neuralis). Proces ten indukowany jest przez strunę grzbietową i mezoderme przystrunową. Szybki wzrost płytki nerwowej powoduje unoszenie się jej brzegów i zagłębianie części środkowej z wytworzeniem rynienki nerwowej (sulcus neuralis). Około 20 dnia można wyróżnić elementy mózgowia: przodomózgowie (prosencephalon), śródmózgowie (mesencephalon) i tyłomózgowie (rhombencephalon). Następnie około 21 dnia fałdy boczne rynienki nerwowej zaczynają się łączyć, tworząc cewę nerwową. Powstała struktura stanowi podłoże dla dalszego różnicowania się struktur mózgu i rdzenia kręgowego z wyjątkiem dolnej części odcinka krzyżowego i odcinka guzicznego rdzenia kręgowego [7, 94].

Tradycyjnie zamykanie się cewy nerwowej było opisywane jako proces zaczynający się w jednym punkcie (w okolicy przyszłego połączenia rdzenia kręgowego i rdzenia przedłużonego) i postępujący przez ciągłość w kierunku dogłowym i doogonowym. W "jednopunktowym" modelu zamykania się cewy nerwowej przyjmuje się powstanie w odcinkach głowowym i ogonowym dwóch

otworów: otworu nerwowego przedniego (neuroporus anterior), zamykającego się około 25 dnia i otworu nerwowego tylnego (neuroporus posterior), którego całkowite zamknięcie następuje około 28 dnia rozwoju zarodka [7]. W ujęciu klasycznym pierwotny brak zamknięcia cewy nerwowej (von Recklinghausen, 1886) stanowi przyczynę powstawania wad cewy nerwowej [95]. Możliwość wtórnego otwarcia cewy nerwowej jako potencjalna przyczyna powstawania omawianych wad wydaje się obecnie wykluczona [29].

W ostatnich latach van Allen zaproponowała wielomiejscowy model zamykania się cewy nerwowej [85]. Koncepcja ta, wyróżniająca pięć punktów inicjacji zamykania się rynienki nerwowej (rycina 1), ma w porównaniu do modelu klasycznego kilka istotnych zalet. Daje możliwość wyjaśnienia różnorodnego, w zależności od umiejscowienia, ryzyka powtórnego wystąpienia wad z grupy dysrafii i częstości występowania wad towarzyszących. Przyjmując koncepcję klasyczną, należałoby założyć, że wada zawsze obejmuje zamykające się jako ostatnie, najbardziej dystalne okolice cewy nerwowej, lub też, że częstym zjawiskiem jest ponowne otwieranie się cewy nerwowej w miejscach o bardziej proksymalnej lokalizacji, przy zamkniętych odcinkach dystalnych, co nie jest zgodne z obserwacjami klinicznymi i doświadczalnymi [29, 85]. W końcu model wielopunktowy może stanowić wyjaśnienie dla zespołów chorobowych o podłożu genetycznym, manifestujących się wadą cewy nerwowej występującą w określonym miejscu.

Opisany proces formowania się cewy nerwowej nosi nazwę pierwotnej neurulacji [94].



Rycina 1. Punkty zamykania się cewy nerwowej według hipotezy van Allen

1.1.2. Wtórna neurulacja

W odróżnieniu od pierwotnej, następująca później wtórna neurulacja doprowadza do powstania końcowych odcinków rdzenia kręgowego (dolne segmenty krzyżowe od S2 w dół i segment guziczny). Między 28 a 32 dniem życia zarodka dochodzi do rozwoju drobnych wakuoli w obrębie grupy niezróżnicowanych komórek położonych doogonowo od cewy nerwowej. Wakuole te stopniowo powiększają się i łączą z kanałem centralnym istniejącej już cewy

nerwowej. Proces kanalizacji kończy się ok. 7 tygodnia życia zarodka, natomiast proces ostatecznego kształtowania stożka rdzenia i ogona końskiego kończy się już po urodzeniu dziecka [94].

1.2. Topografia i elementy kliniki wad cewy nerwowej

Zaburzenia procesu pierwotnej i wtórnej neurulacji doprowadzają do powstania wad cewy nerwowej, określanych też nazwą zespołu dysrafii.

1.2.1. Wady powstające w wyniku zaburzenia procesu pierwotnej neurulacji:

A. Wady w obrębie czaszki

- **Bezmózgowie (anencephalia)**

Jest wynikiem braku zamknięcia cewy nerwowej w zakresie punktów zamykania 2, 3 i 4. W bezmózgowiu stwierdza się brak skóry, kości sklepienia czaszki i opon mózgowo-rdzeniowych oraz znajdujący się na zewnątrz szczątkowy mózg lub całkowity brak mózgu [29, 85].

- **Exencephalia**

Rzadko występująca wada o mniejszym nasileniu niż bezmózgowie, polegająca na braku skóry i kości sklepienia czaszki z obecnością nieprawidłowej tkanki mózgowej, pokrytej cienką błoną podobną do opony twardej [29]. W

przypadku bezmózgowia jak i exencephalii większość dzieci rodzi się martwych lub umiera w ciągu kilku dni po porodzie [81].

- **Przepuklina czaszkowo-oponowa (meningocoele cranialis) i czaszkowo - oponowo - mózgowa (meningoencephalocoele)**

Zaburzenia te są następstwem niezamknięcia otworów nerwowych powstających na granicy zamykających się odcinków cewy nerwowej, pomiędzy punktami inicjacji zamykania 3 i 2, 2 i 4 oraz przy niecałkowitym zamknięciu cewy w punkcie 4 [85]. Obejmowane są czasem wspólną nazwą cephalocoele lub cranium bifidum [1]. Wyróżnia się tutaj przepuklinę czaszkowo - oponową i przepuklinę czaszkowo - oponowo - mózgową. Przepuklinę czaszkowo - oponową tworzy workowato wypukłona poprzez ubytek kostny opona, wypełniona płynem mózgowo-rdzeniowym, przepuklina czaszkowo - oponowo - mózgowa zawiera ponadto elementy nieprawidłowo zbudowanej kory mózgowej, mózdzku lub pnia mózgu [29]. W przypadku przepukliny oponowo - mózgowej istnieje duże ryzyko współistnienia wodogłowa. W zależności od rozmiarów i umiejscowienia wady stwierdza się różne nasilenie deficytów neurologicznych, zazwyczaj z obecnością ciężkiego upośledzenia psychoruchowego. Wady te umiejscowione mogą być w okolicy potylicznej (forma najczęstsza, obejmująca w populacji europejskiej ok. 85% przypadków [1], powstaje na skutek braku zamknięcia cewy nerwowej w punkcie 4), czołowej (brak zamknięcia się otworu nerwowego pomiędzy punktami zamykania 2 i 3), ciemieniowo-potylicznej (otwór nerwowy między punktami 2 i 4) lub twarzowej z przepukliną wpuklającą się do zatok przynosowych, oczodołu lub też gardła (punkt 3).

B. Wady w obrębie czaszki i kręgosłupa

- **Bezmózgowie z całkowitym rozszczepem kręgosłupa (craniorachischisis totalis)**

Wada ta powstaje na skutek braku zamknięcia cewy nerwowej w punktach 2, 4 i 1. Stwierdza się bezmózgowie i rozszczep kręgosłupa z widoczną nieprawidłową tkanką nerwową.

- **Iniencephalia**

Jest to rzadkie zaburzenie obejmujące ubytek kości potylicznej wraz z otworem wielkim (foramen magnum) oraz rozszczep górnego odcinka kręgosłupa, połączone ze znacznym odgięciem głowy ku tyłowi. Jest efektem zaburzenia zamykania się cewy nerwowej w hipotetycznych punktach 1 i 4 [85].

C. Wady w obrębie kręgosłupa (spina bifida cystica seu aperta)

- **Całkowity rozszczep kręgosłupa (myeloschisis, rachischisis)**

Powstaje w wyniku całkowitego braku zamknięcia się cewy nerwowej w punktach 1 i 5. Występuje tu rozszczep kręgosłupa z widoczną nieprawidłową tkanką nerwową, przy całkowitym braku skóry i struktur kostnych pokrywających nieprawidłowe elementy nerwowe.

- **Przepuklina oponowo-rdzeniowa (myelomeningocele) i oponowa (meningocele)**

Powstaje w wyniku zaburzenia zamykania się cewy nerwowej w zakresie punktów 1 i 5 [85]. W przypadku przepukliny oponowo - rdzeniowej, u noworodka w linii środkowej pleców stwierdza się zwykle ubytek skóry, rozszczep kręgosłupa i

wynicowaną płytkę nerwową lub też podobną do worka torbiel pokrytą cienką warstwą skóry, pod którą uwidacznia się nieprawidłowa tkanka nerwowa. Od umiejscowienia i rozległości wady zależy nasilenie deficytów neurologicznych. Uszkodzenia są zwykle bardziej rozległe w przepuklinach o wyższej lokalizacji. Poza uszkodzeniem ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego występują tutaj zaburzenia w czynności innych narządów i układów, szczególnie układu kostnego, moczowego i skóry. Wada w okolicy piersiowo-lędźwiowej lub lędźwiowo-krzyżowej (w tej okolicy wada występuje w około 75% przypadków) [8] w zależności od przypadku powoduje niedowład wiotki kończyn dolnych, u wielu dzieci zaburzenia rozwojowe kończyn dolnych (deformacje stóp i zwichnięcie stawów biodrowych), dysfunkcję zwieraczy z pęcherzem neurogennym, nietrzymaniem moczu, wtórnymi odpływami pęcherzowo-moczowodowymi i wynikającym stąd potencjalnym uszkodzeniem nerek oraz nietrzymaniem stolca. Obraz chorobowy dodatkowo komplikują owrzodzenia skóry współistniejące z rozległymi zaburzeniami czucia. W większości przypadków przepuklinie oponowo - rdzeniowej towarzyszy zespół Arnolda - Chiariego (określany również jako zespół Chiariego typu II, obejmujący doogonowe przemieszczenie mózdzku i rdzenia przedłużonego) i związane z nim wodogłowie, wtórne do zwężenia wodociągu mózgu lub utrudnienia przepływu płynu mózgowo - rdzeniowego przez otwór Magendiego i wokół rdzenia kręgowego [1, 81]. W takiej sytuacji dołączają się często objawy związane z uszkodzeniem tyłomózgowia. Niejednokrotnie stwierdza się towarzyszącą przepuklinie dodatkową wadę rdzenia kręgowego o typie rozszczepu rdzenia lub zdwojenia rdzenia. Paradoksalnie pacjenci, u których

przepuklina znajduje się w górnym odcinku kręgosłupa piersiowego lub szyjnego mogą mieć znacznie mniejsze ubytki neurologiczne, bardzo często bez towarzyszącego wodogłowia [1, 8, 29, 81].

Przepukliną oponową określa się przemieszczenie opon rdzeniowych przez nie zamknięte tylne łuki kręgowe. Przepukliny oponowe stanowią około 10 - 20% przypadków wad w zakresie kręgosłupa [29]. Przepuklina oponowa pojawia się zwykle w linii środkowej ciała, wzdłuż kręgosłupa, w formie przeświecającego guza położonego zazwyczaj w dolnej części pleców. W przypadku przepukliny oponowej rdzeń kręgowy jest zbudowany prawidłowo. W konsekwencji nie stwierdza się deficytów neurologicznych, W niektórych przypadkach do worka przepuklinowego przemieszczone mogą być jedynie korzenie nerwowe (radiculocoele) [8, 29]. U dzieci z takim zaburzeniem (pomimo zewnętrznego podobieństwa do przepukliny oponowej w zasadzie odmianą przepukliny oponowo - rdzeniowej) występują zaburzenia o znacznie mniejszym nasileniu w porównaniu do rozległych przepuklin oponowo - rdzeniowych.

Rzadkimi odmianami przepuklin oponowych są przepukliny przednie, wpuklające się do miednicy poprzez ubytek kości krzyżowej i mogące wywoływać zaburzenia czynności pęcherza moczowego i zaparcia. Inną rzadką odmianą tego typu wad jest przepuklina boczna wypuklająca się na plecach, do boku od kręgosłupa.

1.2.2. Wady powstające w wyniku zaburzenia procesu wtórnej neurulacji

Wady te różnią się od powstałych w wyniku zaburzenia procesu pierwotnej neurulacji nie tylko umiejscowieniem w odcinku krzyżowym i ogonowym (poniżej segmentu S2), ale również obecnością zazwyczaj prawidłowej skóry pokrywającej uszkodzenie. Grupa ta obejmuje zaburzenia rozwoju stożka rdzenia i nici końcowych.

Często anomalia jest niezauważana przez długi okres czasu, stąd stosowane tutaj określenie „ukryte stany dysraficzne”. Wprawdzie czynność mięśni kończyn dolnych może być prawidłowa, występują jednak zaburzenia czucia i dysfunkcja zwieraczy.

- **Myelocystocoele**

U dziecka stwierdza się cystowate poszerzenie kanału centralnego w dystalnym odcinku rdzenia kręgowego. Stosunkowo często obserwuje się współistniejące wady takie jak zarośnięcie odbytu i przepuklina pępowinowa (omphalocoele).

- **Tłuszczaki stożka rdzenia, przepukliny oponowe, formy mieszane (lipoma, meningocoele, lipomeningocoele)**

W okolicy krzyżowej stwierdza się zazwyczaj workowatą torbiel, zawierającą tłuszczak połączony z nieprawidłowym stożkiem rdzenia, oraz ubytek kości krzyżowej. W zależności od rozległości deformacji stożka rdzenia występują różnie

nasilone ubytki neurologiczne. W przypadku obecności przepukliny oponowej zwykle nie stwierdza się ubytków neurologicznych [1, 94].

- **Rdzeń zakotwiczony, zdwojenie rdzenia (diplomylia), rozszczep rdzenia (diastematomyelia)**

Są to zaburzenia manifestujące się deficytami neurologicznymi powstającymi w wyniku ograniczenia ruchomości i pociągania rdzenia kręgowego lub nieprawidłowej struktury anatomicznej najczęściej w obrębie stożka rdzenia [94]. Wady te mogą również współwystępować z przepukliną oponowo - rdzeniową wyższego odcinka rdzenia.

- **Zatoka skórna, cysta dermoidalna, naczyniak okolicy krzyżowo-ogonowej**

Są to zmiany w powłokach okolicy krzyżowo-ogonowej polegające na przerwaniu ciągłości skóry, lub też obecności nieprawidłowej struktury takiej jak cysta, naczyniak, przebarwienie, kępki włosów. Zwykle nie stwierdza się zaburzeń neurologicznych, czasami jednak struktury te mogą łączyć się z kanałem kręgowym, sprzyjając występowaniu zakażeń opon mózgowo - rdzeniowych [94]

1.2.3. Tarń dwudzielna (spina bifida occulta) i ukryte stany dysraficzne

Jest to najczęstsza i jednocześnie najłagodniejsza postać dysrafii. Występuje u ok. 5% populacji [81]. Na zdjęciu rentgenowskim kręgosłupa można stwierdzić niezrośnięte tylne łuki i nieprawidłowe trzony kręgowe typowo na poziomie L5 i S1, chociaż zaburzenie może występować na różnej wysokości.

Wada ta przebiega bezobjawowo. W przypadku współistnienia wymienionych zaburzeń skórnych lub też zaburzeń struktury rdzenia o typie rdzenia zakotwiczonego, rozszczepu lub zdwojenia rdzenia z towarzyszącymi deficytami neurologicznymi, zaburzenia określa się zwyczajowo nazwą "ukryty stan dysraficzny" [8, 29, 81].

1.3. Zarys diagnostyki i leczenia wad cewy nerwowej

1.3.1. Diagnostyka prenatalna wad cewy nerwowej

Podstawowymi metodami stosowanymi w diagnostyce prenatalnej wad cewy nerwowej są: oznaczanie stężenia alfa-fetoproteiny w surowicy matki, badanie ultrasonograficzne płodu oraz badanie stężenia alfa-fetoproteiny i elektroforeza izoenzymów acetylocholinoesterazy w płynie owodniowym uzyskanym metodą amniopunkcji [1, 39, 94].

Alfa-fetoproteina jest białkiem występującym w dużych stężeniach w surowicy i płynie mózgowo - rdzeniowym płodu (stanowi około 90% frakcji surowiczych globulin płodu) [1]. Może być wykryta już 30 dni po zapłodnieniu. Najwyższe stężenie w surowicy białko to osiąga między 10 i 13 tygodniem rozwoju zarodka. W przypadku obecności otwartej wady cewy nerwowej dochodzi do zwiększenia stężenia alfa-fetoproteiny w płynie owodniowym. Zwiększona ilość

alfa-fetoproteiny w płynie owodniowym powoduje z kolei podwyższenie jej stężenia w surowicy matki [94].

W końcu lat siedemdziesiątych udowodniono przydatność oznaczania stężenia alfa-fetoproteiny w surowicy matki jako przesiewowej metody, pozwalającej na wykrywanie wad cewy nerwowej. Stwierdzono, że okres pomiędzy 16 i 18 tygodniem ciąży jest optymalny dla pomiaru alfa-fetoproteiny w surowicy matki. W tym czasie w ok. 80% przypadków otwartej wady cewy nerwowej stężenie alfa-fetoproteiny ponad dwukrotnie przekracza normę [94]. Nieprawidłowy wynik badania przesiewowego stanowi wskazanie do wykonania badania ultrasonograficznego płodu. Badanie to, jeżeli jest wykonywane przez osobę doświadczoną, dysponującą odpowiednio czułym sprzętem, pozwala na rozpoznanie wady cewy nerwowej w prawie 100% przypadków (w tym również wad zamkniętych) u zarodka w wieku 16 do 20 tygodni a nawet wcześniej (13 tydzień) w przypadku rozległych wad takich jak bezmózgowie [58, 94]. Weryfikacja podwyższonego stężenia alfa-fetoproteiny w surowicy matki oraz nieprawidłowego obrazu sonograficznego płodu następuje ostatecznie poprzez oznaczenie stężenia alfa-fetoproteiny i badanie izoenzymów acetylocholinoesterazy w płynie owodniowym uzyskanym metodą amniopunkcji. Przy prawidłowo przeprowadzonym badaniu oznaczenie stężenia alfa-fetoproteiny posiada prawie 100% czułość. Dodatkowe badanie izoform acetylocholinoesterazy dziesięciokrotnie zmniejsza liczbę wyników fałszywie dodatnich. Fakt ten spowodował w ostatnim czasie uznanie wyższości badania acetylocholinoesterazy

w porównaniu do alfa-fetoproteiny w weryfikacji rozpoznania wad cewy nerwowej [94].

1.3.2. Leczenie wad cewy nerwowej

Podstawowym pytaniem, które wymaga odpowiedzi przy rozważaniu możliwości terapeutycznych u dzieci z wadą cewy nerwowej jest pytanie o rokowanie wynikające z rodzaju i rozległości wady. W przypadku obecności wady letalnej stosuje się jedynie leczenie podtrzymujące.

- **Postępowanie przed urodzeniem dziecka**

W przypadku prenatalnego rozpoznania wady cewy nerwowej, jeszcze przed urodzeniem dziecka należy rozważyć możliwości leczenia wewnątrzłonowego. Ze względu na potencjalną możliwość dodatkowego uszkodzenia rdzenia kręgowego pod wpływem ekspozycji cewy nerwowej na płyn owodniowy w przypadku przepukliny oponowo - rdzeniowej [58] podjęto próby zamykania wad cewy nerwowej przy pomocy wewnątrzmacicznego zabiegu operacyjnego. W przypadku przeprowadzenia zabiegu z końcem drugiego trymestru ciąży (optymalnie nie później niż pomiędzy 22 i 25 tygodniem ciąży - daje to bowiem możliwość częściowej regeneracji płodowych struktur nerwowych), można oczekiwać nie tylko znacznie mniejszego nasilenia deficytów neurologicznych, ale wręcz cofnięcia się anomalii anatomicznych składających się na zespół Arnolda - Chiariego, co wiąże się też z mniejszą częstością występowania wodogłowia. Zabiegi takie, chociaż bardzo obiecujące, mają na razie charakter eksperymentalny. Ze względu na

znaczne ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego i śmierci dziecka wykonywane są obecnie tylko w kilku ośrodkach na świecie [58]. Uzupełniającą metodą, która daje szansę poprawy rozwoju dziecka jest wewnątrzmaciczny zabieg odbarczenia wodogłowia powstającego u płodu. W przypadku opracowania odpowiednich standardów postępowania, procedury te mają szansę stać się jedną z pierwszoplanowych metod leczniczych wad cewy nerwowej [58].

Potencjalna możliwość wystąpienia urazu mechanicznego w trakcie porodu drogami natury powoduje, w przypadku rozpoznania u dziecka wady cewy nerwowej, konieczność wykonywania cesarskiego cięcia jeszcze przed rozpoczęciem akcji porodowej.

- **Postępowanie po urodzeniu dziecka**

W przypadku encephalocoele lub meningocoele cranialis interwencja neurochirurgiczna wskazana jest u większości pacjentów. Wyjątkiem są dzieci z masywnymi uszkodzeniami i wyraźnym małopłowiem. Diagnostyka przedoperacyjna obejmuje badanie ultrasonograficzne, tomografię komputerową i magnetyczny rezonans jądrowy. Operacja powinna być przeprowadzona jak najszybciej w przypadku wycieku płynu mózgowo – rdzeniowego, może być odłożona w przypadku defektów pokrytych skórą. Rokowanie jest zależne od rozległości i umiejscowienia wady.

Operacyjne zamknięcie wady cewy nerwowej w przypadku przepukliny oponowo – rdzeniowej należy w miarę możliwości przeprowadzić w pierwszej dobie życia dziecka. Uzasadnieniem dla wczesnego zabiegu operacyjnego jest

zapobieganie wystąpieniu zakażenia centralnego systemu nerwowego. Rutynowym postępowaniem do czasu zabiegu operacyjnego jest stosowanie profilaktycznej antybiotykoterapii.

Podstawowym problemem terapeutycznym w przypadku przepuklin oponowo – rdzeniowych jest występujące w większości przypadków wodogłowie. Szybkie narastanie obwodu głowy, napięte ciemiaczko i rozstęp szwów czaszkowych są typowymi objawami wodogłowia (dołączać się mogą objawy dysfunkcji pnia mózgu), a badanie ultrasonograficzne i tomografia komputerowa pozwalają na określenie dynamiki rozwoju wodogłowia. Metodą leczniczą stosowaną rutynowo jest założenie zastawki komorowo – otrzewnowej. Wczesne leczenie pozwala na uzyskanie najlepszych wyników, mierzonych ilorazem inteligencji dziecka [94]. Głównym powikłaniem obecności zastawki komorowo – otrzewnowej są zakażenia ośrodkowego układu nerwowego, które stanowią główny czynnik pogarszający rozwój intelektualny dziecka.

Po okresie noworodkowym obok wodogłowia i powikłań związanych z obecnością zastawki komorowo - otrzewnowej, istotnym problemem stają się powikłania ortopedyczne i powikłania związane z układem moczowym.

Doświadczenie uczy, że główną przyczynę śmierci chorych dzieci po upływie pierwszego roku życia stanowi niewydolność nerek, dlatego w tym okresie w centrum uwagi pojawiają się problemy urologiczne. Jedynie u około 10% chorych dzieci obserwuje się prawidłową kontrolę zwieraczy [81]. W pozostałych przypadkach stwierdza się pęcherz neurogeny a postępowanie obejmujące

regularne cewnikowanie, profilaktykę i intensywne leczenie zakażeń oraz, w miarę potrzeby, zabiegi urologiczne, stanowi podstawę leczenia pozwalającego na minimalizację uszkodzeń nerek.

Nietrzymanie stolca stanowi klinicznie mniejszy problem, dający się zwykle opanować dzięki stosowaniu regularnych wlewów doodbytniczych i odpowiedniego treningu.

Często występujące końsko - szpotawe ustawienie stóp oraz wywołane przykurczami mięśniowymi deformacje kończyn dolnych, wymagają intensywnej rehabilitacji a często również leczenia operacyjnego. Ze względu na mogące wystąpić zwichnięcie, uważnej obserwacji wymagają też stawy biodrowe chorych dzieci. Współpraca ortopedów i rehabilitantów pozwala pomóc znacznemu odsetkowi pacjentów w nauce chodzenia.

Leczenie przepukliny oponowej polega na jej chirurgicznym zamknięciu. W przypadku izolowanej przepukliny bez zaangażowania rdzenia nie występują ubytki neurologiczne. Dodatkowego leczenia wymagać mogą anomalie kostne, obserwowane zwłaszcza w bocznych przepuklinach oponowych.

Dokładne określenie anatomii uszkodzeń w przypadku stanów dysraficznych w obrębie stożka rdzenia i nici końcowych wymaga diagnostyki obrazowej obejmującej zdjęcia rentgenowskie kręgosłupa, badanie ultrasonograficzne, mielografię, tomografię komputerową oraz, pozwalający na najbardziej precyzyjną ocenę anatomii wady, magnetyczny rezonans jądrowy. Zabieg operacyjny mający na celu uniknięcie powikłań neurologicznych wynikających głównie z pociągania

rdzenia i struktur z nim związanych (rdzeń zakotwiczony) oraz ucisku wywieranego przez guz (najczęściej tłuszczak stożka rdzenia) wykonywany jest coraz częściej w okresie noworodkowym, co pozwala na ograniczenie uszkodzeń [94]. W zależności od rozległości wady mogą pojawić się wymagające kompleksowej opieki zaburzenia urologiczne.

1.3.3. Profilaktyka wystąpienia wad cewy nerwowej

Zapobieganie wystąpieniu choroby (pierwotna profilaktyka) w sposób oczywisty stanowi najlepszy sposób postępowania w przypadku wad cewy nerwowej. W końcu lat 70-tych zwrócono uwagę na potencjalną rolę kwasu foliowego w zapobieganiu wystąpieniu wad cewy nerwowej [76]. W latach 90-tych, w randomizowanych badaniach kontrolowanych placebo, stwierdzono znamienne obniżenie ryzyka wystąpienia takich wad u dzieci kobiet zażywających kwas foliowy [17, 36, 57]. W badaniu nadzorowanym przez British Medical Research Council wykazano 72%-ową redukcję częstości wad cewy nerwowej wśród potomstwa tych matek z grupy wysokiego ryzyka (posiadających już jedno dziecko z wadą), które stosowały kwas foliowy [57]. Według danych amerykańskich suplementacja kwasu foliowego pozwala na redukcję częstości wad cewy nerwowej w populacji ogólnej o ponad 50%. [3].

Dzienne zapotrzebowanie na kwas foliowy u osób dorosłych wynosi około 180 - 200 μg [49]. Wzrasta ono w ciąży i aktualnie kobietom w wieku rozrodczym zaleca się przyjmowanie 400 μg kwasu foliowego dziennie. Zalecana dzienna

dawka kwasu foliowego dla kobiet, u których w poprzedniej ciąży wystąpiła wada cewy nerwowej wynosi natomiast 4 do 5mg dziennie [3, 14, 49, 57, 86]. Suplementację kwasu foliowego należy prowadzić co najmniej na miesiąc przed i w ciągu pierwszych trzech miesięcy ciąży. Pozwala to uzupełnić ewentualne niedobory folianów i zabezpiecza odpowiednią ich ilość w okresie zamykania się cewy nerwowej. W Stanach Zjednoczonych od 1 stycznia 1998 stosuje się powszechnie suplementację mąki kwasem foliowym, jako uniwersalną metodę pierwotnej profilaktyki wad cewy nerwowej [2, 45, 70]. Równolegle do coraz szerzej stosowanej profilaktyki folianowej zaznacza się spadek częstości występowania wad cewy nerwowej [12, 80]. Stopniowo wzrasta też społeczna świadomość korzyści wynikających ze stosowania kwasu foliowego w ciąży [2, 20, 62, 70, 86].

1.4. Epidemiologia wad cewy nerwowej

Wady cewy nerwowej należą do grupy najbardziej "dewastujących": organizm wad wrodzonych. W większości przypadków powodują śmierć lub znaczne kalectwo dotkniętego wadą dziecka.

Częstość występowania wad cewy nerwowej wykazuje zróżnicowanie w zależności od analizowanej populacji.

W badaniach przeprowadzonych w makroregionie krakowskim, w oparciu o rejestr wad wrodzonych w latach 1970-1972 i 1979-1981 stwierdzono częstość występowania wad cewy nerwowej wynoszącą 0,92-0,94 / 1000 urodzeń. Analiza

obejmowała wszystkie przypadki bezmózgowia, cephalocoele, myelomeningocoele i meningocoele. Analizowano urodzenia żywe i martwe. Częstość występowania wad nie uległa zmianie w ciągu ponad 10 lat, które upłynęły pomiędzy oboma okresami obserwacji. Nie stwierdzono zależności występowania wad cewy nerwowej od sezonu, w którym przypadała data porodu lub ostatnia miesiączka matki przed zajściem w ciążę. Wyliczone empirycznie ryzyko powtórzenia wady w rodzinie wynosiło 3,2% +/- 1,6 [63, 64, 65, 66].

Podobne badania prowadzone w innych ośrodkach na świecie ilustrują różnice występujące pomiędzy różnymi populacjami. Częstość występowania omawianych wad wynosiła odpowiednio na Węgrzech 0,4 / 1000 urodzeń, we Francji 0,52 / 1000 urodzeń (centralny wschód) i 0,86 / 1000 urodzeń (rejon Paryża), w USA 0,57 / 1000 urodzeń (Atlanta), w Izraelu 0,57 / 1000 urodzeń, w Wielkiej Brytanii 0,63 / 1000 urodzeń, w Japonii 0,67 / 1000 urodzeń, w Norwegii 0,69 / 1000 urodzeń, w Holandii (rejony północne) 0,92 / 1000 urodzeń, w Brazylii 1,61 / 1000 urodzeń, w Chinach 5,5 / 1000 urodzeń (rejony północne) i 1 / 1000 (rejony południowe), w RPA 6,13 / 1000 urodzeń (czarnoskóra populacja rejonu Transkei) i 0,95 / 1000 urodzeń (czarnoskóra ludność Cape Town) [9, 50, 70].

Zachorowalność w rejonie krakowskim, wynosząca 0,92-0,94 umiejscawia naszą populację wśród populacji o średniej częstości występowania wad cewy nerwowej, pomiędzy społeczeństwami o niskiej częstości (np. Węgrzy) i wysokiej częstości występowania tych wad (np. mieszkańcy RPA z rejonu Transkei).

Dzieci z najcięższymi postaciami omawianych wad (bezmózgowie, całkowity rozszczep kręgosłupa) rodzą się martwe lub umierają wkrótce po urodzeniu. Natomiast w coraz większej liczbie przypadków bardziej ograniczonych wad, dzięki rozwojowi opieki medycznej, dziecko przeżywa okres noworodkowy i niemowlęcy. Odsetek dzieci przeżywających zależy nie tylko od stopnia ciężkości wady, ale również od dostępności i społecznej akceptacji leczenia. Przykładowo prawie 100% dzieci z wadą umiera w wiejskich rejonach północnych Chin, 35% w Holandii a tylko 10% w USA. Dzięki potencjalnym możliwościom leczenia i zapobiegania późnym powikłaniom wad cewy nerwowej (np. niewydolność nerek) poprawia się również rokowanie długoterminowe dla osób dorosłych obarczonych wadą. Według różnych danych 30 lat przeżywa ok. 52-68% osób operowanych wkrótce po urodzeniu [11]. W zależności od dostępności leczenia oraz powikłań związanych z wodogłowie i jego leczeniem, iloraz inteligencji tych, którzy przeżyli, kształtuje się na poziomie średnio od 72 do 102 [1]. Intensywna rehabilitacja i leczenie ortopedyczne pomagają znacznemu odsetkowi dzieci w nauce chodzenia.

1.5. Etiologia wad cewy nerwowej

Ze względu na heterogenność etiologiczną wad cewy nerwowej, identyfikacja odpowiedzialnych za ich powstawanie czynników przyczynowych jest ciągle otwartym problemem. Wiadomo, że część wad z grupy dysrafii może stanowić element większych zaburzeń genetycznych. Wymienia się tutaj aberracje chromosomowe takie jak trisomia 13, trisomia 18, triploidia i zespół Turnera.

Kolejną grupę stanowią wady będące składową rzadkich zaburzeń takich jak sekwencja taśm owodniowych lub też zespołów chorobowych uwarunkowanych mutacją pojedynczych genów – taka sytuacja występuje w zespołach Meckela-Grubera, Walkera-Warburga i zespole Waardenburga. Z drugiej strony zidentyfikowano kilka czynników o działaniu teratogennym, zwiększających ryzyko wystąpienia wady. Zalicza się do nich matczyną cukrzycę typu I, stosowanie u matki leków przeciwpadaczkowych - kwasu walproinowego i karbamazepiny, a także innych leków – aminopteryny i warfaryny. Niejasna jest również rola narażenia matki na hipertermię oraz nadużywania przez matkę alkoholu jako kolejnych czynników mogących przyczyniać się do powstania wad cewy nerwowej [37, 51, 85].

Wszystkie wymienione czynniki odpowiadają jednak jedynie za niewielki odsetek wad cewy nerwowej. Przyczyna powstawania wad izolowanych, nie stanowiących części większych zespołów o podłożu genetycznym, w większości przypadków pozostaje niejasna.

1.5.1. Koncepcja folianozależności wad cewy nerwowej

Obserwacje epidemiologiczne prowadzone w latach 70-tych i 80-tych dostarczyły przesłanek do wysunięcia teorii o wspólnym wpływie na powstawanie wad cewy nerwowej ze strony czynników genetycznych i modyfikujących je czynników środowiskowych. Badania nad dziedziczeniem wad cewy nerwowej

prowadzono między innymi w Zakładzie Genetyki Medycznej w Krakowie. W trakcie tych badań zaproponowano model dziedziczenia sumującego z niepełną penetracją genu i 55% częstością przypadków sporadycznych [64]. Z drugiej strony wielu badaczy analizowało wpływ czynników środowiskowych na częstość występowania omawianych wad. Obserwowana zwiększona zachorowalność wśród przedstawicieli niższych warstw społecznych przyczyniła się do podjęcia badań dotyczących sposobu żywienia matek dzieci z wadą cewy nerwowej. Sposób żywienia może wykazywać znaczne zróżnicowanie w zależności od pory roku, kraju czy warstwy społecznej, wpływając na stopień ekspresji pewnych cech uwarunkowanych genetycznie. Potencjalny efekt niedożywienia dodatkowo potęguje się u płodu, który w okresie szybkiego podziału komórek nie otrzymuje wystarczającej ilości substancji odżywczych.

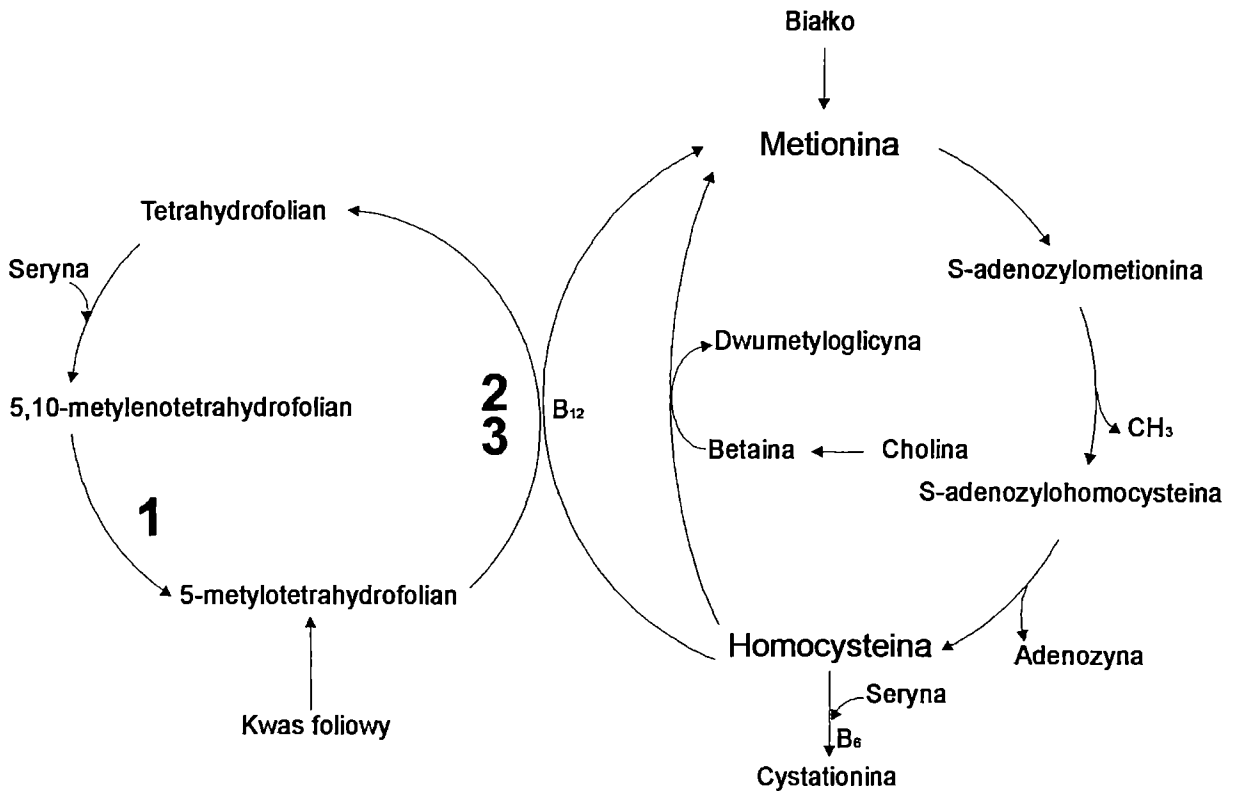
W końcu lat 70-tych prowadzono badania nad wpływem suplementacji witamin na występowanie omawianych wad. Zwrócono uwagę na istotną rolę kwasu foliowego w zapobieganiu wystąpieniu wad cewy nerwowej [76]. W roku 1981 w badaniu prowadzonym przez Laurence'a i wsp. w niewielkiej grupie matek dzieci z wadą cewy nerwowej [43] oraz na początku lat 90-tych, w badaniach populacyjnych prowadzonych przez British Medical Research Council [57] oraz Czeizela i Dudasa [17] wykazano znamienne niższe ryzyko wystąpienia takich wad u potomstwa kobiet zażywających kwas foliowy. Badania te zostały następnie potwierdzone w innych ośrodkach w Europie, USA i Azji [9, 73]. Wśród dzieci matek zażywających kwas foliowy (w porównaniu do dzieci kobiet nie zażywających kwasu foliowego) stwierdzono redukcję częstości wad cewy

nerwowej o ok. 50-70%. Dodatkowo wykazano obniżone stężenie folianów w surowicy i erytrocytach kobiet, które urodziły dziecko z wadą cewy nerwowej [54, 72, 96].

Jeżeli przyjąć, że kwas foliowy spełnia protekcyjną rolę w stosunku do wad cewy nerwowej, to logicznym wydaje się podjęcie próby określenia genetycznych mechanizmów warunkujących takie działanie.

W organizmie ssaków kwas foliowy bierze udział w transporcie rodników jednowęglowych, stanowiącym między innymi integralną część procesu syntezy nukleotydów, a także w wielu reakcjach metylacji. Po wykazaniu podwyższonego stężenia homocysteiny w surowicy i w płynie owodniowym grupy kobiet, które urodziły dziecko z wadą cewy nerwowej, wykazaniu mniejszej zawartości metioniny w ich diecie, oraz po udowodnieniu roli metioniny jako czynnika niezbędnego do prawidłowego zamykania się cewy nerwowej w eksperymentach prowadzonych na myszach, badania skoncentrowały się na folianozależnym szlaku remetylacji homocysteiny do metioniny [21, 52, 53, 72, 74, 77, 93]. Podwyższenie stężenia homocysteiny w surowicy oraz obniżenie stężenia folianów w surowicy i w erytrocytach stwierdzono również u dzieci z wadą cewy nerwowej [90], co przemawia za wspólnym wpływem czynników matczynych i płodowych na powstawanie omawianych wad. Dodatkową przesłankę do badań przemian aminokwasów siarkowych stanowiło stwierdzenie obniżonego stężenia witaminy B₁₂ w surowicy i płynie owodniowym pobranym od kobiet, które urodziły dziecko z wadą cewy nerwowej. Witamina ta stanowi koenzym dla syntazy metioniny - centralnego enzymu opisywanego szlaku metabolicznego [19, 52, 53, 78].

Wśród genów, których dysfunkcja, u matki lub u płodu, potencjalnie prowadziła do zmniejszenia aktywności szlaku remetylacji homocysteiny do metioniny (a w konsekwencji do wystąpienia hiperhomocysteinemii, hipometioninemii i możliwości powstania wady cewy nerwowej) wymieniane są geny kodujące trzy enzymy bezpośrednio związane z reakcją remetylacji: reduktazę 5,10-metylenotetrahydrofolianową, syntazę metioniny i reduktazę syntazy metioniny. Szczególne zainteresowanie budzą polimorfizmy wymienionych genów, to znaczy warianty występujące w populacji z częstością powyżej 1%, mogące powodować upośledzenie funkcji kodowanego enzymu, co stanowi potencjalny czynnik ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej. Najistotniejsze elementy szlaku remetylacji homocysteiny do metioniny przedstawia rycina 2.



1 - reduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolianowa

2 - syntaza metioniny

3 - reduktaza syntazy metioniny

Rycina 2. Szlak remetylacji homocysteiny do metioniny

1.5.2. Polimorfizmy genów kodujących enzymy szlaku remetylacji homocysteiny do metioniny

- Polimorfizmy 677C→T i 1298A→C genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej

Reduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolianowa (MTHFR) katalizuje redukcję 5,10-metylenotetrahydrofolianu do 5-metylotetrahydrofolianu, prowadząc do

wytworzenia aktywnej formy folianu, potrzebnej do reakcji remetylacji homocysteiny do metioniny [25]. U człowieka gen kodujący MTHFR zlokalizowany jest na chromosomie 1 (1p36.6). Gen ten składa się z 11 egzonów, a całkowita długość regionu kodującego wynosi 1980 par zasad [25, 32].

Dotychczas opisano dwa częste polimorfizmy genu MTHFR, których obecność prowadzi do obniżenia aktywności kodowanego enzymu.

- Pierwszy, zlokalizowany w czwartym egzonie, w rejonie kodującym miejsce wiązania folianów (a więc rejon katalityczny, istotny dla aktywności enzymu), polega na tranzycji cytozyny w tyminę w pozycji 677 (677C→T), co prowadzi do zamiany alaniny na walinę [28]. Obecność polimorfizmu prowadzi do powstania termolabilnej formy enzymu, którego aktywność u osób homozygotycznych (dwa allele 677T) wynosi 35% aktywności prawidłowej, upośledzając produkcję 5-metylotetrahydrofolianu i dodatkowo rozkład folianów pomiędzy osoczem i krwinkami czerwonymi [18, 28, 31, 88]. Obecność genotypu 677TT wiąże się z podwyższonym stężeniem homocysteiny w surowicy oraz obniżonym stężeniem folianów w surowicy i prawdopodobnie w erytrocytach [5, 10, 35]. Podwyższonego stężenia homocysteiny w surowicy nie wykazano natomiast u heterozygot, u których aktywność MTHFR wynosi około 70% [97].
- Drugi z opisanych polimorfizmów zlokalizowany jest w siódmym egzonie, w regionie odpowiedzialnym prawdopodobnie za regulację aktywności enzymu poprzez interakcję z S-adenozylometioniną [88]. Polega na transwersji

adeniny w cytozynę w pozycji 1298 (1298A→C), co wiąże się z zamianą glutaminy na alaninę i obniżeniem aktywności enzymu o osób homozygotycznych (dwa allele 1298C) do około 60% aktywności prawidłowej [88]. W przeciwieństwie do polimorfizmu 677C→T, polimorfizm 1298A→C nie powoduje znaczącego podwyższenia całkowitego stężenia homocysteiny ani obniżenia stężenia folianów w surowicy [88].

- Podwyższenie stężenia homocysteiny i obniżenie stężenia folianów w surowicy występuje natomiast w sytuacji obecności podwójnej heterozygotyczności w zakresie opisanych polimorfizmów (genotyp 677T/1298C). Genotyp taki wiąże się z obniżeniem aktywności enzymu o około 50% [88].

Homozygotyczność w zakresie obu wymienionych mutacji jednocześnie jest zjawiskiem niezwykle rzadkim i opisywana była dotychczas jedynie w tkankach poronionych płodów [40]. Jedynie w kilku doniesieniach opisywano rzadkie występowanie u ludzi genotypu 677TT/1298AC i 677CT/1298CC [25, 27, 40, 97]. Wyjaśnieniem tego zjawiska może być hipotetyczne sprzężenie pomiędzy loci wewnątrzgenowymi obu mutacji [79, 88].

- **Polimorfizm 2756A→G genu syntazy metioniny**

Drugim, obok reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej, folianozależnym enzymem, biorącym bezpośredni udział w reakcji remetylacji homocysteiny jest syntaza metioniny. Enzym ten kodowany jest przez gen znajdujący się na chromosomie 1, w pozycji 1q43. Całkowita długość regionu kodującego wynosi

3798 par zasad [46, 91]. Syntaza metioniny katalizuje samą reakcję remetylacji, a brak jej aktywności powoduje wystąpienie objawów homocystynurii. Obok rzadkich mutacji genu syntazy metioniny zidentyfikowany został polimorfizm polegający na tranzykcji adeniny w guaninę w pozycji 2756 (2756A→G), której konsekwencją jest podstawienie kwasu asparaginowego przez glicynę w pobliżu domeny wiążącej S-adenozylometioninę. Glicyna zaburza w tej pozycji strukturę przestrzenną białka, co potencjalnie mogłoby prowadzić do obniżenia aktywności syntazy metioniny i podwyższenia stężenia homocysteiny w surowicy [55, 91].

- **Polimorfizm 66A→G genu reduktazy syntazy metioniny**

Trzecim spośród enzymów biorących bezpośredni udział w reakcji remetylacji homocysteiny do metioniny jest reduktaza syntazy metioniny. Utrzymuje ona w stanie aktywnym syntazę metioniny, a więc jej dysfunkcja mogłaby spowodować obniżenie aktywności syntazy metioniny z automatycznym podwyższeniem stężenia homocysteiny w surowicy. Gen kodujący reduktazę syntazy metioniny został zlokalizowany na chromosomie 5, w pozycji 5p15.2-15.3 [44]. W ostatnim okresie zidentyfikowano polimorfizm genu reduktazy syntazy metioniny polegający na wystąpieniu tranzykcji adeniny w guaninę w pozycji 66, co łączy się z zamianą izoleucyny w metioninę. Polimorfizm ten występuje w rejonie prawdopodobnie odpowiedzialnym za wiązanie FMN (5-fosforan ryboflawiny), potencjalnie ważnym dla aktywności enzymatycznej kodowanego białka [102, 103].

1.5.3. Folianoniezależne wady cewy nerwowej

Badania eksperymentalne prowadzone na myszach doprowadziły do określenia genów, których mutacje powodują u nich wystąpienie wad cewy nerwowej. Wyselekcjonowano ponad 60 szczepów myszy z wysoką częstością występowania omawianych wad [16, 23, 24, 41]. Potwierdzono rolę kwasu foliowego, identyfikując szczepy myszy, u których często występują wady folianozależne (mutacje w obrębie genów Pax3, Cart1, Sp, Cd). Ze względu na ewolucyjną i genetyczną zależność kompleksu genów T/t, determinujących występowanie wad dysraficznych i genów H-2, warunkujących antygeny zgodności tkankowej u myszy, oraz znaczną homologię chromosomalnych regionów głównego układu zgodności tkankowej u myszy i u człowieka, poszukiwano markerów wad cewy nerwowej w układzie MHC [63]. Opisano asocjację tych wad z niektórymi allelami układu HLA klasy I [63, 69]. Badania prowadzone na myszach doprowadziły też do wyselekcjonowania szczepu curly tail (ct). U myszy curly tail nie stwierdzono folianozależności wad cewy nerwowej, zaobserwowano natomiast znaczną redukcję częstości wad po podaniu inozytolu [33, 41, 48]. Dotychczas nie prowadzono badań nad potencjalnymi zaletami stosowania inozytolu w zapobieganiu wadom cewy nerwowej u ludzi, być może jednak suplementacja inozytolu mogłaby zwiększyć skuteczność pierwotnej profilaktyki wad cewy nerwowej [16].

2. CEL PRACY

Celem badań była analiza roli polimorfizmów genów kodujących enzymy szlaku remetylacji homocysteiny do metioniny jako potencjalnych czynników ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej. Analizę tę przeprowadzono poprzez weryfikację następującej hipotezy zerowej:

H0: Polimorficzne warianty 677 C→T, 1298 A→C genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej, 2756 A→G genu syntazy metioniny oraz 66 A→G genu reduktazy syntazy metioniny występują z jednakową częstością w populacji ogólnej oraz w populacjach matek dzieci z wadą cewy nerwowej i dzieci z wadą cewy nerwowej.

3. MATERIAŁY I METODYKA

3.1. Badana populacja

Uniwersytecki Szpital Dziecięcy w Krakowie stanowi trzeciorzędowy ośrodek referencyjny w zakresie leczenia neurochirurgicznego oraz kompletnej opieki na dziećmi z wadą cewy nerwowej, obejmując rejestracją pełną populację dzieci z wadą, z wyłączeniem tych, które urodziły się martwo, lub zmarły przed przesłaniem do Instytutu.

Uczestnictwo w badaniu zaproponowano 130 kolejnym rodzinom dzieci z izolowaną wadą cewy nerwowej, które były kontrolowane w Poradni Mielodysplazji w okresie od lipca 1999 do czerwca 2000. Rodziny, które wyraziły pisemną zgodę na uczestnictwo (zgodnie z wymogami Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego), były włączane do badań. Oceniając, czy wada cewy nerwowej ma charakter izolowany opierano się na dokumentacji medycznej, zawierającej dane uzyskane w trakcie hospitalizacji i konsultacji dzieci w poradniach szpitala, w tym w Poradni Genetycznej.

W badaniu brały udział dzieci z wadą cewy nerwowej i ich matki. W kilku przypadkach w badaniu uczestniczyło jedynie pełnoletnie dziecko lub też, na prośbę rodziców, sama matka. Ostatecznie grupa osób badanych składała się z

przedstawicieli 115 rodzin, w tym 108 dzieci z wadą cewy nerwowej i 112 matek dzieci z wadą cewy nerwowej.

W odniesieniu do dzieci uczestniczących w badaniu, na podstawie analizy dokumentacji medycznej i dodatkowego wywiadu, prowadzono rejestrację danych obejmujących:

- wiek w momencie badania,
- płeć,
- rodzaj i lokalizację anatomiczną wady (tabela 1), określane na podstawie:
 - opisu zabiegu operacyjnego korekcji wady, wraz z wynikiem badania histopatologicznego,
 - wyników badań obrazowych obejmujących zdjęcia rentgenowskie kręgosłupa (w tym zdjęcia z cystografii mikcyjnej i urografii), magnetyczny rezonans jądrowy ośrodkowego układu nerwowego i mielografię,
 - badania neurologicznego, oceniającego zakres zaburzeń czuciowych i ruchowych,
- obecność wodogłowia i zespołu Arnolda - Chiariego (analiza uwzględniała wyniki badań obrazowych - ultrasonografii mózgu, tomografii komputerowej i magnetycznego rezonansu jądrowego głowy),
- posiadanie rodzeństwa z wadą cewy nerwowej.

Tabela I. Zastosowany podział wad cewy nerwowej, wynikający z hipotezy o wielomiejscowym zamykaniu się cewy nerwowej oraz wyodrębnienia pierwotnej i wtórnej neurulacji.

Grupa	Odpowiadające punkty zamykania się cewy nerwowej
Cephalocele (przepukliny czaszkowo - oponowe i czaszkowo-oponowo - mózgowe)	2, 3, 4
Wady w okolicy piersiowo - lędźwiowej (obejmujące rdzeń kręgowy powyżej segmentu L2)	1 (oraz ewentualnie 5 i dolny odcinek krzyżowy)
Wady w okolicy lędźwiowo - krzyżowej (obejmujące rdzeń kręgowy poniżej segmentu L1)	5 (oraz ewentualnie dolny odcinek krzyżowy)
Wady dolnego odcinka okolicy krzyżowej (segmenty rdzenia kręgowego poniżej S2)	Zaburzenia procesu wtórnej neurulacji

W odniesieniu do matek uczestniczących w badaniu, na podstawie analizy dostępnej dokumentacji medycznej dziecka oraz dodatkowego wywiadu, rejestrowano dane obejmujące:

- wiek w chwili urodzenia dziecka,
- ewentualną cukrzycę matczyną,
- stosowanie przez matkę w pierwszych dwóch miesiącach ciąży leków mogących mieć związek z wystąpieniem wady cewy nerwowej (kwasu walproinowego, karbamazepiny, aminopteryny i warfaryny)
- narażenie na hipertermię w pierwszych dwóch miesiącach ciąży,

- urodzenie drugiego dziecka z wadą cewy nerwowej lub poronienie płodu z wadą cewy nerwowej.

Grupę kontrolną stanowiło pierwszych 100 uczestników wybranych z reprezentatywnej dla populacji krakowskiej, losowo dobranej grupy 310 niespokrewnionych osób w wieku od 18 do 64 lat, biorących udział w populacyjnym badaniu polimorfizmów reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej, prowadzonym w II Katedrze Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

W trakcie planowania badania zakładano jedynie analizę trzech polimorfizmów: 677 C→T genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej, 2756 A→G genu syntazy metioniny i 66 A→G genu reduktazy syntazy metioniny. Jednak ze względu na potencjalną rolę polimorfizmu 1298 A→C genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej w obniżeniu aktywności szlaku remetylacji homocysteiny do metioniny, badanie poszerzono o genotypowanie w kierunku obecności powyższego, czwartego polimorfizmu. Jednocześnie, ze względu na wcześniejsze określenie przez badaczy z II Katedry Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego częstości polimorfizmów genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej w całej wspomnianej 310-osobowej grupie, zrezygnowano z planowanego początkowo genotypowania w zakresie polimorfizmu 677C→T u 100 osób należących do tej grupy, mających stanowić populację kontrolną w niniejszym badaniu. W przeprowadzonej analizie dotyczącej polimorfizmów 677C→T i 1298A→C oparto się na danych dotyczących

populacyjnego rozkładu występowania wymienionych polimorfizmów [82]. Ostatecznie genotypowanie prowadzono w odniesieniu do wszystkich badanych polimorfizmów w grupach 112 matek dzieci z wadą cewy nerwowej oraz 108 dzieci z wadą cewy nerwowej, natomiast w odniesieniu do polimorfizmów genów syntazy metioniny i reduktazy syntazy metioniny dodatkowo w 100-osobowej grupie kontrolnej.

3.2. Metodyka badań

Genotypowanie prowadzono metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (polymerase chain reaction - PCR) w połączeniu z analizą długości fragmentów restrykcyjnych (restriction fragments length polymorphism - RFLP).

Łańcuchowa reakcja polimerazy jest metodą umożliwiającą zwielokrotnienie liczby kopii fragmentu kwasu nukleinowego danego organizmu, przy niezwykle małej ilości powielanego wzorca. Ze względu na fakt powielania nawet pojedynczych fragmentów kwasów nukleinowych w milionach kopii, reakcja ta określana jest również mianem amplifikacji. Do przeprowadzenia reakcji PCR, poza amplifikowanym kwasem nukleinowym, niezbędna jest obecność specyficznego enzymu - termostabilnej polimerazy DNA, substratów - starterów ograniczających miejsce zachodzenia polimeryzacji do określonego fragmentu kwasu nukleinowego i dezoksynukleotydów (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), oraz koenzymu polimerazy - jonów Mg. PCR jest trójetapowym procesem, powtarzanym cyklicznie założoną

ilość razy. Pojedynczy cykl składa się z denaturacji termicznej DNA stanowiącego matrycę, przyłączania do matrycy starterów i wydłużania (polimeryzacji). Produkt uzyskany w jednym cyklu stanowi matrycę w następnym, a każdy cykl teoretycznie podwaja liczbę fragmentów kwasu nukleinowego - stąd określenie reakcja łańcuchowa.

Analiza długości fragmentów restrykcyjnych jest metodą umożliwiającą stwierdzenie w badanym genomie obecności mutacji o typie zmiany jednego nukleotydu, jeżeli prowadzi ona do nabycia lub utraty miejsca cięcia przez enzym restrykcyjny. Polega na poddaniu zamplifikowanego fragmentu kwasu nukleinowego działaniu enzymu restrykcyjnego i ocenie długości uzyskanych fragmentów metodą elektroforezy na żelu agarozowym lub poliakrylamidowym. W przypadku obecności poszukiwanej mutacji, w badanej próbce można stwierdzić fragmenty kwasów nukleinowych o określonej długości.

3.2.1. Odczynniki stosowane w trakcie badania

- DNAzol® Reagent (GIBCO BRL, USA),
- Polimerazy DNA:
 - Taq DNA Polymerase (GIBCO BRL, USA),
 - DyNAzyme II DNA Polymerase (FINNZYMES, Finlandia),
 - BIOTOOLS DNA Polymerase (BIOTOOLS - Biotechnological & Medical Laboratories S.A., Hiszpania),

- Endonukleazy restrykcyjne:
 - *Hinf* I (EUROGENTEC, Belgia),
 - *Mbo* II (EUROGENTEC, Belgia),
 - *Hae* III (EUROGENTEC, Belgia),
 - *Nde* I (New England Biolabs, USA),
- Agaroz:
- Metaphor[®] - agaroz do rozdzielania małych fragmentów kwasów nukleinowych (FMC BioProducts, USA),
- Agaroz do rutynowego użytku (SIGMA Chemical Co., USA),
- Startery do łańcuchowej reakcji polimeryzacji (PCR), zsyntetyzowane przez TIB Molbiol (Polska),
- Mieszanina dNTP (dezoksynukleotydów) do reakcji PCR (Polgen, Polska; FINNZYMES, Finlandia),
 - Bufor do elektroforezy zawierający:
 - 89 mM TRIS (Sigma Chemical Co., USA),
 - 89 mM kwas borsy (Sigma Chemical Co., USA),
 - 0,2 mM EDTA (Sigma Chemical Co., USA),
- Mieszanina lizująca zawierająca:
 - 154 mM NH₄Cl (POCH, Polska),
 - 9,2 mM KHCO₃ (POCH, Polska),
 - 2 mM EDTA (Sigma Chemical Co., USA),
- 1,5 mM MgCl₂ (GIBCO BRL, USA; BIOTOOLS - Biotechnological & Medical Laboratories S.A., Hiszpania),

- Dimetylosulfotlenek (DMSO),
- Bromek etyldyny (ET-Br),
- Bufor ładujący do elektroforezy (30% Ficoll, 100 mM EDTA, 0,05% błękit bromofenolowy),
- Alkohol etylowy 70% i 96%,
- 0,5 M EDTA (Sigma Chemical Co., USA),
- Olej mineralny do PCR (PROMEGA, USA),
- Ampułkowana jałowa woda do iniekcji i ampułkowany jałowy 0,9% NaCl (Polfa, Polska),

3.2.2. Izolacja DNA

W pierwszym etapie badania wyizolowano DNA uczestniczących w badaniu 108 dzieci i 112 matek z rodzin obciążonych wystąpieniem wady cewy nerwowej. W tym celu postępowano według procedury podanej w tabeli II. Dodatkowo zabezpieczono otrzymane z II Katedry Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego próbki DNA 100 osób tworzących grupę kontrolną.

Tabela II. Procedura izolowania DNA z pełnej krwi, stosowana w Laboratorium Genetyki Molekularnej Katedry Pediatrii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

1. Pobrać 4 - 5 ml krwi do probówki z dodatkiem 0,5 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0).
2. Wirować krew przez 20 minut, przy prędkości 4800 obrotów na minutę, w temperaturze 20°C (wirówka Heraeus Sepatech Biofuge 28 RS).
3. Zebrać leukocyty umieszczone w interfazie, zalać 50 ml buforu lizującego, przeprowadzić lizę w temperaturze 4°C.
4. Wirować 20 minut przy prędkości 7000 obrotów na minutę, w temperaturze 4°C (wirówka Heraeus Sepatech Biofuge 28 RS).
5. Osad zawiesić w 300 µl soli fizjologicznej.
6. Dodać 900 µl odczynnika DNAzol® Reagent produkcji GIBCO BRL, wymieszać.
7. Dodać 900 µl 96% alkoholu etylowego.
8. Wytrząsać delikatnie celem wyprecypitowania DNA.
9. Dwukrotnie przepłukać DNA 70% alkoholem.
10. Do amplifikacji DNA wysuszyć, zalać 600 µl 8mM NaOH, inkubować przez 24 godziny w temperaturze 42°C celem rozpuszczenia.

3.2.3. Analiza polimorfizmu 677 C→T genu reduktazy

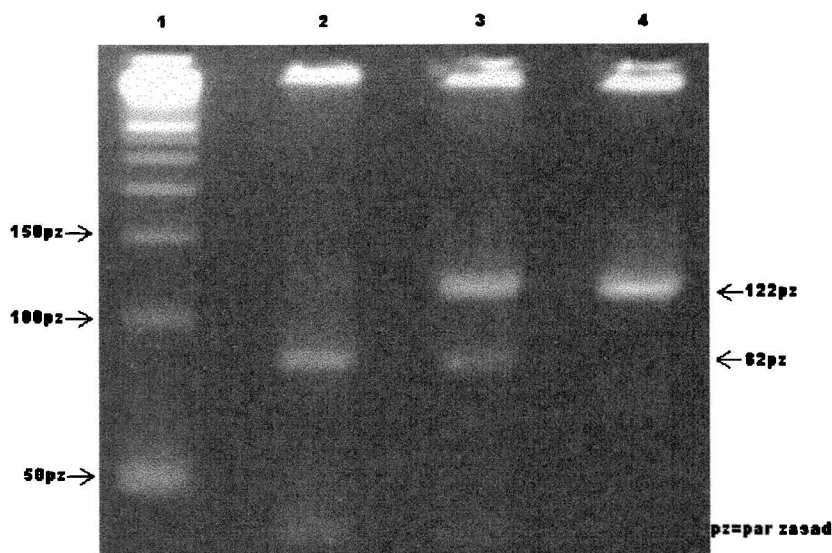
5,10-metylenotetrahydrofolianowej

Wystąpienie tranzycji C→T w pozycji 677 powoduje powstanie miejsca trawienia dla restryktazy *Hinf* I [28]. Enzym ten rozpoznaje sekwencję G*AGTC, nie występującą w allelu prawidłowym. Do amplifikacji stosowano startery zaprojektowane w Zakładzie Genetyki Medycznej Katedry Pediatrii, w oparciu o sekwencję genową dostępną w publicznych bazach danych (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). W trakcie genotypowania postępowano według poniższego schematu:

- próbki DNA amplifikowano w objętości 30 µl, w mieszaninie zawierającej:
 - 3 µl rozpuszczonego DNA,
 - 0,3 µl (1,5 U) Taq DNA polymerase oraz 3 µl dołączonego do polimerazy buforu,
 - 0,6 µl 10 mM roztworu dNTP (FINNZYMES),
 - 0,9 µl 1,5 mM roztworu MgCl₂,
 - po 1,5 µl 20 mM roztworu starterów o sekwencjach:
 - CTG ACC TGA AGC ACT TGA AGG (sens),
 - AGT GAT GCC CAT GTC GGT (antysens),
 - 19,2 µl wody.
- reakcję prowadzono w termocyklerze Perkin Elmer 480, stosując następujący profil termiczny:
 - denaturacja wstępna: 95°C - 9 minut,

- 30 cykli o następujących parametrach:
 - denaturacja: 95°C - 1 minuta,
 - przyłączanie starterów: 58°C - 1 minuta,
 - wydłużanie: 72°C - 1 minuta,
- końcowe wydłużanie: 72°C - 10 minut,
- uzyskany produkt amplifikacji o długości 122 par zasad poddawano trawieniu, dodając do 8 µl produktu 2µl buforu zawierającego 10 U enzymu *Hinf* I.
- produkty trawienia rozdzielano przy pomocy elektroforezy na 4% żelu agarozowym METAPHOR.

W obecności genotypu 677TT uzyskiwano 2 fragmenty: pierwszy o długości 82 par zasad i drugi o długości 40 par zasad. W obecności genotypu 677CC nie obserwowano cięcia produktu amplifikacji. Różnicowanie genotypów 677CC, 677CT i 677TT przedstawia rycina 3.



Rycina 3. Różnicowanie poszczególnych genotypów w zakresie polimorfizmu 677C→T genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej - wynik elektroforezy na żelu agarozowym. Od strony lewej widoczne następujące próbki: 1 - znacznik (kolejne fragmenty o długości zwiększającej się o 50 par zasad), 2 - homozygota 677TT (fragment o długości 82 par zasad odpowiadający dwóm allelom 677T), 3 - heterozygota 677CT (fragment o długości 122 par zasad odpowiadający allelowi 677C oraz fragment o długości 82 par zasad odpowiadający allelowi 677T), 4 - homozygota 677CC (fragment o długości 122 par zasad odpowiadający dwóm allelom 677C). W próbce nr 2 słabo widoczny (ze względu na parametry żelu agarozowego), nieistotny dla różnicowania genotypów, fragment o długości 40 par zasad, pochodzący z przecięcia allelela 677T.

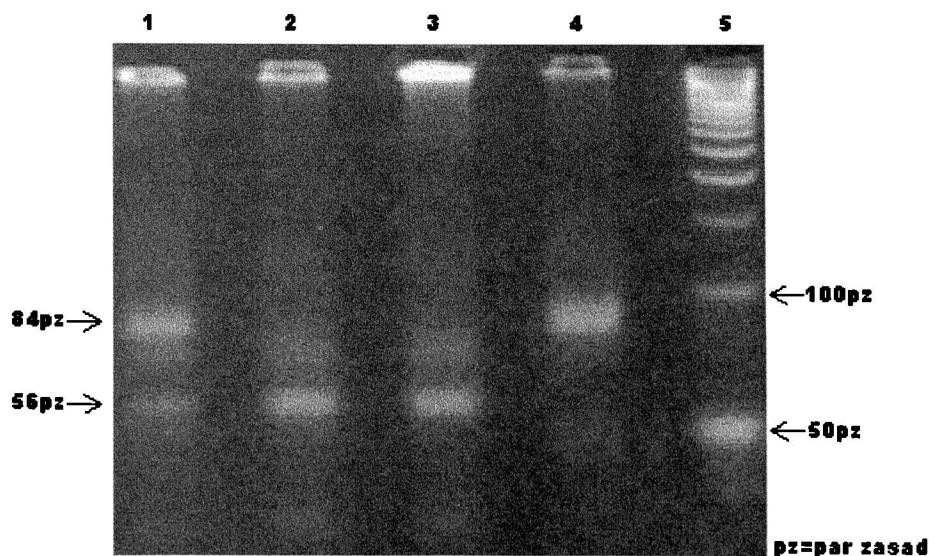
3.2.4. Analiza polimorfizmu 1298 A→C genu reduktazy

5,10-metylenotetrahydrofolianowej

Genotypowanie prowadzono według metodyki podanej przez van der Put [88], we własnej modyfikacji. Wystąpienie transwersji A→C w pozycji 1298 powoduje likwidację miejsca trawienia dla restryktazy *Mbo* II. Enzym ten rozpoznaje sekwencję GAAGA(N)^{8*}, występującą w allelu prawidłowym. W trakcie genotypowania postępowano według poniższego schematu:

- próbki DNA amplifikowano w objętości 25 µl, w mieszaninie zawierającej:
 - 3 µl rozpuszczonego DNA,
 - 0,75 µl (1,5 U) DyNAzyme II DNA Polymerase oraz 2,5 µl dołączonego do polimerazy buforu,
 - 0,25 µl 25 mM roztworu dNTP (Polgen),
 - 1,25 µl dimetylosulfotlenku,
 - po 1 µl 10 mM roztworu starterów o następujących sekwencjach:
 - CTT TGG GGA GCT GAA GGA CTA CTA C (sens),
 - CAC TTT GTG ACC ATT CCG GTT TG (antysens),
 - 15,25 µl wody.
- reakcję prowadzono w termocyklerze Perkin Elmer 480, stosując następujący profil termiczny:
 - denaturacja wstępna: 92°C - 4 minuty,
 - 35 cykli o następujących parametrach:
 - denaturacja: 92°C - 1 minuta,
 - przyłączanie starterów: 51°C - 1 minuta,
 - wydłużanie: 72°C - 30 sekund,
 - końcowe wydłużanie: 72°C - 7 minut,
- uzyskany produkt amplifikacji o długości 163 par zasad poddawano trawieniu, dodając do 8 µl produktu 2 µl buforu zawierające 5 U enzymu *Mbo* II.
- produkty trawienia rozdzielano przy pomocy elektroforezy na 4% żelu agarozowym METAPHOR.

W obecności genotypu 1298CC uzyskiwano fragmenty o długości 84, 31, 30 i 18 par zasad. W obecności genotypu 1298AA uzyskiwano fragmenty o długości 56, 31, 30, 28 i 18 par zasad. Różnicowanie genotypów 1298AA, 1298AC i 1298CC przedstawia rycina 4.



Rycina 4. Różnicowanie poszczególnych genotypów w zakresie polimorfizmu 1298A→C genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej - wynik elektroforezy na żelu agarozowym. Od strony lewej widoczne następujące próbki: 1 - heterozygota 1298AC (fragment o długości 84 par zasad odpowiadający allelowi 1298C i fragment o długości 56 par zasad odpowiadający allelowi 1298A), 2 i 3 - homozygoty 1298AA (fragment o długości 56 par zasad odpowiadający dwóm allelom 1298A), 4 - homozygota 1298CC (fragment o długości 84 par zasad odpowiadający dwóm allelom 1298C), 5 - znacznik (kolejne fragmenty o długości zwiększającej się o 50 par zasad). Ze względu na parametry żelu agarozowego niewidoczne są krótsze fragmenty nukleotydowe, nieistotne w różnicowaniu poszczególnych genotypów. W każdej próbce widoczny jest ponadto dodatkowy, stały, niespecyficzny fragment o długości ok. 70 par zasad.

3.2.5. Analiza polimorfizmu 2756 A→G genu syntazy metioniny

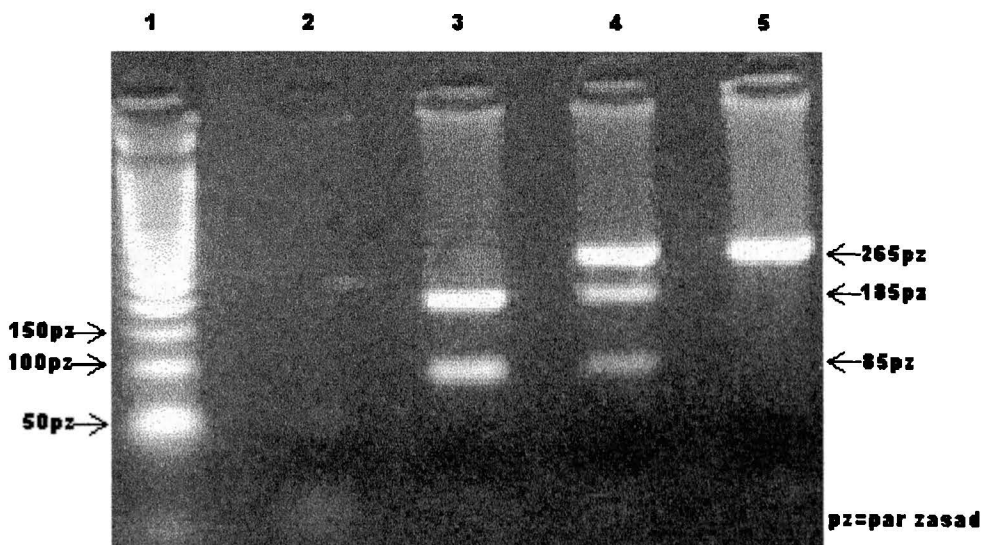
Genotypowanie prowadzono według metodyki podanej przez van der Put [91], we własnej modyfikacji.

Wystąpienie tranzycji A→G w pozycji 2756 genu syntazy metioniny powoduje powstanie miejsca trawienia dla restryktazy *Hae* III. Enzym ten rozpoznaje sekwencję GG*CC, nie występującą w allelu prawidłowym. W trakcie genotypowania postępowano według następującego schematu:

- próbki DNA amplifikowano w objętości 30 µl, w mieszaninie zawierającej:
 - 3 µl rozpuszczonego DNA,
 - 0,75 µl (1,5 U) DyNAzyme II DNA polymerase oraz 3 µl dołączonego do polimerazy buforu,
 - 0,6 µl 10 mM roztworu dNTP (FINNZYMES),
 - po 1 µl 20 mM roztworu starterów o sekwencjach:
 - GGT GTG TTC CCA GCT GTT AGA TG (sens),
 - GAC ACT GAA GAC CTC TGA TTT GAA C (antysens),
 - 20,65 µl wody.
- reakcję prowadzono w termocyklerze Perkin Elmer 480, stosując następujący profil termiczny:
 - denaturacja wstępna: 92°C - 4 minuty,
 - 30 cykli o następujących parametrach:
 - denaturacja: 92°C - 1 minuta,
 - przyłączanie starterów: 56°C - 1 minuta,

- wydłużanie: 72°C – 1 minuta i 30 sekund,
 - końcowe wydłużanie: 72°C - 7 minut,
- uzyskany produkt amplifikacji o długości 265 par zasad poddawano trawieniu, dodając do 8 µl produktu 2 µl buforu zawierającego 5 U enzymu *Hae* III. Produkty trawienia rozdzielano przy pomocy elektroforezy na 3% żelu agarozowym do rutynowego użytku, produkcji SIGMA Chemical Co.

W obecności genotypu 2756AA uzyskiwano nieprzecięty fragment o długości 265 par zasad. W obecności genotypu 2756GG otrzymywano dwa fragmenty o długości 180 i 85 par zasad. Różnicowanie genotypów 2756AA, 2756AG i 2756GG przedstawia rycina 5.



Rycina 5. Różnicowanie poszczególnych genotypów w zakresie polimorfizmu 2756A→G genu syntazy metioniny - wynik elektroforezy na żelu agarozowym. Od strony lewej widoczne następujące próbki: 1 - znacznik (kolejne fragmenty o długości zwiększającej się o 50 par zasad), 2 - kontrola ujemna (próbka nie zawierająca DNA), 3 - homozygota 2756GG (fragmenty o długości 85 i 180 par zasad odpowiadające dwóm allelom 2756G), 4 - heterozygota 2756AG (fragment o długości 265 par zasad odpowiadający allelowi 2756A oraz fragmenty o długości 180 i 85 par zasad odpowiadające allelowi 2756G), 5 - homozygota 2756AA (fragment o długości 265 par zasad odpowiadający dwóm allelom 2756A).

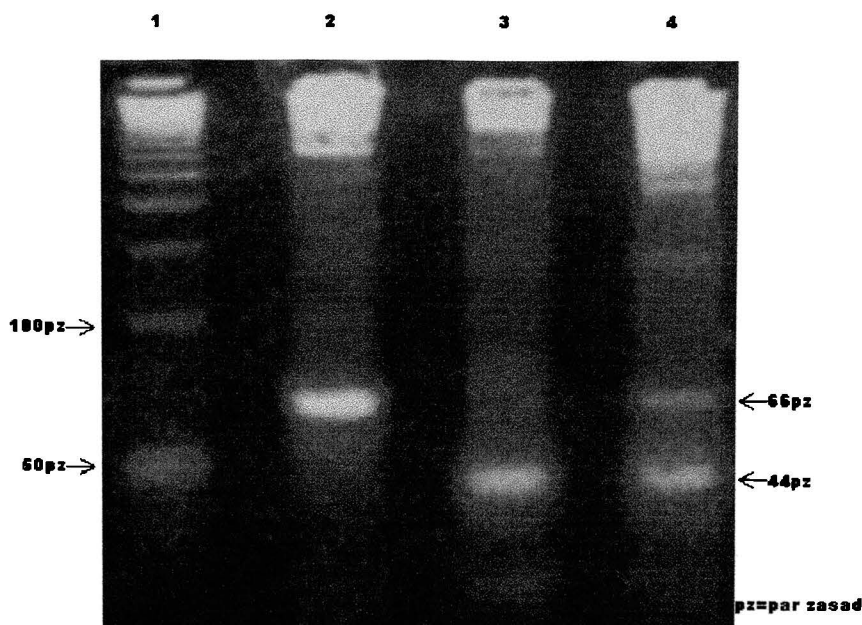
3.2.6. Analiza polimorfizmu 66 A→G genu reduktazy syntazy metioniny

Genotypowanie prowadzono według metodyki podanej przez Wilsona [103], we własnej modyfikacji. Przy zastosowaniu tej metody amplifikacja fragmentu genu reduktazy syntazy metioniny, powoduje wytworzenie sztucznego miejsca trawienia dla restryktazy *Nde* I, które występuje w obecności allela prawidłowego (przy braku tranzykcji A→G w pozycji 66 genu reduktazy syntazy metioniny). Endonukleaza *Nde* I rozpoznaje sekwencję CA*TATG. W trakcie genotypowania postępowano według następującego schematu:

- próbki DNA amplifikowano w objętości 30 µl, w mieszaninie zawierającej:
 - 3 µl rozpuszczonego DNA,
 - 0,3 µl (1,5 U) BIOTOOLS DNA polymerase oraz 3 µl dołączonego do polimerazy buforu,
 - 0,25 µl 25 mM roztworu dNTP (POLGEN),
 - 0,75 µl 1,5 mM roztworu MgCl₂,
 - po 1 µl 20 mM roztworu starterów o sekwencjach:
 - GCA AAG GCC ATC GCA GAA GAC AT (sens),
 - GTG AAG ATC TGC AGA AAA TCC ATG TA (antysens),
 - 20,7 µl wody.
- reakcję prowadzono w termocyklerze Perkin Elmer 480, stosując następujący profil termiczny:
 - denaturacja wstępna: 95°C - 7 minut,

- 35 cykli o następujących parametrach:
 - denaturacja: 95°C – 45 sekund,
 - przyłączanie starterów: 50°C – 45 sekund,
 - wydłużanie: 72°C – 45 sekund,
- końcowe wydłużanie: 72°C - 7 minut.
- uzyskany produkt amplifikacji o długości 66 par zasad poddawano trawieniu, dodając do 6 µl produktu 2 µl buforu zawierającego 20 U enzymu *Nde* I.
- produkty trawienia rozdzielano przy pomocy elektroforezy na 4% żelu agarozowym METAPHOR.

W obecności genotypu 66AA uzyskiwano 2 fragmenty, o długości 44 par zasad i 22 par zasad. W obecności genotypu 66GG nie obserwowano cięcia produktu amplifikacji. Różnicowanie genotypów 66AA, 66AG i 66GG przedstawia rycina 6.



Rycina 6. Różnicowanie poszczególnych genotypów w zakresie polimorfizmu 66A→G genu reduktazy syntazy metioniny - wynik elektroforezy na żelu agarozowym. Od strony lewej widoczne następujące próbki: 1 - znacznik (kolejne fragmenty o długości zwiększającej się o 50 par zasad), 2 - homozygota 66GG (fragment o długości 66 par zasad odpowiadający dwóm allelom 66G), 4 - homozygota 66AA (fragment o długości 44 par zasad odpowiadający dwóm allelom 66A), 4 - heterozygota 66AG (fragment o długości 66 par zasad odpowiadający allelowi 66G i fragment o długości 44 par zasad odpowiadający allelowi 66AA). Ze względu na parametry żelu agarozowego nie jest widoczny fragment o długości 22 par zasad, pochodzący z przecięcia allela 66A. Fragment ten nie jest jednak istotny dla różnicowania genotypów.

3.2.7. Statystyczne opracowanie wyników

W trakcie analizy uzyskanych wyników użyte zostały następujące metody statystyczne:

- statystyki opisowe,
- test χ^2 ,
- dokładny test Fishera,
- iloraz szans z określeniem 95% przedziału ufności.

Uzyskane wyniki uznawano za istotne statystycznie, jeżeli poziom istotności p był mniejszy od 0,05.



4. WYNIKI

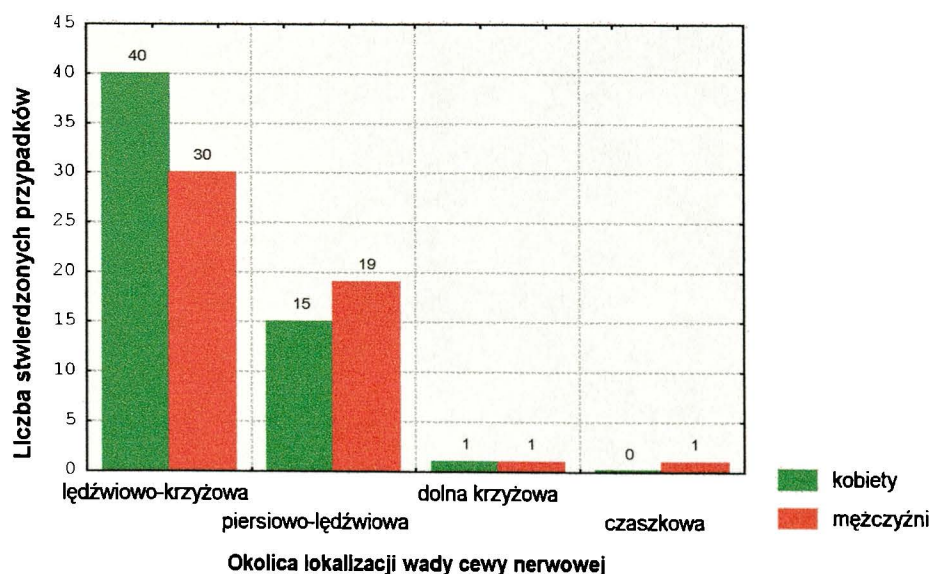
4.1. Charakterystyka badanej populacji

Spośród 130 rodzin obciążonych wystąpieniem wady cewy nerwowej, którym zaproponowano udział w badaniach, zgodę na uczestnictwo wyraziło 115 rodzin (88,4%). W 104 przypadkach badano matkę i dziecko (w tym w jednej z rodzin matkę i dwoje dzieci), w 3 przypadkach jedynie dorosłe dzieci, w 8 przypadkach na prośbę rodziców jedynie matki.

Wśród badanych 108 dzieci w wieku od 1 miesiąca do 23 lat, zarejestrowano 57 dziewcząt (52,8%) i 51 chłopców (47,2%). Z ciąży I pochodziło 53 dzieci (49,1%), z ciąży II - 26 dzieci (24,1%), z ciąży III - 17 dzieci (15,7%), z ciąży IV - 11 (10,2%), z ciąży V - 1 dziecko (0,9%). U 70 dzieci (64,8%) stwierdzono wadę w okolicy lędźwiowo – krzyżowej (poniżej segmentu L1 rdzenia kręgowego), u 35 (32,4%) w okolicy piersiowo – lędźwiowej (obejmującą segmenty rdzenia kręgowego na poziomie L1 i powyżej – do grupy tej zakwalifikowano również dziecko z wadą w okolicy szyjnej, na wysokości C2-C3), u 2 dzieci (1,9%) w dolnym odcinku okolicy krzyżowej (poniżej segmentu S2 rdzenia kręgowego) oraz u jednego dziecka (0,9%) encephalocoele. Wśród wad w zakresie kręgosłupa u 95 dzieci stwierdzono przepuklinę oponowo – rdzeniową, natomiast u 3 przepuklinę oponową (2 w okolicy lędźwiowo – krzyżowej, 1 przepuklinę boczną w okolicy piersiowo – lędźwiowej) i u 9 dzieci lipomyelocoele.

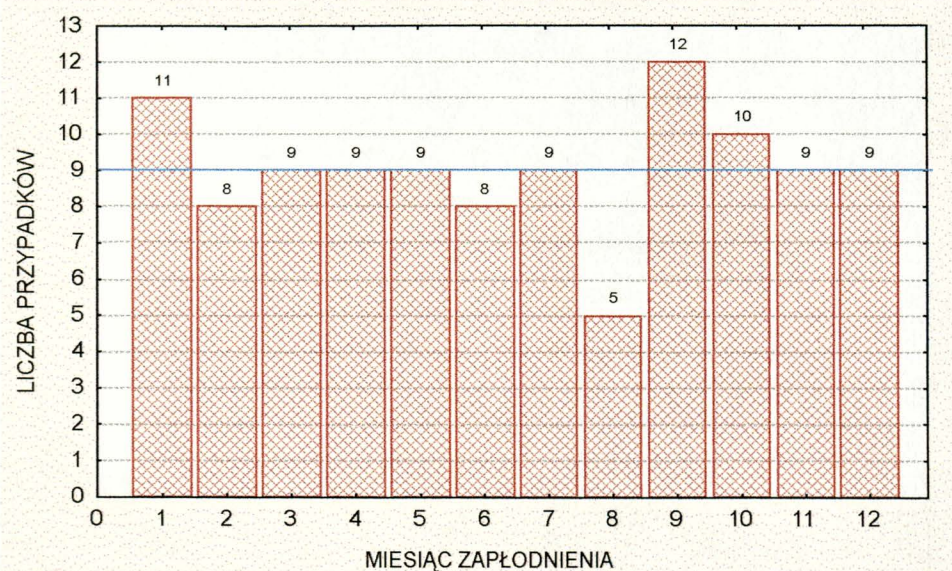
W 15 rodzinach, które nie wyraziły zgody na badanie, w 11 przypadkach u dziecka wystąpiła wada w okolicy lędźwiowo-krzyżowej a w 4 przypadkach w okolicy piersiowo-lędźwiowej.

Rycina 7 przedstawia grupę biorących udział w badaniu dzieci w zależności od płci i lokalizacji wady cewy nerwowej.



Rycina 7. Struktura grupy badanych dzieci w zależności od płci i lokalizacji wady

Populację dzieci analizowano pod względem sezonowości występowania wad cewy nerwowej. Na podstawie daty urodzenia i wieku płodowego przy urodzeniu określono miesiąc rozpoczęcia się ciąży, z której pochodziło badane dziecko. Najmniej ciąż rozpoczęło się w sierpniu (5), najwięcej we wrześniu (12), przy średniej 9 w miesiącu. Różnica pomiędzy rozkładem obserwowanym i oczekiwanym nie była istotna statystycznie ($p=0,98$ w teście χ^2). Dokładne dane przedstawia rycina 8.

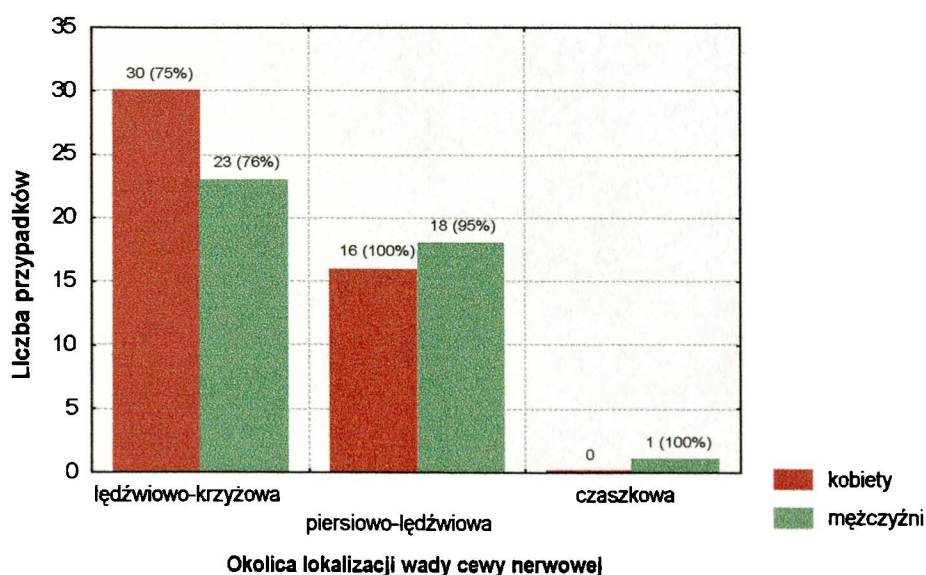


Rycina 8. Charakterystyka populacji badanych dzieci w zależności od miesiąca zapłodnienia

Wśród badanych dzieci stwierdzono obecność wodogłowia u 88 dzieci (81,5%), w tym u 34 (97,1%) dzieci z wadą w okolicy piersiowo – łędźwiowej, u 53 (75,7%) dzieci z wadą w okolicy łędźwiowo – krzyżowej i u dziecka z przepukliną czaszkową. Wodogłowia nie stwierdzono u dziecka z boczną przepukliną oponową okolicy piersiowo - łędźwiowej, u 17 dzieci z wadą w okolicy łędźwiowo - krzyżowej (w tym u dwojga z przepukliną oponową), u 2 dzieci z wadą w dolnej okolicy krzyżowej. Wśród 88 dzieci z wodogłowiem obecność zespołu Arnoldda-Chiariego stwierdzono u 83 dzieci (94,3%). Wodogłowie przy braku radiologicznych cech zespołu Arnoldda-Chiariego obserwowano u 1 dziecka z wadą w okolicy piersiowo - łędźwiowej, 1 dziecka z wadą w okolicy łędźwiowo - krzyżowej i u dziecka z przepukliną mózgową. W dwóch przypadkach nie można było ocenić ewentualnej

obecności zespołu Arnalda-Chiariego ze względu na brak wystarczającej dokumentacji radiologicznej.

Rycina 9 przedstawia strukturę grupy dzieci z wodogłowieiem z uwzględnieniem lokalizacji wady i płci dziecka.



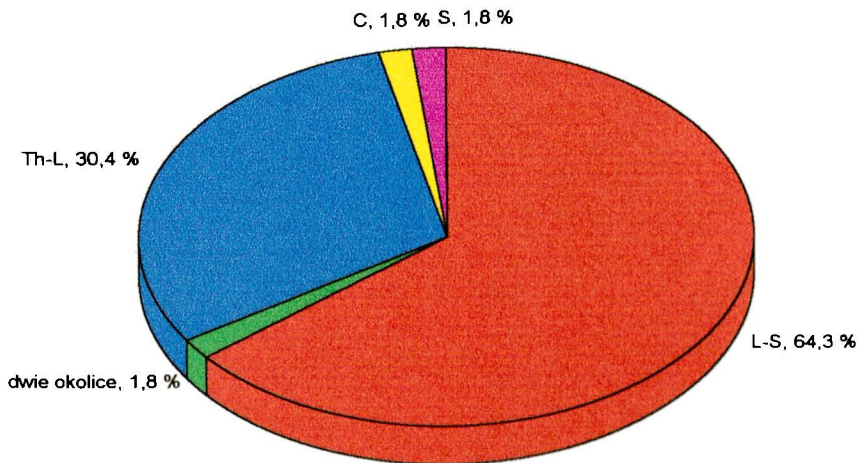
Rycina 9. Grupa dzieci z wodogłowieiem - podział z uwzględnieniem lokalizacji wady cewy nerwowej i płci dziecka

Wśród dzieci bez wodogłowieia u 9 stwierdzono przepuklinę oponowo-rdzeniową okolicy lędźwiowo - krzyżowej, u 8 lipomyelocoele (w tym u 6 w okolicy lędźwiowo - krzyżowej i u 2 w dolnej okolicy krzyżowej) oraz u 3 dzieci przepuklinę oponową.

Spośród biorących udział w badaniu matek, 72 urodziły dziecko z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej, 36 w okolicy piersiowo-lędźwiowej, 2 w dolnej okolicy

krzyżowej, 2 matki urodziły dziecko z encephalocoele. Wśród matek dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej 3 urodziły drugie dziecko z wadą - w jednej rodzinie była to również wada okolicy piersiowo - lędźwiowej, w drugiej bezmózgowie (dzieci te zmarły przed rozpoczęciem niniejszego badania), w trzeciej u dwojga uczestniczących w badaniu dzieci stwierdzono odpowiednio przepuklinę oponową - rdzeniową okolicy szyjnej i przepuklinę oponową okolicy lędźwiowo - krzyżowej).

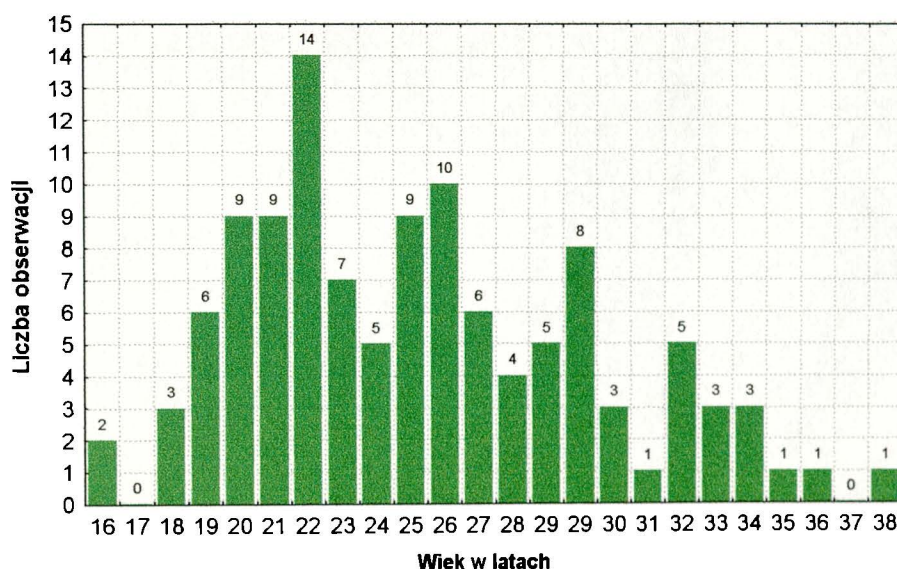
Rycina 10 przedstawia strukturę grupy matek w zależności od lokalizacji wady u dziecka, z uwzględnieniem urodzenia dwojga dzieci z wadą w różnych lokalizacjach.



L-S - okolica lędźwiowo-krzyżowa; Th-L - okolica piersiowo-lędźwiowa;
S-dolny odcinek okolicy krzyżowej; C - wada w obrębie czaszki

Rycina 10. Grupa matek - podział ze względu na lokalizację wady u dziecka

W momencie urodzenia uczestniczących w badaniu dzieci wiek matek wynosił od 16 do 39 lat (rycina 11). W badanej populacji matek stwierdzono 3 przypadki padaczki (w jednym przypadku w ciąży leczenie prowadzono preparatem kwasu walproinowego, w dwóch pozostałych preparatem karbamazepiny). Jedna z matek leczona była w ciąży z powodu cukrzycy typu D. Na podstawie przeprowadzonego wywiadu u żadnej z matek w trakcie ciąży nie stwierdzono narażenia na hipertermię, ani innych czynników mogących mieć związek z wystąpieniem wady cewy nerwowej.



Rycina 11. Wiek badanych matek w momencie urodzenia dziecka z wadą
(w przypadkach wad u dwojga dzieci rejestracja wieku
matki dotyczyła oddzielnie obu przypadków)

4.2. Analiza rozkładu polimorfizmu 677C→T genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej w badanych populacjach

W zakresie polimorfizmu 677C→T przeprowadzono genotypowanie w grupach 112 matek i 108 dzieci. Rozkład poszczególnych genotypów w populacjach matek i dzieci przedstawia tabela III.

Tabela III. Polimorfizm 677C→T w badanych grupach, z uwzględnieniem punktów zamykania się cewy nerwowej i dwukrotnego urodzenia dziecka z wadą w różnych lokalizacjach

Badana grupa	Genotyp-liczba przypadków		
	677CC	677CT	677TT
Matki (cała grupa)	58	38	16
Matki dzieci z wadą w dolnym odcinku okol. krzyżowej	0	1	1
Matki dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej	43	23	6
Matki dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej	12	14	8
Matki dzieci z przepukliną czaszkową	1	0	1
Matki dwojga dzieci z wadą w różnych lokalizacjach	2	0	0
Dzieci (cała grupa)	42	52	14
Dzieci z wadą w dolnym odcinku okolicy krzyżowej	0	1	1
Dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej	30	33	7
Dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej	12	17	6
Dzieci z przepukliną czaszkową	0	1	0

Na podstawie obserwowanego rozkładu genotypów w grupach matek (cała grupa) i dzieci (cała grupa) wyliczono częstość alleliczną dla allele 677T w analizowanych populacjach. Wynosiła ona dla populacji matek 0,31 a dla populacji dzieci 0,37.

Następnie na podstawie prawa Hardy'ego-Weinberga wyliczono oczekiwany rozkład genotypów w badanych grupach i przy pomocy testu χ^2 oceniono zgodność rozkładu obserwowanego z oczekiwanym. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy obserwowanymi i oczekiwanymi rozkładami poszczególnych genotypów w badanych grupach matek ($p = 0,09$) i dzieci ($p = 0,94$).

Kolejnym etapem badania była analiza częstości genotypu 677TT w badanych populacjach jako całości i w poszczególnych podgrupach matek i dzieci (z uwzględnieniem hipotetycznych punktów zamykania się cewy nerwowej i urodzenia przez 2 matki dwojga dzieci z wadą cewy nerwowej w różnych lokalizacjach).

Obserwowane częstości genotypu 677TT porównano z częstością tego genotypu w grupie 310 osób z populacji kontrolnej badanej w II Katedrze Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (w grupie tej stwierdzono 2 allele 677C u 201 osób, po jednym allele 677T i 677C u 94 osób i 2 allele 677T u 15 osób) [82]. Różnice pomiędzy grupami matek i dzieci w porównaniu do grupy kontrolnej analizowano przy pomocy dokładnego testu Fishera i określając iloraz szans z 95% przedziałem ufności. Stwierdzono

statystycznie istotną różnicę pomiędzy częstością homozygot (genotyp 677TT) w grupach matek (cała grupa) w stosunku do populacji kontrolnej (iloraz szans = 3,27; 95% przedział ufności = 1,58-6,78; p w dokładnym teście Fishera = 0,0017) i dzieci (cała grupa) w stosunku do populacji kontrolnej (iloraz szans = 2,92; 95% przedział ufności = 1,38-6,19; p w dokładnym teście Fishera = 0,0059). Dokładna analiza genotypów w poszczególnych podgrupach wykazała jednak brak istotności statystycznej przy porównaniu grupy matek dzieci z wadą w okolicy łędźwiowo – krzyżowej z grupą kontrolną, jak również grupy dzieci z taką wadą z grupą kontrolną. Statystycznie istotne były natomiast różnice pomiędzy grupą matek dzieci z wadą w okolicy piersiowo – łędźwiowej i grupą kontrolną (iloraz szans = 6,05; 95% przedział ufności = 2,41-15,18; p w dokładnym teście Fishera = 0,0007), jak również między grupą dzieci z wadą w tej okolicy i grupą kontrolną (iloraz szans = 4,06; 95% przedział ufności = 1,51-10,90; p w dokładnym teście Fishera = 0,0125). Ze względu na małą liczebność grup, w podobny sposób nie analizowano częstości genotypu 677TT u matek dzieci z wadą w dolnym odcinku okolicy krzyżowej, dzieci z taką lokalizacją wady, matek dzieci z przepukliną czaszkową oraz dzieci z tą lokalizacją wady, a także w grupie matek, które urodziły dwoje dzieci z wadą cewy nerwowej w różnych lokalizacjach i dzieci z rodzin z dwoma przypadkami wady cewy nerwowej. Warte podkreślenia jest jednak wystąpienie genotypu 677TT u jednej z dwóch matek dzieci z wadą w dolnym odcinku okolicy krzyżowej, jednego z dwojga dzieci z wadą w tej lokalizacji i u jednej z dwóch matek dzieci z encephalocoele. Ciekawą obserwację stanowi również fakt braku genotypu 677TT w grupach matek dwojga dzieci z wadą cewy nerwowej oraz dzieci

z rodzin z dwoma przypadkami wady cewy nerwowej. W tabeli 4 zestawiono wartości ilorazów szans, 95% przedziałów ufności i poziomów istotności w dokładnym teście Fishera, uzyskane na podstawie porównania częstości genotypu 677TT w badanych grupach.

Tabela IV. Porównanie częstości homozygot w zakresie polimorfizmu 677 C→T (genotyp 677TT) w grupach matek i dzieci wobec grupy kontrolnej

Badana grupa	Iloraz szans	95% przedział ufności	Wartość p (dokładny test Fishera)
Matki (cała grupa)	3,27	1,58-6,78	0,0017
Matki dzieci z wadą w okolicy łędźwiowo-krzyżowej	1,78	0,69-4,62	0,1844
Matki dzieci z wadą w okolicy piersiowo-łędźwiowej	6,05	2,41-15,18	0,0007
Dzieci (cała grupa)	2,92	1,38-6,19	0,0059
Dzieci z wadą w okolicy łędźwiowo-krzyżowej	2,18	0,88-5,42	0,0880
Dzieci z wadą w okolicy piersiowo-łędźwiowej	4,06	1,51-10,90	0,0125

Dodatkowo analizowano częstości genotypu 677TT w grupach dzieci bez wodogłowia i z wodogłowiem. Wynosiły one odpowiednio 30% (6 przypadków) oraz 9,1% (8 przypadków) - dokładne dane przedstawia tabela V. Różnica pomiędzy obserwowanymi częstościami była statystycznie istotna (iloraz szans = 4,28; 95% przedział ufności = 1,35-13,58; p w dokładnym teście Fishera = 0,0219).

Tabela V. Rozkład genotypów w zakresie polimorfizmu 677C→T w grupach dzieci z wodogłowiem i bez wodogłowia

Badana grupa	Genotyp (liczba przypadków)		
	677CC	677CT	677TT
Dzieci z wodogłowiem	37	43	8
Dzieci bez wodogłowia	5	9	6

4.3. Analiza rozkładu polimorfizmu 1298A→C genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej w badanych populacjach

W zakresie polimorfizmu 1298A→C przeprowadzono genotypowanie w grupach 112 matek i 108 dzieci. Rozkład poszczególnych genotypów w populacjach matek i dzieci przedstawia tabela VI.

Tabela VI. Polimorfizm 1298A→C w badanych grupach, z uwzględnieniem punktów zamykania się cewy nerwowej i dwukrotnego urodzenia dziecka z wadą w różnych lokalizacjach

Badana grupa	Genotyp-liczba przypadków		
	1298AA	1298AC	1298CC
Matki (cała grupa)	63	46	3
Matki dzieci z wadą w dolnym odcinku okol. krzyżowej	2	0	0
Matki dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej	36	33	3
Matki dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej	21	13	0
Matki dzieci z przepukliną czaszkową	2	0	0
Matki dwojga dzieci z wadą w różnych lokalizacjach	2	0	0
Dzieci (cała grupa)	76	30	2
Dzieci z wadą w dolnym odcinku okolicy krzyżowej	2	0	0
Dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej	47	21	2
Dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej	26	9	0
Dzieci z przepukliną czaszkową	1	0	0

Na podstawie obserwowanego rozkładu genotypów w grupach matek (cała grupa) i dzieci (cała grupa) wyliczono częstość alleliczną dla allele 1298C w analizowanych populacjach. Wynosiła ona dla populacji matek 0,23 a dla populacji dzieci 0,16.

Następnie na podstawie prawa Hardy'ego-Weinberga wyliczono oczekiwany rozkład genotypów w badanych grupach i przy pomocy testu χ^2 oceniono

zgodność rozkładu obserwowanego z oczekiwanym. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy obserwowanymi i oczekiwanymi rozkładami poszczególnych genotypów w badanych grupach matek ($p = 0,13$) i dzieci ($p = 0,85$).

Kolejnym etapem badania była analiza częstości genotypu 1298CC w badanych populacjach jako całości i w poszczególnych podgrupach matek i dzieci (z uwzględnieniem hipotetycznych punktów zamykania się cewy nerwowej i urodzenia przez 2 matki dwojga dzieci z wadą cewy nerwowej w różnych lokalizacjach).

Obserwowane częstości genotypu 1298CC porównano z częstością występowania tego genotypu w grupie 310 osób z populacji kontrolnej badanej w II Katedrze Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (w grupie tej stwierdzono 2 allele 1298A u 181 osób, po jednym allele 1298A i 1298C u 112 osób i 2 allele 1298C u 17 osób) [82]. Obserwowano niższą częstość genotypu 1298CC w grupach matek (2,7%) i dzieci (1,9%) w porównaniu do grupy kontrolnej (5,5%), jednak różnice te nie były istotne statystycznie zarówno w odniesieniu do całej grupy matek (iloraz szans = 0,47; 95% przedział ufności = 0,14-1,54; p w dokładnym teście Fishera = 0,1753) jak również całej grupy dzieci (iloraz szans = 0,32; 95% przedział ufności = 0,08-1,28; p w dokładnym teście Fishera = 0,0917), a także podgrup matek dzieci z wadami w okolicach łędźwiowo-krzyżowej i piersiowo-łędźwiowej oraz podgrup dzieci z wadami w tych lokalizacjach (porównywanych z grupą kontrolną). Genotyp 1298CC stwierdzono jedynie w podgrupach matek dzieci z wadą w okolicy łędźwiowo-krzyżowej i dzieci

z taką lokalizacją wady. Ze względu na małą liczebność grup, w podobny sposób nie analizowano częstości genotypu 1298CC u matek dzieci z wadą w dolnym odcinku okolicy krzyżowej, dzieci z taką lokalizacją wady, matek dzieci z przepukliną czaszkową oraz dzieci z tą lokalizacją wady, a także w grupie matek, które urodziły dwoje dzieci z wadą cewy nerwowej w różnych lokalizacjach oraz dzieci z rodzin z dwoma przypadkami wady cewy nerwowej (w dwóch ostatnich grupach nie stwierdzono ponadto genotypu 1298CC). W tabeli VII zestawiono wartości ilorazów szans, 95% przedziałów ufności i poziomów istotności w dokładnym teście Fishera, uzyskane na podstawie porównania częstości genotypu 1298CC w badanych grupach.

Tabela VII. Porównanie częstości homozygot w zakresie polimorfizmu 1298 A→C (genotyp 1298CC) w grupach matek i dzieci wobec grupy kontrolnej

Badana grupa	Iloraz szans	95% przedział ufności	Wartość p (dokładny test Fishera)
Matki (cała grupa)	0,47	0,14-1,54	0,1753
Matki dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej	0,74	0,22-2,45	0,4595
Matki dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej	0,25	0,02-2,52	0,163
Dzieci (cała grupa)	0,32	0,08-1,28	0,0917
Dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej	0,5	0,12-2,01	0,2859
Dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej	0,24	0,02-2,45	0,155

Ze względu na niską częstość genotypu 1298CC w grupie dzieci z wodogłowie (1 przypadek) oraz bez wodogłowia (również 1 przypadek) nie prowadzono dodatkowej analizy statystycznej w tych grupach.

4.4. Analiza rozkładu podwójnej heterozygotyczności w zakresie polimorfizmów 677C→T i 1298A→C genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej (genotyp 677CT/1298AC) w badanych populacjach.

W związku z obserwowanym obniżeniem aktywności enzymatycznej reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej w przypadku obecności genotypu 677CT/1298AC [88] w badanych grupach analizowano częstość takiego genotypu. W grupie 112 matek obecność obu mutacji stwierdzono u 17 osób (11 przypadków u matek dzieci z wadą w okolicy łędźwiowo-krzyżowej i 6 u matek dzieci z wadą w okolicy piersiowo-łędźwiowej). Spośród 108 badanych dzieci, genotyp 677CT/1298AC stwierdzono w 10 przypadkach (8 dzieci z wadą w okolicy łędźwiowo-krzyżowej i 2 dzieci z wadą w okolicy piersiowo-łędźwiowej). W 310-osobowej grupie kontrolnej, badanej w II Katedrze Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego genotyp taki występował w 41 przypadkach [82]. Różnice pomiędzy częstościami występowania analizowanego genotypu w grupach matek i dzieci w stosunku do grupy kontrolnej nie osiągnęły istotności statystycznej. Wartości ilorazów szans z 95% przedziałem ufności oraz wartości p w dokładnym teście Fishera przedstawia tabela VIII.

Tabela VIII. Porównanie częstości podwójnej heterozygotyczności w zakresie polimorfizmów 677C→T i 1298 A→C (genotyp 677CT/1298AC) w grupach matek i dzieci wobec grupy kontrolnej

Badana grupa	Iloraz szans	95% przedział ufności	Wartość p (dokładny test Fishera)
Matki (cała grupa)	1,17	0,64-2,14	0,3557
Matki dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej	1,18	0,58-2,4	0,3847
Matki dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej	1,4	0,56-3,49	0,312
Dzieci (cała grupa)	0,66	0,32-1,36	0,1813
Dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej	0,84	0,38-1,86	0,4297
Dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej	0,39	0,1-1,54	0,1565

Dodatkowo oceniano częstość genotypu 677CT/1298AC w zależności od obecności wodogłowia. W grupie dzieci bez wodogłowia genotyp taki stwierdzono w 3 przypadkach (15%), w grupie dzieci z wodogłowiem w 7 przypadkach (8%). Różnica ta nie była istotna statystycznie (iloraz szans = 2,04; 95% przedział ufności = 0,52-7,94; p w dokładnym teście Fishera = 0,2727).

Genotyp 677CT/1298AC nie występował w rodzinach, w których urodziło się dwoje dzieci z wadą cewy nerwowej.

W badanej populacji nie stwierdzono ponadto występowania genotypów 677TT/1298AC, 677CT/1298CC oraz 677TT/1298CC, mogących teoretycznie prowadzić do znacznego obniżenia aktywności enzymatycznej reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej.

4.5. Analiza rozkładu polimorfizmu 2756A→G genu syntazy metioniny w badanych populacjach

W zakresie polimorfizmu 2756A→G przeprowadzono genotypowanie w grupach 112 matek, 108 dzieci i 100 osób z grupy kontrolnej. Rozkład poszczególnych genotypów w populacjach matek, dzieci i w grupie kontrolnej przedstawia tabela IX.

Na podstawie obserwowanego rozkładu genotypów w grupach matek (cała grupa), dzieci (cała grupa) i w grupie kontrolnej wyliczono częstość alleliczną dla allelela 2756G w analizowanych populacjach. Wynosiła ona dla populacji matek 0,2, dla populacji dzieci 0,18 i dla populacji kontrolnej 0,16.

Następnie na podstawie prawa Hardy'ego-Weinberga wyliczono oczekiwany rozkład genotypów w badanych grupach i przy pomocy testu χ^2 oceniono zgodność rozkładu obserwowanego z oczekiwanym. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy obserwowanymi i oczekiwanymi rozkładami poszczególnych genotypów w badanych grupach matek ($p = 0,55$), dzieci ($p = 0,95$) i w grupie kontrolnej ($p = 0,69$).

Tabela IX. Polimorfizm 2756A→G w badanych grupach, z uwzględnieniem punktów zamykania się cewy nerwowej i dwukrotnego urodzenia dziecka z wadą w różnych lokalizacjach

Badana grupa	Genotyp-liczba przypadków		
	2756AA	2756AG	2756GG
Matki (cała grupa)	72	33	7
Matki dzieci z wadą w dolnym odcinku ok. krzyżowej	1	1	0
Matki dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej	43	23	6
Matki dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej	24	9	1
Matki dzieci z przepukliną czaszkową	2	0	0
Matki dwojga dzieci z wadą w różnych lokalizacjach	2	0	0
Dzieci (cała grupa)	73	31	4
Dzieci z wadą w dolnym odcinku okolicy krzyżowej	2	0	0
Dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej	44	23	3
Dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej	26	8	1
Dzieci z przepukliną czaszkową	1	0	0
Grupa kontrolna	71	25	4

Kolejnym etapem badania była analiza częstości genotypu 2756GG w badanych populacjach jako całości i w poszczególnych podgrupach matek i dzieci (z uwzględnieniem hipotetycznych punktów zamykania się cewy nerwowej i

urodzenia przez 2 matki dwojga dzieci z wadą cewy nerwowej w różnych lokalizacjach).

Częstości genotypu 2756GG obserwowane u matek i dzieci z rodzin obciążonych wadą cewy nerwowej porównano z częstością tego genotypu w grupie 100 osób z populacji kontrolnej. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami analizowano przy pomocy dokładnego testu Fishera i określając iloraz szans z 95% przedziałem ufności. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy częstością homozygot (genotyp 2756GG) w grupach matek (cała grupa) w stosunku do populacji kontrolnej (iloraz szans = 1,6; 95% przedział ufności = 0,48-5,27, p w dokładnym teście Fishera = 0,3373) i dzieci (cała grupa) w stosunku do populacji kontrolnej (iloraz szans = 0,92; 95% przedział ufności = 0,24-3,46, p w dokładnym teście Fishera = 0,5959). Dokładna analiza genotypów w poszczególnych podgrupach wykazała również brak istotności statystycznej przy porównaniu grup matek dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo – krzyżowej i grupy kontrolnej, jak również dzieci z taką wadą i grupy kontrolnej, a także przy porównaniu grupy matek dzieci z wadą w okolicy piersiowo – lędźwiowej i grupy kontrolnej oraz dzieci z wadą w tej okolicy i grupy kontrolnej. Ze względu na małą liczebność grup, w podobny sposób nie analizowano częstości genotypu 2756GG u matek oraz dzieci z wadą w dolnym odcinku okolicy krzyżowej, matek oraz dzieci z przepukliną czaszkową, a także w grupie matek, które urodziły dwoje dzieci z wadą cewy nerwowej w różnych lokalizacjach oraz dzieci z rodzin z dwoma przypadkami wady cewy nerwowej. Warto jedynie zauważyć, że w żadnej z tych podgrup nie stwierdzono genotypu 2756GG. W tabeli X zestawiono wartości ilorazów szans,

95% przedziałów ufności i poziomów istotności w dokładnym teście Fishera, uzyskane na podstawie porównania częstości genotypu 2756GG w badanych grupach.

Tabela X. Porównanie częstości homozygot w zakresie polimorfizmu 2756A→G (genotyp 2756GG) w grupach matek i dzieci wobec grupy kontrolnej

Badana grupa	Iloraz szans	95% przedział ufności	Wartość p (dokładny test Fishera)
Matki (cała grupa)	1,6	0,48-5,27	0,3373
Matki dzieci z wadą w okolicy łędźwiowo-krzyżowej	2,18	0,63-7,47	0,1921
Matki dzieci z wadą w okolicy piersiowo-łędźwiowej	0,72	0,1-5	0,6248
Dzieci (cała grupa)	0,92	0,24-3,46	0,5959
Dzieci z wadą w okolicy łędźwiowo-krzyżowej	1,07	0,26-4,43	0,6068
Dzieci z wadą w okolicy piersiowo-łędźwiowej	0,7	0,1-4,85	0,613

Dodatkowo analizowano częstości genotypu 2756GG w grupach dzieci bez wodogłowia i z wodogłowiem. Wynosiły one odpowiednio 5% (1 przypadek) i 3,4% (3 przypadki) - dokładne dane przedstawia tabela XI. Różnica w zakresie częstości badanego genotypu pomiędzy oboma grupami nie była istotna statystycznie (iloraz szans = 1,49; 95% przedział ufności = 0,2-10,95; p w dokładnym teście Fishera = 0,5452).

Tabela XI. Rozkład genotypów w zakresie polimorfizmu 2756A→G w grupach dzieci z wodogłowiem i bez wodogłowia

Badana grupa	Genotyp (liczba przypadków)		
	2756AA	2756AG	2756GG
Dzieci z wodogłowiem	58	27	3
Dzieci bez wodogłowia	15	4	1

4.6. Analiza rozkładu polimorfizmu 66A→G genu reduktazy syntazy metioniny w badanych populacjach

W zakresie polimorfizmu 66A→G przeprowadzono genotypowanie w grupach 112 matek, 108 dzieci i 100 osób z populacji kontrolnej. Rozkład poszczególnych genotypów w zakresie polimorfizmu 66A→G w populacjach matek, dzieci i w grupie kontrolnej przedstawia tabela XII.

Tabela XII. Polimorfizm 66A→G w badanych grupach, z uwzględnieniem punktów zamykania się cewy nerwowej i dwukrotnego urodzenia dziecka z wadą w różnych lokalizacjach

Badana grupa	Genotyp-liczba przypadków		
	66AA	66AG	66GG
Matki (cała grupa)	42	58	12
Matki dzieci z wadą w dolnym odcinku okol. krzyżowej	1	1	0
Matki dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej	31	31	10
Matki dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej	10	22	2
Matki dzieci z przepukliną czaszkową	0	2	0
Matki dwojga dzieci z wadą w różnych lokalizacjach	0	2	0
Dzieci (cała grupa)	47	50	11
Dzieci z wadą w dolnym odcinku okolicy krzyżowej	1	1	0
Dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej	27	33	10
Dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej	18	16	1
Dzieci z przepukliną czaszkową	1	0	0
Grupa kontrolna	66	29	5

Na podstawie obserwowanego rozkładu genotypów w grupach matek (cała grupa), dzieci (cała grupa) i w grupie kontrolnej wyliczono częstość alleliczną dla allele 66G w analizowanych populacjach. Wynosiła ona dla populacji matek 0,37, dla populacji dzieci 0,33 a dla populacji kontrolnej 0,19.

Następnie wykorzystując prawo Hardy'ego-Weinberga wyliczono oczekiwany rozkład genotypów w badanych grupach i przy pomocy testu χ^2 oceniono zgodność rozkładu obserwowanego z oczekiwanym. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy obserwowanymi i oczekiwanymi rozkładami poszczególnych genotypów w badanych grupach matek ($p = 0,45$), dzieci ($p = 0,9$) i w grupie kontrolnej ($p = 0,77$).

Kolejnym etapem badania była analiza częstości genotypu 66GG w badanych populacjach jako całości i w poszczególnych podgrupach matek i dzieci (z uwzględnieniem hipotetycznych punktów zamykania się cewy nerwowej i urodzenia przez 2 matki dwojga dzieci z wadą cewy nerwowej w różnych lokalizacjach).

Częstości genotypu 66GG obserwowane w grupach matek i dzieci porównano z częstością tego genotypu w grupie 100 osób z populacji kontrolnej. Różnice pomiędzy poszczególnymi grupami analizowano przy pomocy dokładnego testu Fishera i określając iloraz szans z 95% przedziałem ufności. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy częstością homozygot (genotyp 66GG) w grupach matek (cała grupa) w stosunku do populacji kontrolnej (iloraz szans = 2,28; 95% przedział ufności = 0,8-6,43; p w dokładnym teście Fishera = 0,1) i dzieci (cała grupa) w stosunku do populacji kontrolnej (iloraz szans = 2,15; 95% przedział ufności = 0,75-6,15, p w dokładnym teście Fishera = 0,1264). Dokładna analiza genotypów w poszczególnych podgrupach wykazała jednak istotne statystycznie różnice przy porównaniu grup matek dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo – krzyżowej i grupy kontrolnej (iloraz szans = 3,06; 95% przedział ufności = 1,04-

8,97; p w dokładnym teście Fishera = 0,0396), jak również dzieci z taką wadą i grupy kontrolnej (iloraz szans = 3,16; 95% przedział ufności = 1,08-9,28; p w dokładnym teście Fishera = 0,0348). Brak statystycznie istotnej różnicy w stosunku do kontroli obserwowano natomiast w przypadku genotypu 66GG w grupie matek dzieci z wadą w okolicy piersiowo – łędźwiowej, jak również wśród dzieci z wadą w tej okolicy. Ze względu na małą liczebność grup nie analizowano częstości genotypu 66GG u matek oraz dzieci z wadą w dolnym odcinku okolicy krzyżowej, matek oraz dzieci z przepukliną czaszkową, a także w grupie matek, które urodziły dwoje dzieci z wadą cewy nerwowej w różnych lokalizacjach oraz dzieci z rodzin z dwoma przypadkami wady cewy nerwowej. Warto jedynie zauważyć, że w żadnej z tych podgrup nie stwierdzono genotypu 66GG. W tabeli XIII zestawiono wartości ilorazów szans, 95% przedziałów ufności i poziomy istotności w dokładnym teście Fishera, uzyskane na podstawie porównania częstości genotypu 66GG w badanych grupach.

Tabela XIII. Porównanie częstości homozygot w zakresie polimorfizmu 66A→G (genotyp 66GG) w grupach matek i dzieci wobec grupy kontrolnej

Badana grupa	Iloraz szans	95% przedział ufności	Wartość p (dokładny test Fishera)
Matki (cała grupa)	2,28	0,8-6,43	0,1
Matki dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej	3,06	1,04-8,97	0,0396
Matki dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej	1,18	0,25-5,55	0,5577
Dzieci (cała grupa)	2,15	0,75-6,15	0,1264
Dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej	3,16	1,08-9,28	0,0348
Dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej	0,55	0,08-3,72	0,5095

Dodatkowo analizowano częstość genotypu 66GG w grupach dzieci bez wodogłowa i z wodogłowiem. Wynosiły one odpowiednio 20% (4 przypadki) i 8% (7 przypadków) - dokładne dane przedstawia tabela XIV. Różnica ta nie była jednak istotna statystycznie (iloraz szans = 2,89; 95% przedział ufności = 0,81-10,3; p w dokładnym teście Fishera = 0,1185).

Tabela XIV. Rozkład genotypów w zakresie polimorfizmu 66A→G w grupach dzieci z wodogłowie i bez wodogłowia

Badana grupa	Genotyp (liczba przypadków)		
	66AA	66AG	66GG
Dzieci z wodogłowie	39	42	7
Dzieci bez wodogłowia	8	8	4

4.7. Wyniki genotypowania u matek chorych na padaczkę lub cukrzycę

W badanej populacji matek stwierdzono 3 przypadki padaczki (leczonej w ciąży u jednej z uczestniczek preparatem kwasu walproinowego a u dwóch pozostałych preparatem karbamazepiny). U pierwszej z uczestniczek (kwas walproinowy) stwierdzono obecność genotypu 66GG w zakresie polimorfizmu genu reduktazy syntazy metioniny. U wszystkich 3 matek stwierdzono natomiast genotyp 677CT/1298AC (polimorfizmy genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej). Matki te urodziły dzieci z wadami w okolicy lędźwiowo-krzyżowej.

U matki chorującej na cukrzycę nie stwierdzono żadnego z analizowanych genotypów, mogących upośledzać aktywność enzymów szlaku remetylacji homocysteiny do metioniny.

5. DYSKUSJA

Udowodniony w randomizowanych badaniach [17, 57] wpływ suplementacji kwasu foliowego na zmniejszenie częstości występowania wad cewy nerwowej oraz brak jasno określonego mechanizmu leżącego u podstaw tego zjawiska, skłaniają do poszukiwania genetycznego podłoża podatności na wystąpienie wad cewy nerwowej wśród polimorfizmów genów związanych z metabolizmem kwasu foliowego. W przeprowadzonym badaniu porównano rozkład najczęstszych polimorfizmów kluczowych genów folianozależnego szlaku remetylacji homocysteiny do metioniny w populacji rodzin obciążonych wadą cewy nerwowej oraz w populacji ogólnej.

Ze względu na brak możliwości włączenia do badania dzieci z najcięższymi typami wad (śmiertelne wady takie jak bezmózgowie czy całkowity rozszczep czaszki i kręgosłupa) oraz objęcie badaniem jedynie rodzin z izolowaną wadą cewy nerwowej, ponad 97% badanej grupy stanowiły rodziny, w których u dziecka wystąpił rozszczep kręgosłupa (spina bifida). Struktura tej grupy pod względem częstości występowania wad w poszczególnych lokalizacjach była podobna do opisywanej w literaturze [1, 8] z wyraźną przewagą wad w okolicy lędźwiowo-krzyżowej.

Chęć uczestnictwa w badaniach zadeklarowało ponad 88% rodzin, którym zaproponowano udział. Na podstawie analizy struktury grupy dzieci pod względem lokalizacji wady, częstości występowania wodogłowia oraz zespołu Amolda-

Chiariego (obserwacje są zbliżone do danych publikowanych [1, 8, 81]), wydaje się, że uczestnicy mogą być uznani za grupę reprezentatywną dla całej populacji rodzin obciążonych wystąpieniem u dziecka przepukliny oponowo-rdzeniowej. Dodatkowymi przesłankami wydającymi się potwierdzać takie założenie są zgodne z danymi epidemiologicznymi dotyczącymi populacji małopolskiej [64, 66] obserwacje dotyczące braku sezonowości występowania wad cewy nerwowej i wynoszącej ok. 3% częstości powtórnego wystąpienia wady cewy nerwowej w badanych rodzinach.

W badaniu uczestniczyło natomiast jedynie troje dzieci z przepukliną oponową, podczas gdy teoretycznie powinna ona wystąpić u około 10% badanych [29]. Wyjaśnieniem takiej sytuacji może być znacznie mniejsze nasilenie objawów chorobowych u dzieci z przepukliną oponową w porównaniu do przepuklin oponowo-rdzeniowych, co związane jest z rzadszymi wizytami w specjalistycznych poradniach, takich jak poradnia dla dzieci z mielodysplazją, w której prowadzono rekrutację uczestników badania.

Populacja kontrolna składała się z losowo dobranej grupy osób reprezentatywnych dla populacji krakowskiej [82].

W celu dokładniejszej analizy badane grupy matek i dzieci podzielono uwzględniając hipotetyczne miejsca zamykania się cewy nerwowej. Koncepcja wielopunktowego zamykania się cewy nerwowej jest w ostatnich latach powszechnie przyjmowana w literaturze [30, 85, 94]. W przeprowadzonej analizie uwzględniono ponadto zaburzenia wtórnej neurulacji [94], będące

najprawdopodobniej podstawą wystąpienia wady cewy nerwowej w dwóch spośród uczestniczących w badaniu rodzin.

- **Polimorfizmy genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej**

W większości populacji stwierdzono stosunkowo wysoką częstość polimorfizmu 677C→T genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej [4, 67, 71]. Częstość alleliczna dla allelela 677T wynosi w Europie średnio 0,32. Wyraźnie rzadziej allelel 677T występuje w krajach skandynawskich i w Polsce (częstość alleliczna wynosi odpowiednio 0,23 i 0,18) [34, 82]. W roku 1995 van der Put i wsp. [89] stwierdzili zwiększoną częstość allelela 677T w rodzinach, w których wystąpiła wada cewy nerwowej. W następnych latach na podstawie nowych badań i przeprowadzonych metaanaliz [87, 101] potwierdzono rolę omawianego polimorfizmu jako czynnika ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej w populacjach irlandzkiej [75, 100] i w południowo-wschodnich rejonach USA [59]. Odmienne wyniki uzyskano natomiast w badaniach prowadzonych między innymi w Wielkiej Brytanii [60, 47], we Francji [56], Włoszech [26, 68], w Niemczech [42], w RPA [84], w Kanadzie [15] a także w Kalifornii i Iowa [73, 83]. W polskiej populacji dotychczas nie przeprowadzono kompleksowej analizy częstości polimorfizmu 677C→T w populacji rodzin z wadą cewy nerwowej, stwierdzano jednak większą częstość omawianego polimorfizmu wśród samych pacjentów ze spina bifida [61].

Przyczyną rozbieżności wyników uzyskiwanych przez różnych badaczy może być z jednej strony błąd metody genotypowania, a z drugiej rzeczywiste różnice pomiędzy badanymi populacjami. Ponieważ badania prowadzone są w

oparciu o metodę opisaną przez Frosst i wsp. w roku 1995 (z drobnymi modyfikacjami wprowadzanymi przez poszczególnych badaczy) [28], wydaje się, że błędy genotypowania powinny występować z podobną częstością w laboratoriach wszystkich autorów. Kluczowym zagadnieniem wydaje się natomiast dobór badanych populacji. Badane grupy różniły się zarówno pod względem liczebności (od 21 do ponad 200 przypadków), jak i struktury (różne typy wad). W badanych populacjach zwykle osobno analizowano przypadki bezmózgowia, cephalocoele i rozszczepu kręgosłupa. W zakresie tej ostatniej (najbardziej licznej) grupy nie wyróżniano natomiast zazwyczaj kolejnych podgrup w oparciu o hipotetyczne punkty zamykania się cewy nerwowej oraz nie rozdzielano wad powstałych na skutek zaburzenia procesów pierwotnej i wtórnej neurulacji.

W niniejszym badaniu stwierdzono zwiększoną częstość genotypu 677TT genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej w grupie matek dzieci z wadą cewy nerwowej i w grupie samych dzieci z taką wadą w porównaniu z populacją ogólną (iloraz szans wynosił odpowiednio 3,27 i 2,92). Zastosowanie podziału badanych grup matek i dzieci w oparciu o punkty zamykania się cewy nerwowej, z uwzględnieniem odrębności pierwotnej i wtórnej neurulacji doprowadziło jednak do stwierdzenia statystycznie istotnych różnic w częstości genotypu 677TT jedynie pomiędzy podgrupami matek dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej w porównaniu do grupy kontrolnej oraz dzieci z tą lokalizacją wady w porównaniu do grupy kontrolnej (iloraz szans 6,05 i 4,06). Nie stwierdzono natomiast statystycznej istotności w odniesieniu do różnic pomiędzy najliczniejszą wśród matek grupą matek dzieci z przepukliną w okolicy lędźwiowo-krzyżowej i grupą kontrolną oraz

najliczniejszą wśród dzieci grupą dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej i grupą kontrolną. Fakt ten może stanowić wyjaśnienie wspomnianych różnic w ocenie roli genotypu 677TT jako czynnika ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej. W świetle przeprowadzonego badania genotyp taki należy uznać za czynnik ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej w okolicy piersiowo-lędźwiowej. Ryzyko takie dotyczy zarówno urodzenia dziecka z wadą przez matkę posiadającą genotyp 677TT oraz wystąpienia wady u dziecka z takim genotypem. Podobne wyniki, sugerujące rolę polimorfizmu 677C→T w zwiększeniu ryzyka wystąpienia wady w lokalizacji piersiowo-lędźwiowej uzyskał jedynie Volcik i wsp. [92] - statystycznie istotne różnice wystąpiły jednak jedynie w odniesieniu do grupy matek dzieci z wadą cewy nerwowej.

Ze względu na niewielką liczebność grup trudno ocenić rolę genotypu 677TT jako czynnika ryzyka wystąpienia encephalocoele oraz wad cewy nerwowej powstałych w wyniku zaburzenia procesu wtórnej neurulacji. Należy jednak zwrócić uwagę na częste występowanie takiego genotypu (ok. 50%) w rodzinach zakwalifikowanych do wymienionych podgrup.

Ciekawą obserwacją jest fakt częstszego występowania genotypu 677TT w grupie dzieci bez wodogłowia w porównaniu do grupy dzieci z wodogłowiem. Analizując bliżej grupę dzieci bez wodogłowia można jednak stwierdzić, że nie była ona jednorodna. Do grupy tej należały dzieci z wadami powstałymi w następstwie zaburzeń pierwotnej i wtórnej neurulacji, a więc dwóch odrębnych procesów. Weryfikacja nasuwających się wątpliwości byłaby możliwa w przypadku

przebadania większej grupy dzieci z wadami cewy nerwowej, bez towarzyszącego wodogłowa.

W 1998 roku w pracy van der Put i wsp. zaproponowano uznanie obecności genotypów 1298CC oraz 677CT/1298AC genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej za kolejne czynniki ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej, ze względu na towarzyszące obu powyższym genotypom obniżenie aktywności enzymatycznej reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej [88]. W badaniach prowadzonych później przez Stegmann i wsp. [79] na populacji niemieckiej, Volcik i wsp. [92] na populacji Teksasu i Kalifornii oraz Barbera i wsp. [6] na populacji pogranicza Teksasu i Meksyku nie potwierdzono jednak roli opisanych genotypów jako czynników ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej. Wyniki te są zgodne z uzyskanymi w niniejszym badaniu, które nie wykazało zwiększonej częstości analizowanych genotypów w populacjach matek i dzieci z rodzin obciążonych wystąpieniem wady cewy nerwowej. Częstości te były niższe od obserwowanych w populacji ogólnej (różnice nie były istotne statystycznie), co pozostaje w zgodzie z obserwacjami Stegmann i wsp. [79]. W badanej przez tych autorów populacji oba polimorfizmy występowały jednocześnie jedynie w pozycji trans (zmutowane allele z dwóch loci na różnych chromosomach homologicznych). Wyjaśnieniem tego faktu może być postulowana przez cytowanych badaczy obecność zjawiska odchylenia od równowagi na skutek sprzężenia pomiędzy loci 677 i 1298 genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej (linkage disequilibrium). Przyjmując taką hipotezę można spodziewać się, że większa częstość allele 677T spowoduje zmniejszenie częstości allele 1298C.

Teoretycznie, wystąpienia najmniejszej aktywności enzymatycznej reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej można by oczekiwać u osób z genotypem 677TT/1298CC, 677TT/1298AC lub 677CT/1298CC. W badanych populacjach rodzin, w których wystąpiła wada cewy nerwowej (matki i dzieci) nie zaobserwowano dotychczas jednoczesnej homozygotyczności w zakresie obu polimorfizmów. W badaniach prowadzonych przez Weisberga i wsp. [97], Friedmanna i wsp. [27] i Isotalo i wsp. [40] stwierdzono jednak pojedyncze przypadki wystąpienia genotypów 677TT/1298AC i 677CT/1298CC. Wszystkie trzy genotypy (677TT/1298CC, 677TT/1298AC i 677CT/1298CC) obserwowano natomiast u płodów (tkanki płodowe uzyskane po spontanicznym poronieniu), co sugeruje rolę omawianych genotypów jako przyczyny poronień [40]. W opisanych przypadkach musiało dojść do zjawiska crossing over i wytworzenia allele 677T/1298C [97]. Powyższe badania podważają jednocześnie hipotezę wysuniętą przez Stegmann i wsp., dotyczącą odchylenia od równowagi na skutek sprzężenia pomiędzy loci 677 i 1298 genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej.

Wprawdzie w niniejszym badaniu nie obserwowano częstszego występowania genotypu 677CT/1298AC w badanych populacjach (analizowanych całościowo) w porównaniu do grupy kontrolnej, jednak interesujący jest fakt obecności takiego genotypu u wszystkich trzech matek leczonych z powodu padaczki. Genetycznie uwarunkowane obniżenie aktywności enzymatycznej reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej, wynikające z podwójnej heterozygotyczności w zakresie obu polimorfizmów, może dodatkowo zmniejszać aktywność szlaku remetylacji homocysteiny do metioniny, obniżoną przy

stosowaniu pochodnych kwasu walproinowego [22, 37]. W tej sytuacji obecność genotypu 677CT/1298AC u matki leczonej pochodnymi kwasu walproinowego mogłaby zostać uznana za czynnik zwiększający ryzyko wystąpienia wady cewy nerwowej u dziecka. Hipoteza ta wymaga weryfikacji poprzez analizę genotypów większej liczby leczonych lekami z tej grupy matek dzieci z wadą cewy nerwowej. Niejasny pozostaje natomiast mechanizm ewentualnej interakcji analizowanego genotypu i leczenia matki karbamazepiną jako czynników, które nakładając się mogłyby sprzyjać wystąpieniu u dziecka wady cewy nerwowej.

Żaden z analizowanych genotypów genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej nie wystąpił u matki chorej na cukrzycę ani u jej dziecka. Wykluczenie ewentualnego związku badanych polimorfizmów z cukrzycą wymaga weryfikacji poprzez badanie większej grupy matek, które urodziły dziecko z wadą cewy nerwowej i leczyły się z powodu cukrzycy.

- **Polimorfizm 2756A→G genu syntazy metioniny**

Obniżenie aktywności syntazy metioniny jako centralnego enzymu szlaku remetylacji homocysteiny do metioniny powinno teoretycznie spowodować zwiększenie ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej [52]. Rolę polimorfizmu 2756A→G w powstawaniu wad cewy nerwowej po raz pierwszy analizowali w 1997 roku van der Put i wsp. [91], nie stwierdzając statystycznie istotnych różnic pomiędzy częstością genotypu 2756GG wśród holenderskich matek dzieci z wadą cewy nerwowej i wśród samych dzieci w porównaniu z grupą kontrolną. Podobne

wyniki uzyskali Brody i wsp. [26] analizując populację irlandzką. Mniejszą częstość genotypu 2756GG wśród dzieci z wadą cewy nerwowej w porównaniu do populacji kontrolnej wykazali w populacji kanadyjskiej Christensen i wsp. [15], sugerując ochronną rolę takiego genotypu w kontekście ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej. Obserwowane różnice pomiędzy badaczami oraz niewielka liczba badań dotyczących analizowanego polimorfizmu stanowiły przesłanki do podjęcia analogicznych badań w populacji małopolskiej.

W niniejszym badaniu nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zakresie częstości omawianego polimorfizmu w grupach matek i dzieci w stosunku do grupy kontrolnej. Istotności statystycznej nie osiągnęły również różnice w częstości badanego polimorfizmu pomiędzy żadną z wyodrębnionych podgrup matek i dzieci a grupą kontrolną. Uzyskane wyniki świadczą o braku wpływu opisywanej mutacji na zwiększenie ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej i są zgodne z obserwacjami zespołów kierowanych przez van der Put i Brody'ego. Obserwowana przez Christensen i wsp. obniżona częstość genotypu 2756GG wśród dzieci z wadą cewy nerwowej wynikać może z małej liczebności badanej grupy (55 dzieci).

- **Polimorfizm 66A→G genu reduktazy syntazy metioniny**

Reduktaza syntazy metioniny, utrzymując w aktywnym stanie syntazę metioniny jest kolejnym kluczowym enzymem szlaku remetylacji homocysteiny do metioniny. W 1999 roku Wilson i wsp. [103] opisali polimorfizm 66A→G genu

reduktazy syntazy metioniny, którego obecność wiązała się ze zwiększeniem ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej. Stwierdzenie genotypu 66GG przy niskim stężeniu witaminy B₁₂ w surowicy korelowało ze zwiększeniem ryzyka wystąpienia u dziecka wady z grupy spina bifida.

W niniejszym badaniu obserwowano statystycznie istotne różnice pomiędzy częstością genotypu 66GG w grupach matek dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej w porównaniu do grupy kontrolnej i dzieci z wadą w tej okolicy w porównaniu do grupy kontrolnej (genotyp 66GG występował częściej w grupach matek i dzieci). Obserwowane wartości ilorazów szans wynosiły 3,06 dla populacji matek i 3,16 dla populacji dzieci. Różnice te nie były istotne w odniesieniu do całej grupy matek i całej grupy dzieci oraz do wszystkich pozostałych podgrup, w tym podgrup matek i dzieci obejmujących wady w okolicy piersiowo-lędźwiowej. Uzyskane wyniki korelują z danymi przedstawionymi przez Wilsona i wsp., dotyczą jednak dwukrotnie większej grupy badanych, w tym również grupy chorych dzieci (a nie tylko, jak w cytowanej pracy, grupy matek) i po raz pierwszy uwzględniają podział wad cewy nerwowej w oparciu o punkty zamykania się cewy nerwowej. Na podstawie wyników uzyskanych w niniejszym badaniu obecność genotypu 66GG u matki należy uznać za czynnik ryzyka urodzenia dziecka z wadą cewy nerwowej w okolicy lędźwiowo-krzyżowej, natomiast genotyp 66GG u dziecka za czynnik ryzyka wystąpienia wady w tej lokalizacji.

Interesującą obserwację stanowi fakt wystąpienia badanego genotypu u matki leczonej z powodu padaczki pochodnymi kwasu walproinowego. Dodatkowo stwierdzono u niej genotyp 677CT/1298AC w zakresie genu reduktazy 5,10-

metylenotetrahydrofolianowej. W związku ze wspomnianym obniżeniem aktywności szlaku remetylacji homocysteiny do metioniny przy stosowaniu pochodnych kwasu walproinowego, obecność obu wymienionych genotypów mogłaby dodatkowo zwiększać ryzyko wystąpienia wady cewy nerwowej u dziecka.

Genotypu 66GG nie obserwowano u matki chorej na cukrzycę ani u jej dziecka. Wykluczenie ewentualnego związku badanego polimorfizmu z cukrzycą wymaga weryfikacji poprzez badanie większej grupy matek, które urodziły dziecko z wadą cewy nerwowej i leczyły się z powodu cukrzycy.

- **Dwukrotne wystąpienie wady cewy nerwowej a badane polimorfizmy**

Ze względu na brak możliwości ścisłego wydzielenia grupy rodzin, w których występowanie wady cewy nerwowej miałoby charakter rodzinny (w wielu przypadkach badane dziecko pochodziło z pierwszej i do chwili badania jedynej ciąży, ponadto ujemny wywiad rodzinny również nie pozwala na jednoznaczne wykluczenie potencjalnie rodzinnego występowania wady) ograniczono się do analizy badanych genotypów w grupie 3 matek i 4 dzieci z rodzin obciążonych dwukrotnym wystąpieniem wady cewy nerwowej. U żadnej z badanych osób nie stwierdzono obecności poszukiwanych genotypów mogących teoretycznie zwiększać ryzyko wystąpienia wady. Wykluczenie wpływu obecności badanych mutacji na rodzinne występowanie wad cewy nerwowej wymaga jednak przebadania większej liczby matek i dzieci z takich rodzin.

6. WNIOSKI

1. Polimorfizm 677C→T genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej występuje ze zwiększoną częstością w populacjach matek dzieci z wadą cewy nerwowej w okolicy piersiowo-lędźwiowej i dzieci, u których wystąpiła wada cewy nerwowej w tej okolicy. Polimorfizm ten należy uznać za czynnik ryzyka wystąpienia wady o powyższej lokalizacji u dziecka matki o genotypie 677TT oraz u dziecka o genotypie 677TT.
2. Brak wystarczających przesłanek do uznania polimorfizmu 677C→T za czynnik ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej w okolicy lędźwiowo-krzyżowej i w innych lokalizacjach (poza okolicą piersiowo-lędźwiową). Weryfikacji poprzez przebadanie większej populacji wymaga zaobserwowana różnica w częstości genotypu 677TT w grupach dzieci z wadą cewy nerwowej bez towarzyszącego wodogłowia i z wodogłowiem.
3. Ze względu na mniejszą niż populacyjna częstość polimorfizmu 1298A→C genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej w grupie matek dzieci z wadą cewy nerwowej i w grupie dzieci z taką wadą, brak przesłanek do uznania go za czynnik ryzyka wystąpienia takiej wady.
4. Częste występowanie genotypu 677CT/1298AC w zakresie genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej wśród leczonych kwasem walproinowym i karbamazepiną matek dzieci z wadą cewy nerwowej może świadczyć o roli tego

genotypu jako potencjalnego czynnika ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej. Dla potwierdzenia takiej hipotezy konieczne jest jednak przebadanie większej liczby matek z tej grupy.

5. Brak przesłanek do uznania obecności polimorfizmu 2756A→G genu syntazy metioniny za czynnik ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej.
6. Polimorfizm 66A→G genu reduktazy syntazy metioniny występuje ze zwiększoną częstością w populacjach matek dzieci z wadą cewy nerwowej w okolicy łódźwiowo-krzyżowej i dzieci z taką wadą. Polimorfizm ten należy uznać za czynnik ryzyka wystąpienia wady w powyższej okolicy u dziecka matki o genotypie 66GG oraz u dziecka o genotypie 66GG.
7. W żadnej z rodzin, w których dwukrotnie urodziło się dziecko z wadą cewy nerwowej nie stwierdzono obecności analizowanych w niniejszej pracy polimorfizmów. W celu wykluczenia ich związku z rodzinnym występowaniem wad cewy nerwowej należy jednak przeprowadzić badanie w większej grupie takich rodzin.

7. STRESZCZENIE

Wady cewy nerwowej stanowią grupę anomalii, które ze względu na anatomiczną lokalizację i rozległość zmian już w momencie urodzenia przesądzają o dalszych losach dziecka. Obejmują one zaburzenia o różnym stopniu ciężkości - od bezmózgowia i całkowitego rozszczepu czaszki i kręgosłupa do przepuklin oponowo - rdzeniowych, oponowych i tami dwudzielnej. Pomimo znacznego udoskonalenia technik leczenia, ta grupa wad nadal posiada znaczący udział w śmiertelności noworodków i niemowląt, lub stanowi przyczynę ciężkiego, nieuleczalnego kalectwa. Niedoskonałość metod leczniczych zmusza do poszukiwania sposobów skutecznego zapobiegania wystąpieniu tych zaburzeń. Podstawowe znaczenie dla profilaktyki ma określenie ich etiologii.

Większość wad cewy nerwowej powstaje pomiędzy 20 i 28 dniem życia zarodka na skutek zaburzenia procesu zamykania się cewy nerwowej, zwanego pierwotną neurulacją. W procesie pierwotnej neurulacji wyodrębnić można pięć miejsc inicjacji zamykania się cewy nerwowej, których dysfunkcja wiąże się prawdopodobnie z wystąpieniem wad w różnych odcinkach układu nerwowego. Zaburzenia wtórnej neurulacji (procesu przebiegającego w późniejszym okresie rozwoju zarodkowego) powodują natomiast wystąpienie niewielkiego odsetka "niskich" wad cewy nerwowej, zlokalizowanych w dolnym odcinku okolicy krzyżowej kręgosłupa.

Zapobieganie wystąpieniu choroby (pierwotna profilaktyka) z oczywistych względów stanowi najlepszy sposób leczenia wad cewy nerwowej. W końcu lat 70-tych zwrócono uwagę na rolę kwasu foliowego w profilaktyce wystąpienia tych zaburzeń. W randomizowanych badaniach stwierdzono znamienne niższe ryzyko urodzenia chorego dziecka przez kobietę zażywającą kwas foliowy. Wśród potomstwa matek zażywających tą witaminę stwierdzono redukcję częstości występowania wad cewy nerwowej o 50-70%.

W organizmie ssaków kwas foliowy bierze udział w transporcie rodników jednowęglowych, stanowiącym między innymi integralną część procesu syntezy nukleotydów, a także w wielu reakcjach metylacji. Po wykazaniu podwyższonego stężenia homocysteiny w surowicy ciężarnych kobiet, które następnie urodziły dziecko z wadą cewy nerwowej oraz po udowodnieniu roli metioniny jako czynnika niezbędnego do prawidłowego zamykania się cewy nerwowej, badania skoncentrowały się na folianozależnym szlaku remetylacji homocysteiny do metioniny.

Wśród genów, których dysfunkcja u matki lub u płodu mogłaby potencjalnie prowadzić do zmniejszenia aktywności szlaku remetylacji homocysteiny do metioniny (a w konsekwencji do wystąpienia hiperhomocysteinemii, hipometioninemii i możliwości powstania wady cewy nerwowej) wymieniane są geny kodujące trzy enzymy bezpośrednio związane z reakcją remetylacji: reduktazę 5,10-metylenotetrahydrofolianową, syntazę metioniny i reduktazę syntazy metioniny. Szczególne zainteresowanie budzą polimorfizmy tych genów (warianty stwierdzone w populacji z częstością powyżej 1%), mogące przyczyniać

się do obniżenia aktywności powyższego szlaku metabolicznego i przez to stanowić czynnik ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej.

W niniejszej pracy porównano częstości polimorfizmów 677C→T i 1298A→C genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej, 2756A→G genu syntazy metioniny oraz 66A→G genu reduktazy syntazy metioniny w populacji ogólnej i w rodzinach, w których wystąpiła wada cewy nerwowej.

Przy pomocy metody PCR-RFLP przeprowadzono genotypowanie w zakresie wszystkich wymienionych polimorfizmów u przedstawicieli 115 rodzin, w których wystąpiła wada cewy nerwowej, w tym u 112 matek i 108 dzieci z wadą. Grupę kontrolną w odniesieniu do polimorfizmów 677C→T i 1298A→C genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej stanowiła populacja 310 reprezentatywnych dla populacji krakowskiej dorosłych osób, które badano w II Katedrze Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. W niniejszej pracy oparto się na danych opublikowanych przez zespół II Katedry Chorób Wewnętrznych, zawierających rozkład poszczególnych genotypów obu polimorfizmów we wspomnianej populacji. Grupę kontrolną w odniesieniu do polimorfizmów 2756A→G genu syntazy metioniny i 66A→G genu reduktazy syntazy metioniny stanowiło pierwsze 100 osób należących do opisanej 310-osobowej grupy, których próbki DNA udostępnione zostały przez badaczy z II Katedry Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego dla celów niniejszego badania.

W analizie statystycznej uzyskanych wyników wykorzystano następujące testy: test χ^2 , dokładny test Fishera, iloraz szans z 95% przedziałem ufności oraz statystyki opisowe.

W zakresie polimorfizmu 677C→T zidentyfikowano genetyczny czynnik ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej w okolicy piersiowo-lędźwiowej kręgosłupa. Czynnikiem tym jest obecność u matki lub u dziecka genotypu 677TT. Przy porównaniu z grupą kontrolną genotyp ten występował znamiennej częściej w całej grupie matek (iloraz szans 3,27; 95% przedział ufności 1,58-6,78; $p = 0,0017$) i w całej grupie badanych dzieci (iloraz szans 2,92; 95% przedział ufności 1,38-6,19; $p = 0,0059$). Po przeprowadzeniu dokładnej analizy poszczególnych podgrup statystycznie istotne były jednak jedynie różnice w częstości występowania wspomnianego genotypu pomiędzy grupą matek dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej a grupą kontrolną (iloraz szans 6,05; 95% przedział ufności 2,41-15,18; $p = 0,0007$) oraz pomiędzy grupą dzieci z wadą w okolicy piersiowo-lędźwiowej a grupą kontrolną (iloraz szans 4,06; 95% przedział ufności 1,51-10,9; $p = 0,0125$).

W zakresie polimorfizmu 1298A→C nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości analizowanego genotypu 1298CC pomiędzy grupami matek i dzieci a grupą kontrolną. Genotyp ten występował ponadto u badanych matek i dzieci rzadziej niż w grupie kontrolnej.

Statystycznej istotności nie osiągnęły również różnice w częstości mieszanej heterozygotyczności w zakresie opisanych polimorfizmów (genotyp 677CT/1298AC) pomiędzy grupami badanych matek i dzieci a grupą kontrolną.

Interesującą obserwacją jest natomiast fakt wystąpienia powyższego genotypu u wszystkich matek, które w ciąży leczono z powodu padaczki preparatami karbamazepiny i kwasu walproinowego. Fakt ten może sugerować współdziałanie analizowanego genotypu i wymienionych leków w teratogenezie wad cewy nerwowej. Hipoteza ta wymaga jednak weryfikacji poprzez badanie większej grupy matek, które urodziły dziecko z wadą cewy nerwowej i były leczone w ciąży wymienionymi lekami przeciwpadaczkowymi.

W odniesieniu do częstości polimorfizmu 2756A→G genu syntazy metioniny nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy badanymi populacjami matek i dzieci a grupą kontrolną.

W odniesieniu do polimorfizmu 66A→G genu reduktazy syntazy metioniny zidentyfikowano genetyczny czynnik ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej w okolicy lędźwiowo-krzyżowej kręgosłupa. Czynnikiem tym jest obecność u matki lub u dziecka genotypu 66GG. Stwierdzono istotność statystyczną w odniesieniu do różnic częstości tego genotypu pomiędzy grupami matek dzieci z wadą w okolicy lędźwiowo-krzyżowej a grupą kontrolną (iloraz szans 3,06; 95% przedział ufności 1,04-8,97; $p = 0,0396$), jak również pomiędzy grupą dzieci z taką wadą i grupą kontrolną (iloraz szans 3,16; 95% przedział ufności 1,08-9,28; $p = 0,0348$). Różnice w częstości genotypu 66GG w pozostałych podgrupach matek i dzieci w stosunku do grupy kontrolnej a także w całych grupach matek i dzieci w porównaniu do grupy kontrolnej nie były istotne statystycznie.

W niniejszym badaniu nie stwierdzono jednoznacznego związku pomiędzy analizowanymi polimorfizmami i wystąpieniem u chorego dziecka wodogłowa. Wprawdzie obecność polimorfizmu 677C→T genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej (genotyp 677TT) obserwowano częściej u dzieci bez wodogłowa, jednak wobec niejednorodności tej grupy dzieci konieczne wydaje się przebadanie większych populacji.

Analiza obecności badanych polimorfizmów w rodzinach, w których urodziło się dwoje dzieci z wadą cewy nerwowej wykazała brak poszukiwanych genotypów u wszystkich uczestniczących w badaniu członków tych rodzin. Dla wykluczenia wpływu opisanych polimorfizmów na rodzinne występowanie wad cewy nerwowej niezbędne byłoby jednak przebadanie większej liczby rodzin obciążonych dwukrotnym wystąpieniem tego typu wad.

8. PIŚMIENNICTWO

1. **Aicardi J.:**
"Diseases of the Nervous System in Childhood",
2nd ed., Mac Keith Press, 1998, 69-118.
2. **Alberman E., Noble J.M.:**
"Commentary: Food should be fortified with folic acid",
Br Med J, 1999, 319: 93.
3. **American Academy of Pediatrics:**
"Folic acid for the prevention of neural tube defects",
Pediatrics, 1999, 104(2): 325-7.
4. **Arruda V.R., Siqueira L.H., Gonçalves M.S., von Zuben P.M., Soares M.C., Menezes R., Annicino-Bizzacchi J.M., Costa F.F.:**
"Prevalence of the mutation C677→T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil",
Am J Med Genet, 1998, 78(4): 332-5.
5. **Bailey L.B., Gregory J.F. 3rd.:**
"Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement",
J Nutr, 1999, 129(5): 919-22.
6. **Barber R., Shalat S., Hendricks K., Joggerst B., Larsen R., Suarez L., Finnell R.:**
"Investigation of folate pathway gene polymorphisms and the incidence of neural tube defects in a Texas Hispanic population",
Mol Genet Metab, 2000, 70(1): 45-52.
7. **Bartel H.:**
"Embriologia",
Wydawnictwo Lekarskie PZWL, wydanie 2, Warszawa 1999, 339-72.
8. **Behrman R.E., Kliegman R.M., Arvin A.M.:**
"Textbook of Pediatrics",
15th ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia – London – Toronto – Montreal – Sydney – Tokyo, 1996, 1803-6.
9. **Berry R.J., Li Z., Erickson J.D., Li S., Moore C.A., Wang H., Mulinare J., Zhao P., Wong L.-Y.C., Gindler J., Hong S.-X., Correa A., Hao L., Gunter E.:**
"Prevention of neural tube defects with folic acid in China",
New Engl J Med, 1999, 341(20): 1485-90.

10. **Blom H.J.:**
"Mutated 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and moderate hyperhomocysteinaemia",
Eur J Pediatr, 1998, 157 Suppl 2: S131-4.
11. **Botto L.D., Moore C.A., Khoury M.J., Erickson J.D.:**
"Neural-tube defects",
New Engl J Med, 1999, 341(20): 1509-19.
12. **Brent R.L., Oakley G.P., Mattison D.R.:**
"The unnecessary epidemic of folic acid-preventable spina bifida and anencephaly",
Pediatrics, 2000, 106(4): 825-7.
13. **Brody L.C., Baker P.J., Chines P.S., Musick A., Molloy A.M., Swanson D.A., Kirke P.N., Ghosh S., Scott J.M., Mills J.L.:**
"Methionine synthase: high-resolution mapping of the human gene and evaluation as a candidate locus for neural tube defects",
Mol Genet Metab, 1999, 67(4): 324-33.
14. **Brönstrup A., Hages M., Prinz-Langenohl R., Pietrzik K.:**
"Effects of folic acid and combinations of folic acid and vitamin B-12 on plasma homocysteine concentrations in healthy, young women",
Am J Clin Nutr, 1998, 68: 1104-10.
15. **Christensen B., Arbour L., Tran P., Leclerc D., Sabbaghian N., Platt R., Gilfix B.M., Rosenblatt D.S., Gravel R.A., Forbes P., Rozen R.:**
"Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects",
Am J Med Genet, 1999, 84(2): 151-7.
16. **Copp A.J.:**
"Prevention of neural tube defects: vitamins, enzymes and genes",
Curr Opin Neurol, 1998, 11(2): 97-102.
17. **Czeizel A.E., Dudas I.:**
"Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation",
New Engl J Med, 1992, 327: 1832-5.
18. **Daly S.F., Molloy A.M., Mills J.L., Lee Y.J., Conley M., Kirke P.N., Weir D.G., Scott J.M.:**
"The influence of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genotypes on enzyme activity in placental tissue",
Br J Obstet Gynaecol, 1999, 106(11): 1214-8.
19. **Dawson E.B., Evans D.R., Harris W.A., Van Hook J.W.:**
"Amniotic fluid B12, calcium, and lead levels associated with neural tube defects",
Am J Perinatol. 1999, 16(7):373-8.

20. **Eskes T.K.:**
"Open or closed",
Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1998, 78: 169-77.
21. **Fawcett L.B., Pugarelli J.E., Brent R.L.:**
"Effects of supplemental methionine on antiserum-induced dysmorphology in rat embryos cultured in vitro",
Teratology, 2000 61(5): 332-41.
22. **Finnell R.H., Wlodarczyk B.C., Craig J.C., Piedrahita J.A., Bennett G.D.:**
"Strain-dependent alterations in the expression of folate pathway genes following teratogenic exposure to valproic acid in a mouse model",
Am J Med Genet, 1997, 70: 303-11.
23. **Fleming A., Copp A.J.:**
"A genetic risk factor for mouse neural tube defects: defining the embryonic basis",
Hum Mol Genet, 2000, 9(4): 575-81.
24. **Fleming A., Copp A.J.:**
"Embryonic folate metabolism and mouse neural tube defects",
Science, 1998, 280(5372): 2107-9.
25. **Födinger M., Horl W.H., Sunder-Plassmann G.:**
"Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase",
J Nephrol, 2000, 13(1): 20-33.
26. **Fowler B.:**
"Disorders of homocysteine metabolism",
J Inherit Metab Dis, 1997 20(2): 270-85.
27. **Friedman G, Goldschmidt N., Friedlander Y., Ben-Yehuda A., Selhub J., Babaey S., Mendel M., Kidron M., Bar-On H.:**
"A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations",
J Nutr, 1999, 129: 1656-61.
28. **Frosst P., Blom H.J., Milos R., Goyette P., Sheppard C.A., Matthews R.G., Boers G.H.J., DenHeijer M., Kluijtmans L.A.J., VandenHeuwel L.P., Rozen R.:**
"Identification of a candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase",
Nature Genet, 1995, 10: 111-3.
29. **Gilbert-Barness E.:**
"Potter's pathology of the fetus and infant",
Mosby, St Louis 1997, 1045-56.
30. **Golden J.A., Chernoff G.F.:**
"Multiple sites of anterior neural tube closure in humans: evidence from anterior neural tube defects (anencephaly)",
Pediatrics, 1995, 95(4): 506-10.

31. **Goyette P., Christensen B., Rosenblatt D.S., Rozen R.:**
"Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR",
Am J Hum Genet, 1996, 59(6): 1268-75.
32. **Goyette P., Pai A., Milos R., Frosst P., Tran P., Chen Z., Chan M., Rozen R.:**
"Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)",
Mamm Genome, 1998, 9(8): 652-6.
33. **Greene N.D., Copp A.J.:**
"Inositol prevents folate-resistant neural tube defects in the mouse",
Nature Med, 1997, 3(1): 60-6
34. **Gudnason V., Stansbie D., Scott J., Bowron A., Nicaud V., Humphries S.:**
"C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. EARS group",
Atherosclerosis, 1998, 136(2): 347-54.
35. **Harmon D.L., Woodside J.V., Yarnell J.W., McMaster D., Young I.S., McCrum E.E., Gey K.F., Whitehead A.S., Evans A.E.:**
"The common 'thermolabile' variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinaemia",
QJM, 1996, 89(8): 571-7.
36. **Hendricks K., Larsen R., Suarez L.:**
"Neural tube defect surveillance and folic acid intervention – Texas-Mexico border, 1993-1998",
JAMA, 2000, 283(22): 2928-30.
37. **Hishida R., Nau H.:**
"VPA-induced neural tube defects in mice. I. Altered metabolism of sulfur aminoacids and glutathione",
Teratog Carcinog Mutagen, 1998, 18(2): 49-61.
38. **Hobbs C.A., Sherman S.L., Yi P., Hopkins S.E., Torfs C.P., Hine R.J., Pogribna M., Rozen R., James S.J.:**
"Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome",
Am J Hum Genet, 2000, 67: 623-30.
39. **Ilnicka A., Pawłowska B., Czyżewska J., Głogowska I., Korlak J., Rodo M., Bieganska K., Szirkowiec W., Zdzienicka E., Zaremba J.:**
"Analiza poziomu alfa-fetoprotein w przypadkach otwartych wad cewy nerwowej i aberracji chromosomowych u płodu",
Neurol Neurochir Pol, 1996, 30(1): 65-75.

40. **Isotalo P.A., Wells G.A., Donnelly J.G.:**
"Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: An examination of C677T and A1298C mutations",
Am J Hum Genet, 2000, 67(4): 986-90.
41. **Juriloff D.M., Harris M.J.:**
"Mouse models for neural tube closure defects",
Hum Mol Genet, 2000, 9(6): 993-1000.
42. **Koch M.C., Stegmann K., Ziegler A., Schroter B., Ermert A.:**
"Evaluation of the MTHFR C677T allele and the MTHFR gene locus in a German spina bifida population",
Eur J Pediatr, 1998, 157(6): 487-92.
43. **Laurence K.M., James N., Miller M.H., Tennant G.B., Campbell H.:**
"Double-blind randomized controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural tube defects",
Br Med J, 1981, 282:1509-11.
44. **Leclerc D., Odievre M.-H., Wu Q., Wilson A., Huizenga J.J., Rozen R., Scherer S.W., Gravel R.A.:**
"Molecular cloning, expression and physical mapping of the human methionine synthase reductase gene",
Gene, 1999, 240: 78-85.
45. **Lewis D.P., Van Dyke D.C., Stumbo P.J., Berg M.J.:**
"Drug and environmental factors associated with adverse pregnancy outcomes. PartIII: Folic acid: pharmacology, therapeutic recommendations, and economics",
Ann Pharmacother, 1998, 10: 1087-95.
46. **Li Y.N., Gulati S., Baker P.J., Brody L.C., Banerjee R., Kruger W.D.:**
"Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene",
Hum Mol Genet, 1996, 5(12): 1851-8.
47. **Luccock M.D., Daskalakis I., Briggs D., Yates Z., Levene M.:**
"Altered folate metabolism and disposition in mothers affected by a spina bifida pregnancy: influence of 677c→t methylenetetrahydrofolate reductase and 2756a→g methionine synthase genotypes",
Mol Genet Metab, 2000 70(1): 27-44.
48. **McKusick V.A.:**
"Neural tube defect, folate-resistant. On-line manual for mendelian inheritance in man",
The Johns Hopkins University Press, Baltimore 1998.
49. **McNulty H.:**
"Folate requirements for health in different population groups",
Br J Biomed Sci, 1995, 52(2):110-9.

50. **Melnick M., Marazita M.L.:**
"Neural tube defects, methylenetetrahydrofolate reductase mutation, and north/south dietary differences in China",
J Craniofac Genet Dev Biol, 1998, 18(4): 233-5.
51. **Melvin E.C., George T.M., Worley G., Franklin A., Mackey J., Viles K., Shah N., Drake C.R., Enterline D.S., McLone D., Nye J., Oakes W.J., McLaughlin C., Walker M.L., Peterson P., Brei T., Buran C., Aben J., Ohm B., Bermans I., Qumsiyeh M., Vance J., Pericak-Vance M.A., Speer M.C.:**
"Genetic studies in neural tube defects. NTD Collaborative Group",
Pediatr Neurosurg, 2000, 32(1): 1-9.
52. **Mills J.L., McPartlin J.M., Kirke P.N., Lee Y.J., Conley M.R., Weir D.G., Scott J.M.:**
"Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects",
Lancet, 1995, 345(8943): 149-51.
53. **Mills J.L., Scott J.M., Kirke P.N., McPartlin J.M., Conley M.R., Weir D.G., Molloy A.M., Lee Y.J.:**
"Homocysteine and neural tube defects",
J Nutr, 1996, 126(3): 756S-760S.
54. **Molloy A.M., Mills J.L., Kirke P.N., Ramsbottom D., McPartlin J.M., Burke H., Conley M., Whitehead A.S., Weir D.G., Scott J.M.:**
"Low blood folates in NTD pregnancies are only partly explained by thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase: low folate status alone may be the critical factor",
Am J Med Genet, 1998, 78(2): 155-9.
55. **Morita H., Hurihara H., Sugiyama T., Hamada C., Kurihara Y., Shindo T., Ohhashi Y., Yazaki Y.:**
"Polymorphism of the methionine synthase gene: association with homocysteine metabolism and late-onset vascular diseases in the Japanese population",
Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19: 298-302.
56. **Mornet E., Muller F., Lenvoise-Furet A., Delezoide A.L., Col J.Y., Simon-Bouy B., Serre J.L.:**
"Screening of the C677T mutation on the methylenetetrahydrofolate reductase gene in French patients with neural tube defects",
Hum Genet, 1997, 100(5-6): 512-4.
57. **MRC Vitamin Study Research Group:**
"Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study",
Lancet, 1991, 338(8760): 131-7.
58. **Olutoye O.O., Adzick N.S.:**
"Fetal surgery for myelomeningocele",
Semin Perinat, 1999, 23(6): 462-473.

-
59. **Ou C.Y., Stevenson R.E., Brown V.K., Schwartz C.E., Allen W.P., Khoury M.J., Rozen R., Oakley G.P. Jr, Adams M.J. Jr.:**
"5,10 Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects",
Am J Med Genet, 1996 63(4): 610-4.
60. **Papapetrou C., Lynch S.A., Burn J., Edwards Y.H.:**
"Methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects",
Lancet, 1996, 348(9019): 58.
61. **Pawlak A., Rogala P., Ziółkiewicz P., Pławski A., Słomski R.:**
"Increased frequency of common MTHFR gene mutation (677C(r)T) among adult spina bifida patients in Poland",
Eur J Med Genet, 1998, Suppl 1, P3.025.
62. **Petrini J.R., Damus K., Johnston D.R.:**
"Knowledge and use of folic acid by women of childbearing age – United States, 1995 and 1998",
JAMA, 1999, 281(20): 1883-4.
63. **Pietrzyk J.J.:**
"Badania epidemiologiczne, rodzinne i immunogenetyczne w stanach dysrafii ośrodkowego układu nerwowego u dzieci",
Pediatrics Polska, 1979, 1207-12.
64. **Pietrzyk J.J.:**
"Neural tube malformations: complex segregation analysis and recurrence risk",
Am J Med Genet, 1980, 7(3): 293-300.
65. **Pietrzyk J.J.:**
"Wady cewy nerwowej (WCN) – ocena z perspektywy 25 lat badań",
Przegl Lek, 1998, 55(4): 164-7.
66. **Pietrzyk J.J., Grochowski J., Kańska B.:**
"CNS malformations in the Kraków region. I. Birth prevalence and seasonal incidence during 1979-1981",
Am J Med Genet, 1983, 14(1):181-8.
67. **Rady P.L., Tying S.K., Hudnall S.D., Vargas T., Kellner L.H., Nitowsky H., Matalon R.K.:**
"Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): the incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population",
Am J Med Genet, 1999 86(4): 380-4.
68. **Rizzari C., Valsecchi M.G., Conter V.:**
"MTHFR 677C→T mutation and neural-tube defects",
Lancet, 1997, 350(9089): 1479-80.

69. **Rogala P., Szulc A., Pawlak A., Głowacki M.:**
"Heterogenność kliniczna myelomeningocele w aspekcie wielomiejscowego mechanizmu zamykania cewy nerwowej",
Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol, 1995, 60(2): 97-105.
70. **Rosano A., Smithells D., Cacciani L., Botting B., Castilla E., Cornel M., Erickson D., Goujard J., Irgens L., Merlob P., Robert E., Siffel C., Stoll C., Sumiyoshi Y.:**
"Time trends in neural tube defects prevalence in relation to preventive strategies: an international study",
J Epidemiol Community Health, 1999, 53(10): 630-5.
71. **Schneider J.A., Rees D.C., Liu Y.-T., Clegg J.:**
"Worldwide distribution of a common metylenetetrahydrofolate reductase mutation",
Am J Hum Genet, 1998, 62: 1258-60.
72. **Scholl T.O., Johnson W.G.:**
"Folic acid: influence on the outcome of pregnancy",
Am J Clin Nutr, 2000, 71(5 Suppl): 1295S-303S.
73. **Shaw G.M., Rozen R., Finnell R.H., Wasserman C.R., Lammer E.J.:**
"Maternal vitamin use, genetic variation of infant methylenetetrahydrofolate reductase, and risk for spina bifida",
Am J Epidemiol, 1998, 148(1): 30-7.
74. **Shaw G.M., Velie E.M., Schaffer D.M.:**
"Is dietary intake of methionine associated with a reduction in risk for neural tube defect-affected pregnancies?",
Teratology, 1997, 56(5): 295-9.
75. **Shields D.C., Kirke P.N., Mills J.L., Ramsbottom D., Molloy A.M., Burke H., Weir D.G., Scott J.M., Whitehead A.S.:**
"The "thermolabile" variant of methylenetetrahydrofolate reductase and neural tube defects: An evaluation of genetic risk and the relative importance of the genotypes of the embryo and the mother",
Am J Hum Genet, 1999, 64(4): 1045-55.
76. **Smithells R.W., Sheppard S., Schorah C.J.:**
"Vitamin deficiencies and neural tube defects",
Arch Dis Child, 1976, 51: 944-50.
77. **Stegers-Theunissen R.P., Boers G.H., Blom H.J., Nijhuis J.G., Thomas C.M., Borm G.F., Eskes T.K.:**
"Neural tube defects and elevated homocysteine levels in amniotic fluid",
Am J Obstet Gynecol, 1995, 172(5): 1436-41.
78. **Steen M.T., Boddie A.M., Fisher A.J., Macmahon W., Saxe D., Sullivan K.M., Dembure P.P., Elsas L.J.:**
"Neural-tube defects are associated with low concentrations of cobalamin (vitamin B12) in amniotic fluid",
Prenat Diagn, 1998, 18(6): 545-55.

79. **Stegmann K., Ziegler A., Ngo E.T., Kohlschmidt N., Schroter B., Ermer A., Koch M.C.:**
"Linkage disequilibrium of MTHFR genotypes 677C/T-1298A/C in the German population and association studies in probands with neural tube defects (NTD)",
Am J Med Genet, 1999, 87(1): 23-9.
80. **Stevenson R.E., Allen W.P., Pai G.S., Best R., Seaver L.H., Dean J., Thompson S.:**
"Decline in prevalence of neural tube defects in a high-risk region of the United States",
Pediatrics, 2000, 106(4): 677-83.
81. **Swaiman K.F.:**
"Pediatric neurology. Principles and practice",
2nd ed. Mosby, St. Louis 1994, 422-44.
82. **Szczeklik A., Sanak M., Jankowski M., Dropiński J., Czachór R., Musiał J., Axenti I., Twardowska M., Brzostek T., Tendera M.:**
"Mutation A1298C of methylenetetrahydrofolate reductase: a risk for early coronary disease not associated with hyperhomocysteinemia",
Am J Med Genet, 2001, 101(1): 36-9.
83. **Trembath D., Sherbondy A.L., Vandyke D.C., Shaw G.M., Todoroff K., Lammer E.J., Finnell R.H., Marker S., Lerner G., Murray J.C.:**
"Analysis of select folate pathway genes, PAX3, and human T in a Midwestern neural tube defect population",
Teratology. 1999, 59(5): 331-41.
84. **Ubbink J.B., Christianson A., Bester M.J., Van Allen M.I., Venter P.A., Delport R., Blom H.J., van der Merwe A., Potgieter H., Vermaak W.J.:**
"Folate status, homocysteine metabolism, and methylene tetrahydrofolate reductase genotype in rural South African blacks with a history of pregnancy complicated by neural tube defects",
Metabolism, 1999, 48(2): 269-74.
85. **van Allen M.I., Kalousek D.K., Chernoff G.F., Juriloff D., Harris M., McGillivray B.C., Yong S.-L., Langlois S., McLeod P.M., Chitayat D., Friedman J.M., Wilson R.D., McFadden D., Pantzar J., Ritchie S., Hall J.G.:**
"Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans",
Am J Med Genet, 1993, 47: 723-43.
86. **van der Pal-de Bruin K.M., de Walle H.E., Jeeninga W., de Rover C., Cornel M.C., de Jong-van den Berg L.T., Schouten J., Brand R., Buitendijk S.E.:**
"The Dutch 'Folic Acid Campaign' - have the goals been achieved?",
Paediatr Perinat Epidemiol, 2000, 14(2): 111-7.
87. **van der Put N.M., Eskes T.K., Blom H.J.:**
"Is the common 677C→T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defects? A meta analysis",
QJM, 1997, 90: 111-5.

-
88. **van der Put N.M., Gabreels F., Stevens E.M., Smeitink J.A., Trijbels F.J., Eskes T.K., van den Heuvel L.P., Blom H.J.:**
"A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?",
Am J Hum Genet, 1998, 62(5): 1044-51.
89. **van der Put N.M.J., Steegers Theunissen R.P.M., Frosst P., Trijbels F.J.M., Eskes T.K.A.B., van den Heuvel L.P., Mariman E.C.M., de Heyer M., Rozen R., Blom H.J.:**
"Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida",
Lancet, 1995, 346(8982): 1070-1.
90. **van der Put N.M., Thomas C.M., Eskes T.K., Trijbels F.J., Steegers-Theunissen R.P., Mariman E.C., De Graaf-Hess A., Smeitink J.A., Blom H.J.:**
"Altered folate and vitamin B12 metabolism in families with spina bifida offspring",
QJM, 1997, 90(8): 505-10.
91. **van der Put N.M., van der Molen E.F., Kluijtmans L.A., Heil S.G., Trijbels J.M., Eskes T.K., Van Oppenraaij-Emmerzaal D., Banerjee R., Blom H.J.:**
"Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance to hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease",
QJM, 1997, 90(8): 511-7.
92. **Volcik K.A., Blanton S.H., Tyerman G.H., Jong S.T., Rott E.J., Page T.Z., Romaine N.K., Northrup H.:**
"Methylenetetrahydrofolate reductase and spina bifida: evaluation of level of defect and maternal genotypic risk in Hispanics",
Am J Med Genet, 2000, 95(1): 21-7.
93. **Vollset S.E., Refsum H., Irgens L.M., Emblem B.M., Tverdal A., Gjessing H.K., Mosen A.L., Ueland P.M.:**
"Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study",
Am J Clin Nutr, 2000, 71(4): 962-8.
94. **Volpe J.J.:**
"Neurology of the newborn",
4th ed., W.B.Saunders Company, Philadelphia – London – Toronto – Montreal – Sydney – Tokyo, 2001, 3-21.
95. **von Recklinghausen F.:**
"Untersuchungen über die Spina bifida",
Arch Pathol Anat, 1886, 105: 243-330
96. **Wald N.J., Hackshaw A.K., Stone R., Sourial N.A.:**
"Blood folic acid and vitamin B12 in relation to neural tube defects",
Br J Obstet Gynaecol, 1996, 103(4): 319-24.

97. **Weisberg I., Tran P., Christensen B., Sibani S., Rozen R.:**
"A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity",
Mol Genet Metab, 1998, 64(3): 169-72.
98. **Wenstrom K.D., Johanning G.L., Owen J., Johnston K.E., Acton S., Cliver S., Tamura T.:**
"Amniotic fluid homocysteine levels, 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase genotypes, and neural tube closure sites",
Am J Med Genet, 2000, 90(1): 6-11.
99. **Wenstrom K.D., Owen J., Johanning G., Johnston K., Acton S., Tamura T.:**
"Are all five neural tube closure sites affected by homocysteine metabolism?",
Am J Obstet Gynecol. 1998, 178(1S): 146S.
100. **Whitehead A.S., Gallagher P., Mills J.L., Kirke P.N., Burke H., Molloy A.M., Weir D.G., Shields D.C., Scott J.M.:**
"A genetic defect in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects",
QJM, 1995, 88(11): 763-6.
101. **Wilcken D.E.:**
"MTHFR 677C→T mutation, folate intake, neural-tube defect, and risk of cardiovascular disease",
Lancet, 1997, 350(9078): 603-4.
102. **Wilson A., Leclerc D., Rosenblatt D.S., Gravel R.A.:**
"Molecular basis for methionine synthase reductase deficiency in patients belonging to the cblE complementation group of disorders in folate/cobalamin metabolism",
Hum Mol Genet, 1999, 8(11): 2009-16.
103. **Wilson A., Platt R., Wu Q., Leclerc D., Christensen B., Yang H., Gravel R.A., Rozen R.:**
"A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida",
Mol Genet Metab, 1999, 67(4): 317-23.

