

DOPAD ABNORMÁLNEHO METABOLIZMU A GENETICKÝCH VARIÁCIÍ SÚVISIACICH S KYSELINOU LISTOVOU NA ROZVOJ DEFEKTOV NEURÁLNEJ TRUBICE A ĎALŠÍCH OCHORENÍ

The impact of abnormal metabolism and folic acid-related genetic variations on the development of neural tube defects and other diseases

Vanda RÍSOVÁ¹, Petra OŤAPKOVÁ², Ján MIERTUŠ³, Lívia GAJDOŠOVÁ⁴, Vladimír JAKUŠ⁴, Štefan POLÁK⁵

¹Ústav histológie a embryológie LF UK v Bratislave, prednosta prof. RNDr. I. Varga, PhD. et PhD.

²II. gynekologicko-pôrodnická klinika LF UK a UN v Bratislave, prednosta prof. MUDr. J. Záhumenský, PhD., MPH

³Magis Lab SRL, Rovereto (TN), Italy, prednosta M. Bertelli

⁴Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LF UK v Bratislave, prednosta prof. MUDr. L. Turecký, CSc.

⁵Anatomický ústav LF UK v Bratislave, prednosta prof. MUDr. Š. Polák, CSc.

ABSTRAKT

Defekty neurálnej trubice sú najbežnejšie kongenitálne poruchy súvisiace s malformáciami miechy a lebky, ako sú anencefália, kraniorachischíza, spina bifida cystica, encefalokéla a spina bifida occulta. Vznikajú ako následok nesprávneho uzavretia neurálnej trubice počas embryogenézy. Ide o multifaktorové ochorenia s rizikovými faktormi vrátane genetickej predispozície, rôznych environmentálnych expozícií, pohlavnej odlišnosti a rasovej rôznorodosti. Jedným z kľúčových rizikových faktorov je nízky perikoncepčný príjem folátov u žien v reprodukčnom veku.

Cieľ práce: Patofyziológia defektov neurálnej trubice a metabolizmus folátov nie sú ešte stále dostatočne objasnené. Naša práca sa zameriava na najnovšie pohľady z výskumu metabolizmu jedného uhlíka a jednonukleotidových polymorfizmov génov vo folátovej dráhe na rozvoj defektov neurálnej trubice a ďalších ochorení. Ukazuje sa, že dopyt po jednotkách uhlíka je najvyšší počas vývoja plodu. Nedostatok folátov spôsobuje hypometyláciu deoxyribonukleovej kyseliny, blokuje syntézu 2'-deoxytymidín-5'-monofosfátu a zvyšuje chybnú inkorporáciu uracilu. Tieto účinky môžu vyústiť do genómových nestabilit, ktoré zvyšujú riziko defektov neurálnej trubice.

Výsledky: Identifikácia genetických rizikových faktorov defektov neurálnej trubice nie je jednoduchá vzhľadom na zapojenie viacerých génov do procesu uzatvárania neurálnej trubice. Štúdie genetických polymorfizmov naznačujú rizikové faktory, ale žiadny špecifický gén súvisiaci s folátmi zatiaľ nebol označený za hlavný determinant možnosti vzniku defektov neurálnej trubice.

Záver: Bude potrebné pomocou nových technológií vyhodnotiť viacero génov vrátane génov súvisiacich s folátmi a iných génov u tých istých jedincov, aby sa odhalila možná kombinovaná príslušnosť rizikových alel, ktoré nemusia byť jednotlivé štatisticky významné. Súčasný pokrok v oblasti sekvenovania

ABSTRACT

Neural tube defects are the most common congenital disorders associated with malformations of the spinal cord and skull, such as anencephaly, craniorachischisis, spina bifida cystica, encephalocele, and spina bifida occulta. They arise as a consequence of improper closure of the neural tube during embryogenesis. These are multifactorial diseases with risk factors including genetic predisposition, various environmental exposures, gender differences, and racial diversity. One of the key risk factors is low periconceptional folate intake in women of reproductive age.

The aim: Given that the pathophysiology of neural tube defects and folate metabolism is still poorly understood and elucidated. Our work focuses on the recent insights from research on one-carbon metabolism and single nucleotide polymorphisms of genes in the folate pathway on the development of neural tube defects and other diseases. It appears that the demand for carbon units is highest during fetal development. Folate deficiency causes hypomethylation of deoxyribonucleic acid, blocks synthesis of 2'-deoxythymidine-5'-monophosphate, and increases misincorporation of uracil. These effects can result in genomic instabilities that increase the risk of neural tube defects.

Results: Identifying genetic risk factors for neural tube defects is not straightforward due to the involvement of multiple genes in the neural tube closure process. Studies of genetic polymorphisms suggest risk factors, but no specific folate-related gene has yet been identified as a major determinant of the possibility of developing neural tube defects.

Conclusion: In the future, it will be necessary to use new technologies to evaluate multiple genes, including folate-related genes and other genes in the same individuals, to reveal the possible combined association of risk alleles that may not be individually statistically significant. Current advances in

celého genómu, exómu a sekvenovania novej generácie môžu pomôcť pochopiť genetický a epigenetický základ defektov neurálnej trubice u ľudí. Použitie transkriptomiky, proteomiky, metabolomiky môže napomôcť v identifikácii nových biomarkerov a molekulárnych sietí súvisiacich s defektami neurálnej trubice (obr. 1, lit. 71). Text v PDF www.lekarsky.herba.sk.
KLÚČOVÉ SLOVA: defekty neurálnej trubice, anencefália, kraniorachischíza, spina bifida, encefalokéla, kyselina listová, foláty, 5-metyltetrahydrofolát, génové polymorfizmy, epigenomika. Lek Obz 2024, 73 (7): 248-256

whole-genome, exome, and next-generation sequencing may help to understand the genetic and epigenetic basis of neural tube defects in humans. The use of transcriptomics, proteomics, and metabolomics may help in the identification of new biomarkers and molecular networks related to neural tube defects (Fig. 1, Ref. 71). Text in PDF www.lekarsky.herba.sk.
KEY WORDS: neural tube defects, anencephaly, craniorachischisis, spina bifida, encephalocele, folic acid, folate, 5-methyltetrahydrofolate, gene polymorphisms, epigenomics. Lek Obz 2024, 73 (7): 248-256

Úvod

Vrodené vývojové chyby sú štrukturálne alebo funkčné chyby, ktoré sa vyskytujú počas prenatalného obdobia (1). Defekty neurálnej trubice (NTD) sú najrozšírenejšie vrodené anomálie s celosvetovým výskytom približne 0,5 - 2,0 %, ktoré vznikajú počas embryonálneho vývoja (2). Patogenéza NTD zostáva nejasná, hoci štúdie naznačujú, že NTD sú výsledkom komplexnej súhry narušených génových regulačných sietí, vplyvov prostredia a epigenetickej regulácie (3, 4). Doteraz je porucha biosyntézy tymidylátu de novo (dTMP) a s ňou spojené hromadenie uracilu v deoxyribonukleovej kyseline (DNA) jediným známym metabolickým rizikom pre NTD citlivé na foláty (5). Na presné určenie príčin NTD je potrebné komplexne pochopiť mechanizmy, ktoré súvisia s uzatváraním neurálnej trubice (6).

Pred troma desaťročiami prvé randomizované štúdie preukázali fetoprotektívny účinok kyseliny listovej (FA), resp. multivitamínových doplnkov s FA účinných v rámci primárnej prevencie NTD (7). Preventívny účinok vysokého príjmu syntetickej FA pred rozvojom NTD sa všeobecne považuje za jeden z najvýznamnejších nutričných objavov v rokoch 1976 - 2006 (8). Okrem ochrany pred NTD je suplementácia FA spojená aj so zníženým rizikom vrodených srdcových a močových chýb, ale aj deformácií končatín (9). Predpokladá sa, že na úrovni populácie sa nutričné požiadavky na foláty, ako aj na vitamín D, nedajú plne pokryť „pestrou stravou“, ako to odporúčajú celosvetové zdravotnícke organizácie (10). Z tohto dôvodu je nevyhnutné pristúpiť k suplementácii spomínaných vitamínov. Je však dôležité poznamenať, že syntetická FA je v ľudskom tele neaktívna a musí sa v pečeni premeniť na aktívnu molekulu 5-metyltetrahydrofolátu (5-MTHF), ktorý pôsobí ako metylový donor v rôznych metabolických reakciách. Patrí medzi ne premena homocysteínu (HCY) na metionín (MET), biosyntéza glycínu zo serínu a biosyntéza prekursorových molekúl DNA. Dostatočné množstvo folátov je nevyhnutné pre správne bunkové procesy, metabolizmus aminokyselín, metyláciu DNA, syntézu bielkovín alebo lipidov, replikáciu DNA a delenie buniek. Počas tehotenstva, keď formujúca sa placenta a embryo prechádzajú mnohými deleniami buniek, sa spotreba folátov takmer štvornásobne zvýši (11). Stalo sa zaužívanou praxou predpisovať ženám FA v období pred počatím a počas celého tehotenstva. Keďže

5-MTHF nevyžaduje aktiváciu, je okamžite k dispozícii matke a plodu a nehromadí sa v krvi ako FA, z tohto dôvodu sa odporúča uprednostniť suplementáciu 5-MTHF pred FA (12).

Príjem, transport a metabolická dráha folátov

Primárnym zdrojom folátov u človeka je strava, v ktorej sa foláty nachádzajú predovšetkým v polyglutamátovej forme. Potravinové zdroje folátu zahŕňajú zelenú listovú zeleninu, strukoviny, mäso, orechy, kvasnice, cereálie, obilné klíčky, špargľu, ružičkový kel, avokádo, brokolicu, celozrnné výrobky a citrusové plody (13). Polyglutamáty sa musia hydrolyzovať na monoglutamáty (10), pričom vzniká monoglutamylfolát, ktorý je následne transportovaný cez črevo pomocou protónovo viazaného folátového transportéra, cez plazmatickú membránu redukovaným folátovým nosičom a cez mitochondriálnu membránu mitochondriálnym folátovým transportérom (14). Monoglutamáty sú jediné formy folátov, ktoré cirkulujú v krvi a sú prenášané cez bunkovú membránu. Po vstupe do bunky však prevažne existujú ako polyglutamáty v dôsledku pôsobenia folyl-polyglutamát syntázy (FPGS). Táto metabolická konverzia umožňuje zadržanie folátov, ktoré by sa inak stratili vyplavením z buniek (15).

Nástupom priemyselnej revolúcie sa začali z potravín vytrácať vitamíny, živiny a foláty. Zvýšil sa výskyt neplodnosti, komplikácií v tehotenstve a vrodených chýb, ako sú NTD. Na základe tohto dopytu vedci v laboratóriách vytvorili v roku 1945 syntetickú formu folátu, ktorú nazvali FA. Táto kyselina nemá v ľudskom tele žiadny biologický prínos, kým sa nezmení génmi na 5-MTHF. Tento proces je integrálnou súčasťou folátového cyklu. 5-MTHF sa po uvoľnení do cirkulácie viaže na plazmatické bielkoviny a zároveň je transportovaný do všetkých tkanív organizmu, vrátane mozgovomiechového moku (16). Je dôležité poznamenať, že 5-MTHF je prirodzenou formou folátov a predstavuje 98 % všetkých folátov v plazme. Na rozdiel od FA sa nemusí transformovať pomocou dihydrofolátreduktázy (DHFR), aby sa stal aktívnym. Biologická dostupnosť 5-MTHF nie je preto obmedzená saturáciou tohto enzýmu a jeho príjem nemá za následok hromadenie vysokooxidovanej formy folátu v krvi. Okrem toho polymorfizmy v génoch zodpovedných za kódovanie MTHFR a DHFR nemajú vplyv na biologickú dostupnosť 5-MTHF, namiesto toho však ovplyvňujú polymorfizmus FA (17).

Folát je tiež syntetizovaný črevnou mikrobiotou, čím je umožnená jeho absorpcia cez hrubé črevo. Priame dôkazy naznačujú, že foláty sú absorbované cez hrubé črevo prostredníctvom redukovaného folátového nosiča a protónovo viazaného folátového transportéra (18). Celkové množstvo folátu v tele je približne 15 - 30 mg, z toho polovica je v pečeni a zvyšná časť cirkuluje v krvi a tkanivách.

Generácie folátov

Za 1. generáciu folátov sa považuje FA získavaná zo stravy. Ide o nestabilnú a biologicky ťažko dostupnú formu. Z tohto dôvodu bola vytvorená 2. generácia folátov, a to syntetická FA, ktorá je biologicky dostupnejšia a stabilnejšia pri oxidácii (19). FA je hlavnou syntetickou formou vitamínu B9. Nachádza sa v obohatených potravinách a mnohých vitamínových doplnkoch. FA sa rozkladá svetlom, pri vysokých teplotách (nad 100 °C), pri vysokej koncentrácii kyslíka a nízkom pH (20). Využitie FA závisí od stravy a spôsobu varenia. Za 3. generáciu folátov sa označuje vápenatá soľ 5-MTHF. Najnovšie sa ako 4. generácia folátov objavuje glykozamínová soľ 5-MTHF (Quatrofolic). Jej charakteristickými črtami je vyššia stabilita, rozpustnosť a biologická dostupnosť ako kalciová soľ (21). Je dôležité si uvedomiť, že nie všetky formy folátu sú rovnaké. Najlepšími formami folátov sú L-metylfolát (vápenatá soľ 5-MTHF alebo glykozamínová soľ 5-MTHF) a nemetylovaná forma kyselina folínová (folinát vápenatý), ktorá sa odporúča užívať pacientom citlivým na metylované

formy folátu. L-metylfolát podporuje metyláciu a kyselina folínová podporuje tvorbu báz DNA. Hoci obe formy možno získať z potravy, telo ich musí extrahovať a aktivovať.

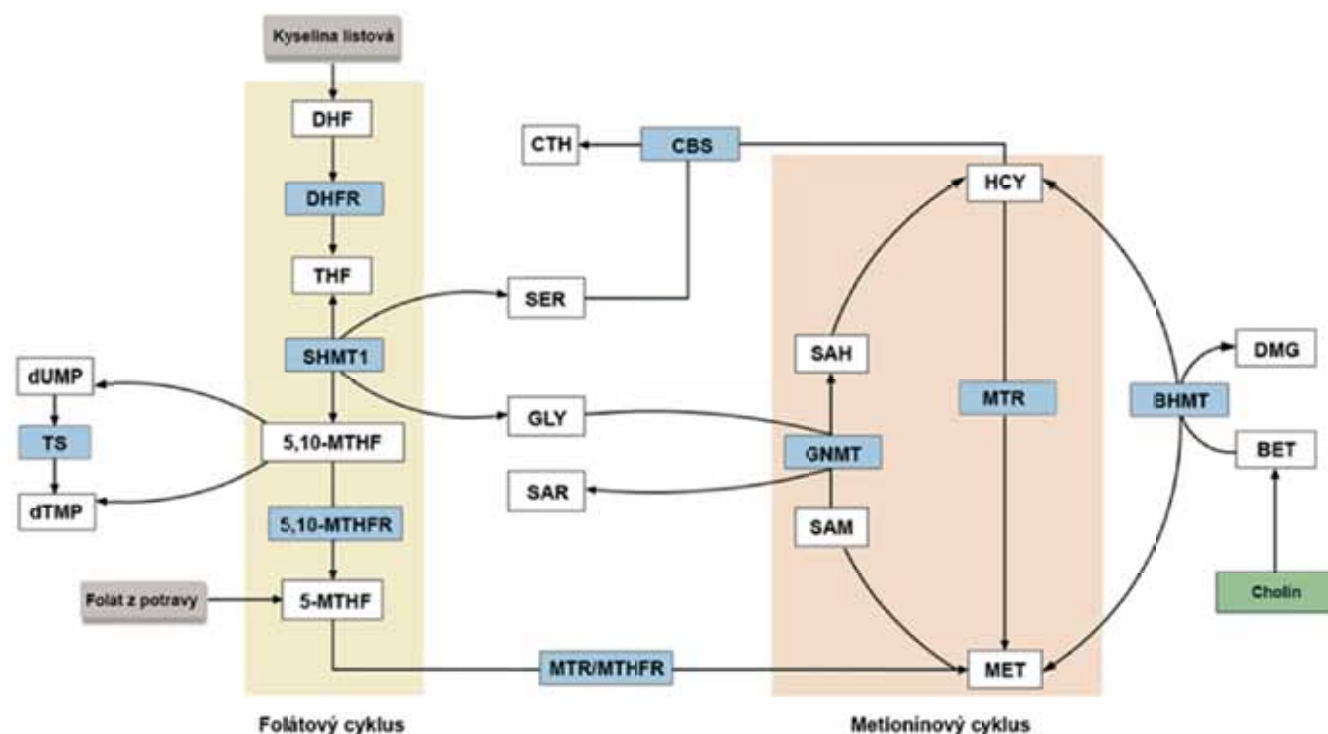
Enzýmy zapojené do metabolizmu folátov

Metabolizmus folátov pozostáva z folátového a metionínového cyklu (obr. 1). Vo folátovom cykle prebieha redukcia atómov uhlíka na oxidačných úrovniach formaldehydovej (formylovej), metylénovej alebo metylovej skupiny, kovalentne viazanej na dusík v polohe 5 alebo 10 (22). Takzvaný metabolizmus jedného uhlíka (OCM) je metabolická sieť široko existujúca v cytoplazme, mitochondriách a jadre. Ide o vzájomne závislé a nevyhnutné biosyntetické dráhy v týchto kompartmentoch. OCM v cytoplazme je potrebný na syntézu polyamínov, metylačné reakcie širokého spektra molekúl, ako sú fosfolipidy, neurotransmitery, proteíny a rôzne malé molekuly. V mitochondriách je OCM potrebný pre veľké množstvo reakcií, ako je vzájomná premena serínu a glycínu, metabolizmus cholínu, purínov a histidínu a syntézu formylovej transferovej ribonukleovej kyseliny (t-RNA). Ukázalo sa, že v jadre určitých typov buniek existuje dráha biosyntézy tymidylátu de novo závislá od folátu.

Tieto procesy sú regulované metabolizmom FA prostredníctvom komplexnej dráhy, ktorá zahŕňa najmenej 30 rôznych enzýmov (23):

- **Dihydrofolát reduktáza (DHFR)** – katalyzuje v pečeni redukciu DHF na THF – biologicky aktívnu formu folátu

Obrázok 1. Úloha folátu a cholínu v jednouhlíkovom (1C) metabolizme. 5,10-MTHFR – 5,10-metyléntetrahydrofolátreduktáza; 5,10-MTHF – 5,10-metyléntetrahydrofolát; 5-MTHF – 5-metyltetrahydrofolát; BET – betaín; BHMT – betaín-homocysteín S-metyltransferáza; CBS – cystatio-9-P-syntáza; CTH – cystationín; DHF – dihydrofolát; DHFR – dihydrofolátreduktáza; DMG – dimetylglycín; dUMP – deoxyuridín monofosfát; dTMP – deoxytymidín monofosfát; GLY – glycín; GNMT – glycín N-metyltransferáza; HCY – homocysteín; MET – metionín; MTR – metionín syntáza; SAH – S-adenosylhomocysteín; SAM – S-adenozylmetionín; SAR – sarkozín; SER – serín; SHMT1 – serínhydroxymetyltransferáza 1; THF – tetrahydrofolát; TS – tymidylátsyntáza.



látu. Táto redukcia syntetizuje koenzýmy, ktoré majú úlohu v mnohých metabolických dráhach (24). THF má rozhodujúcu úlohu v metabolizme jedného uhlíka (OCM), funguje ako jednouhlíkový nosič, ktorý získava jeden uhlík zo serínu za vzniku glycínu (25). Enzým DHFR dokáže vyprodukovať 200 µg DHF zo syntetickej FA. Každých viac ako 200 µg FA, ktoré skonzumujeme navyše, tento enzým nedokáže pretransformovať. Hromadenie nemetabolizovanej FA v našom tele inhibuje dôležité enzýmy a obmedzuje schopnosť tela získavať aktívny folát.

- **Serín hydroxymetyltransferáza (SHMT1)** konvertuje THF na 5,10-metyléntetrahydrofolát (5,10-MTHF).
- **5,10-metyléntetrahydrofolát reduktáza (5,10-MTHFR)** má kľúčovú úlohu v metabolizme folátov tým, že ireverzibilne katalyzuje premenu 5,10-metyléntetrahydrofolátu (5,10-MTHF) na 5-metyltetrahydrofolát (5-MTHF), ktorý je primárnou cirkulujúcou formou folátu (26). Pôsobí ako donor metylu pre remetyláciu HCY.
- **Tymidylátsyntáza (TS)** katalyzuje premenu 2'-deoxyuridín-5'-monofosfátu (dUMP) na deoxytymidylát monofosfát (dTMP) s použitím 5,10-MTHF ako metylového donora. Táto reakcia je dôležitým krokom pre syntézu DNA (25).
- **Metionínsyntáza (MTR)** je katalyzátor remetylácie HCY na MET presunom metylvej skupiny z 5-MTHF na HCY (24). Táto reakcia je dôležitá, pretože poskytuje MET na syntézu SAM, ktorý je univerzálnym donorom metylových skupín (26).
- **Metyltetrahydrofolát reduktáza (MTHFR)** premieňa potravinové foláty na aktívnu formu folátu, 5-MTHF známy aj ako L-metylfolát (L-5-MTHF). Odhaduje sa, že viac ako 50 % populácie má genetickú mutáciu v géne MTHFR, ktorá môže brániť v dosiahnutí dostatočnej hladiny folátov z potravy.

Metylačné reakcie a regulácia hladín homocysteínu

Foláty ako prirodzená forma vitamínu B9 a ich syntetický derivát FA, sa zúčastňujú na metylačných reakciách, ktoré sú nevyhnutné pre epigenetické procesy embryogenézy (6). Tieto reakcie sú súčasťou metionínového cyklu. Po vstupe do bunky funguje 5-MTHF ako donor metylu pre HCY remetyláciu (27 – 28). MET slúži ako substrát pre SAM, ktorý pôsobí ako kofaktor a donor metylových skupín pri metylačných reakciách. Tieto reakcie zahŕňajú metyláciu DNA, RNA, neurotransmitterov, lipidov a proteínov vrátane histónov (29). Po odovzdaní svojej metylvej skupiny sa SAM mení na SAH, ktorý pôsobí ako kompetitívny inhibítor mnohých metyltransferáz (30). SAM je silným inhibítorom MTHFR, ktorý vo vysokej koncentrácii znižuje syntézu 5-MTHF, a tým aj remetyláciu HCY. Naopak, pri nízkych koncentráciách SAM podporuje remetyláciu HCY. Nedostatok folátov môže viesť k zníženiu dostupnosti jednouhlíkatých skupín potrebných pre metylačné reakcie. To následne spôsobuje hromadenie HCY. Zvýšená hladina HCY môže viesť k akumulácii SAH,

ktorý inhibuje metyltransferázy závislé od SAM (31), čo môže spôsobiť hypometyláciu DNA (32). Je dôležité poznamenať, že k tomuto účinku môže prispieť nedostatok SAM, ako aj akumulácia SAH. Na rozdiel od toho suplementácia FA vedie k zníženiu hladiny HCY v krvi, ktorý pri vysokých koncentráciách môže spôsobiť poškodenie endotelových buniek a zároveň sa spája so zvýšeným rizikom kardiovaskulárnych ochorení (33).

Genetické polymorfizmy súvisiace s metabolizmom folátu

Napriek dlhoročným klinickým štúdiám a výskumu na zvieracích modeloch nie sú známe vzorce genetickej variability u ľudí, ktoré predurčujú vznik NTD. To obmedzuje našu schopnosť definovať genetickú štruktúru, ktorá je základom etiológie NTD. Na pochopenie genetického základu NTD je potrebné preskúmať digénne aj polygénne interakcie, ako aj širšie spektrum zmien genómu (34). Hladina folátov a rodinná anamnéza patria medzi najsilnejšie rizikové faktory NTD. Preto boli gény kódujúce enzýmy a iné proteíny súvisiace s metabolickými dráhami folátov identifikované ako kandidátske gény pre riziko rozvoja NTD. Tým, že sú tieto dráhy úzko prepojené, bola ich identifikácia náročná. Poruchy v jednej dráhe súčasne narušajú všetky dráhy v sieti (35). Sieť zodpovedná za folátom sprostredkovaný OCM je nevyhnutná pre syntézu purínových nukleotidov, tymidylátu a remetyláciu HCY na MET. MET sa potom môže premeniť na SAM na podporu viac ako 100 bunkových metylačných reakcií. Zmenený OCM môže negatívne vyústiť do zníženej rýchlosti syntézy DNA, zvýšenej inkorporácie uracilu do DNA, čo môže viesť k nestabilite genómu a k zmenám vo vzorcoch metylácie chromatinu.

Polymorfizmy v génoch zapojených do metabolizmu folátov môžu ovplyvniť stav folátov. Biosyntéza dTMP je jedinou cestou OCM, ktorá sa ukázala ako príčinná v patogenéze NTD závislých od FA a ktorá zodpovedá až za 70 % rizika NTD u ľudí (36). Poruchy syntézy dTMP vedú ku genómovej nestabilite a bunkovej smrti. Znížená miera syntézy tymidíntrifosfátu (dTTP) spôsobuje zníženie poolu dTTP potrebného na syntézu DNA a zvýšenie substrátu dUMP. V dôsledku neschopnosti DNA polymeráz rozlišovať medzi dUTP a dTTP, vedie narušená syntéza dTMP k zvýšeniu chybných inkorporácií uracilu v DNA (37). Početné štúdie preukázali, že nedostatok folátov spôsobuje genómovú nestabilitu a chromozómové zlomy (38) a uracilové DNA glykozylázy môžu vylúčiť uracil z DNA. Na určenie etiológie NTD reagujúcich na FA, NTD nereagujúcich na FA a iných faktorov spojených s NTD je dôležité pochopiť, či fungujú prostredníctvom spoločného mechanizmu súvisiaceho s folátmi a ktoré cesty sú príčinné v patogenéze NTD.

Pri štúdiách ľudských NTD sa dosiaľ zistila pozitívna asociácia s folátovými receptormi kódovanými génmi FOLR1, FOLR2 a FOLR3, ďalej MTHFR, MTRR, MTHFDIL, TYMS, DHFR, MTHFD1 a SHMT1. Výlučne negatívnu asociáciu preukazoval folátový transportér kó-

dovaný génom SLC19A1, protónovo viazaný folátový transporter kódovaný génom SLC46A1 a MTR (39). Najrozsiahlšie skúmaným génovým variantom rizika NTD u ľudí je bežný polymorfizmus MTHFR. Tento gén má viac ako 30 známych mutácií a 10 polymorfizmov, ktoré modifikujú jeho enzymatickú aktivitu (40). MTHFR uľahčuje prenos metylových skupín z folátového cyklu do metionínového cyklu, čo z neho robí kľúčový bod pre distribúciu jednouhlíkatých jednotiek medzi funkčnými výstupmi OCM (41). Znížená aktivita MTHFR vedie k zníženiu 5-MTHF, čo zhoršuje remetyláciu HCY a zvyšuje hladinu HCY (17). Viaceré štúdie poukázali na úlohu MTHFR rs1801133 v riziku NTD (42). Ukázalo sa však, že variant MTHFR nemá kauzálny účinok vedúci k NTD, ako je to v prípade iných príkladov zvýšeného celkového HCY v plazme. Metaanalýza tvrdí, že riziko NTD spôsobené variantom MTHFR je spôsobené poruchou folátov a nie zmenenou remetyláciou HCY (43).

Gén MTHFR sa nachádza na 1p36.3 (44). Ak MTHFR funguje v tele správne, zabezpečí vznik dostatočného množstva 5-MTHF, čo umožní premenu HCY na MET a následne vznik SAM dôležitého pre metylačné reakcie vrátane metylácie DNA. Najviac preskúmané polymorfizmy v géne MTHFR sú:

- C677T: C → T na nukleotide 677, čo spôsobuje premenu alanínu na valín v proteíne (45).
- A1298C: A → C na nukleotide 1298, čo vedie ku konverzii alanínu na glutamát v proteíne. Tieto polymorfizmy sú od seba vzdialené 2,1 kb. Medzi ďalšie zaznamenané polymorfizmy patria T1059C, T1317C a G1793A (26).

Nukleotidová zámena 677C → T v géne MTHFR, ktorá je v populácii pomerne častá, sa považuje za prvý identifikovaný rizikový faktor pre rázštep chrbtice. Polymorfizmus MTHFR A1298C bol identifikovaný ako ďalší genetický rizikový faktor pre NTD, hoci jeho vplyv je menej významný ako vplyv polymorfizmu C677T. Je to spôsobené tým, že negatívny účinok C677T na aktivitu enzýmu, folátov a hladinu HCY je u zložených heterozygotov zosilnený. Preto niektoré prípady NTD, ktoré by sa dali vysvetliť prítomnosťou genotypu 677TT, možno pripísať zloženým heterozygotom (46). V súvislosti s NTD sa skúmali aj polymorfizmy v iných génoch, ktoré sú významné pre metabolizmus alebo transport folátov. Polymorfizmus považovaný za ďalší genetický rizikový faktor pre NTD sa nachádza na krátkom ramienku ľudského chromozómu 5 v géne pre enzým metionínsyntáza reduktáza (MTRR) (47). Funkciou enzýmu MTRR je aktivácia MTR, ktorá si vyžaduje prítomnosť vitamínu B12. Riziko NTD sa výrazne zvyšuje, ak sa nízka hladina B12 v krvi kombinuje s homozygotným genotypom 66GG. Prítomnosť dvojito homozygotného genotypu MTHFR 677TT/MTRR 66GG zvýšila štvornásobne riziko vzniku NTD u detí a trojnásobne u ich matiek (48). Polymorfizmus, ktorý sa nachádza na dlhom ramienku ľudského chromozómu 14 v géne pre enzým metyléntetrahydrofolátdehydrogenáza 1 (MTHFD1), sa podieľa na katalýze troch po sebe

nasledujúcich reakcií a zároveň je kľúčový pre správny metabolizmus folátov.

Štúdie genetických polymorfizmov, najmä tých, ktoré sa podieľajú na OCM folátov, naznačujú rizikové faktory, ako napríklad MTHFR, ale žiadny špecifický gén súvisiaci s folátmi zatiaľ nebol označený za hlavný determinant možnosti vzniku NTD. Konkrétne ku vzniku NTD pravdepodobne prispieva narušenie syntézy DNA, ktorá je potrebná na proliferáciu buniek a zároveň epigenetická regulácia expresie génov závislá od metylácie DNA alebo histónov. Epigenomika zahŕňa širokú škálu modifikácií sekvencií genómovej DNA, ktoré možno skúmať pomocou vysokovýkonných techník. Nedávny pokrok v epigenomických technológiách umožnil štúdium vrodených malformácií a integráciu veľkého množstva údajov na pochopenie NTD (49). Zhang a kol. (50) zistili, že TRIM4 gén je spojený s NTD na základe celogenómovej DNA metylačnej analýzy. Abnormálne metylačné vzory v TRIM4 v imunitných dráhach by mohli byť zapojené do patogenézy NTD. Genetické varianty v génoch TRIM4 len mierne prispievajú k etiológii ľudských NTD. Ide o prvú štúdiu, ktorá analyzovala asociáciu TRIM4 génu a NTD z genetických a epigenetických hľadísk (50).

Prechod od hľadania jednotlivých génov k skúmaniu exómu, prípadne celého genómu, môže pomôcť pri identifikácii a hodnotení ďalších rizikových polymorfizmov, ale aj lepšie pochopiť genetické faktory podieľajúce sa na vzniku NTD (51). Štúdium genomiky a transkriptomiky má kľúčový význam pri objavovaní ciest ochorení a navrhovaní presných a účinných liekov (52). Na potrebné skúmanie dynamiky metabolizmu folátov, respektíve analýzu metabolického toku folátov sa používajú stabilné izotopy ako deutérium alebo značkovany ¹³C folát. Okrem toho možno testovať aktivitu enzýmov zapojených do metabolizmu folátu (napríklad MTHFR). Moderná metabolomika je súčasťou personalizovanej (resp. presnej) medicíny, ktorá je zameraná na individualizované vyhľadávanie prevencie či terapie porúch a ochorení (53).

V súčasnosti sa veľké úsilie kladie na identifikáciu biochemických markerov z klinických vzoriek a modelových systémov pomocou hmotnostnej (MS) a tandemovej (MS/MS) spektrometrie spriahnutej s kvapalinovou (LC) respektíve s plynovou (GC) chromatografiou a tiež pomocou nukleárnej magnetickej rezonančnej (NMR) spektroskopie (54). Tento prístup poskytuje nový pohľad na pochopenie NTD na proteínovej, metabolickej a molekulovej úrovni (55).

Kyselina listová verus 5-metyltetrahydrofolát

Konvenčné prenatálne odporúčania naznačujú, že suplementácia doplnkov FA pomôže tehotným ženám v predkoncepčnom období predchádzať NTD. Dôvodom, prečo lekári naďalej odporúčajú a predpisujú doplnky FA v tehotenstve či pri vysokých hladinách HCY, je tradičná štruktúra prenatálneho poradenstva a cenová dostupnosť doplnkov FA.

Termín FA a folát sa často zamieňajú, no pritom ide o dve rôzne živiny. Hoci niektorí lekári môžu tvrdiť, že sú totožné, je medzi nimi významný rozdiel: FA je syntetická forma, kým foláty sa vyskytujú v prirodzenej forme. Hoci FA má podobnosť s prirodzenou verziou, nemusí účinne podporovať dopyt organizmu po prirodzenom foláte, najmä u jedincov s poruchou metylácie alebo inými genetickými problémami. FA je bežne prítomná v obohatených potravinách na báze obilnín, v mnohých multivitamínoch, prenatálnych vitamínoch a iných výživových doplnkoch alebo prípravkoch na lekárske predpis. Táto preferencia FA nie je spôsobená jej prirodzenou výhodou oproti folátu, ale tým, že sa tradične používa ako lacnejšia alternatíva. Netreba zabúdať na to, že FA môže skutočne blokovať folátové receptory, čo vedie k nedostatku folátu v tele! U ľudí sú folátové receptory kódované tromi génmi: FOLR1, FOLR2, FOLR3. Súvislosť medzi génmi FOLR a NTD prvýkrát opísali O'Byrne et al. (56).

Existujú rôzne typy folátov, ktoré sa líšia od syntetickej FA. Foláty sú prirodzené formy vitamínu B9, ktoré priaznivo vplyvajú na tehotenstvo, ale aj na náladu, zdravie srdca a psychickú pohodu. Pre zdravý metylačný cyklus je veľmi dôležité udržiavať dostatočnú hladinu folátov. Metylácia je nevyhnutná pre funkciu DNA, replikáciu a delenie buniek (57). Foláty sú tiež potrebné na odbúravanie HCY, ktorý je spojený so zvýšeným rizikom srdcových ochorení. Okrem toho je folát dôležitým prvkom na tvorbu zdravých erytrocytov, ktoré prenášajú živiny a kyslík do celého tela, na udržanie zdravého nervového systému, energetickej hladiny a mentálnej jasnosti.

Vedci študovali možnosť, či príjem FA počas tehotenstva vedie k akumulácii neaktívnych metabolitov v sére plodu. Obeid a kol. (58) uskutočnili štúdiu, v ktorej porovnávali sérové koncentrácie folátov u 25 novorodencov, ktorých matky počas tehotenstva užívali FA, s podobným počtom novorodencov, ktorých matky ju neužívali. Suplementácia FA počas tehotenstva nie je schopná obohatiť fetálne sérum, na rozdiel od 5-MTHF a THF. Z toho vyplýva, že suplementácia 5-MTHF počas tehotenstva by mohla byť spôsobom, ako okamžite dodať foláty plodu (58).

Kyselina listová a jej metabolity v zdraví a chorobe

Hoci je folát nevyhnutný počas celého života, je obzvlášť dôležitý v ranom štádiu ľudského vývoja. Choroby vyplývajúce z nedostatku FA možno klasifikovať na základe 2 prístupov (59):

1. Nedostatočný príjem, zvýšené straty a spotreba:
 - nedostatočný príjem: podvýživa, nevyvážená strava, jednostranná diéta s obmedzením zelenej zeleniny, parenterálna výživa s nedostatočnou suplementáciou;
 - zvýšené straty: hnačky, vracanie, diabetes mellitus, alkoholizmus, lieky (antikonvulzíva, analgetiká, estrogény, izoniazid, erytropoetín, metotrexát);

- zvýšená spotreba: chronický stres, trauma, vrcholové športovanie, tehotenstvo (viacpočetné, placenta praevia, abrupcia placenty, predchádzajúce spontánne potraty, pôrody s nízkou pôrodnou hmotnosťou či kongenitálnymi anomáliami).

2. Prejavy orgánových ochorení:

- renálne: chronické obličkové zlyhanie, dlhotrvajúca dialyzačná liečba;
- hepatálne: cirhóza;
- hematologické: kosáčikovitá anémia, talasémia major, dedičná sférocytóza;
- gastrointestinálne: enteritída, kolitída, celiakia, Crohnova choroba, malabsorpčné stavy, sprue.

FA je nevyhnutná pre erytropoézu. Jej nedostatok spomaľuje dozrievanie erytrocytov, čo vedie k vzniku hyperchrómnej megaloblastickej anémie, ktorá je charakterizovaná znížením počtu erytrocytov a zvýšením priemernej koncentrácie hemoglobínu v každom erytrocyte.

Hyperhomocysteinémia, ktorá môže byť spôsobená nedostatočným príjmom folátov alebo poruchou metabolizmu folátov, ako aj nedostatkom vitamínu B12, sa spája so zvýšeným rizikom hypertenzie, kardiovaskulárnych a cerebrovaskulárnych ochorení (60 – 61). Zároveň je rizikovým faktorom tromboembolických komplikácií, najmä u 25 % populácie s variantmi v géne kódujúcom MTHFR (62).

Nízky stav folátov sa epidemiologicky spája s viacerými druhmi rakoviny, vrátane leukémie, lymfómu, rakoviny hrubého čreva, prsníka a prostaty. Foláty majú kľúčovú úlohu pri syntéze DNA a metylácii, ktoré sú nevyhnutné na udržanie integrity DNA a expresie génov. Deficit folátov môže mať za následok začlenené uracilu do DNA, chromozómové zlomy, vznik buniek s abnormálnym karyotypom a zmeneným dávkovaním génov, čo zvyšuje pravdepodobnosť vzniku nádorov (63).

FA je kofaktorom v OCM, ktorý má dôležitú úlohu pri udržiavaní integrity neurónov a pružnosti nervových buniek. Starnutie vedie k výraznému zníženiu koncentrácie FA a jej esenciálneho metabolitu SAM v mozgovomiechovom moku, čo v konečnom dôsledku môže vyústiť do hyperhomocysteinémie. Tento stav sa spája s rôznymi neurologickými ochoreniami, ako sú demencia a Alzheimerova choroba. Deficit FA a zvýšené hladiny HCY môžu poškodiť neuróny, následkom čoho vzniká poškodenie DNA a apoptóza v hipokampe, v oblasti mozgu zodpovednej za pamäť (64 – 66).

Folát a cholin sa považujú za kľúčové substráty pri vývoji a formovaní fetálneho mozgu (67 – 68), ide predovšetkým o delenie a rast neurónov či syntézu neurotransmiterov (69). Folát aj po prvom trimestri stále predstavuje kľúčovú látku pri vývoji niektorých častí mozgu, ako je hipokampus, corpus striatum, sluchové a zrakové centrá mozgovej kôry (70). Nedostatočné hladiny folátov sú spájané aj so zmenami v neurologickom vývoji potomstva, ako je napríklad znížený celkový objem

mozgu, zmenená hrúbka kortikálnej a bielej hmoty mozgu, neurogenéza a apoptóza neurónov (71).

Záver

Príčina NTD nie je stále dostatočne objasnená. Pochopenie súvislosti medzi NTD a rôznymi genetickými markermi môže pomôcť lepšie pochopiť genetiku a patogenézu NTD. Identifikácia a presné určenie genetických rizikových faktorov NTD nie je jednoduché vzhľadom na zapojenie viacerých génov do procesu uzatvárania neurálnej trubice. Výskum za posledných tridsať rokov však naznačuje, že genetická zložka patológie NTD je najlepšie opísaná omnigénnym modelom dedičnosti. Do budúcnosti bude nevyhnutné kompletne vyhodnotiť viacero génov vrátane génov súvisiacich s folátmi a iných génov u tých istých jedincov, aby sa odhalila možná kombinovaná príslušnosť rizikových alel, ktoré nemusia byť jednotlivo štatisticky významné.

Súčasný pokrok v oblasti sekvenovania celého genómu, exómu a sekvenovania novej generácie môžu pomôcť pochopiť genetický a epigenetický základ NTD u ľudí. Preto treba na dosiahnutie požadovaných cieľov získať informácie o všetkých dráhach a úrovniach, ktoré majú vplyv na ochorenie. Je nepochybné, že OCM je vysokosofistikovaná biochemická dráha, ktorá zložito riadi prenos jednotiek s jedným uhlíkom z jednej molekuly na druhú. OCM má významnú úlohu vo fyziologických a patologických stavoch a v súčasnosti je predmetom intenzívneho výskumu. OCM zostáva fascinujúcou a zložitou biochemickou cestou s jeho prísnu reguláciou a príspevom k mnohým biologickým procesom. Treba tu však určiť mechanizmus a zodpovedajúcu metabolickú dráhu pre iniciáciu a progresiu jednouhlíkového metabolizmu. Ukazuje sa, že všetky zložky metabolických dráh neboli ešte identifikované a úlohou navyše zostáva pochopiť, ako sú regulované tieto metabolické toky. Porovnávací a funkčný genomika a proteomika otvorili nové možnosti riešenia týchto zostávajúcich problémov. Štúdium genomiky a transkriptomiky má kľúčový význam pri objavovaní ciest ochorení a navrhovaní presných a účinných terapeutických cieľov. Metódy sekvenovania nukleových kyselín, najmä technológie sekvenovania novej generácie, sú základnými nástrojmi na štúdium týchto úrovní. Projekt ľudského genómu, detekcia jednonukleotidových polymorfizmov a celogenómové asociačné štúdie (GWAS) sú základom väčšiny moderných štúdií.

Ďalším významným krokom je prechod od konvenčnej medicíny k personalizovanej (resp. presnej) medicíne. Cieľom personalizovanej medicíny je zamerať správnu liečbu na správnych pacientov v správnom čase. Technológie omiky pokročili a v súčasnosti poskytujú nástroje bez hypotéz na preskúmanie každého génu v genóme jedincov postihnutých NTD. To umožňuje objavovať patogénne varianty a metylačné ciele v celom postihnutom genóme. Štúdie profilovania transkriptómu môžu identifikovať gény s expresiou regulovanou folátmi, čím sa efektívnejšie odhalia genetické mechanizmy vedúce k vzniku NTD v dôsledku nedostatku folátov.

Použitie transkriptomiky, cielej a necielej proteomiky, metabolomiky a analýzy metabolických tokov môže napomôcť v identifikácii nových biomarkerov a molekulových sietí súvisiacich s NTD.*

***Poďakovanie:** Táto práca bola podporená grantom EÚ v rámci programu cezhraničnej spolupráce Interreg V-A Slovenská republika - Rakúsko V014-NutriAging.

Vyhlasenie o ľudských právach. Tento článok neobsahuje žiadne štúdie na ľudských či zvieracích objektoch.

Konflikt záujmov: Autori publikácie vyhlasujú, že nemajú žiaden konflikt záujmov.

Literatúra

1. SARMAH S, MURALIDHARAN P, MARRS JA. Common congenital anomalies: environmental causes and prevention with folic acid containing multivitamins. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2016, 108: 274 – 286.
2. YANG X, FAN G, WANG Z, et al. Study on the relationship between genetic polymorphism of reductive folic acid carrier and the risk of neural tube defects. *Childs Nerv Syst* 2023, 39 (7): 1711 – 1718.
3. FINNELL RH, CAIAFFA CD, KIM SE, et al. Gene Environment Interactions in the Etiology of Neural Tube Defects. *Front Genet* 2021, 12: 608.
4. WOLUJEWICZ P, ROSS ME. The search for genetic determinants of human neural tube defects. *Curr Opin Pediatr* 2019, 31 (6): 739 – 746.
5. LACHENAUER ER. Folate one-carbon metabolism in mouse models of neural tube defects. *ecommons.cornelledu*. Published online May 30, 2019. Accessed January 30, 2024.
6. COPP AJ, GREENE NDE. Neural tube defects- disorders of neurulation and related embryonic processes. *Wiley Interdiscip Rev Dev Bio* 2013, 2 (2): 213 – 227.
7. CINGEL V, GBELCOVÁ H, RAJEC J, et al. Kyselina listová a poruchy uzatvárania neurálnej rúry – od minulosti po súčasnosť. *Čes-slov Pediat* 2012, 67 (1): 45 – 55.
8. KATAN MB, BOEKSCHOTEN MV, CONNOR WE, et al. Which are the greatest recent discoveries and the greatest future challenges in nutrition? *Eur J Clin Nutr* 2009, 63 (1): 2 – 10.
9. CHENG Z, GU R, LIAN Z, et al. Evaluation of the association between maternal folic acid supplementation and the risk of congenital heart disease: a systematic review and meta-analysis. *Nutr J* 2022, 21 (1): 20.
10. NNR. Nordic Nutrition Recommendations NNR 2004 Integrating Nutrition and Physical Activity. Nordic Council of Ministers; Stockholm, Sweden: 2005.
11. BAR-OZ B, KOREN G, NGUYEN P, et al. Folate fortification and supplementation- are we there yet? *Reprod Toxicol* 2008, 25 (4): 408 – 412.
12. FERRAZZI E, TISO G, DI MARTINO D. Folic acid versus 5-methyl tetrahydrofolate supplementation in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2020, 253: 312 – 319.
13. ISMAIL S, ELJAZZAR S, GANJI V. Intended and Unintended Benefits of Folic Acid Fortification-A Narrative Review. *Foods* 2023, 12 (8): 1612.
14. FROESE DS, FOWLER B, BAUMGARTNER MR. Vitamin B₁₂, folate, and the methionine remethylation cycle-biochemistry, pathways, and regulation. *J Inherit Metab Dis* 2019, 42 (4): 673 – 685.

15. NAZKI FH, SAMEER AS, GANAIE BA. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene* 2014, 533 (1): 11 – 20.
16. KOMLOSI M. Využitie kyseliny listovej z pohľadu internistu. *Medicus news* 2020, 2 (3): 38 – 40.
17. SCHWAHN B, ROZEN R. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences. *Am J Pharmacogenomics* 2001, 1: 189 – 201.
18. ROSSI M, AMARETTI A., RAIMONDI S. Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* 2011, 3: 118 – 134.
19. FAIT T. The fourth generation of folates and preconception care. *Prakt Gyn* 2014, 18 (4): 246 – 250.
20. GAZZALI AM, LOBRY M, COLOMBEAU L, et al. Stability of folic acid under several parameters. *Eur J Pharm Sci* 2016, 93: 419 – 430.
21. PENTIVA K, McNULTY H, REICHERT R, et al. The short term bioavailabilities of (6S)-5-methyltetrahydrofolate and folic acid are equivalent in men. *J Nutr* 2004, 134 (3): 580– 585.
22. ZHENG Y, CANTLEY LC. Toward a better understanding of folate metabolism in health and disease. *J Exp Med* 2019, 216 (2): 253 – 266.
23. LIGHTFOOT TJ, SKIBOLA C F, WILLETT EV, et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma associated with polymorphisms in folate-metabolizing genes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, 14 (12): 2999 – 3003.
24. SHANE B. Folate chemistry and metabolism. *Clin Res Regul Affairs* 2001, 18 (3): 137 – 159.
25. WANG X, YU J, WANG J. Neural Tube Defects and Folate Deficiency: Is DNA Repair Defective? *Int J Mol Sci* 2023, 24 (3): 2220.
26. SHARP L, LITTLE J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004, 159 (5): 423 – 443.
27. HIRAOKA M, KAGAWA Y. Genetic polymorphisms and folate status. *Congenit Anom* 2017, 57 (5): 142 – 149.
28. HUBNER RA, HOULSTON RS. Folate and colorectal cancer prevention. *Br J Cancer* 2009, 100 (2): 233 – 239.
29. CRIDER KS, YANG TP, BERRY RJ, et al. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. *Adv Nutr* 2012, 3 (1): 21 – 38.
30. RYAN BM, WEIR DG. Relevance of folate metabolism in the pathogenesis of colorectal cancer. *J Lab Clin Med* 2001, 138 (3), 164 – 176.
31. YI P, MELNYK S, POGRIBNA M, et al. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 2000, 275 (38): 29318 – 29323.
32. LIU JJ, WARD RL. Folate and one-carbon metabolism and its impact on aberrant DNA methylation in cancer. *Adv Genet* 2010, 71: 79 – 121.
33. KELLY GS. Folates: supplemental forms and therapeutic applications. *Altern Med Rev* 1998, 3 (3): 208 – 20.
34. WOLUJEWICZ P, AGUIAR-PULIDO V, ABDELALEEM A, et al. Genome-wide investigation identifies a rare copy-number variant burden associated with human spina bifida. *Genet Med* 2021, 23 (7): 1211 – 1218.
35. MISSELBECK K, MARCHETTI L, FIELD MS, et al. A hybrid stochastic model of folate-mediated one-carbon metabolism: Effect of the common C677T MTHFR variant on de novo thymidylate biosynthesis. *Sci Rep* 2017, 7: 797.
36. PREVENTION OF NEURAL TUBE DEFECTS: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet* 1991, 338 (8760): 131 – 137.
37. BARNES DE, LINDAHL T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet* 2004, 38: 445 – 476.
38. KNOCK E, DENG L, WU Q, et al. Strain differences in mice highlight the role of DNA damage in neoplasia induced by low dietary folate. *J Nutr* 2008, 138 (4): 653 – 658.
39. ALMEKKAWI AK, ALJARDALI MW, DAADAA HM, et al. Folate Pathway Gene Single Nucleotide Polymorphisms and Neural Tube Defects: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Pers Med* 2022, 12 (10): 1609.
40. LECLERC D, SIBANI S, ROZEN R. Molecular Biology of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Overview of Mutations/Polymorphisms. *Landes Bioscience* 2000 – 2013.
41. LEUNG KY, PAI YJ, CHEN Q, et al. Partitioning of One-Carbon Units in Folate and Methionine Metabolism Is Essential for Neural Tube Closure. *Cell Rep* 2017, 21 (7): 1795 – 1808.
42. WHITEHEAD AS, GALLAGHER P, MILLS JL, et al. A genetic defect in 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. *QJM* 1995, 88 (11): 763 – 766.
43. TSANG BL, DEVINE OJ, CORDERO AM, et al. Assessing the association between the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C>T polymorphism and blood folate concentrations: a systematic review and meta-analysis of trials and observational studies. *Am J Clin Nutr* 2015, 101 (6): 1286 – 1294.
44. GOYETTE P, SUMMER JS, MILOS R, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994, 7 (2): 195 – 200.
45. FROSST P, BLOM HJ, MILOS R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995, 10 (1): 111 – 113.
46. van der PUT NM, GABREELS F, STEVENS EM, et al. 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 – 1051.
47. LECLERC D, WILSON A, DUMAS R, et al. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95 (6): 3059 – 3064.
48. WILSON A, PLATT R, WU Q, et al. 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 – 323.
49. HUANG W, YUAN Z, GU H. Exploring epigenomic mechanisms of neural tube defects using multi-omics methods and data. *Ann NY Acad Sci* 2022, 1515: 50 – 60.
50. ZHANG H, GUOY, GU H, et al. TRIM4 is associated with neural tube defects based on genome-wide DNA methylation analysis. *Clin Epigenetics* 2019, 11 (1): 17.
51. MOLLOY AM, PANGILINAN F, BRODY LC. Genetic Risk Factors for Folate-Responsive Neural Tube Defects. *Annu Rev Nutr* 2017, 37: 269 – 291.
52. DUCKER GS, RABINOWITZ JD. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab.* 2017, 25 (1): 27 – 42.
53. MUHARREMI G, MECANI R, MUKA T. The Buzz Surrounding Precision Medicine: The Imperative of Incorporating It into Evidence-Based Medical Practice. *J Pers Med* 2023, 14 (1): 53.

-
54. LI D, YI J, HAN G, et al. MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research. *ACS Meas Sci Au* 2022, 2 (5): 385 – 404.
55. PUVIRAJESINGHE TM, BORG JP. Neural tube defects: from a proteomic standpoint. *Metabolites* 2015, 5 (1): 164 – 183.
56. O'BYRNE MR, AU KS, MORRISON AC, et al. Association of folate receptor (FOLR1, FOLR2, FOLR3) and reduced folate carrier (SLC19A1) genes with meningomyelocele. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010, 88 (8): 689 – 694.
57. WANG S, ZENG Y, PEI P, et al. Abnormal transcriptome-wide DNA demethylation induced by folate deficiency causes neural tube defects. *Front Genet* 2022, 13: 987210.
58. OBEID R, HOLZGREVE W, PIETRZIK K. Is 5-methyltetrahydrofolate an alternative to folic acid for the prevention of neural tube defects? *J Perinatal Med* 2013, 41 (5): 469 – 483.
59. DOSEDLA E, KELIJ D, CALDA P. Využitie kyseliny listovej v gravidite. *Súč Klin Pr* 2016, 2: 41 – 46.
60. LI R, WENG H, PAN Y, et al. Relationship between homocysteine levels and post-stroke cognitive impairment in female and male population: from a prospective multicenter study. *J Transl Intern Med* 2021, 9 (4): 264 – 272.
61. BAILEY LB, STOVER PJ, McNULTY H, et al. Biomarkers of Nutrition for Development-Folate Review. *J Nutr* 2015, 145 (7): 1636S – 1680S.
62. KUMAR A, PALFREY HA, PATHAK R, et al. The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health. *Nutr Metab* 2017, 14 (1): 1 – 12.
63. KAWAKITA D, LEE YA, GREN LH, et al. The impact of folate intake on the risk of head and neck cancer in the prostate, lung, colorectal, and ovarian cancer screening trial (PLCO) cohort. *Br J Cancer* 2018, 118 (2): 299 – 306.
64. KIM T. Can gamma entrainment of the brain rhythms prevent or alleviate Alzheimer's disease? *J Transl Intern Med* 2021, 9(4): 231 – 233.
65. Maynard AG, Petrova B, Kanarek N. Notes from the 2022 Folate, Vitamin B12, and One-Carbon Metabolism Conference. *Metabolites* 2023, 13 (4): 486.
66. AKHGARJAND C, EBRAHIMI MOUSAVI S, KALANTAR Z, et al. Does folic acid supplementation have a positive effect on improving memory? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Front Aging Neurosci* 2022, 14: 966933.
67. NYARADI A, LI J, HICKLING S, et al. The role of nutrition in children's neurocognitive development, from pregnancy through childhood. *Front Hum Neurosci* 2013, 7: 97.
68. IRVINE N, ENGLAND-MASON G, FIELD CJ, et al. Prenatal Folate and Choline Levels and Brain and Cognitive Development in Children: A Critical Narrative Review. *Nutrients* 2022, 14 (2): 364.
69. GEORGIEFF MK. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. *Am J Clin Nutr* 2007, 85 (2): 614S – 620S.
70. THOMPSON RA, NELSON CA. Developmental science and the media: early brain development. *Am Psychol* 2001, 323: 310 – 314.
71. VIRDI S, JADAVJI NM. The Impact of Maternal Foliates on Brain Development and Function after Birth. *Metabolites* 2022, 12 (9): 876.

Do redakcie došlo 15. 2. 2024

Adresa pre korešpondenciu:

MUDr. Vanda Risová, PhD.

Ústav histológie a embryológie LF UK

Sasinkova 4

811 08 Bratislava

E-mail: vanda.risova@fmed.uniba.sk