

Uloga folatne kiseline u sprječavanju defekta neuralne cijevi

Manzin, Tanja; Domijan, Ana-Marija; Marušić, Srećko; Turčić, Petra

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2018, 74, 429 - 448**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:245323>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Uloga folatne kiseline u sprječavanju defekta neuralne cijevi

TANJA MANZIN¹, ANA-MARIJA DOMIJAN², SREĆKO MARUŠIĆ³, PETRA TURČIĆ⁴

¹Studentica Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Ante Kovačića 1, 10 000 Zagreb

²Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Zavod za farmaceutsku botaniku, Schrottova 39, 10 000 Zagreb

³Klinička bolnica Dubrava, Avenija Gojka Šuška 6, 10000 Zagreb

⁴Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet,
Zavod za farmakologiju, Domagojeva 2, 10 000 Zagreb

UVOD

Prirodne mane (kongenitalne malformacije) vodeći su uzrok smrti djece u prvoj godini života (1,2). Defekti neuralne cijevi NTD-i, (engl. *neural tube defects*) drugi su po učestalosti nakon prirođenih mana srca. Razlikujemo više tipova NTD-a, a najčešći oblik je spina bifida, odnosno rascjep kralježnice. NTD-i nastaju tijekom 3. i 4. tjedna trudnoće uslijed nepravilnog zatvaranja neuralne cijevi, fetalne ishodišne strukture iz koje se tijekom embrionalnog razvoja razvijaju mozak, kralježnica i kralježnička moždina (2,3).

Folati ili vitamin B9 strukturno su slični spojevi kojima su bogate namirnice biljnog podrijetla, osobito zeleno lisnato povrće, a važni su za normalan rast i razvoj organizma (4). Folatna kiselina sintetski je pripravak te se zbog istovjetnih bioloških učinaka u organizmu kao i folati svrstava u vitamin B9. Folatna kiselina se zbog svoje veće stabilnosti i bioraspoloživosti od prirodnih folata dodaje u hranu i/ili dodatke prehrani (4).

Već je u 18. stoljeću uočena veća učestalost NTD-a među stanovništvom nižeg socioekonomskog statusa što se povezalo s prehranom oskudnom vitaminima. Moguću povezanost nedostatka folata i poremećaja u razvitku ploda uočio je znanstvenik Callender 1944. godine (5). Nakon toga uslijedila su brojna klinička istraživanja provedena u drugoj polovini 20. stoljeća koja su pokazala da uzimanje folatne kiseline prije trudnoće i tijekom prvoga tromjesečja može spriječiti nastanak NTD-a (6). Današnja istraživanja usmjerena su prema razjašnjavanju molekularnih mehanizama nastanka NTD-a. Interes

znanstvenika za istraživanje NTD-a može se objasniti činjenicom da su NTD-i česte prirodene mane te da se ostalim uzročnicima smrti fetusa i novorođenčadi (poput virusnih i drugih infekcija) smanjila učestalost razvojem medicinske znanosti (posebno je tu ulogu odigrala procijepljenost stanovništva). Pored toga NTD-i su javnozdravstveni problem u smislu smrtnosti, pobola, troška liječenja, ali i ljudske patnje (7). U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) izračunato je da liječenje djeteta sa spinom bifidom u njegovih prvih 20 godina života iznosi otprilike 70.000 USD godišnje (prema podacima iz 2001. godine) što uključuje i prosječno pet operacija godišnje u prvih 5 godina života (2).

U ovom članku opisani su nastanak i učestalost NTD-a te su navedeni do sada istraživani čimbenici razvoja NTD-a. Osobita pažnja posvećena je dosadašnjim spoznajama o ulozi folatne kiseline u prevenciji pojavnosti NTD-a te su navedeni proučavani molekularni mehanizmi razvoja NTD-a. Spoznaje o molekularnim mehanizmima razvoja NTD-a omogućile bi razvoj ciljane terapije tog poremećaja.

DEFEKTI NEURALNE CIJEVI

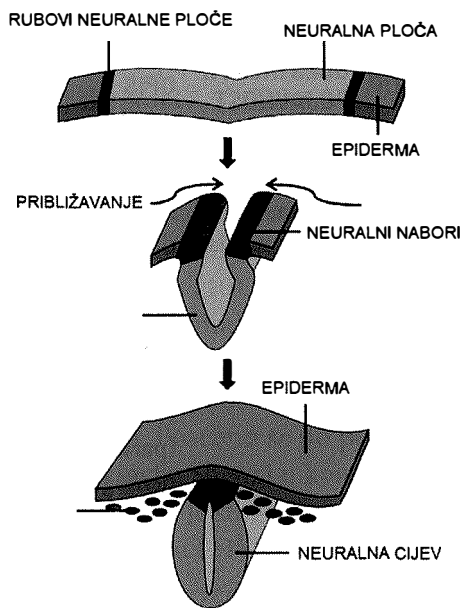
NTD-i uključuju nepotpun razvoj mozga, kraljezničke moždine i/ili zaštitnih pokrova tih organa. Svim tipovima NTD-a zajednička osnova je nepravilno zatvaranje i razvoj, odnosno ponovno otvaranje spojenih mjesta neuralne cijevi (1, 2).

Neuralna cijev predstavlja ishodišnu strukturu fetusa iz koje se tijekom embriogeneze razvijaju mozak, kralježnica i kraljeznička moždina fetusa sa svim pripadajućim živcima. Neuralna cijev prisutna je samo tijekom embriogeneze do trenutka formiranja središnjeg živčanog sustava. Proces formiranja neuralne cijevi naziva se neurulacija (engl. *neurulation*). Zatvaranje neuralne cijevi događa se između 3. i 4. tjedna trudnoće. U tom razdoblju neuralna cijev se postupno zatvara, a proces zatvaranja mora biti potpun i pravilan. U slučajevima nepravilnog zatvaranja neuralne cijevi, a zbog još nedovoljno poznatih čimbenika, javljaju se NTD-i (1, 3).

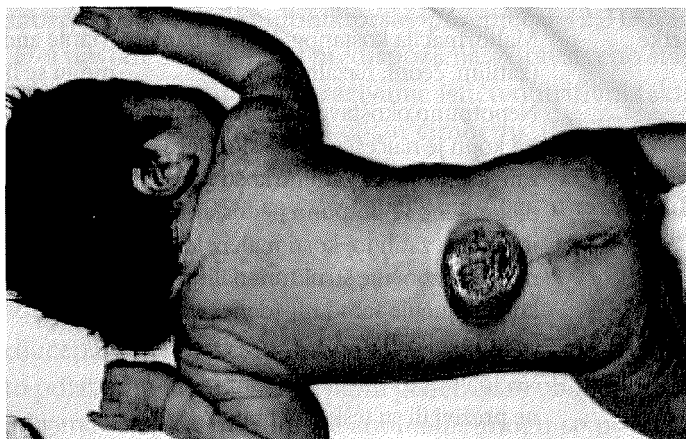
Proces embrionalnog razvoja neuralne cijevi prikazan je na slici 1. Središnji živčani sustav embrija pojavljuje se početkom 3. tjedna trudnoće u obliku neuralne ploče. Rubovi neuralne ploče se uzdižu i postaju neuralni nabori dok središnje udubljeno područje predstavlja neuralni žlijeb. Daljnjim uzdizanjem neuralni nabori se približavaju središnjoj liniji gdje se u konačnici spajaju. Dakle, neuralna cijev je zatvorena cjevasta tvorba s uskim kranijalnim (kraljeznička

moždina) i širim cefaličkim dijelom (mjesto pojave prvih moždanih mjehurića, prekursora mozga). Budući da se prednji i stražnji dio neuralne cijevi posljednji zatvaraju, veća je vjerojatnost pojave NTD-a upravo na tim područjima buduće lubanje i donjeg dijela kralježnice (1, 3).

Razvoj težih oblika NTD-a tijekom trudnoće može rezultirati spontanim pobačajem zbog smrti novorođenčeta, dok blaži oblici NTD-a uzrokuju otežani način života. Ovisno o veličini i lokalizaciji oštećenja, bolest se može manifestirati u rasponu od cijeloživotne nepokretnosti do manjih fizičkih nedostataka (2). Najčešći fenotipovi NTD-a su: spina bifida, anencefalija i encefalokela (slika 2., tablica 1.). NTD-i se mogu dijagnosticirati ultrazvukom, a ako se ultrazvučni pregled ploda kombinira s nalazom α -fetoproteina (biljeg NTD-a) u krvi majke ili plodnoj vodi moguće je dijagnosticirati više od 80 % svih malformacija fetusa prije kraja 12. tjedna trudnoće (1, 3).



Slika 1. Neurulacija (formiranje neuralne cijevi). Gornji dio slike prikazuje ljubičastu neuralnu ploču čiji se plavi rubovi uzdižu formirajući nabore koji se u konačnici spajaju i čine neuralnu cijev (prilagođeno prema (8))



Slika 2. Dijete rođeno sa spinom bifidom (9)

Tablica 1. Osnovni fenotipovi defekata neuralne cijevi (prilagodeno prema (1, 3))

FENOTIP	UČESTALOST/ POJAVNOST	OPIS	MOGUĆNOST LIJEČENJA
Spina bifida	Najčešća, na 3. mjestu kongenitalnih malformacija u svijetu.	Najblaži oblik NTD-a; greška u spajanju neuralnih lukova kralježaka, najčešće se javlja u lumbosakralnom dijelu te rezultira rascjepom kralježnice (može biti uključen i rascjep kralježničke moždine). Dijete rođeno sa spinom bifidom ima paralizu živaca od mjesta nastanka NTD-a naniže: poteškoće u hodanju (paraliza donjih ekstremiteta), nemogućnost kontroliranja mjehura i sfinktera (urinarna i fekalna inkontinencija), intelektualne teškoće.	Intrauterinim kirurškim zahvatom u 28. tjednu trudnoće. Dijete se porodi carskim rezom, a nakon zahvata na kralježnici vraća se u maternicu. Rezultati: smanjena učestalost hidrocefalusa, poboljšana kontrola mokrenja i defekacije i poboljšan motorički razvoj nogu.
Anencefalija	4 puta češća kod ženske nego kod muške djece.	»Otvorena« NTD što znači da je živčano tkivo izloženo vanjskim utjecajima; nije došlo do zatvaranja prednjeg kraja neuralne cijevi, mjesta razvoja buduće lubanje; dolazi do nerazvijanja svoda lubanje pa je malformirani mozak otkriven te je sklon nekrozi i propadanju tkiva. Letalna; najčešće mrtvorodenče; smrt djeteta nekoliko sati ili nekoliko dana nakon poroda. Djeca su uglavnom bez svijesti, gluha, slijepa i ne osjećaju bol.	Nema.
Encefalokela	Rijetke	Malformacija koštanog dijela lubanje (zatiljni, čeonni, nazalni dio). Nepotpuno okoštavanje kostiju lubanje od kojih je najčešće (80 % slučajeva) zahvaćena ljuska zatiljne kosti koja djelomično ili potpuno nedostaje. Ako je otvor u zatiljnoj kosti malen, kroz njega se izbočuje struktura nalik vreći koja uključuje samo moždane ovojnice (meningokela). Većina djece s encefalokelom ne preživi ili su teško mentalno retardirana.	Manje anomalije mogu se liječiti kirurški (vraćanje moždanih ovojnica unutar lubanje).

Učestalost NTD-a

Učestalost NTD-a ovisna je o zemljopisnom području, socioekonomskom statusu i pripadnosti određenoj etničkoj skupini (7, 3). Tako je učestalost NTD-a u Kanadi 0,9 na 10 000 porođaja, u centralnoj Francuskoj 0,7 na 10 000 porođaja dok je u Ujedinjenim Arapskim Emiratima 7,7 na 10 000 porođaja, a u Južnoj Americi 11,7 na 10 000 porođaja (2). Pojedina zemljopisna područja posebno se ističu visokom pojavnošću NTD-a. Primjerice, za Meksiko se za 1991. godinu navodi učestalost od 36 na 10 000 poroda (10). Na području duž američko-meksičke granice među ženama hispanskog podrijetla u razdoblju od 1993. do 1995. godine zabilježena je učestalost NTD-a od 16 do 18 na 10 000 porođaja, što je dvostruko više nego u ostatku SAD-a (za ostatak SAD navodi se učestalost od približno 6 na 10 000 poroda) (10). Posebno se po pojavnosti ove anomalije ističe područje sjeverne Kine, provincija Shanxi u kojoj je 1997. godine učestalost NTD-a bila 14,9 na 1 000 porođaja te je stoga Shanxi provincija, područje s najvećom pojavnošću NTD-a na svijetu (11).

Prema podacima EUROCAT-a (engl. *European Surveillance of Congenital Anomalies*) u Europskoj uniji u razdoblju od 2011. do 2015. učestalost NTD-a bila je 8,9 na 10 000 porođaja (12). U Hrvatskoj je učestalost za razdoblje od 1983. do 2007. prema EUROCAT-u bila 5,4 na 10 000 porođaja (13), a za razdoblje od 2011. do 2015. godine 4,75 na 10 000 porođaja (12). No, ono što je najvažnije je da se učestalost NTD-a zadnjih 40-tak godina u svijetu smanjuje prvenstveno zbog pravodobne prenatalne dijagnostike.

Etiologija NTD-a

Iako još uvijek nisu poznati rizični čimbenici razvoja NTD-a, smatra se da su NTD-i posljedica više rizičnih čimbenika i njihovih međusobnih interakcija, odnosno da su NTD-i multifaktorski poremećaj (2,3). Kao čimbenici razvoja NTD-a navode se genetička predispozicija, zdravstveno stanje trudnica i okolišni čimbenici (2, 7). Brojna istraživanja ističu nutritivni faktor, odnosno nedostatan unos folata kao važniji okolišni čimbenik (7). To potvrđuje činjenica da je učestalost NTD-a u zemljama u razvoju, a to je i populacija s nižim socioekonomskim statusom, veća i do četiri puta nego u razvijenim zemljama (14).

Genetički čimbenici razvoja NTD-a

Na uključenost genetičkih čimbenika u razvoj NTD-a upućuje to što se NTD-i često pojavljuju udruženi s drugim genetičkim oboljenjima poput Mekkelovog sindroma. No, kromosomske anomalije mogu se povezati svega sa 2 do 16 % slučajeva NTD-a (15).

Na povezanost genetičkih čimbenika s razvojem NTD-a upućuje i to da se NTD-i pojavljuju učestalije u nekim etničkim skupinama, primjerice kod Meksikanaca i Iraca (15). Najvažniji dokaz uključenosti gena u razvoj NTD-a je pojavljivanje NTD-a unutar jedne obitelji. Istraživanja potvrđuju da je rizik za pojavu NTD-a među braćom 2 do 5 % (2). Istraživanje provedeno u Ujedinjenom Kraljevstvu (UK) u razdoblju od 1972. do 1979. godine pokazalo je da ako je u obitelji već rođeno dijete s NTD-om, vjerojatnost da će se u toj obitelji roditi drugo dijete s NTD-om je 3,14 %, a ako je u istoj obitelji rođeno već dvoje djece s NTD-om, vjerojatnost da iduće dijete ima NTD-a je 11,76 % (16). Nedavno istraživanje provedeno u SAD u razdoblju od 2012. do 2013. godine potvrdilo je učestalost NTD-a od 3,1 % između braće (prvi stupanj rođaka) (17). Za sada su podaci o pojavljivanju NTD-a između drugog stupnja rođaka (roditelj-dijete) i trećeg stupnja rođaka nepotpuni, ali u pravilu pokazuju nižu pojavnost, odnosno rizik za širu obitelj nije veći od opće populacije (2). Budući da danas djeca rođena s NTD-om primaju adekvatnu brigu i pomoć te dožive i reproduktivnu dob, može se očekivati da će se u skoroj budućnosti dobiti i podaci o prenošenju bolesti s roditelja na dijete.

Geni uključeni u razvoj NTD-a još uvijek se istražuju. Istraživanja na eksperimentalnim životinjama provedena na glodavcima pokazuju da je preko 100 gena direktno ili indirektno povezano s formiranjem neuralne cijevi, a mutacije na tim genima mogu dovesti do razvoja NTD-a (2).

Zdravstveno stanje trudnica kao čimbenik razvoja NTD-a

Kao moguća stanja trudnica koja se povezuju s nastankom NTD-a navode se: hiperinzulinemija, pretilost, povećana izloženost majke stresu, pasivno pušenje, hipertermija i uzimanje nekih vrsta lijekova (12,18).

U razdoblju od siječnja 2003. do veljače 2004. godine provedena je populacijska studija u Shanxi provinciji (sjeverna Kina) području s najvećom učestalošću NTD-a na svijetu (11). U toj studiji uspoređeni su rizični čimbenici kojima su bile izložene majke koje su rodile djecu s NTD-om (n = 158) i kontrolna skupina majki (n = 226). Istraživanje je pokazalo da niska razina obrazovanja (samo osnovna škola ili niže), prethodno rođena djeca s NTD-om, prehlade i groznice, upotreba analgetika i antipiretika, dnevno pasivno izlaganje dimu cigareta, slaba ventilacija u prostorijama koje se griju kao i preko šest obroka u tjednu koji sadrže ukiseljeno povrće za vrijeme trudnoće pridonose nastanku NTD-a. Čimbenici koji sprječavaju nastanak NTD-a su konzumacija mesa jednom do tri puta tjedno te konzumacija mahunarki preko šest puta tjedno. Zanimljivo je da je primijećena razlika u povezanosti rizičnih čimbenika i dva najčešća fenotipa NTD-a, anencefalije i spine bifide. Okolišni čimbenici bolje

su korelirali s pojavnošću anencefalije, dok su prethodno rođena djeca s NTD-om bolje korelirala s pojavnošću spine bifide.

Brojna istraživanja provedena su među ženama hispanskog podrijetla na području uz američko-meksičku granicu u Teksasu, području SAD-a s najvećom učestalosti NTD-a. Istraživanja su pokazala da se majčina pretilost (indeks tjelesne mase preko 30 kg/m²) i hiperinzulinemija (koncentracija inzulina u serumu iznad 11 μIU/mL) mogu povezati s razvojem NTD-a (19). Naredno istraživanje provedeno na tom području pokazalo je da su trudnice koje su u prvom tromjesečju bile febrilne ili izlagane vrućim kupkama i saunama imale 15 % veću vjerojatnost za razvoj NTD-a fetusa, a taj je rizik bio manji ako se febrilnost liječila antipireticima (20). Kasnije istraživanje na istom području pokazalo je da žene nepušači izložene dimu cigarete za vrijeme trudnoće imaju veću vjerojatnost roditi dijete s NTD-om (21). U preglednom članku Suareza i suradnika (2012.) obrađeni su rezultati prikupljeni tijekom šest godina istraživanja (od 1995. do 2000.) o pojavnost NTD-a na području uz američko-meksičku granicu i mogućim rizičnim čimbenicima (10). Taj članak sistematizirao je 23 istraživanja na tom području, a koja su uključila žene koje su rodile djecu s NTD-om (n = 184) i kontrolne žene (n = 225). Utvrđeno je da su debljina, hiperinzulinemija, niska razina feritina, niska razina vitamina B12 te visoka razina homocisteina čimbenici rizika za razvoj NTD-a. Također, u populaciji čija je prehrana bila oskudna folatnom kiselinom, kao čimbenici rizika za razvoj NTD-a pokazali su se i dijareja, stres i unos nitrata i nitrita. Autori su zaključili da je za razvoj NTD-a potrebno više faktora (multifaktorski poremećaj) te da će pojedinac s niskom razinom folatne kiseline biti podložniji djelovanju drugih čimbenika (primjerice debljini ili mikotoksinu fumnizinu B₁).

Upotreba antikonvulziva, lijekova koji se koriste u sprječavanju epileptičkih napadaja (npr. valproična kiselina i karbamazepin), također povećava rizik od kongenitalnih malformacija (18). Rizik od pojave malformacija kod djeteta u slučaju majčinog uzimanja jednog antikonvulziva iznosi 7,8 %. Taj rizik može porasti i na 15,4 % kada se antikonvulzivi kombiniraju, odnosno koristi više njih istovremeno. Najteratogeniji među antikonvulzivima pokazala se valproična kiselina (18). Antikonvulzivi prolaze placentu te djeluju direktno na embrio/fetus, a kao mogući mehanizmi teratogenog učinka navode se indukcija jetrenih enzima i ometanje apsorpcije folata (18).

Okolišni čimbenici uključeni u razvoj NTD-a

Različiti okolišni čimbenici poput teških metala (živa, olovo, arsen i kadmij), pesticida i mikotoksina povezuju se s nastankom NTD-a.

U studiji koju su proveli Brender i suradnici (2006.) bile su uključene žene hispanskog podrijetla duž američko-meksičke granice koje su rodile dijete s NTD-om ($n = 184$) i kontrolna skupina žena ($n = 225$) s normalno razvijenim djetetom. Ispitanicama je sakupljen uzorak plazme i urina i ispitan na prisustvo olova, arsena, kadmija i žive (22). U urinu žena koje su rodile djecu s NTD-om pronađena je povišena razina žive te se stoga izloženost živi povezala s nastankom NTD-a. Autori su pretpostavili da su majke došle u kontakt sa živom preko hidratantnih krema u kojima je, upravo za vrijeme provođenja te studije, utvrđeno prisustvo živinog klorida. U istraživanju provedenom u Shanxi provinciji u sjevernoj Kini (područje koje ima najveću učestalost NTD-a u svijetu) sakupljene su placente nakon rođenja djece s NTD-om ($n = 80$) i kontrola ($n = 50$) te je u placentama izmjerena razina arsena, žive, kadmija i olova (23). U tom istraživanju samo je razina žive nađena u višoj koncentraciji u placentama majki koje su rodile djecu s NTD-om nego u kontrola. Ti su rezultati direktno povezali izloženost majke teškom metalu živi s nastankom NTD-a (23).

Ispitivan je utjecaj organskih/industrijskih zagađivača na razvoj NTD-a. U studiji koja je istražila (na osnovu podataka Registra prirođenih mana Teksasa, SAD) blizinu stanovanja majki koje su rodile djecu s NTD-om pored tvornica i/ili opasnog industrijskog otpada pokazano je da blizina opasnog otpada nema utjecaja na nastanak bolesti, ali se blizina tvornica i prisustvo kemikalija u zraku povezalo s razvojem NTD-a (24). Značajno veći broj slučajeva spine bifide i anencefalije povezan je s izloženosti trudnica pesticidima (blizina područja zasađenih raznim poljoprivrednim kulturama). No, ti rezultati dobiveni su na temelju ispunjenog upitnika, a u biološkim uzorcima majki (krv i urin) razina pesticida bila je ispod detekcijskog limita (25). U studiji koja je provedena u provinciji Shanxi u Kini, placente djece rođene s NTD-om ($n = 80$) i kontrola ($n = 50$) analizirane su na prisustvo policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAH), organokloriranih pesticida, polikloriranih bifenila i polibromiranih difenil etera (26). U toj studiji povezana je izloženost majki PAH-ovima i insekticidima *o,p'*-dikloro difenil trikloroetanu (DDT) i heksaklorocikloheksanu (HCH) s razvojem NTD-a.

Kao jedan od vjerojatno najznačajnijih okolišnih čimbenika u razvoju NTD-a navodi se i mikotoksin fumonizin B₁ koji je sekundarni metabolit plijesni roda *Fusarium* (27–29). Plijesni roda *Fusarium* česti su zagađivači kukuruza, a uočeno je da je upravo u onim područjima svijeta (države Srednje Amerike, pojedine regije Kine te Južne Afrike) u kojima stanovništvo većinom konzumira hranu pripremljenu iz kukuruza veća učestalost NTD-a. Eksperimenti na pokusnim životinjama (glodavcima) kao i epidemiološke studije potvrdile su mikotoksin fumonizin B₁ kao okolišni čimbenik koji se može

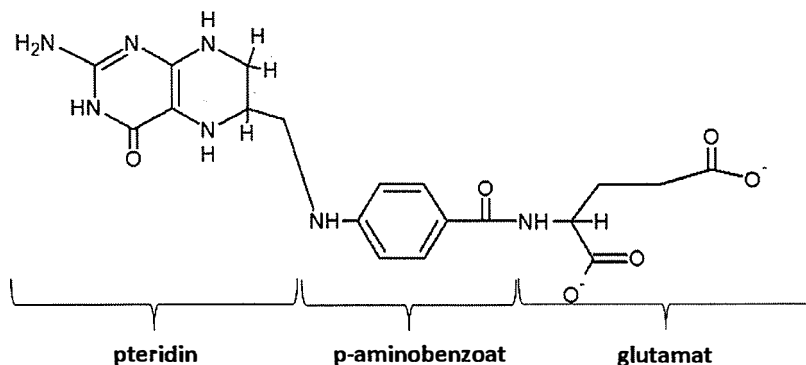
povezati s nastankom NTD-a (28). U pokusu provedenom na mišjim embrijima koji su tretirani s fumonizinom B₁ (50 μM tijekom 2 sata) došlo je do razvoja NTD-a u 66,7 % slučajeva (30) što je povezalozloženoš fumonizinu B₁ s nastankom NTD-a. Epidemiološka studija provedena među trudnicama hispanškog podrijetla duž američko-meksičke granice pokazala je da je veća pojavnost NTD-a u onih trudnica koje su bile izložene fumonizinu B₁ (prisutnom u hrani pripremljenoj iz kukuruza) (31). Povezanost izloženosti fumonizinu B₁ s razvojem NTD-a potvrđena je i u članku Suareza i suradnika (2012.) te su autori zaključili da je izloženost fumonizinu B₁ rizik za razvoj NTD-a u onoj populaciji čija se prehrana bazira na kukuruzu te ima nedovoljan unos folata (10).

FOLATNA KISELINA I RAZVOJ NTD-a

Folati i folatna kiselina

Folati i folatna kiselina spadaju u skupinu vitamina B-kompleksa, vitamina topljivih u vodi. Folati su prirodni derivati, a folatna kiselina sintetski pripravak vitamina B9 (32).

Naziv folat potječe od latinske riječi *folium* što znači list. Namirnice kao što su zeleno lisnato povrće (špinat, salata), brokula, mahunarke, voće (naranče, limun, kivi) i žitarice bogati su izvor folata. Meso i mesni proizvodi uglavnom sadrže malo folata, no izuzetak je jetra koja je bogata folatima (4). U prirodi nalazimo više derivata folata koji su poliglutamadni oblici tetrahidrofolata (THF) (slika 3.). Osnovna struktura folata je pteridinski prsten koji je preko metilne skupine povezan s para-aminobenzoatom koji je konjugiran ili s jednom ili s više L-glutaminskih kiselina tvoreći tako glutamatni ili poliglutamadni



Slika 3. Tetrahidrofolat (THF) biološki aktivni folat

oblik. Biljke i gljive mogu sintetizirati THF, a životinje ne (33). U tablici 2. navedeni su neki od najčešćih derivata folata. Prirodni folati su vrlo nestabilni, a nestabilnosti pridonosi dugotrajno skladištenje i visoke temperature (termičkom obradom namirnica uništava se veći dio ovoga vitamina) (4, 32). Zbog svoga poliglutamatskog oblika prirodni derivati folata puno se teže apsorbiraju.

Folatna kiselina je sintetski monoglutamat koji je oksidiran te stabilan (slika 4.). Folatna kiselina stoga što je monoglutamat ima bolju bioraspodivnost od prirodnih derivata folata, poliglutamata. Navedeno je da je apsorpcija na prazan želudac prirodnih folata dva puta slabija od folatne kiseline (7). Upravo zbog svoje veće stabilnosti, bolje apsorpcije i bolje bioraspodivnosti u odnosu na prirodne folate, folatna kiselina se koristi pri fortifikaciji (obogaćivanju) hrane.

Tablica 2. Glavni derivati folata (4, 32).

SINTETSKI FOLAT

Folatna kiselina

PRIRODNI FOLATI

Dihidrofolat

Tetrahidrofolat

5-metiltetrahidrofolat

5-formiltetrahidrofolat

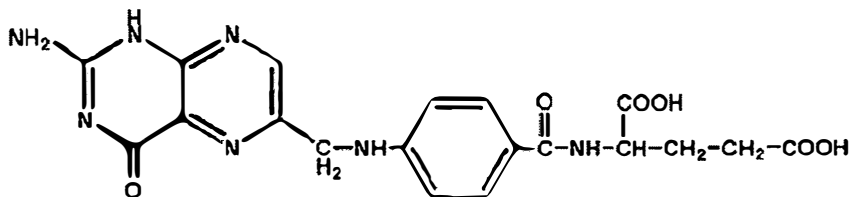
10-formiltetrahidrofolat

5,10-metheniltetrahidrofolat

5,10-metilentetrahidrofolat

10-formildihidrofolat

10-formil-folatna kiselina



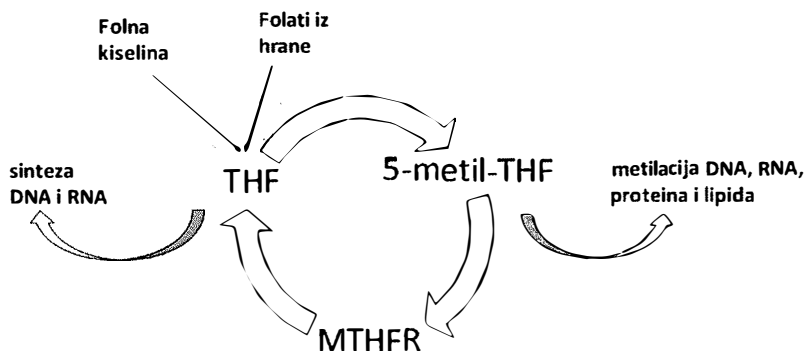
Slika 4. Folatna kiselina – sintetski pripravak vitamina B9 veće stabilnosti i bioraspodivnosti od prirodnih folata

Uloga folata i folatne kiseline u organizmu

U organizmu folati i folatna kiselina sudjeluju u brojnim metaboličkim reakcijama, sintezi aminokiselina i nukleinskih kiselina. Prvenstveno su potrebni onim stanicama koje se brzo diferenciraju i dijele, primjerice pri proizvodnji stanica krvi te stanicama fetusa i njegove neuralne cijevi. Stoga je tijekom trudnoće povećana potreba za folatima. Brojne studije pokazuju da su folati važni za održavanje zdravlja te se njihov nedostatan unos osim s razvojem NTD-a povezuje i s megaloblastičnom anemijom, kardiovaskularnim bolestima i razvojem raka (33).

Folati i folatna kiselina nisu metabolički aktivni oblici te se u organizmu moraju reducirati kako bi sudjelovali u staničnom metabolizmu (32). Već tijekom apsorpcije dolazi do metaboličkih promjena (slika 5.). Poliglutamati se hidroliziraju do monoglutamata i zatim do THF. Folatna kiselina je monoglutamat te se prvo prevodi u dihidrofolat pa u THF. THF se uz pomoć enzima metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR) prevodi u 5-metil-tetrahidrofolat (5-metil-THF) poznat i kao 1-metilfolat koji je dominantni oblik folata kojeg nalazimo u plazmi (32). 5-metil-THF ulazi u stanicu pomoću specifičnih receptora folata. U stanici se 5-metil-THF prevodi u poliglutamate te u tom obliku ostaje u stanici jer ne može prijeći staničnu membranu (15).

Folati, THF i 5-metil-THF, metaboliti prirodnih folata i folatne kiseline su ti koji sudjeluju u metaboličkim procesima. THF kao prenosilac ugljika sudjeluje u sintezi purina i pirimidina, sastavnih dijelova DNA. Metilirani oblik, 5-metil-THF, primarni je donor metilne skupine u remetilaciji homocisteina u metionin. Metionin je supstrat za S-adenozilmetionin (SAM) koji je univerzalni donor metilne skupine za DNA, histone, proteine i lipide (6). Procesi metilacije DNA i histona omogućuju ekspresiju pojedinih gena i održavanje



Slika 5. Apsorpcija i biološka aktivacija folata i folatne kiseline te metabolički putevi u kojima sudjeluju folati; THF – tetrahidrofolat; MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza; 5-metil-THF – 5-metil-tetrahidrofolat

stabilnosti kromosoma te predstavljaju ključne procese za normalan razvoj embrija (15).

Dokazi o protektivnoj ulozi folatne kiseline u razvoju NTD-a

Istraživanja provedena u drugoj polovini 20. stoljeća pokazala su da unos ili same folatne kiseline ili multivitamina koji sadrže folatnu kiselinu prije i za vrijeme trudnoće smanjuje pojavnost NTD-a. Smithells i suradnici (1983.) proveli su istraživanje u UK u koje su uključili preko 1000 žena (34). Njihovo istraživanje pokazalo je da suplementacija s multivitaminima koji su sadržavali 0,36 mg folatne kiseline, a koja je započela 2 mjeseca prije trudnoće i nastavila se u prvome tromjesečju smanjuje pojavnost NTD s 5,9 % na 0,5 %. Studija provedena na Kubi u kojoj su trudnice primale folatnu kiselinu u koncentraciji 5 mg/dan smanjila je pojavnost NTD-a s 3,5 % na 0 % (35). Neke od provedenih studija prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Studije koje su pratile unos folatne kiseline i razvoj defekta neuralne cijevi NTD-a (engl. *neural tube defects*) u novorođenčadi

AUTOR	DRŽAVA	TRETMAN	SMANJENJE POJAVNOSTI NTD-a
Mulinare i sur. 1988. (36)	SAD (Atlanta)	MV+FA 0,8 mg	za 60 %
Bower i Stanely, 1989. (37)	Zapadna Australija	FF+MV+FA 0,8 mg	za 75 %
Mills i sur. 1989. (38)	SAD (Kalifornija i Illinois)	FF+MV+FA 0,8 mg	●
Werler i sur. 1993. (39)	SAD i Kanada (Boston, Philadelphia, Toronto)	MV+FA 0,4 mg	za 40 %
Shaw i sur. 1995. (40)	SAD (Kalifornija)	FA	za 35 %

MV-multivitamini; FA-folatna kiselina; FF- folati iz hrane

U studijama navedenim u tablici 3. suplementacija s folatnom kiselinom većinom je započela prije trudnoće i nastavila se tijekom prvoga tromjesečja te su sve studije, osim Millis i suradnika (1989.) zabilježile smanjenje pojavnosti NTD-a u rasponu od 35 do 75 % (38).

Najvažnije istraživanje proveo je Britanski savjet za istraživanja u medicini MRC-UK (engl. *British Medical Research Council*), a rezultati su objavljeni

1991. godine (41). To istraživanje jedno je od najvećih i najvažnijih, a uključilo je 33 centra u UK te je suplementaciju (koja je započela mjesec dana prije začeća i nastavila se tijekom prvog tromjesečja) s folatnom kiselinom (4 mg/dan) ili s multivitaminima (sa i bez folatne kiseline) usporedilo s placebom. U grupi koja je dobivala folatnu kiselinu (samu ili s multivitaminima) zabilježeno je smanjenje pojavnosti od 72 % NTD-a u usporedbi s placebom, dok multivitaminimska suplementacija bez folatne kiseline nije imala učinka. Nakon toga provedeno je tzv. »Budimpeštansko istraživanje« u kojem su trudnice dobivale ili folatnu kiselinu (0,8 mg/dan) ili elemente u tragovima (42). U grupi žena koje su primale folatnu kiselinu (uključeno je bilo 2104 žene) nije zabilježen niti jedan slučaj NTD-a, dok je u grupi koja je primala elemente u tragovima (uključeno 2052 žene) zabilježeno je 6 slučajeva NTD-a. Istraživanje provedeno u Kini u kojem su žene uzimale 0,4 mg folatne kiseline također je zabilježilo smanjenje pojavnosti NTD-a (43).

Odmah nakon objavljivanja MRC-UK studije 1991. godine Američki Centar za kontrolu i prevenciju bolesti CDC (engl. *Centers for Disease Control and Prevention*) dao je preporuku ženama koje planiraju trudnoću, a koje su visokorizične (već su rodile dijete s NTD-om) da unose 4 mg folatne kiseline dnevno prije začeća i tokom prvog tromjesečja (44). U 1992. godini, nakon rezultata »Budimpeštanske studije«, CDC je preporučio dozu od 0,4 mg folatne kiseline za sve žene reproduktivne dobi uz prehranu bogatu folatima, a za žene koje su već rodile dijete s NTD-om (visokorizične skupina žena) preporučena je doza od 4 mg dnevno (45).

Rezultati preporuka i edukacije u SAD-u nisu bili zadovoljavajući, odnosno nije zabilježen značajniji pad pojavnosti NTD-a te je Američka agencija za hranu i lijekove FDA (engl. *Food and Drug Administration*) 1996. godine preporučila fortifikaciju (obogaćivanje) žitarica kao mjeru prevencije NTD-a (46). Od 1998. godine u SAD fortifikacija žitarica folatnom kiselinom je obavezna. Žitarice se obogaćuju s 1,4 mg folatne kiseline na 1 kg hrane da bi unos folatne kiseline u žena reproduktivne dobi bio 0,1 mg/dan. I druge su države Sjeverne Amerike, Australije i većina država Južne Amerike uvele obaveznu fortifikaciju žitarica (15).

U istraživanju u kojem je uspoređena pojavnost NTD-a u SAD prije fortifikacije (razdoblje od 1995. do 1996. godine) s razdobljem nakon fortifikacije (razdoblje od 1998. od 1999. godine) pojavnost spine bifide smanjila se za 31 %, a anencefalije za 16 % (47). I ostale zemlje koje su uvele obaveznu fortifikaciju hrane s folatnom kiselinom zabilježile su smanjenje pojavnosti NTD-a od 10 do 80 % (15). Treba spomenuti i studiju provedenu u Saudijskoj Arabiji koja nije zabilježila značajnu razliku u pojavnosti NTD-a između razdoblja prije obavezne fortifikacije s folatnom kiselinom i nakon (48). Iako je rezultate teško tumačiti stoga što promjene životnog stila ili socioekonomski status

utječu na pojavnost NTD-a, ipak može se reći da je obavezna fortifikacija žitarica dovela do smanjenja pojavnosti NTD-a (15). Neki znanstvenici ističu da bi povećana izloženost folatnoj kiselini, s obzirom da folati imaju epigenetski učinak, mogla rezultirati razvojem karcinoma (15). No, zabilježeno je da je od 1998. godine, od kada je fortifikacija folatnom kiselinom obavezna, došlo da smanjenja učestalosti i smrtnosti od karcinoma debelog crijeva u SAD (15). Kasnije objavljena studija potvrdila je da se unos folatne kiseline za vrijeme trudnoće u svrhu prevencije NTD-a ne može povezati s razvojem karcinoma dojke niti s razvojem karcinoma bilo koje druge vrste kao ni s razvojem kardiovaskularnih bolesti (49).

Zemlje Europske unije nemaju zakon o obogaćivanju hrane folatnom kiselinom, a zdravstvene preporuke variraju od bez preporuka do preporuka za suplementaciju prehrane za visoko rizične trudnice, ili sve žene reproduktivne dobi. Usprkos tome u EU smanjenje učestalosti NTD-a nije zabilježeno (15). Zemlje članice EU nisu spremne podržati obogaćivanje namirnica jer povećani unos folatne kiseline može prikriti nedostatak vitamina B12 te povećati rizik raka debelog crijeva (4).

U Hrvatskoj još uvijek nema postupka fortifikacije hrane kao ni službenih smjernica o uzimanju folatne kiseline prije i za vrijeme trudnoće. Uzimanje folatne kiseline prije i za vrijeme trudnoće ovisi o informiranosti trudnica i o preporuci ginekologa, a najčešće se suplementacija započne nakon saznanja o trudnoći. Preporuke za uzimanje folatne kiseline se slažu s FDA smjernicama: 0,4 mg/dan za niskorizične trudnoće barem do 12. tjedna i 4 do 5 mg/dan za visokorizične trudnoće. Unatoč nepostojanju smjernica o uzimanju folatne kiseline, ona se nalazi u prvih 50 najkorištenijih lijekova u izvanbolničkoj potrošnji u 2009. godini što upućuje na postojanje svijesti trudnica o preventivnoj važnosti folatne kiseline (4, 13).

Interakcije lijekova s folatnom kiselinom

Pokazano je da neki lijekovi zbog strukturne sličnosti folatnoj kiselini sprečavaju apsorpciju folatne kiseline ili ometaju metabolizam folata. To su: sulfametoksazol + trimetoprim (antibiotik), metotreksat (citostatik), aspirin (nesteroidni protuupalni lijek), sulfadoksin + pirimetamin (antimalarik), sulfasalazin (crijevni protuupalni lijek), azatioprin (imunosupresivni lijek), antacidi, rifampicin (antituberkulotik) i spomenuti antikonvulzivi. Nabrojane lijekove treba izbjegavati za vrijeme trudnoće, no trebalo bi također kad god je to moguće, izbjegavati propisivati ih ženama reproduktivne dobi (18).

Molekularni aspekti povezanosti folatne kiseline i NTD-a

Iako epidemiološke studije pokazuju da folatna kiselina igra važnu ulogu u prevenciji nastanka NTD-a, mehanizam protektivnog učinka folatne kiseline

u prevenciji razvoja NTD-a još uvijek nije u potpunosti jasan. Zanimljivi su slučajevi u kojima su majke imale normalnu razinu folata u krvi, a rodile su djecu s NTD-om. Pored toga, eksperimentalne životinje kojima je uskraćivana folatna kiselina u prehrani imale su nižu razinu folata u krvi, ali nije došlo do razvoja NTD-a ploda. Stoga se smatra da niža razina folata majki nije dovoljna za razvoj NTD-a (15). Pretpostavlja se da su u razvoj NTD-a vjerojatno uključeni geni koji kodiraju proteine povezane direktno ili indirektno s metabolizmom folata, folatne kiseline i metionina. Tri su moguća mehanizma koja se istražuju: receptori folata, sinteza nukleotida i metilacija.

Razvoj NTD-a povezuje se s nedovoljnom količinom folata u stanici, odnosno nedovoljnim ulaskom folata u stanicu, a za što je odgovoran receptor za folat (15). Pokazano je da žene koje su rodile dijete s NTD-om imaju nefunkcionalni receptor za folat na staničnoj membrani što dovodi do nedovoljnog ulaska folata u stanicu (50). Pokus proveden na miševima koji su imali inaktivirani gen za protein uključen u transport folata u stanicu rezultirao je razvojem NTD-a, a pojavnost NTD-a se mogla smanjiti suplementacijom s folatnom kiselinom (učinak je bio ovisan o dozi) (51). Stoga je moguće da višak folatne kiseline (putem suplementacije ili obogaćivanjem prehrane) može nadomjestiti nedovoljan ulazak folata u stanicu. Pokazano je da mikotoksin fumonizin B₁ (spomenuti etiološki čimbenik NTD-a) uzrokuje veću incidenciju NTD-a upravo djelovanjem na receptor folata pa time i na ulazak folata u stanicu. Fumonizin B₁ zbog svoje strukturne sličnosti sa sfingolipidima remeti metabolizam sfingolipida koji su važna strukturna komponenta staničnih membrana. U staničnoj membrani sfingolipidi prisutni su u blizini receptora folata, a zbog fumonizina B₁ i njegovog učinka na metabolizam sfingolipida receptori folata postaju nefunkcionalni što onda u konačnici dovodi do manjeg ulaska folata u stanicu (27, 28). U već spomenutom pokusu provedenom na mišjim embrijima fumonizin B₁ (50 μM, tijekom 2 sata) izazvao je pojavu 66,7 % NTD-a (30). No, kada su mišji embriji tretirani i s fumonizinom B₁ i s folatnom kiselinom (fumonizin B₁ 50 μM + folna kiselina 1 mM, tijekom 2 sata) pojavnost NTD-a se smanjila na 34,3 %.

Drugi mogući mehanizam utjecaja folata i folatne kiseline na nastanak NTD-a je uloga folata u sintezi nukleotida. U embriju u kojem se stanice neprestano dijele povećana je potreba za nukleotidima pri replikaciji DNA. Barber i suradnici (1999.) postavili su hipotezu da kada neuroepitelne stanice nemaju dovoljno nukleotida, replikacija stanica se usporava te zatvaranje neuralne cijevi kasni. Pokusi na miševima podupiru ovu hipotezu (52).

S obzirom da su folati uključeni u proces metilacije, neki znanstvenici sugeriraju poremećaj procesa metilacije kao vezu folata i nastanka NTD-a (53). U mozgu fetusa s NTD-om zabilježena je hipometilacija genomske DNA (54). Istražuje se i polimorfizam gena koji kodira za enzim MTHFR koji katalizira

sintezu 5-metil-THF, aktivnog oblika folata potrebnog za reakcije metilacije (55). U djece rođene s NTD-om na području uz američko-meksičku granicu utvrđen je polimorfizam MTHFR gena (10).

Potencijal 5-metil-THF u prevenciji NTD-a

Ovisno o genskoj varijaciji MTHFR gena, razlikujemo osobe s normalnom i manjom katalitičkom aktivnošću (i do 68 %) enzima koji katalizira sintezu 5-metil-THF (56). Istraživanje provedeno u Hrvatskoj na 288 zdravih dobrovoljaca pokazalo je da približno 46 % osoba ima gensku varijantu MTHFR gena za normalnu aktivnost enzima, a 54 % osoba ima gensku varijantu gena za manju katalitičku aktivnost enzima (57). To otvara mogućnost suplementacije s 5-metil-THF, biološki aktivnim metabolitom folata i folatne kiseline, a ne folatnom kiselinom. U teoriji bi takva suplementacija bila od koristi osobama s genetskim polimorfizmom gena za MTHFR enzim kod kojih je zabilježena smanjena katalitička aktivnost tog enzima pa samim time i smanjena koncentracija 5-metil-THF. U studiji u koju su bile uključene 144 žene pokazano je da 5-metil-THF postiže veću koncentraciju u stanicama nego kada je za suplementaciju korištena folatna kiselina (58). Koliko bolji učinak ima 5-metil-THF u odnosu na folatnu kiselinu i koja mu je perspektiva u prevenciji NTD-a teško je zaključiti zbog nedostatka studija, ali nudi zanimljiva potencijalna rješenja.

ZAKLJUČAK

Uloga folatne kiseline u sprječavanju pojavnosti NTD-a je nedvojbeno dokazana. Međutim NTD-i su multifaktorski poremećaji te osim niže razine folata i/ili folatne kiseline u prehrani i neki drugi čimbenici poput genetski i okolišnih imaju ulogu u razvoju NTD-a. Trenutno je područje istraživanja molekularnih mehanizama povezanosti folata s razvojem NTD-a vrlo dinamično. Napredak u tim istraživanjima omogućio bi razvoj ciljane terapije NTD-a koja bi u konačnici dovela i do smanjenja učestalosti ovoga poremećaja.

Na osnovu sadašnjih spoznaja važno je žene koje planiraju trudnoću i trudnice informirati i educirati o prednosti suplementacije s folatnom kiselinom. Pritom treba voditi računa o lijekovima koji mogu interferirati s unosom folatne kiseline i njenim metabolizmom.

The role of folic acid in prevention of neural tube defects

T. Manzin, A-M. Domijan, S. Marušić, P. Turčić

Abstract

Neural tube defects (NTDs) are the second most common type of birth defect. In period of 2011 til 2015 in Croatia the incidence of NTDs were 4.75

on 10 000 births. Importantly, due to better prenatal diagnosis the incidence of NTDs is decreasing. The aetiology of NTDs is not known and NTDs are considered multifactorial disorders. Evidence so far suggests that in development of NTDs genetics and environmental factors are involved and some studies indicate importance of folate and/or folic acid deficiency.

Folates are naturally occurring while folic acid is synthetic derivative of vitamin B9. Due to its stability and better absorption folic acid is used for supplementation and food fortification. Within the organism folates and folic acid are involved in numerous metabolic pathways such as synthesis of amino acids, nucleotides and DNA methylation, indicating that folates and folic acid are required in the processes that involve higher DNA synthesis as in embryonic cells.

Studies conducted since 1970s indicate that supplementation with folic acid (alone or in combination with other vitamins) can reduce NTDs occurrence. Based on these results, in 1998 USA and some other countries introduced food (cereals) fortification with folic acid that has led to the decrease of NTDs occurrence in these countries for 10 to 80 %. Such fortification is not embraced in Croatia and other European Union countries due to involvement of folic acid in DNA methylation and possible development of cancers. Molecular mechanisms underlying development of NTDs are not known yet. Currently, several molecular mechanisms of NTDs development are investigated such as folate receptor on plasma membrane, nucleotide synthesis and DNA methylation. Knowledge on the molecular mechanism of NTDs development will point to the development of more effective intervention for treatment of NTDs.

Literatura – References

1. Sadler TW. Langmanova medicinska embriologija. Zagreb: Školska knjiga, 2008.
2. Detrait ER, George TM, Etchevers HC, Gilbert JR, Vekemans M, Speer MC. Human neural tube defects: developmental biology, epidemiology and genetics. *Neurotoxicol Teratol.* 2005; 27:515–524.
3. Damjanov I, Jukoć S, Nola M. Patologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2008.
4. Babić Božović I, Vraneković J. Folati i folna kiselina: dosadašnje spoznaje. *Medicina fluminensis*, 2014; 50:169–175.
5. Callender STE. A critical review of pernicious anemia of pregnancy. *Q J Med.* 1944; 13:75–105.
6. Barua S, Kuizon S, Junaid M. Folic acid supplementation in pregnancy and implication in health and disease. *J Biomed Sci.* 2014; 21:77.
7. Pitkin RM. Folate and neural tube defect. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85:285–288.
8. <https://www.aboutthemcat.org/anat/neurulation>, datum pristupa 7.4.2018.
9. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/spina-bifida/symptoms-causes/syc-20377860>, datum pristupa 7.4.2018.

10. Suarez L, Felkner M, Brender JD, Canfield M, Zhu H, Hendricks KA. Neural tube defects on the Texas-Mexico border: what we've learned in the 20 years since the Brownsville cluster. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2012; 94:882–892.
11. Li Z, Ren A, Zhang L, Guo Z, Li Z. A population-based case-control study of risk factors for neural tube defects in four high-prevalence areas of Shanxi province, China. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2006; 20:43–53.
12. <http://www.eurocat.ulster.ac.uk>, datum pristupa 18.3.2018.
13. Vitale K, Sović S, Milić M, Balorda Lj, Todorović G, Uhoda B. Folna kiselina – što znaju i koliko ju koriste roditelje u Zadarskoj županiji. *Med Jad.* 2011; 41:95–103.
14. Dessie MA, Zeleke EG, Workie SB, Berihun AW. Folic acid usage and associated factors in the prevention of neural tube defects among pregnant women in Ethiopia: cross-sectional study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2017; 17:313.
15. Imbard A, Benoist J-F, Blom HJ. Neural tube defects, folic acid and methylation. *Int J Environ Res Public Health.* 2013; 10:4352–4389.
16. Seller M. Recurrence risks for neural tube defect genetic counselling clinic population. *J Med Genet.* 1981; 18:245–248.
17. Dupépe EB, Patel DM, Rocque BG, Hopson B, Arynchyna AA, Bishop ER, Blount JP. Surveillance survey of family history in children with neural tube defects. *J Neurosurg Pediatr.* 2017; 19:690–695.
18. Kondo A, Kamihira O, Ozawa H. Neural tube defects: prevalence, etiology and prevention. *Int J Urol.* 2009; 16:49–57.
19. Hendricks KA, Nuno OM, Suarez L, Larsen R. Effects of hyperinsulinemia and obesity on risk of neural tube defects among Mexican Americans. *Epidemiology.* 2001; 12:630–635.
20. Suarez L, Felkner M, Hendricks K. The effect of fever, febrile illness, and heat exposure on the risk of neural tube defects on an Texas-Mexican border population. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2004; 70:815–819.
21. Suarez L, Cardarelli K, Hendricks K. Maternal stress, social support and risk of neural tube defects among Mexican Americans. *Epidemiology.* 2003; 14:612–616
22. Brender JD, Suarez L, Felkner M, Gilani Z, Stinchcomb D, Moody K, Henry J, Hendricks K. Maternal exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury and neural tube defects in offspring. *Environ Res.* 2006; 101:132–139.
23. Jin L, Zhang L, Li Z, Liu J-M, Ye R, Ren A. Placental concentration of mercury, lead, cadmium and arsenic and the risk of neural tube defects in a Chinese population. *Reprod Toxicol.* 2013; 35:25–31.
24. Suarez L, Brender JD, Langois PH, Zhan FB, Moody K. Maternal exposure to hazardous waste sites and industrial facilities and risk of neural tube defect in offspring. *Ann Epidemiol.* 2007; 17:772–777.
25. Brender J, Felkner M, Suarez L, Canfield MA, Henry JP. Maternal pesticide exposure and neural tube defects in Mexican Americans. *Ann Epidemiol.* 2010; 20:16–22.
26. Ren A, Qiu X, Jin L, Ma J, Li Z, Zhang L, Zhu H, Finnell RH. Association of selected persistent organic pollutants in the placenta with the risk of neural tube defects. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108:12770–12775.
27. Marasas WFO, Riley RT, Hendricks KA, Stevens VL, Sadler TW, Gelineau-van Waes J, Missmer SA, Cabrera J, Torres O, Gelderblom WCA, Allegood J, Martinez C, Maddox J, Miller JD, Starr L, Cameron Sullards M, Roman AV, Voss KA, Wang E, Merrill

- AH, Jr. Fumonisin disrupts sphingolipid metabolism, folate transport and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defect among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J Nutr*. 2004; 134:711–716.
28. Domijan A-M. Fumonisin B₁: a neurotoxic mycotoxin. *Arh Hig Rada Toxicol*. 2012; 63:531–544.
 29. Domijan A-M. Rezultati nedavnih studija o mehanizmu neurotoksičnosti fumonizina B₁. *Krmiva*. 2013; 55:25–33.
 30. Sadler TW, Merrill AH, Stevens VL, Cameron Sullards M, Wang E, Wang P. Prevention of fumonisin B₁-induced neural tube defects by folic acid. *Teratology*. 2002; 66:169–176.
 31. Missmer SA, Suarez L, Felkner M, Wang E, Merrill AH, Jr., Rotman KJ, Hendricks KA. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along Texas Mexico border. *Environ Health Perspect*. 2006; 114:237–241.
 32. Medić-Šarić M., Buhač I, Bradamante V. Vitamini i minerali – istine i predrasude. Zagreb: La Roche, 2000.
 33. Verma A, Pandey A, Dubey N. Physico-chemical characteristics, analytics and metabolism of folate in plants. *J Food Process Technol*. 2015; 7:536.
 34. Smithells RW, Nevin NC, Seller MJ, Sheppard H, Harris R, Read AP, Fielding DW, Walker S, Schorah CJ, Wild J. Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences. *Lancet* 1983; 1:1027–1031.
 35. Vergel MC, Sanchez LR, Heredero BL, Rodriguez PI, Martinez AJ. Primary prevention of neural tube defects with folic acid supplementation: Cuban experience. *Prenat Diagn*. 1990; 10:149–152.
 36. Mulinare J, Cordero JF, Erickson JD, Berry RJ. Periconceptional use of multivitamins and the occurrence of neural tube defects. *JAMA* 1988; 260:3141–3145.
 37. Bower C, Stanley FJ. Dietary folate as a risk factor for neural-tube defects: evidence from a case-control study in Western Australia. *Med J Aust*. 1989; 150:613–619.
 38. Mills JL, Rhoads GG, Simpson JL, Cunningham GC, Conley MR, Lassman MR, Walden ME, Depp OR, Hoffman HJ. The absence of a relation between the periconceptional use of vitamins and neural tube defects. *N Engl J Med*. 1989; 321:430–435.
 39. Werler MM, Shapiro S, Mitchell AA. Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. *JAMA* 1993; 269:1257–1261.
 40. Shaw GM, Schaffer D, Verlie EM, Morland K, Harris JA. Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology* 1995; 6:219–226.
 41. MRC Vitamin Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991; 338:131–7.
 42. Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med*. 1992; 327:1832–1835.
 43. Berry RJ, Li Z, Erickson JD, Li S, Moore CA, Wang H, Mulinare J, Zhao P, Wong LY, Gindler J, Gong SX, Correa A. Prevention of neural-tube defects with folic acid in China. China-U.S. Collaborative project for neural tube defect prevention. *N. Engl. J. Med*. 1999; 341:1485–1490.
 44. Centers for Disease Control. Use of folic acid for prevention of spina bifida and other neural tube defects--1983–1991. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1991; 40:513–516.

45. Centers for Disease Control. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1992; 41:1–6.
46. Food and Drug Administration. Food standards: Amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. *Fed. Regist.* 1996; 61:8781–8797.
47. Williams LJ, Mai CT, Edmonds LD, Shaw GM, Kirby RS, Hobbs CA, Sever LE, Miller LA, Meaney FJ, Levitt M. Prevalence of spina bifida and anencephaly during the transition to mandatory folic acid fortification in the United States. *Teratology.* 2002; 66:33–39.
48. Seidahmed MZ, Abdelbasit OB, Shaheed MM, Alhussein KA, Miqdad AM, Khalil MI, Al-Enazy NM, Salih MA. Epidemiology of neural tube defects. *Saudi Med J* 2014; 35:S29–S35.
49. Taylor CM, Atkinson C, Penfold C, Bhattacharya S, Campbell D, Davey Smith G, Leary S, Ness A. Folic acid in pregnancy and mortality from cancer and cardiovascular disease: further follow-up of the Aberdeen folic acid supplementation trial. *J Epidemiol Community Health.* 2015; 69:789–794.
50. Rothenberg SP, da Costa MP, Sequeira JM, Cracco J, Roberts JL, Weedon J, Quadros EV. Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350:134–142.
51. Spiegelstein O, Mitchell LE, Merriweather MY, Wicker NJ, Zhang Q, Lammer EJ, Finnell RH. Embryonic development of folate binding protein-1 (*Folbp1*) knockout mice: Effects of the chemical form, dose, and timing of maternal folate supplementation. *Dev Dyn.* 2004; 231:221–231.
52. Barber RC, Lammer EJ, Shaw GM, Gerr KA, Finnell RH. The role of folate transport and metabolism in neural tube defect risk. *Mol Gen Metab.* 1999; 66:1–9.
53. Green ND, Stainer P, Moor GE. The emerging role of epigenetic mechanism in the etiology of neural tube defects. *Epigenetics.* 2011; 6:875–883.
54. Chang H, Zhang T, Zhang Z, Bao R, Fu C, Wang Z, Bao Y, Li Y, Wu L, Zheng X, Wu J. Tissue-specific distribution of aberrant DNA methylation associated with maternal low-folate status in human neural tube defects. *J Nutr Biochem.* 2011; 22:1172–1177.
55. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995; 10:111–113.
56. Greenberg JA, Bell SJ, Guan Y, Yu Y-H. Folic acid supplementation and pregnancy: more than just neural tube defect prevention. *Rev Obstet Gynecol.* 2011; 4:52–59.
57. Lovričević I, Franjić BD, Tomičić M, Vrkić N, De Syo D, Hudorović N, Sonicki Z, Lončar R. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677 C→T genetic polymorphism in 288 Croatian volunteers. *Coll Antropol* 2004; 28:647–654.
58. Lamers Y, Prinz-Langenohl R, Brämsswig S, Pietrzik K. Red blood cell folate concentrations increase more after supplementation with [6S]-5-methyltetrahydrofolate than with folic acid in women of childbearing age. *Am J Clin Nutr.* 2006; 84:156–161.

Primljeno 20 travnja 2018.