

## Spremenjena aktivnost encima 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR) kot dejavnik tveganja za številne bolezni

Decreased enzymatic activity of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for the development of several diseases

Maša Vidmar,<sup>1</sup> Jasna Grželj,<sup>2</sup> Ksenija Geršak,<sup>1</sup> Irena Mlinarič-Raščan<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Štajmarjeva 3, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> KRKA, d. d., Novo mesto, Šmarješka 6, Novo mesto, Slovenija

<sup>3</sup> Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Aškerčeva 7, Ljubljana, Slovenija

### Korespondenca/ Correspondence:

prof. dr. Ksenija Geršak,  
dr. med., e: ksenija.gersak@mf.uni-lj.si

### Gljučne besede:

folna kislina;  
polimorfizmi MTHFR;  
presnova folatov;  
tveganje za bolezen;  
interakcije z zdravili

### Key words:

folic acid; MTHFR  
polymorphisms; folate  
metabolism; disease risk;  
drug interaction

### Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn. 2016;  
85: 324–37

### Izvleček

Pomen folatov v fiziologiji je že dolgo znan, prav tako številne patologije, povezane z znižanim folatnim statusom. Pomanjkanje folatov pri posamezniku je lahko posledica nizkega vnosa folata, genske zasnove posameznika ali sočasnega zdravljenja z zdravili, ki vplivajo na folatni status. Namen tega prispevka je osvetliti pomen ugotavljanja genetskih polimorfizmov, ki pomembno vplivajo na raven biološko aktivne oblike folata. V procesu pretvorbe 5,10-metilen-THF v 5-metil-THF je ključen encim MTHFR, ki je polimorfen, zato pa ima lahko zmanjšano encimsko aktivnost.

V slovenski populaciji ima polno aktivnost encima MTHFR le 9,3 % posameznikov, ki so homozigoti za divji tip alelov, medtem ko je povprečna aktivnost encima pri nosilcih mutiranih alelov med 50–60 %. Prisotnost polimorfizma MTHFR predstavlja tveganje za pojav hiperhomocisteinemije in kardiovaskularnih bolezni, nevroloških bolezni, pojav raznih oblik raka, pri nosečnicah pa tudi večje tveganje za pojav okvar ploda. Za ohranjanje ustreznega folatnega statusa so v nekaterih državah uvedli dodajanje folne kisline v prehrano, vendar se je potrebno zavedati, da ta pristop ne bo odpravil pomanjkljivosti v delovanju encima MTHFR, lahko pa ublaži njihov vpliv na končni fenotip posameznika.

Prisotnost polimorfizmov v ključnih genih folatnega cikla je pogosta. Zato je ugotavljanje genetske zasnove posameznika smiselno predvsem pri najbolj ranljivih skupinah prebivalstva, npr. pri nosečnicah in bolnikih, zdravljenih z zdravili, kot so 5-fluorouracil, metotreksat, 6-merkaptopurin, ki se na različne načine vpletajo v presnovno pot folatov. Genotipizacija bi prispevala k identifikaciji bolnikov, pri katerih je povečano tveganje za neustrezen folatni status in zato pomagala pri preprečenju z njim povezanih patoloških stanj.

### Abstract

The importance of folates in human physiology is well known, as are various pathologies associated with low folate status. Folate deficiency can occur due to low dietary intake, a genetic predisposition or treatment with medicines affecting the folate status. The aim of this paper is to explore the importance of determining genetic polymorphisms, which influence the levels of biologically active folate. MTHFR is involved in the transformation of 5,10-methylene-THF to 5-methyl-THF. Polymorphisms of the MTHFR gene are associated with decreased enzymatic activity.

Prispelo: 25. maj 2016,  
Sprejeto: 30. jun. 2016

Only 9.3 % of the population in Slovenia display full activity of the MTHFR enzyme; these subjects are non-mutated homozygotes (wild-type alleles). In contrast, the average enzymatic activity in subjects with mutated alleles is between 50 and 60 %. MTHFR polymorphism is associated with an increased risk of hyperhomocysteinemia and cardiovascular diseases, neurological disorders and various types of cancer. There is also an increased risk for congenital malformations. Folic acid food fortification was introduced in some countries in order to assure an adequate folate status in the population. However, this approach does not address the decreased activity of MTHFR.

Polymorphism in the key enzymes of the folate cycle is common. Determination of the genetic predisposition is therefore plausible in the most vulnerable population groups, such as pregnant women and patients receiving medicines influencing the folate cycle in various ways, e.g. 5-fluorouracil, methotrexate and 6-mercaptopurine. Genotyping would allow the identification of patients at high risk for suboptimal folate status.

## Uvod

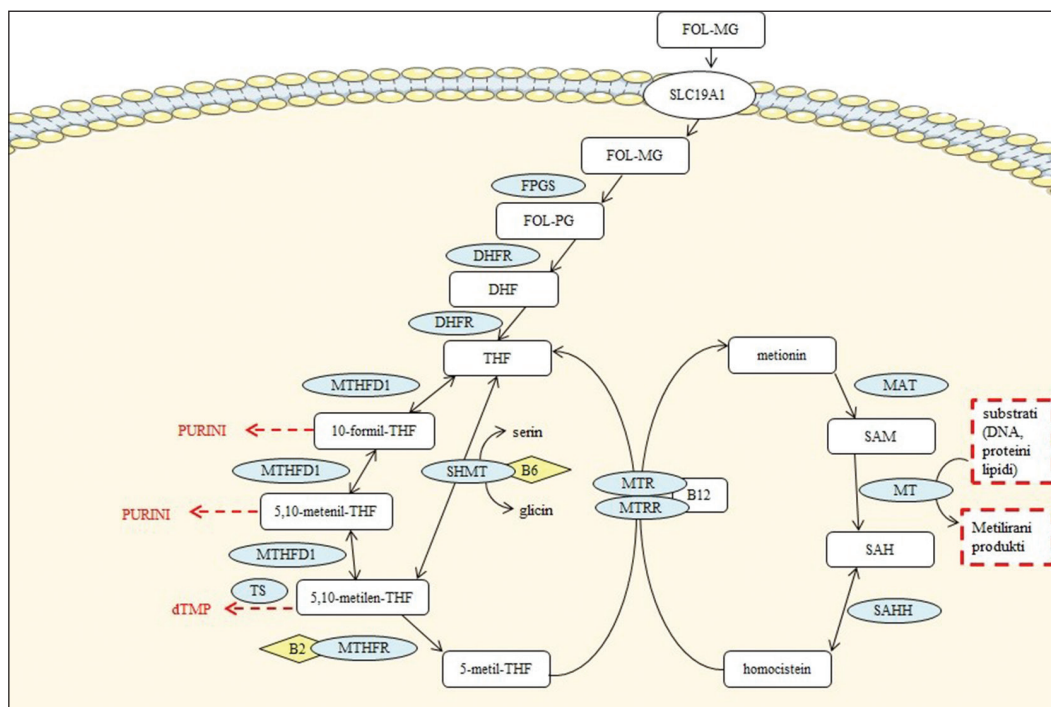
Folat je esencialen vodotopen vitamin B<sub>9</sub>, ki je za človeški organizem izjemno pomemben, saj je ključen za celično rast in razvoj.<sup>1</sup> Sodeluje v procesu sinteze molekule DNA, v metabolizmu aminokislin in v remetilacijskih procesih.<sup>2</sup> Poimenovanje folat označuje tako v hrani prisotne naravne oblike, ki so v poliglutamati obliki kakor tudi sintetično monoglutamato obliko, folno kislino.<sup>3,4</sup>

Pomanjkanje folata je največkrat povezano s pomanjkljivim vnosom zaradi neuravnotežene prehrane, lahko pa so vpleteni tudi številni drugi mehanizmi. Do pomanjkanja folata lahko pridejo stanja, ki zvišajo potrebe ali vplivajo na absorpcijo, uporabo ali izločanje folatov. Med dejavnike tveganja tako spadajo povečane potrebe v obdobjih hitre rasti, med nosečnostjo in v obdobju dojenja, celiakija, kronična vnetna črevesna bolezen, kronični alkoholizem, kajenje, dializa, pomanjkanje vitamina B<sub>12</sub> itd., na raven folatov pa lahko vpliva tudi sočasna uporaba nekaterih zdravil. Prisotni genetski polimorfizmi genov za encime folatnega cikla so dodaten dejavnik tveganja in pomanjkanje še dodatno poglabijo.<sup>5</sup>

## Cikel presnove folatov

Absorpcija folatov poteka v proksimalnem delu tankega črevesja, predvsem v dvanajstniku in jejunumu. Po zaužitju se mora folat za vstop v celice pretvoriti v metilirano tetrahidrofolat. Pretvorba se začne v enterocitih z encimom glutamat karboksipeptidaza II, ki hidrolizira poliglutamate v monoglutamate in na ta način omogoči njihovo absorpcijo. Pri zaužitju folne kisline, ki je monoglutamat, ta reakcija ni potrebna.<sup>6,7</sup> Po vstopu v celico, ki poteka z aktivnim transportnim prenašalcem reduciranega folata, se folati ali njihovi analogi ponovno poliglutamirajo, saj so v takšni obliki boljši substrati encimov. Hkrati pa to omogoča tudi, da se zadržijo v celici.<sup>3</sup> Poliglutamacijo omogoči encim folilpoliglutam sintetaza (FPGS), tej reakciji pa sledi redukcija dihidrofolata (DHF) v tetrahidrofolat (THF), ki jo katalizira encim dihidrofolat reduktaza (DHFR). Poliglutamirani in reducirani metaboliti nato vstopajo v cikel presnove folatov, ki je sklopljen s presnovo vitamina B<sub>12</sub> in remetilacijskim ciklom (Slika 1).<sup>2,4,5,8</sup>

Biološko aktivna oblika folata je tetrahidrofolat (THF), ki se lahko uporabi neposredno za sintezo purinov ali pa se s pomočjo encima serin hidroksi-



**Slika 1:** Prikaz vstopa folata v celico, poliglutamacija in redukcija folatov, cikel presnove folatov in remetilacijski cikel.

FOL-MG: folat monoglutamat; SLC19A1: folatni prenašalec; FPGS: folilpoliglutamat sintetaza; FOL-PG: folat poliglutamat; DHFR: dihidrofolat reduktaza; DHF: dihidrofolat; THF: tetrahidrofolat; MTHFD1: metilentetrahidrofolat dehidrogenaza 1; MTHFR: 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza, MTR: metionin sintaza; MAT: metionin adenoziltransferaza; SAM: S-adenozil metionin; MT: metiltransferaza; SAH: S-adenozil homocistein; SAHH: S-adenozil homocistein hidrolaza; dTMP: deoksitimidin monofosfat; TS: timidilat sintaza; SHMT: serin hidroksimetiltransferaza.

metiltransferaze (SHMT) in kofaktorja vitamina B<sub>6</sub> pretvori v 5,10-metilentetrahidrofolat (5,10-metilen-THF), ki je osrednja molekula v metabolizmu folatov. 5,10-metilen-THF lahko deluje kot substrat za pretvorbo dUMP v dTMP in nadaljnjo sintezo DNA, lahko pa se s pomočjo encima 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR) in kofaktorja vitamina B<sub>2</sub> pretvori v 5-metiltetrahidrofolat (5-metil-THF). Le-ta je substrat za reakcijo pretvorbe homocisteina v metionin, ki jo katalizira encim metionin sintaza (MTR). Metionin se nato pretvori v S-adenozil metionin (SAM), ki je glavni donor metilne skupine in vpliva na metilacijo lipidov, proteinov in DNA. Ko SAM odda metilno skupino, se preoblikuje v S-adenozil

homocistein (SAH), ta pa v homocistein.<sup>8-11</sup>

### 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR)

MTHFR (EC 1.5.1.20) je ključni encim v presnovni poti folata, saj nepovratno katalizira nastanek 5-metil-THF, ki je osnovna oblika folata v telesu.<sup>12</sup> Funkcionalna skupina THF se lahko usmeri v sintezo dTMP ali v sintezo metionina in na ta način vpliva na sintezo ali na metilacijo DNA.<sup>9,13</sup>

Gen *MTHFR*, ki kodira citoplazemski encim MTHFR, se nahaja na kratkem kraku kromosoma 1, na mestu 1p36.3 in je sestavljen iz 11 eksonov.<sup>14</sup> Poznanih je več polimorfizmov tega gena, ki vplivajo

na aktivnost oziroma na stabilnost encima. Identificiranih je preko 40 točkovnih mutacij v genu *MTHFR*, najbolj raziskana in najbolj pogosta polimorfizma sta C677T in A1298C.<sup>9,13,15</sup>

### Polimorfizem MTHFR C677T

Polimorfizem C677T (rs1801133) se nahaja v delu gena *MTHFR*, ki kodira katalitično domeno encima MTHFR. Zamenjava citozina s timinom na mestu 677 povzroči zamenjavo alanina z valinom na mestu 222 proteinske sekvence, kar vodi v zmanjšano aktivnost encima.<sup>11,16</sup> Pri homozigotih 677TT je aktivnost encima zmanjšana za 70 %, pri heterozigotih pa za 35 % glede na aktivnost pri normalnem genotipu (Tabela 1).<sup>9,15</sup> Ob nizkem vnosu folatov predstavlja zmanjšana encimska aktivnost tveganje za kopičenje homocisteina.<sup>17</sup> Nižja aktivnost encima MTHFR povzroča tudi večjo razpoložljivost 5,10-metilen-THF, kar pomeni, da je na razpolago več gradnikov za purinsko sintezo in učinkovitejšo pretvorbo dUMP v dTMP.<sup>18</sup> Zato zaradi zmanjšane aktivnosti encima nastaja tudi manj 5-metil-THF, kar vodi v zmanjšano remetilacijo homocisteina in znižano raven SAM v celici. To se izraža v hipometilaciji proteinov, lipidov in DNA.<sup>11,18</sup>

Pojavnost polimorfizma C677T je geografsko specifična. V severnih državah Evrope je približno 12 % homozigotov

677TT, v južni Evropi pa do 24 %, heterozigotov 677CT je okoli 40 %.<sup>19</sup> Sorazmerno pogosto se polimorfizem pojavlja pri Hispancih, pri Afričanih in temnopoltih, medtem ko v Braziliji in ZDA precej poredko (Tabela 2).<sup>19-23</sup>

V Sloveniji je polimorfizem MTHFR C677T prisoten pri več kot polovici prebivalstva; 46 % je heterozigotov 677CT, 42 % prebivalstva je nemutiranih homozigotov, 12 % Slovencev je mutiranih homozigotov z genotipom 677TT (Tabela 3).<sup>24</sup>

### Polimorfizem MTHFR A1298C

Drugi najpogostejši polimorfizem A1298C (rs1801131) povzroči v genu *MTHFR* zamenjavo adenina s citozinom na mestu 1298, kar vodi v spremembo na proteinski ravni in sicer zamenjavo glutamata z alaninom na mestu 429.<sup>11,25</sup> Ta sprememba se zgodi v delu gena, ki kodira regulacijsko domeno encima MTHFR.<sup>11</sup> Pri homozigotih 1298CC je aktivnost encima zmanjšana za 40 %, pri heterozigotih pa za 20 % (Tabela 1). Ta sprememba v genu *MTHFR* ne vpliva bistveno na koncentracijo folata in/ali koncentracijo homocisteina v krvi, je pa kljub temu klinično pomembna, saj pri majhnem vnosu oziroma v povečanih potrebah po folatu precej vpliva na njihovo presnovo.<sup>11,26</sup> V evropski populaciji je pogostnost homozigotov 1298CC okoli 10 % in enako velja tudi za

**Tabela 1:** Aktivnost encima MTHFR glede na genotip.<sup>9,11,15,24</sup>

Genotip		Nemutirani homozigot (»wild-type«)	Heterozigot	Mutiran homozigot
		677CC	677CT	677TT
Nemutirani homozigot (»wild-type«)	1298AA	100 %	60 %	30 %
Heterozigot	1298AC	80 %	50–60 %	n. a.
Mutirani homozigot	1298CC	60 %	n. a.	n. a.

n.a. (angl.: not available) – ni podatka

slovensko populacijo.<sup>27</sup> Posameznikov z genotipom 1298AC je v Sloveniji 42 %, z genotipom 1298AA pa 47 %.<sup>24</sup>

Alel z obema polimorfizmoma MTHFR C677T in A1298C je redek. Glede na dejstvo, da so genotipe 677CT/1298AC, 677TT/1298AC, 677TT/1298CC zasledili zgolj pri spontano splavljenih zarodkih, so domnevali, da polimorfizma C677T in A1298C v položaju *cis* nista združljiva z življenjem.<sup>11,28,29</sup> To domnevo je leta 2000 ovrgla kanadska raziskovalna skupina, ki je prva diagnosticirala dva novorojenčka z genotipom 677TT/1298AC in s tem dokazala, da se polimorfizma lahko pojavljata tudi v konfiguraciji *cis*.<sup>30</sup> Te ugotovitve je potrdila tudi nadaljnja študija, ki je med 1.238 preiskovanci diagnosticirala dva posameznika z genotipom 677CT/1298CC in tri posameznike z genotipom 677TT/1298AC.<sup>31</sup> Ni pa potrjeno, ali je genotip 677TT/1298CC združljiv z življenjem ali je le tako izjemno redek, da ga do danes še niso odkrili pri živem posamezniku.

V primeru, da je posameznik sestavljen heterozigot za polimorfizem MTHFR A1298C in C677T (genotip 677CT/1298AC) je aktivnost encima zmanjšana za 40–50 %, spremembe v

genotipu pa se zrcalijo v povišanih koncentracijah homocisteina in znižanih koncentracijah folata v krvi.<sup>25</sup> Aktivnosti encima MTHFR glede na genotip so prikazane v Tabeli 1.

V slovenski populaciji je le 9,3 % prebivalstva, ki ima popolno aktivnost encima MTHFR. Največji delež prebivalstva je heterozigotov, kar pomeni, da je povprečna aktivnost encima v slovenski populaciji med 50–60 %. Dobra desetina prebivalstva, ki ima genotip 677TT/1298AA, pa ima encimsko aktivnost MTHFR zgolj 30 %. Klinično pomembno znižanje encimske aktivnosti imajo tudi sestavljeni heterozigoti 677CT/1298AC, ki jih je v slovenski populaciji okoli 20 % (Tabeli 1, 3).<sup>24</sup>

### Povezanost polimorfizmov v genu za MTHFR s pojavnostjo številnih patofizioloških stanj

S polimorfizmi v genu *MTHFR* in nezadostnim vnosom folatov ali njegovih analogov ter pomanjkanjem drugih vitaminov pred in med nosečnostjo je povezano povečano tveganje za nastanek prirojenih napak ploda, kot so prirojene

**Tabela 2:** Pojavnost polimorfizmov C677T in A1298C glede na etnično pripadnost<sup>19–23</sup> in pojavnost polimorfizma v slovenski populaciji v odstotkih (%).<sup>25</sup>

Etnična pripadnost	C677T genotip			A1298C genotip			Sestavljen heterozigot
	Nemutirani homozigot (»wild-type«)	Heterozigot	Mutirani homozigot	Nemutirani homozigot (»wild-type«)	Heterozigot	Mutirani homozigot	
	CC	CT	TT	AA	AC	CC	677CT/1298AC
Afričani	78	20	2	68	29	3	4
Azijci	31–62	35–53	3–20	49–68	30–47	2–4	14–15
Hispanci	18–45	47–50	18–30	50–66	27–34	2–6	15
Kavkazijci	29–54	39–51	4–27	44–48	41–46	10–12	15–23
Slovenci	42,1	46,4	11,5	47	42,2	10,4	20,2

srčne napake, orofacialne shize in napake nevralne cevi.<sup>8,19</sup>

Najpogostejše prirojene razvojne nepravilnosti so prirojene **srčne napake (CHD)**. Incidenca CHD v Sloveniji je 8–10 primerov na 1000 rojstev.<sup>32</sup> V letu 2014 se je po podatkih Statističnega urada Republike Slovenije rodilo 20.460 otrok, predvidoma to torej pomeni 180 novih bolnikov. Tveganje za razvoj CHD je lahko povezano s pomanjkanjem folatov, bodisi zaradi vnosa ali zaradi mutacij v genih za encime folatnega cikla, tudi MTHFR.<sup>33</sup> Izvedene so bile številne raziskave, zaključki katerih niso bili enotni glede vpliva genotipa in okoljskih dejavnikov. Novejše metaanalize potrjujejo pozitivno korelacijo med polimorfizmom C677T in pojavom CHD.<sup>34</sup> S povečanim tveganjem za CHD je povezan tudi genotip 1298CC.<sup>35</sup>

Incidenca **orofacialne shize (OFC)** je 1 na 700 rojstev v vseh populacijah in je druga najpogostejša prirojena napaka.<sup>36,37</sup> V povezavi z OFC je gen *MTHFR* daleč najbolj raziskan. Novejša metaanaliza, ki je preučila 18 študij, je dokazala pozitivno korelacijo med materinim genotipom 677TT in pojavnostjo OFC, medtem ko korelacije med materinim in otrokovim genotipom ter tveganjem za OFC ni dokazala.<sup>37</sup> V študiji slovenske populacije otrok z OFC smo dokazali, da se pri otrocih z genotipi, ki kodirajo manj aktivne oblike encima MTHFR, pojavnost shize poveča do 2,5-krat.<sup>38</sup>

Pomemben vzrok perinatalne umrljivosti predstavljajo **okvare nevralne cevi (NTD)**. Incidenca NTD je približno 1 na 1000 rojstev in se giblje med 0,78 in 12 na 1000 rojstev v vseh populacijah.<sup>39</sup> Znano je, da so NTD multifaktorske bolezni, pri nastanku katerih sodelujejo genetski in okoljski dejavniki.<sup>40</sup> Med glavne genetske dejavnike spadajo mutacije v genih folatnega cikla, močno povežavo pa so dokazali tudi pri polimorfizmih

v genu *MTHFR*.<sup>9</sup> Pri materah, ki so sestavljeni heterozigoti 677CT/1298AC, 677TT/1298AC, 677CT/1298CC, ki jih je v kavkazijski populaciji 15–23 %, se tveganje za nastanek NTD poveča na 6- do 7-krat. Če je mati homozigot 677TT, je tveganje za nastanek NTD 2-krat večje kot pri materi z genotipom 677CC, če pa sta tako mati kot plod 677TT homozigota, se tveganje za nastanek NTD poveča na 6- do 7-krat. Pri heterozigotih 677CT je tveganje za nastanek NTD rahlo povišano, medtem ko povezanosti med polimorfizmom MTHFR A1298C in NTD pri kavkazijski populaciji ni.<sup>41,42</sup>

Povečano tveganje za **kardiovaskularne bolezni** je prav tako povezano s prisotnostjo polimorfizmov MTHFR. Zmanjšana aktivnost encima MTHFR povzroči večjo koncentracijo 5,10-metilen-THF in zato zmanjšano koncentracijo 5-metil-THF.<sup>43</sup> Od količine 5-metil-THF je odvisna pretvorba homocisteina v metionin. Če je znižana raven 5-metil-THF, je metilacija homocisteina v metionin manj učinkovita, kar vodi v nastanek hiperhomocisteinemije. Homocistein je znan biološki označevalec motene presnove folatov, ki pa je nespecifičen, saj nanj vplivajo tudi ostali vitamini B, ki so vpleteni v folatni cikel.<sup>3,8,13</sup> Čeprav mehanizem vpliva homocisteina na srčno-žilne bolezni ni znan, gre verjetno za vpliv preko trombofilije, ki pogostokrat nastane zaradi mutacije v faktorju V Leiden (FVL), polimorfizmi MTHFR pa tveganje samo še povečajo. S trombofilijo in mutacijami v genu *MTHFR* so povezani tudi ponavljajoči se splavi.<sup>44</sup>

Polimorfizmi v folatnem ciklu so povezani tudi s **kancerogenezo**. Zmanjšana remetilacija homocisteina vodi v zmanjšano sintezo SAM, kar vpliva na metilacijo bioloških molekul.<sup>9,18</sup> Znano je, da metilacijski vzorec DNA vpliva na izražanje genov. V splošnem

velja, da hipometilacija poveča izražanje genov, kar lahko vodi do aktivacije protoonkogenov in kancerogeneze, metilacija pa njihovo izražanje utiša.<sup>45</sup> Kancerogeneza je lahko tudi posledica večje razpoložljivosti 5,10-metilen-THF. Večja razpoložljivost tega substrata pomeni večje število gradnikov za metilacijo dUMP v dTMP. Ta reakcija predstavlja edino pot za sintezo timidina *de novo*. Oslabljen encim TS lahko povzroči napačno vgrajevanje dUTP v molekulo DNA, kar vodi v poškodbe kromosomov in nastanek lomljivih mest na molekuli DNA. Dvoverižne prelome molekule DNA in napačno vgrajevanje uracila pa so raziskovalci opazili tudi pri ljudeh z znižanim folatnim statusom.<sup>9,18,46,47</sup>

Spremembe v folatnem ciklu oziroma folatnem statusu vplivajo tudi na nastanek **nevroloških motenj**. Folat igra pomembno vlogo pri normalnem delovanju centralnega živčnega sistema (CŽS), saj je kofaktor v tetrahidrobiopterinskem (BH<sub>4</sub>) ciklu, ki vodi v sintezo serotonina in drugih neurotransmiterjev. Mutacije v genu *MTHFR* lahko preko biosinteze SAM posredno vplivajo na sintezo monoaminskih neurotransmiterjev (serotonin, dopamin, noradrenalin) in na razvoj številnih nevroloških motenj, kot so bipolarna motnja, Parkinsonova bolezen, Alzheimerjeva bolezen in vaskularna demenca.<sup>48-50</sup>

## Dodajanje folatov

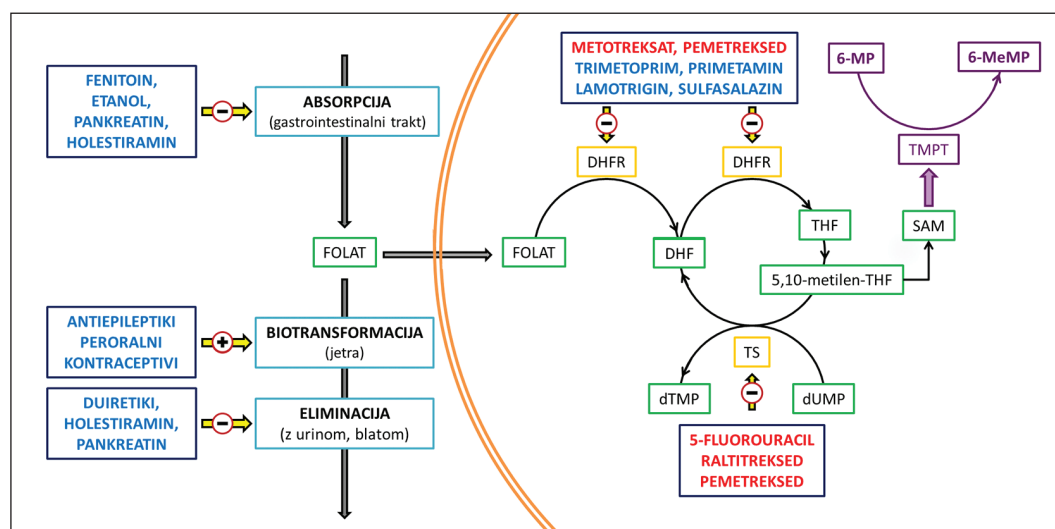
Zaradi priznanega pomena folata za homeostazo organizma so v številnih državah uvedli dodajanje folne kisline v prehrano. Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) je v ZDA že leta 1998 uvedla dodajanje folne kisline moki, kruhu, kosmičem, koruznemu zdrobu, rižu, testeninam in drugim žitnim izdelkom, predvsem z namenom zmanjšati tveganje za razvoj okvar nevralne cevi pri novorojenčkih.<sup>51</sup> Nekoliko kasneje so se za ta ukrep odločili tudi v Kanadi, še kasneje pa v Avstraliji.<sup>52</sup> Večina evropskih in azijskih držav se za ta korak ni odločila. Izjeme so le Kazahstan, Kosovo, Kirgizistan, Republika Moldavija, Turkmenistan in Uzbekistan.<sup>53</sup> Kljub pozitivnim učinkom še vedno potekajo številne razprave o možnih negativnih vplivih dodajanja folne kisline. Prevelike količine folne kisline namreč lahko prekrijejo simptome megaloblastne anemije, ki nastane zaradi pomanjkanja vitamina B<sub>12</sub>. Če te simptome prepoznamo prepozno, lahko bolezen napreduje in vodi do težjih nevroloških okvar.<sup>3,54</sup> Zvišana raven folne kisline lahko vpliva tudi na metilacijo molekule DNA in tako na epigenetske spremembe.<sup>51</sup>

Prehranska priporočila za dnevni vnos folata se med državami razlikujejo, načeloma pa so postavljena tako, da omogočajo doseganje ustreznega folatnega statusa (serumska koncen-

**Tabela 3:** Pojavnost polimorfizma C677T in A1298C v slovenski populaciji.<sup>24</sup>

Genotip		Nemutirani homozigot (»wild-type«)	Heterozigot	Mutiran homozigot
		677CC	677CT	677TT
Nemutirani homozigot (»wild-type«)	1298AA	9,3 %	26,2 %	11,5 %
Heterozigot	1298AC	22,4 %	20,2 %	n. a.
Mutirani homozigot	1298CC	10,4 %	n. a.	n. a.

n.a. (angl.: not available) – ni podatka



**Slika 2:** Zdravilne učinkovine, povezane s folatnim ciklom.

Učinkovine lahko vplivajo na farmakokinetiko folata (levo) ali neposredno na folatni cikel (desno). Z rdečo so označene učinkovine, kjer je folatni cikel tarča primarnega mehanizma delovanja, z modro so označene učinkovine, ki se uporabljajo v druge terapevtske namene, vendar pa se vseeno vpletajo v folatni cikel oziroma vplivajo na folatni status. V primeru 6-merkaptopurina (6-MP, označeno z vijolično) spremembe v folatnem ciklu vplivajo na metabolno inaktivacijo učinkovine. DHF: dihidrofolat; THF: tetrahydrofolat; dTMP: deoksitimidin monofosfat; dUMP: deoksiuridin monofosfat; SAM: S-adenozil metionin; 6-MP: 6-merkaptopurin; 6-MeMP: 6-metilmerkaptopurin; TS: timidilat sintaza; DHFR: dihidrofolat reduktaza; SLC19A1: prenašalec reduciranega folata; TMPT: tiopurin-S-metiltransferaza.

tracija  $\geq 10$  nmol/L in koncentracija v eritrocitih  $\geq 340$  nmol/L) tudi v najbolj ranljivih skupinah prebivalstva, kot so posamezniki s polimorfizmom MTHFR (Tabela 2).<sup>3</sup> Priporočila so enotna glede potrebe po povišanem vnosu folatov pri nosečnicah in doječih materah, nekatere institucije pa priporočajo višji vnos vsem ženskam v rodni dobi, da bi preprečevali prirojene napake ploda tudi pri nenačrtovanih nosečnostih.<sup>4</sup> Dodajanje folne kisline pred načrtovano nosečnostjo je skladno tudi s priporočili proizvajalcev zdravil, ki vsebujejo folno kislino.<sup>55-57</sup>

Dnevni odmerki, višji od priporočenih, načeloma ne predstavljajo tveganja za zdravje, ker pa lahko prekrijejo znake megaloblastne anemije, je dnevni vnos folatov s hrano ali prehranskimi dopolnili omejen na 1000  $\mu\text{g}$  folatnega ekvivalenta.<sup>3,4</sup>

Razumevanje vloge polimorfnosti MTHFR gena je vodilo k spoznanju, da bi bilo pri posameznikih z genotipom

677TT, kjer je aktivnost MTHFR le 30 % normalne aktivnosti, priporočljivejšee jemanje metiliranih oblik folata. Na ta način se izognemo zmanjšani encimski pretvorbi, ki je posledica polimorfizma MTHFR. Takšno možnost predstavlja kalcijev levomefolat, ki je stabilna sol L-5-metiltetrahydrofolne kisline, torej sol prevladujoče oblike folata v plazmi, ki v cikel presnove folatov lahko vstopa neposredno, brez encimske pretvorbe.<sup>58</sup>

Zagotavljanje zadostne količine folatov lahko izniči vpliv polimorfizmov MTHFR 677, 1298 in tveganje za kopičenje homocisteina ter tako njegove patološke učinke.

### Povezava med prisotnostjo polimorfizmov v genu MTHFR in odzivom na zdravila

Zaradi pomena, ki ga ima prisotnost polimorfizma MTHFR ter možnega vpliva na izid zdravljenja, povezavo med



polimorfizmi MTHFR in učinkovitostjo in/ali varnostjo zdravil raziskujejo v številnih študijah.<sup>59</sup> Največ raziskav je s področja onkologije, ko so preučevali predvsem metotreksat, 5-fluorouracil in 6-merkaptopurin.

Zdravila na folatni cikel oz. folatni status vplivajo preko različnih mehanizmov (Slika 2, Tabela 4), to pa lahko ob prisotnosti polimorfizmov privede do pomanjkanja folatov.

Kot prikazuje Slika 2, lahko učinkovine na folatni cikel oz. folatni status vplivajo pred ali po vstopu folata v celico. Številna zdravila vplivajo na farmakokinetične procese in tako zmanjšujejo količino folata, ki je na voljo za vstop v celico. Fenitoin in etanol zmanjšata obseg absorpcije, peroralni kontraceptivi in antiepileptiki pospešijo biotransformacijo, diuretiki povečajo eliminacijo, medtem ko holestiramin in pankreatin zmanjšata obseg absorpcije ter pospešita izločanje. Zaradi inhibicije prenašalca SLC19A1 s sulfasalazinom je lahko oviran tudi vstop folata v celice.<sup>5</sup> Mnoge učinkovine na folatni cikel vplivajo neposredno, saj učinkujejo na vanj vpletene encime. Metotreksat, pemetreksed, trimetoprim, primetamin, lamotrigin in sulfasalazin zavirajo delovanje encima

DHFR, medtem ko 5-fluorouracil, raltitreksed in pemetreksed zmanjšajo aktivnost encima TS.<sup>5,60,61</sup> Poseben primer je 6-merkaptopurin, ko je učinek obraten, saj spremembe v folatnem ciklu vplivajo na metabolno inaktiviranje učinkovine.<sup>62</sup>

Prisotnost polimorfizmov v genu *MTHFR* in zato zmanjšana aktivnost encima lahko vpliva na zdravljenje z analogi purinskih in pirimidinskih baz ali analogi folne kisline, ki delujejo preko kompetitivnega vključevanja v folatni cikel.

Predstavniki fluoropirimidinov, 5-fluorouracil (5-FU), ki se uporablja za zdravljenje solidnih tumorjev, učinkuje v S-fazi celičnega cikla in ovira sintezo nukleinskih kislin. Po vstopu v celico se 5-FU z encimsko reakcijo pretvori v deoksifluorouracil monofosfat (5-FdUMP), ki zavira aktivnost encima TS. Ta katalizira metilacijo dUMP v dTMP, donor metilne skupine v tej reakciji pa je molekula 5,10-metilen-THF. Do nepovratne inhibicije TS pride zaradi vezave 5-FdUMP, 5,10-metilen-THF in TS v kompleks, ki nima encimske aktivnosti. Zato je zavrta sinteza dTMP, kar vodi v zmanjšanje sinteze DNA, napačno vgrajevanje dUMP v molekulo DNA, nastanka lomljivih mest v molekuli DNA

**Tabela 4:** Zdravilne učinkovine, ki preko različnih mehanizmov vplivajo na folatni cikel ali folatni status.<sup>5,60,61</sup>

Mehanizem interakcije		Učinkovina
Vpliv na farmakokinetične parametre	Zmanjšana absorpcija	Fenitoin, pankreatin, holestiramin, sulfasalazin, etanol, antacidi, ki vsebujejo magnezij ali aluminij
	Pospešen metabolizem	Fenitoin, fenobarbital, karbamazepin, pirimidon, peroralni kontraceptivi
	Pospešeno izločanje	Tiazidni diuretiki, diuretiki zanke
Inhibicija encimov folatnega cikla	DHFR	Metotreksat, pemetreksed, primetamin, trimetoprim, lamotrigin, sulfasalazin
	TS	5-fluorouracil, raltitreksed, pemetreksed
	MTHFR	Metaboliti metotreksata

ter apoptozo.<sup>63-65</sup> Zadostna znotrajcelična koncentracija 5,10-metilen-THF je pomembna za optimalno učinkovitost 5-FU.<sup>64,65</sup> Ob prisotnem polimorfizmu MTHFR je povišana znotrajcelična koncentracija 5,10-metilen-THF, kar vpliva na hitrost nastajanja in stabilnost kompleksa TS/5-FdUMP/5,10-metilen-THF. To vpliva tudi na bolnikov odziv na terapijo.<sup>63-65</sup> Izvedene študije so pokazale pozitivno povezavo med prisotnostjo polimorfizma C677T oziroma polimorfizmov C677T in A1298C<sup>65</sup> ter učinkovitostjo zdravljenja s 5-FU.<sup>65-68</sup> Ker pa je 5-FU učinkovina z ozkim terapevtskim oknom, lahko povečan odziv vpliva tudi na varnost. Več toksičnih učinkov so namreč zaznali tako v prisotnosti polimorfizma C677T kot tudi A1298C.<sup>63</sup>

Metotreksat (MTX) je kompetitivni inhibitor encima DHFR, ki prepreči redukcijo DHF v THF. Nekako nedosledno ga uvrščamo med antagoniste folne kisline. Uporablja se za zdravljenje številnih solidnih tumorjev in hematoloških malignih bolezni, kakor tudi za zdravljenje revmatičnih in drugih vnetnih bolezni.<sup>55,56</sup> Tako kot 5-FU tudi MTX deluje predvsem na S fazo celičnega cikla, njegov učinek pa je bolj izrazit v tkivih s hitrodeležimi celicami. Poleg tega presnovki MTX inhibirajo MTHFR.<sup>69</sup> Pri zdravljenju z MTX lahko pride v prisotnosti polimorfizma MTHFR do spremembe v koncentraciji reduciranih folatov, do hudega poslabšanja folatnega statusa ter do povišanih koncentracij homocisteina.<sup>63</sup> V številnih raziskavah so dokazali, da polimorfizem C677T v genu *MTHFR* vpliva na pojav neželenih učinkov pri zdravljenju z MTX, kot so hepatotoksičnost, mielosupresija, vnetje ustne sluznice in toksični učinki v gastrointestinalnem traktu.<sup>63,69</sup> Pri bolnikih s polimorfizmom C677T so ob povišani toksičnosti MTX izmerili povišane koncentracije homocisteina, pri homoz-

igotih 677TT pa so v primerjavi z drugimi genotipi zaznali tudi višje plazemske koncentracije MTX, kar naj bi bilo povezano z nastopom neželenih učinkov.<sup>63</sup> Toksični učinki MTX so lahko tako hudi, da je potrebno njegov odmerek znižati ali pa zdravljenje za nekaj časa celo prekiniti.<sup>72</sup> Izkazalo se je, da so neželeni učinki v veliki meri povezani s pomanjkanjem folata, zato se skladno s trenutnimi smernicami zdravljenja takim bolnikom pogosto dodaja folna ali pa folinska kislina (5-formil tetrahidrofolna kislina).<sup>60,63</sup> Tak pristop zmanjša pojav hudih neželenih učinkov in z njimi povezanih prekinitev zdravljenja, ne vpliva pa na učinkovitost. V večini primerov se je izkazalo, da dodatek folne oziroma folinske kisline ublaži ali izniči vpliv polimorfizma C677T na toksičnost MTX.<sup>63</sup>

Polimorfizem MTHFR vpliva tudi na zdravljenje s 6-merkaptopurinom (6-MP), čeprav se ta učinkovina ne vpleta direktno v folatni cikel. 6-MP je analog purina, ki se uporablja kot imunosupresiv in predstavlja temelj vzdrževalnega zdravljenja pri bolnikih z akutno limfoblastno levkemijo (ALL).<sup>62,73,74</sup> Encim tiopurin-S-metiltransferaza (TPMT) je eden glavnih encimov, ki so odgovorni za presnovo 6-MP do neaktivnih presnovkov, njegova aktivnost pa je povezana z učinkovitostjo in varnostjo zdravljenja.<sup>73,74</sup> Encimska aktivnost TPMT je odvisna predvsem od polimorfizmov v genu *TPMT*, vplivajo pa tudi drugi dejavniki. Mednje spada tudi endogena koncentracija SAM, ki vpliva na stabilnost encima. To pomeni, da sta za aktivnost TPMT pomembna tudi cikel presnove folatov in folatni status.<sup>62,73</sup> Ker aktivnost MTHFR zaradi vpliva na nastajanje 5-metil-THF vpliva tudi na nastajanje SAM, lahko prisotnost polimorfni različic tega encima prispeva k zmanjšanju aktivnosti TPMT ter zato toksičnosti 6-MP.<sup>73,75</sup> Pokazalo se je, da

pri pediatričnih bolnikih z ALL sočasna prisotnost polimorfizmov MTHFR in TPMT prispeva k povečani toksičnosti terapije, pri takih bolnikih pa je bilo večkrat potrebno prilagoditi terapijo in znižati odmerke. Poznavanje polimorfizmov MTHFR ter bolnikovega folatnega statusa bi lahko torej prispevalo k dodatni individualizaciji zdravljenja s tiopurini.<sup>73</sup>

Kljub intenzivnim farmakogenomskim raziskavam po trenutno dostopnih podatkih obstaja le eno zdravilo, čigar navodila za uporabo izrecno omenjajo polimorfizem MTHFR. V Kanadi zaradi povečanega tveganja za vensko ali arterijsko tromboembolijo ženskam s hiperhomocisteinemijo zaradi mutacij v genu *MTHFR* odsvetujejo uporabo transdermalnega kontraceptiva, ki vsebuje kombinacijo norelgestromina in etinilestradiola.<sup>76</sup> V EU in ZDA take omejitve zaenkrat še ni.

Obstaja še vrsta drugih učinkovin, ki vplivajo na folatni status ali folatni cikel, vendar je medsebojno delovanje precej slabo raziskano, podatkov o vplivu polimorfizma MTHFR pa ni na voljo. Mehanizmi interakcij so torej različni, učinkovine pa lahko vplivajo bodisi na

farmakokinetične parametre ali encime folatnega cikla.

Pri uporabi nekaterih od naštetih zdravil, recimo kombinacije trimetoprima in sulfametoksazola, ter pri dolgotrajnem zdravljenju z antiepileptiki je skladno z navodili za uporabo potrebno razmisliti o dodajanju folatov. Posebna pozornost je potrebna pri bolnicah v rodni dobi in nosečnicah.<sup>5</sup>

## Zaključek

Glede na to, da lahko polimorfizmi MTHFR poglobijo pomanjkanje folata ter vplivajo na številne zdravilne učinkovine in njihove učinke, bi bilo s sodobnimi tehnikami molekularne genetike smiselno identificirati bolnike, pri katerih je aktivnost encima MTHFR zmanjšana. Sodobne tehnike molekularne genetike namreč omogočajo hitro, zanesljivo in ekonomično ugodno izvedbo genskega testiranja.<sup>77</sup> Najpogosteje se uporabljajo testi, ki slonijo na amplifikaciji fragmenta genomske DNA, ki vsebuje preučevane polimorfizme. Z uporabo alel specifičnih oligonukleotidov zanesljivo določimo prisotnost preiskovanega polimorfizma in genotip preiskovanca.<sup>78</sup>

## Literatura

- Duan S, Huang RS, Zhang W, Mi S, Bleibel WK, Kistner EO, et al. Expression and alternative splicing of folate pathway genes in HapMap lymphoblastoid cell lines. *Pharmacogenomics*. 2009; 10(4): 549–63.
- Mahmood L. The metabolic processes of folic acid and Vitamin B12 deficiency. *J Health Res Rev*. 2014; 1: 5–9.
- European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. *EFSA J*. 2014; 12: 1–277.
- National Institutes of Health (NIH). Folate - Dietary Supplement Fact Sheet. NIH [Internet] 2016. Dostopno 28.1.2016 s spletne strani: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Folate-HealthProfessional>.
- Worthington P. Drug-Nutrient Interactions Involving Folate. In: Boullata JI, Armenti VT. *Handbook of Drug-Nutrient Interactions*. 2nd edition. USA. 2010; 513–37.
- Imbard A. Neural Tube Defects, Folic Acid and Methylation. *Int J Environ Res Public Health*. 2013; 10: 4352–89.
- Blom HJ. Folic acid, methylation and neural tube closure in humans. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2009; 85(4): 295–302.
- Blom HJ. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J Inherit Metab Dis*. 2011; 34: 75–81.
- Nazki FH. Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene*. 2014; 533: 11–20.
- Bailey LB. Recent Advances in Nutritional Science Folate Metabolism and Requirements. *J Nutr*. 1999; 129: 779–82.
- Zetterberg H. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. *Eur J Hum Genet*. 2002; 10: 113–8.

12. Sharp L. Polymorphisms in Genes Involved in Folate Metabolism and Colorectal Neoplasia: A HuGE Review. *Am J Epidemiol.* 2004; 159: 423-43.
13. Bohanec P. Genetski polimorfizmi encimov v presnovni poti folata v zdravi slovenski populaciji. *Zdrav Vestn.* 2004; 73: 807-13.
14. Kniffin CL. 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR. OMIM Entry [Internet] 2015. Dostopno 25.3.2016 s spletne strani: <http://www.omim.org/entry/607093>.
15. Garilli B. MTHFR Mutation: A Missing Piece in the Chronic Disease Puzzle. *ND. Contrib. Writ.* 2012; 13(2).
16. Jacques PF. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation.* 1996; 93: 7-9.
17. Crider KS, et al. MTHFR 677C>T genotype is associated with folate and homocysteine concentrations in a large, population-based, double-blind trial of folic acid supplementation. *Am J Clin Nutr.* 2011; 93(6): 1365-72.
18. Johansson M. The MTHFR 677C>T polymorphism and risk of prostate cancer: results from the CAPS study. *Cancer Causes and Control* 2007; 18(10): 1169-74.
19. Czeizel A. Folate Deficiency and Folic Acid Supplementation: The Prevention of Neural-Tube Defects and Congenital Heart Defects Nutrients. 2013; 5: 4760-75.
20. Guéant-Rodriguez R-M, et al. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(3): 701-7.
21. Moll S, et al. Homocysteine and MTHFR Mutations. *Circulation.* 2015; 132: 6-9.
22. Leclerc D. Molecular Biology of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and Overview of Mutations/Polymorphisms. *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Dostopno 6.11.2015 s spletne strani: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6561>.
23. Wilcken B. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *J Med Genet.* 2003; 40: 619-25.
24. Karas Kuzelicki N. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) low activity genotypes reduce the risk of relapse-related acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leuk Res.* 2009; 33: 1344-8.
25. Weisberg I. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab.* 1998; 64: 169-172.
26. Kennedy DA, MTHFR Polymorphisms, and the Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Cancer Epidemiol.* 2012; 1-24.
27. DNA - Gen za MTHFR, polimorfizem 1298 A>C. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo [Internet]. [cited 1.12.2015]. Dostopno na: <http://www.ffa.uni-lj.si/raziskave/laboratorij-za-molekularno-diagnostiko/seznam-laboratorijskih-preiskav-in-storitev/mthfr-1298-ac>.
28. Zappacosta B, et al. Genotype Prevalence and Allele Frequencies of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T and A1298C Polymorphisms in Italian Newborns. *Lab Med.* 2009; 40(12): 732-6.
29. Ogino S. Genotype and haplotype distributions of MTHFR677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *J Hum Genet.* 2003; 48: 1-7.
30. I Isotalo PA. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: An Examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum. Genet* 2000; 67: 986-90.
31. Brown NM. Detection of 677CT/1298AC »double variant« chromosomes: Implications for interpretation of MTHFR genotyping results. *Genet Med.* 2005; 7: 278-82.
32. Društvo za zdravlje srca in ožilja Slovenije. *Smernice za družine z otrokom s prirojeno srčno napako.* Ljubljana; 2011.
33. Xuan C. Association Between MTHFR Polymorphisms and Congenital Heart Disease: A Meta-analysis based on 9,329 cases and 15,076 controls. *Sci Rep.* 2014; 4(7311): 1-13
34. Nie Y. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and congenital heart disease: a meta-analysis. *Clin Chem Lab. Med.* 2011; 49(12): 2101-8.
35. Hobbs CA. Congenital heart defects and genetic variants in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Med Genet.* 2006; 43: 162-6.
36. Brito LA. Genetics and Management of the Patient with Orofacial. *Cleft Plast Surg. Int.* 2012; 1-11.
37. Luo YL. Association between MTHFR polymorphisms and orofacial clefts risk: A meta-analysis. *Birth Defects Res. A Clin Mol Teratol.* 2012; 94(4): 237-44.
38. Karas-Kuzelicki N. Korelacija genotipov s pojavnostjo OFC. (preliminarni rezultati).
39. Alfarrá HY. Neural tube defects between folate metabolism and genetics. *Indian J Hum Genet.* 2011; 17(3): 126-31.
40. Greene NDE. Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet.* 2009; 18(2): 113-29.
41. Czeizel AE. Prevention of neural-tube defects with periconceptional folic acid, methylfolate, or multivitamins? *Ann Nutr Metab.* 2011; 58(4): 263-71.
42. Wang XW. Association between MTHFR A1298C polymorphism and neural tube defect susceptibility: A metaanalysis. *Am J Obstet. Gynecol.* 2012; 206(3): 251.e1-251.e7.
43. Varga EA. Homocysteine and MTHFR Mutations: Relation to Thrombosis and Coronary Artery Disease. *Circulation.* 2005; 111: 289-293.
44. Nurk E. Factor V Leiden, pregnancy complications and adverse outcomes: The Hordaland Homocysteine Study. *OJM.* 2006; 99(5): 289-98.
45. Phillips T. The Role of Methylation in Gene Expression. *Nat Educ.* 2008; 1(1): 116.
46. Pooja S. MTHFR 677C>T Polymorphism and the Risk of Breast Cancer: Evidence from an Original Study and Pooled Data for 28031 Cases and 31880 Controls. *PLoS One.* 2015; 13(3):e0120654.
47. Lu C. Diet folate, DNA methylation and genetic polymorphisms of MTHFR C677T in association

- with the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2011; 11: 91.
48. Lewis SJ. The thermolabile variant of MTHFR is associated with depression in the British Women's Heart and Health Study and a meta-analysis. *Mo Psychiatry*. 2006; 11: 352–60.
  49. Morrisette DA. Second messenger psychiatric disorders: a messed up MTHFR. (metylenetetrahidrofolate reductase) (Report) [Internet]. 2011. Dostopno 20.1.2016 s spletne strani: <http://www.highbeam.com/doc/1G1-252496863.html>.
  50. Miller AL. The methylation, neurotransmitter, and antioxidant connections between folate and depression. *Altern Med Rev*. 2008; 13(3): 216–26.
  51. Crider KS. Folic Acid Food Fortification—Its History, Effect, Concerns, and Future Directions. *Nutrients*. 2011; 3(3): 370–84.
  52. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Spina Bifida and Anencephaly Before and After Folic Acid Mandate - United States, 1995-1996 and 1999-2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2004; 57(17): 362–5.
  53. Food Fortification Initiative, Enhancing Grains for Healthier Lives. Europe [Internet]. Dostopno 25.11.2015 s spletne strani: [http://www.ffinetwork.org/regional\\_activity/europe.php](http://www.ffinetwork.org/regional_activity/europe.php).
  54. Farkaš J. Javnozdravstveni vidiki dodajanja folne kisline živilom [Seminar]. Ljubljana: Katedra za javno zdravje, Socialna medicina; 2008.
  55. Soediono B. Folicin. *J Chem. Inf Model*. 1989; 53: 160.
  56. Femibion - Pre-conception + Pregnancy. Leaflet
  57. SPC, Labeling and Package Leaflet. Folic Acid - Tifol. 2010; 3-7.
  58. Seremak-Mrozikiewicz A. Metafolin - alternative for folate deficiency supplementation in pregnant women. *Ginek Pol*. 2013; 84(7): 641–6.
  59. Gene: MTHFR. PharmGKB [Internet]. Dostopno 25.3.2016 s spletne strani: <https://www.pharmgkb.org/gene/PA245#tabview=tabo&subtab=33>.
  60. JAZMP-IB. Povzetek glavnih značilnosti zdravila - Metotreksat Actavis. 2015.
  61. Van Gelder MM. Tetatogenic mechanisms of medical drugs. *Hum Reprod. Update*. 2010; 16(4): 378–94.
  62. Karas-Kuzelicki N. Individualization of thiopurine therapy: thiopurine S-methyltransferase and beyond. *Pharmacogenomics*. 2009; 10(8): 1309–22.
  63. De Mattia E. C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. *Eur J. Cancer*. 2009; 45(8): 1333–51.
  64. Afzal S. MTHFR polymorphisms and 5-FU-based adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2009; 20(10): 1660–6.
  65. Etienne-Grimaldi MC. Metylenetetrahidrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2010; 69(1): 58–66.
  66. Cohen V. Metylenetetrahidrofolate Reductase Polymorphism in Advanced Colorectal Cancer: A Novel Genomic Predictor of Clinical Response to Fluoropyrimidine-based Chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2003; 9: 1611–5.
  67. Suh KW. Which gene is a dominant predictor of response during FOLFOX chemotherapy for the treatment of metastatic colorectal cancer, the MTHFR or XRCC1 gene? *Ann Surg Oncol*. 2006; 13(11): 1379–85.
  68. Ruzzo A. Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007; 25(10): 1247–54.
  69. Ulrich CM. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahidrofolate reductase C677T polymorphism. *Blood*. 2001; 98(1): 231–5.
  70. Świerkot J, et al. Associations between single-nucleotide polymorphisms of RFC-1, GGH, MTHFR, TYMS, and TCII genes and the efficacy and toxicity of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Pol Arch Med Ween*. 2015; 125(3): 152–60.
  71. Yang L. Impact of methylenetetrahidrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms on methotrexate-induced toxicities in acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2012; 33(5): 1445–54.
  72. Chiusolo P. Preponderance of methylenetetrahidrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate. *Ann Oncol*. 2002; 13(12): 1915–8.
  73. Karas-Kuzelicki N. Heterozygosity at the TPMT gene locus, augmented by mutated MTHFR gene, predisposes to 6-MP related toxicities in childhood ALL patients. *Leukemia*. 2009; 23: 971–4.
  74. JAZMP-R/001. Povzetek glavnih značilnosti zdravila - PURI-NETHOL. 2013.
  75. Moon W. Review article: recent advances in pharmacogenetics and pharmacokinetics for safe and effective thiopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016; 43: 863–83.
  76. Health Canada Santé Canada (HCSC) label information for ethinyl estradiol, norelgestromin and F2, F5, MTHFR, PROC, PROS1, SERPINC1. PharmGKB [Internet]. Dostopno 2.4.2016 s spletne strani: <https://www.pharmgkb.org/label/PA166127695?previousQuery=mthfr>.
  77. Laboratorij za molekularno genetiko. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo [Internet]. Dostopno 20.3.2016 s spletne strani: <http://www.ffa.uni-lj.si/raziskave/laboratorij-za-molekularno-diagnostiko>.
  78. Panovska Z. Povezanost polimorfizmov v izbranih genih folatnega cikla z napakami nevalne cevi [Diplomska naloga]. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo; 2010.