

ПРЕВАНТИВНИЯТ ЕФЕКТ НА ФОЛИЕВАТА КИСЕЛИНА СРЕЩУ ВРОДЕНИ ДЕФЕКТИ НА НЕВРАЛНАТА ТРЪБА

I. РЕЗЮМЕ

Дефектите на невралната тръба (ДНТ) включват голям брой вродени малформации, които възникват когато отворената през най-ранните етапи на ембрионалното развитие неврална тръба, не успее да се затвори през първия месец след оплождането. ДНТ се считат за едни от най-често срещаните малформации с варираща честота в зависимост от генетичния фон и условията на околната среда.

Изследванията показват, че фолиевата киселина играе важна роля срещу появата на ДНТ. Много проучвания доказват, че този витамин от "В" групата има важен протективен ефект, както срещу рецидиви на ДНТ така и срещу нововъзникнали случаи. В тази връзка, през 1992 г. Националната Здравна Служба на САЩ издаде препоръка всички жени в хетерогенна възраст да приемат най-малко 400 мкг фолиева киселина дневно.

II. ВЪВЕДЕНИЕ

Целта на този документ е да направи обзор на това, което се знае за превантивния ефект на фолиевата киселина срещу ДНТ. Този обзор включва преглед на мофогенезата и епидемиологията на ДНТ, доказателства

за връзката между фолиевата киселина и ДНТ, предполагаеми начини на превенция на ДНТ с фолиева киселина и различни възможности за увеличаване на приема на фолиева киселина.

III. ДЕФЕКТИ НА НЕВРАЛНАТА ТРЪБА (ДНТ)

A. Клиника

От гледна точка на фенотип [1], епидемиология [2], етиология [3] и клиника [4,5] дефектите на невралната тръба (ДНТ) включват широк кръг вродени малформации. Те възникват в ранните етапи на ембрионалното развитие, когато невралната тръба не успее да се затвори до 28-мия ден на бременността [1]. ДНТ варират от много леки и често субклинични форми с малък отвор на задния вертебрален канал до напълно отворена неврална тръба, представляваща най-тежката форма на дефекта – *craniorachischisis*. По своята тежест ДНТ са толкова разнообразни, че правят всеки случай уникален [3].

Приблизително половината от случаите на ДНТ са аненцефалии, които представляват пълна или частична липса на главен дял от краниалната дъга.

Деца с аненцефалия обикновено са мъртвородени или живеят съвсем кратко. Другата половина от случаите на ДНТ включват различни дефекти по хода на тръбата. От горната част на невралната тръба, от която се развиват черепните кости, възникват дефекти като енцефалоцеле, а от гръбначния канал възниква *spina bifida*, която варира от леки форми представляващи дефект на един прешлен, до засягане на голям участък от гръбначния стълб, при които са отворени почти всички вертебрални дъги.

Въпреки, че съществуват множество класификации на ДНТ и техните клинични последици, все още не се знае защо невралната тръба не успява да се затвори. Повечето гени отговарящи за развитието на структурите на човешкия ембрион също са неизвестни. Това се отнася и за развитието на невралната тръба.

V. Диагноза

Наличието на spina bifida обикновено води до висока степен на нетрудоспособност и инвалидност на засегнатия индивид. Следствие на първоначалния дефект, по време на ембрионалното развитие протичат множество процеси, водещи до тежко засягане на функциите, зависещи от ЦНС. В по-леките случаи, както и при ранно хирургическо възстановяване на дефекта, може да се очаква трайно инвалидизиране [11].

ДНТ могат да се диагностицират пренатално чрез ехография с висока разделителна способност. Методите използвани за сканиране на ДНТ включват измерване нивата на майчиния серумен алфа-фетопротеин, обикновена ехография, и измерване нивата на амниалния алфа-фетопротеин в случаите, когато се извършва амниоцентеза по друг повод [12,15,16,17].

Повишените нива на алфа-фетопротеин в майчиния серум и/или в амниалната течност предполагат наличие на ДНТ. При амниоцентеза освен нивото на амниалния алфа-фетопротеин се проследяват нивата на ацетилхолинестеразта. Дефинитивна диагноза на ДНТ се поставя със ехография с висока разделителна способност, след като скрининговите методи са дали суспектни показатели за наличие на ДНТ.

C. Епидемиология

От вродените малформации ДНТ са с една от най-високите честоти. Честотата на ДНТ варира в зависимост от популацията, географското разположение, времето на измерване, демографския състав на контролната група. В САЩ честотата на ДНТ варира от 4 до 10 на 10000 живи раждажия [35]. Изследвания в Ирландия, Великобритания, Китай, Унгария и Мексико са показали по-висока честота. В някои изследвания са докладвани и честота над 1%. В България честотата на ДНТ е 10 на 10 000, докато в района на Рудозем достига до 0,8%. Разликите в резултатите могат да се дължат на разлики в изследваните популации, разлики в методологията, както и на влиянието на пренаталната диагностика и селективната интерупция на бременности засегнати от ДНТ. (Много методи за изследване честотата на вродените дефекти отчитат дефектите само сред живородените бебета)

ДНТ обикновено са спорадични, рядко свързани с хромозомни аномалии или фамилен обремененост. Все пак риска от втора бременност с ДНТ след прекарана предходна бременност с ДНТ (рецидив) е по-висок от риска за бременност с ДНТ

възникващ за първи път (нововъзникнал)[37]. Риска от рецидив варира между 3 и 5% в зависимост от популацията [38,74].

Аненцефалията засяга по-често женския пол (съотношение женски към мъжки пол 2,3:1), докато при spina bifida се наблюдава само незначителна преобладация на женския пол. В други изследвания не се наблюдават статистически значими разлики в честотата между половете.

D. Рискови фактори за ДНТ.

Съществуващите проучвания предполагат, че генетичните фактори и факторите на околната среда имат роля за появата на ДНТ [17,18]. От генетична гледна точка, някои ДНТ са в резултат на хромозомни аномалии (тризомия 18), а други се дължат на дефект на единични гени (синдром на Meckel-Gruber)[44].

Все пак най-често срещаните ДНТ са мултифакторно обусловени. Те възникват, когато има генетично предразположение към малформация, което се отключва от гаген фактор на околната среда. Към днешна дата са установени множество фактори на околната среда, които имат връзка с появата на ДНТ, а именно 1) социо-икономически статус [45]; 2) повишено съдържание на олово в питейната вода [46]; 3) грип [47]; 4) прегряване на бременната [48]; 5) трудова среда на родителя [49]; 6) затлъстяване [50]; 7) хранителен режим. За един елемент от хранителния режим - фолиевата киселина, е доказано, че играе много важна роля при възникването на ДНТ.

IV. ФОЛИЕВАТА КИСЕЛИНА И ДНТ

В последните години бяха проведени много изследвания, които подкрепиха тезата, че употребата на фолиева киселина от жената намалява риска от поява на ДНТ по време на бременността.

Д-р Lucy Wills за пръв път описва фолиевата киселина през 1930 като фактор, който лекува алиментарна анемия при бременни [52]. От тогава до днес се е събрала достатъчно информация за фолиевата киселина, която доказва нейната връзка с появата на някои вродени малформации. Преди около 30 год. адекватните нива на фолиева киселина сред жените в детерогна възраст стават нов обект на интерес във връзка с възможностите за превенция на феталните и неонаталните малформации [10]. На базата на тези изследвания CDC (Center For Disease Control and Prevention) установи, че ако всички жени в детерогна възраст способни да забременеят, приемат по 400 мкг ежедневно, 50 до 70% от всички случаи на spina bifida и аненцефалия могат да бъдат предотвратени [6].

А. Диетология и физиология.

Фолиевата киселина, водноразтворим витамин от групата "В", се счита за незаменим хранителен елемент. Това означава, че човешкият организъм не може да синтезира фолиева киселина. В червата съществуват бактерии синтезиращи фолиева киселина, но произведеното от тях количество е недостатъчно за дневните нужди на човека [29]. Единствения източник на фолиева киселина е храната. Фолиевата киселина с природен произход е изградена от птеридинов пръстен, пара-амино-бензоена киселина (ПАБК) и "опашка" от 1 до 6 молекули глутаминова киселина. Тези разновидности са обединени под названието "фолати". Колкото повече молекули глутаминова киселина съдържа даден фолат, толкова по-ниска е неговата бионаличност. Повечето фолати имат по няколко молекули глутаминова киселина и трябва да се конвертират до моно-глутаматна форма, за да се абсорбират в тънките черва. Тъй като синтетичната фолиева киселина е моно-глутамат, нейната бионаличност е по-висока от натуралните форми. При топлинна обработка на храната се губят между 20 и 30% от наличната фолиева киселина [53].

Фолатите имат два основни физиологични ефекта: те са кофактор на ензимите синтезиращи ДНК и

РНК и участват в превъщането на хомоцистеина в метионин [29]. През ембрионалното развитие, синтеза на нуклеинови киселини и протеини е най-висок, затова рязко нарастват нуждите от фолиева киселина в организма на жената през този период. При недостиг на фолати се подтиска синтеза на нуклеинови киселини и клетките стават неспособни да произведат достатъчно ДНК за митозата. В допълнение, инхибирания процес на метилиране води до невъзможност да се метилират протеини, липиди и миелин [54].

В. Предполагани механизми на превенция на ДНТ

Точният механизъм, по който фолиевата киселина предпазва от развитие на ДНТ е неизвестен. Една от теориите предполага, че ДНТ не се дължат на недостиг на фолиева киселина в ембрионалния период, а по-скоро се касае за вроден дефект на фолатния метаболизъм. Според тази теория, феталните нива на фолиевата киселина могат да бъдат ниски и при адекватни нива в организма на майката. При дефектен фолатен метаболизъм в организма се натрупва хомоцистеин. При нарушен метаболизъм на хомоцистеина се нарушава функцията на следните ензими: 1) цистатионин синтетаза; 2) метионин синтетаза или 3) 5,10 метилен тетрахидрофолат редуктаза [54]. Множество проучвания изследват отношението между тези ензими и ДНТ [63-72]. Резултатите от тези изследвания са обещаващи и подкрепят идеята, че ДНТ са многофакторно обусловени и се дължат на генетично предразположение, което се отключва от различни независими рискови фактори.

Друга, макар и по-малко популярна теория предполага, че фолиевата киселина намалява честотата на ДНТ като предизвиква селективен аборт на засегнатия фетус [33].

С. Научни доказателства за превантивната роля на фолиевата киселина срещу ДНТ

Научният интерес към фолиевата киселина датира от 1964 г., когато Hibbard публикува данни за връзка между малформации (различни от ДНТ) и недостига на фолиева киселина. Интересът към фолиевата киселина сред научната общност нараства значително след 1976 г., когато Smithells успява да свърже недостига на фолиева киселина с появата на ДНТ [10]. През 1980 той публикува

нерандомизирано изследване с мултивитаминен препарат даван на жени, които са родили от предходна бременност едно или повече деца с ДНТ. Той установил 5% честота на рецидив в групата без медикамент и едва 0,6% честота на рецидив в групата с медикамент [75].

През 1980 г. Laurence, един от водещите изследователи на ДНТ предполага, че при жените с адекватен хранителен режим, честотата на рецидиви би трябвало да е по-ниска. През 1981 г. той публикува резултатите от клинично изследване, което показва 60% намаление на риска от рецидив на ДНТ при жени, които вземат фолиева киселина [11,12].

Други четири изследвания, проведени през 80-те години [6,19,20,21] съдържат данни за протективния ефект на мултивитаминни препарати съдържащи фолиева киселина в периконцептивния период (еден месец преди забременяване и през първия триместър). Всички изследвания показват данни за протективен ефект срещу рецидив на ДНТ в групата, която приема фолиева киселина в сравнение с контролната група. Всички резултати, с изключение на един са статистически значими. Статистически незначимия резултат в дадения случай може да се дължи на малка извадка, неправилна класификация или недостатъчен контрол.

През 1991 г. CDC публикува обзор на доказателствата за превантивния ефект срещу рецидив на ДНТ и препоръчва дозата от 4 мг фолиева киселина за жени, които от предишна бременност са имали дете или фетус със ДНТ [8]. През следващата година, Националната Здравна Служба на САЩ издава препоръка всички жени в детородна възраст, които могат да забременеят да приемат по 0,4 мг фолиева киселина на ден [7]. Една част от случаите на ДНТ не могат да бъдат предотвратени с приема на фолиева киселина [24,27]. Това откритие още веднъж доказва хетерогенността на ДНТ. От значение е и факта че някои етнически групи се повлияват по-слабо от протективния ефект на фолиевата киселина.

D. Дози за профилактика на нововъзникнали случаи и рецидиви.

Докато препоръките, относно периода за прилагане на фолиевата киселина за превенция на ДНТ са категорични (4 седмици преди забременяване до края на първия триместър), то по отношение на оптималната доза мненията не са съвсем единни [29]. Доказателствата в подкрепа на дозата фолиева киселина, понастоящем препоръчвана в САЩ, идват от

изследванията на Medical Research Council [25], Smithell [73] Werler [23] и Shaw [24].

Изследването на Medical Research Council [25] установи намаляване честотата на рецидивите на ДНТ до 71% при дневен прием на 4 мг фолиева киселина. В Европа бе проведено рандомизирано клинично изследване с 0,8 мг фолиева киселина в мултивитаминен препарат. В групата приемаща препарата не са регистрирани случаи с ДНТ. Изследването на Smithell е проведено с 0,36 мг фолиева киселина на ден.

Изследване проведено в 2 области в Китай, публикувано през 1999 г. в New England Journal of Medicine, даде нови доказателства в подкрепа на дозата от 400 мкг фолиева киселина дневно в периконцептивния период. Използваният препарат представлява 400 мкг фолиева киселина на таблетки без други витамини. В северната област, честотата на бременности с ДНТ сред жени приемащи фолиева киселина преди забременяване е била 10 от 10 000 в сравнение с 48 на 10 000 при бременности на жени които не приемат фолиева киселина (80% намаление). В южната област честотата на ДНТ била много по-ниска в сравнение със северната. В южната област сред жените приемащи фолиева киселина преди забременяване в доза от 400 мкг на ден риска от развитие на ДНТ бил намален до 40%, в сравнение с контролната група без медикамент (6 на 10 000 сравнено с 10 на 10 000)

През 1992 г. Националната Здравна Служба на САЩ препоръчва дозата от 0,4 мг фолиева киселина за превенция на нововъзникнали случаи на ДНТ.

През 1991 г. CDC препоръчва дозата от 4 мг за превенция на рецидиви на ДНТ. През същата година Института по Медицина на САЩ препотвърди дозата от 0,4 мг като достатъчен дневен прием в периконцептивния период [29].

E. Превантивен ефект на фолиевата киселина срещу други вродени дефекти.

Резултатите от някои изследвания проведени наскоро показват, че фолиевата киселина може да има превантивен ефект и при други вродени дефекти като вродени цепки на горната устна (labium leporinum), вродени цепки на небцето (faux lupina) и съчетани вродени цепки (cheilognathopalatoschisis)[55,56,57], вродена липса на крайници (amelia)[58], аномалии на пикочо-половата система [60]. За окончателното потвърждаване на тези данни са необходими допълнителни изследвания. Последните проучвания в областта на кардиологията показват, че фолиевата киселина може да намали риска от коронарна болест при възрастни.

V. РАЗЛИЧНИ ВЪЗМОЖНОСТИ ЗА УВЕЛИЧАВАНЕ ПРИЕМА НА ФОЛИЕВА КИСЕЛИНА

Когато трябва да се увеличи дневния прием на фолиева киселина при бременните жени чрез промяна на хранителния им режим, трябва да се имат предвид няколко неща. Първо, много трудно може да се постигне адекватно ниво на фолиевата киселина в организма на жената чрез повишена консумация на природни фолати. Както вече бе споменато, бионаличността на природните фолати е ниска и са необходими много големи количества храна богата на фолати, за да се достигне до еквивалента на 0,4 мг фолиева киселина дневно.

Второ, основната таргет група от населението са жените в периконцептивния период, при които трябва да се поддържа адекватно ниво на фолиева киселина преди и след забременяване. Неправилно е усилията да се насочат само към жените, планиращи бременност, защото повече от половината бременности не са планирани. Затова препоръката за допълнителен прием на фолиева киселина трябва да е насочена към всички жени, които могат да забременеят.

Основните начини за постигане на адекватно ниво на фолиевата киселина в организма на жената са: 1) промяна на хранителния режим; 2) прием на фолиева киселина под форма на таблетки и 3) употреба на храни обогатени с фолиева киселина.

A. Промяна на хранителния режим.

Средното количество фолати в диетата на българската жена е около 0,15 мг дневно. Съществуват множество храни богати на фолиева киселина (портокали, спанак, броколи, листни растения, зърнени храни), но за да се достигне адекватното ниво, еквивалентно на 0,4 мг фолиева киселина дневно, жената трябва значително да увеличи консумацията на тези храни. Това рядко се случва, но дори и тогава серумните нива на фолиева киселина слабо се повишават, без да достигат желаните стойности. Все пак е препоръчително жената да бъде окуражавана да консумира богати на фолиева киселина храни за нормално протичане на бременността.

B. Фолиева киселина на таблетки.

Друга възможност да се осигури адекватно ниво на фолиевата киселина представляват

таблетните форми. На пръв поглед това изглежда по-лесен и приемлив начин за увеличаване серумните нива на фолиева киселина без съществена промяна в хранителните навици. Изследванията обаче показват, че само 30% от жените на възраст между 18 и 45 г. имат навика да пият ежедневно витамини. Някои бременни жени вземат пренатални витамини по съвет на техния лекар, но повечето не започват редовното приемане на витаминни препарати докато не забременеят. За предпазване от ДНТ това е вече твърде късно.

В САЩ се провеждат множество кампании, които се водят по всички медии, провеждат се образователни програми от лекуващите лекари, организират се програми и в училищата. В България до този момент не е проведена нито една кампания, затова жените в хетерогенна възраст могат да разчитат единствено на консултиращия ги лекар за информация по този въпрос.

C. Храни обогатени допълнително с фолиева киселина.

Обогатяването на храните е още един от начините за увеличаване нивото на фолати при жените. Главното предимство на този метод е, че така се обхваща широк кръг от населението, без да се изисква промяна в хранителния режим или навиците. В зависимост от хранителните предпочитания на населението могат да бъдат обогатени различни видове храни. През 1996 г. Комисията по Храни и Лекарства на САЩ (Foods and Drugs Administration) прие решение от 1998 г. в САЩ да започне обогатяване с фолиева киселина на брашното, царевичните храни, спагетите и ориза. Обогатяването на храните трябва да бъде 140 мг на 100 г. продукт. Института по Медицина на САЩ определи дозата от 1 000 мг като Допустима Горна Граница (максималната дневна доза, която не носи риск от поява на странични ефекти) за фолиевата киселина.

При тези норми на обогатяване на храната, в САЩ средостатистическата жена получава приблизително по 100 мг фолиева киселина дневно от обогатени храни. Макар и значителна, тази доза не е достатъчна за превенция на ДНТ. Затова комбинацията от тези три стратегии може да се окаже най-добрия начин да се обхване максимален брой от населението.

D. Оценка на получения ефект от профилактиката на ДНТ с фолиева киселина

Независимо от използваната стратегия, резултатите от нея трябва да се отчитат и да се оценява нейната ефикасност. Това може да става косвено, като се отчита информираността на населението.

Данни за информираността на жените в САЩ са получени след проведено проучване от агенция March of Dimes (MOD).

2002 MOD Въпроси	САЩ 2002	Флорида 2000-01
Чували са за фолиева киселина	80%	66%
Вземат фолиева киселина всеки ден	33%	51%
Знаят за превантивния ефект на фолиевата киселина срещу вродени малформации	20%	15%
Знаят, че трябва да вземат фолиева киселина преди забременяване	10%	17%
Научили са за фолиевата киселина от:		
Медии		
Печатни	46%	35%
Електронни	26%	16%
Лекар	25%	27%

Данните за България получени от телефона анкета проведена на 204 жени, от които 56 бременни, показват следното:

2003 Въпроси	Бременни	Небременни 18-45 г.
Чували са за фолиева киселина	82%	37%
Вземат фолиева киселина всеки ден	82%	16%
Знаят за превантивния ефект на фолиевата киселина срещу вродени малформации	28%	8%
Знаят, че трябва да вземат фолиева киселина преди забременяване	2%	0%
Научили са за фолиевата киселина от:		
Медии		
Печатни	46%	66%
Електронни	0%	0%
Лекар	54%	34%

Най-добрия начин за оценка на ефекта представлява проследяването на нивото на фолиева киселина в кръвта от една страна и от друга честотата на ДНТ в популацията. Нивото на фолатите би могло да бъде следено в серума, плазмата или урината [29]. Измерване на количеството им в еритроцитите дава най-добрата възможност по-дългосрочна прогноза. Концентрацията в серума от своя страна дава добра преценка за експозицията на концепсуса на фолати в най-критичния му период.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доказателствата сочат, че прилагането на синтетична фолиева киселина намалява честотата на ДНТ и може да намали честотата на други вродени дефекти. Съществуват няколко стратегии за повишаване на серумните нива на фолиева киселина при жените и съответно намаляване честотата на ДНТ. Изборът на стратегия зависи, както от популацията към която е насочена, така и от наличните ресурси.

VII БИБЛИОГРАФИЯ

- [1] KM Laurence. *Hydrocephalus and Malformations of the Central Nervous System*. In Jean W. Keeling (Ed). *Fetal and Neonatal Pathology*. Second edition. Springer-Verlag 1993, pp 541-570
- [2] Khoury MJ, Beaty TH, Cohen BH: *Genetic Epidemiology in Medicine and Public Health*, Chapter 10. Oxford University Press 1993, pp316-317
- [3] Milunsky A: *Maternal Serum Screening for Neural Tube Defects*. In *Genetic Disorders and the Fetus*, third edition. Johns Hopkins University Press 1992, pp507-511
- [4] Laurence KM: *Genetics and Prevention of Neural Tube Defects and Uncomplicated Hydrocephalus*. In: Emery AEH, Rimoin DI (eds) *Principles and Practice of Medical Genetics*, 2nd. Edition, Churchill Livingstone 1990, pp 323-346
- [5] Tolmie J: *Neural Tube Defects and other congenital Malformations of the Central Nervous System*. In: Emery AEH, Rimoin DI (Eds) *Principles and Practice of Medical Genetics*, 3rd. Edition, Churchill Livingstone 1997, pp 2151
- [6] Mulinare J, Cordero JF, Erickson JD, Berry RJ: *Periconceptional use of vitamins and the occurrence of neural tube defects*. *JAMA* 1988;260:3141-3145
- [7] Centers for Disease Control and Prevention: *Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects*. *MMWR*;1992:41 (no.RR-14):1-7
- [8] Centers for Disease Control and Prevention: *Use of folic acid for prevention of spina bifida and other neural tube defects*. *MMWR*;1991:40:513-516
- [9] Hibbard BM: *The role of folic acid in pregnancy with particular reference to anemia, abruption and abortion*. *J Obstet Gynecol Br Commonw* 1964;71:529
- [10] Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ: *Vitamin deficiencies and neural-tube defects*. *Arch Dis Child* 1976;51:944
- [11] Laurence KM: *The effect of early surgery for spina bifida cystica on survival and quality of life*. *Lancet* 1974 ; 1:301-304
- [12] Laurence KW: *prenatal detection and prevention of neural tube defects in South Wales*. *J Soc Health* 1986; 106:153-160
- [13] Lawrence KW: *The declining incidence of neural tube defects in the UK*. *Z Kinderchir* 1989;41:51
- [14] Lawrence KW, Tew BJ: *The natural history of spina bifida cystica and cranium bifidum cysticum: the central nervous system malformations in South Wales Part IV*. *Arch Dis Child* 1971;467:127-138
- [15] Milunsky A, Alpert E. *Results and benefits of maternal serum alpha-fetoprotein screening program*. *JAMA* 1984;252:1438.
- [16] Brock DJH, Bolton AE, Monaghan JM. *Prenatal diagnosis of anencephaly through maternal serum alpha-fetoprotein measurement*. *Lancet* 1973;2:923.
- [17] Holmes LB, Driscoll S, Atkins L: *Etiologic heterogeneity of neural tube defects*. *N Engl J Med* 1976;294:365-369
- [18] Khoury MJ, Erickson JD, James LM: *Etiologic heterogeneity of neural tube defects: Clues from epidemiology*. *Am J Epidemiol* 1982a;115:538-548.
- [19] 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.
- [20] Mills JL, Rhoads GG, Simpson JL, et al.: *The absence of relation between the periconceptional use of vitamins and neural-tube defects*. *N Eng J Med* 1989;321:430-435.
- [21] Milunsky A, Jick H, Jik SS, et al.: *Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects*. *JAMA* 1989;262:2847-2852.
- [22] Vergel RG, Sanchez LR, Heredero BL, et al.: *Primary prevention of neural tube defects with folic acid supplementation: Cuban experience*. *Prenat Diagn* 1990;10:1027-1031.
- [23] Werler, Shapiro S, Mitchell AA: *Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrence neural tube defects*. *JAMA* 1993;269:1257-1261.
- [24] Shaw GM, Schaffer D, Velie EM, et al.: *Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects in California*. *Epidemiology* 1995;6:219-226.

- [25] MRC Vitamin Study Research Group: Prevention of neural tube defects results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991;338:131-137.
- [26] Czeizel AE, Dudas I: Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Eng J Med* 1992;327:1832-1835.
- [27] Werler MM, Louik C, Shapiro S, Mitchell AA: Prepregnant weight in relation to risk of neural tube defects. *JAMA* 1996;275:1089-1092.
- [28] Cuskelly GJ, McNulty H, Scott JM: Effect of increasing dietary folate on red-cell folate: implications for prevention of neural tube defects. *Lancet* 1996;347:657-659.
- [29] Institute of Medicine: Dietary Reference Intakes for Thiamine, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin and Choline. National Academy Press, Washington, D.C., 1998; 8-26/36.
- [30] Food and Drug Administration: Food Standards: amendment of standards of identity for enriched grain products to require addition of folic acid. *Federal Register* 1996;8781-8797.
- [31] Centers for Disease Control and Prevention: Knowledge and use of folic acid by women of childbearing age – United States. *MMWR*;1997;46:721-23.
- [32] Congenital Malformations Worldwide: A report from The International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems . International Centre for Birth Defects, Italy. 1997.
- [33] Hook EB, Czeizel AE: can terathanasia explain the protective effect of folic acid supplements on birth defects? *Lancet* 1997;350:513-515.
- [34] Centers for Disease Control and Prevention: Use of folic acid-containing supplements among women of childbearing age-United States. *MMWR*;1998;47:131-134
- [35] National Birth Defect Prevention Network. Congenital Malformations Surveillance Report. *Teratology* 1997; 56(1/2):116 – 175
- [36] International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems (1991): "Congenital malformations Worldwide: A Report from the International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems." Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- [37] Olney R, Mulinare J. *Epidemiology of Neural Tube Defects*, in press
- [38] *Clinical Genetics Handbook* pg. 63
- [39] Elwood JM, Little J, Elwood JH (1992): "Epidemiology and Control of Neural Tube Defects." New York: Oxford University Press.
- [40] Centers for Disease Control and Prevention: Prevalence of spina bifida at birth – United States, 1983-1990: a comparison of two surveillance systems. *MMWR* 1998;45 (No. SS-2):15-26.
- [41] Baird PA. Neural tube defects in the Sikhs. *Am J Med Genet* 1983;16:49-56.
- [42] Elwood JH. Major central nervous system malformations notified in Northern Ireland 1964-1968. *Dev Med Child Neurol* 1972;14:731-9.
- [43] Isaza C, Martina D, Estupinan J, Starck C, Rey H: Prevalencia de malformaciones congenitas diagnosticadas en las primeras 24 horas. *Colombia Medica* vol 1989;20 (4)
- [44] Mckusick VA. *Mendelian Inheritance in Man* 11th Edition. Johns Hopkins Press, 1994.
- [45] Sever LE. Epidemiological aspects of neural tube defects. In: Crandall BF and Brazier MAB (eds): "Prevention of Neural Tube Defects." London: Academic Press, 1978, pp 75-89.
- [46] Bound JP, Harvey PW, Francis BJ, Awwad F, Gatrell AC. Involvement of deprivation and environmental lead in neural tube defects: a matched case-control study. *Arch Dis Child* 1997;76:107-112.
- [47] Lynberg MC, Khoury MJ, Lu X, Cocian T. Maternal flu, fever, and the risk of neural tube defects: a population-based case-control study. *Am J Epidem* 1994;140(3): 244-255.
- [48] Milunsky A, Ulcickas M, Rothman, et al. Maternal heat exposure and neural tube defects. *JAMA* 1992;268:882-5.
- [49] Blatter BM, Roeleveld N, Zielhuis GA, Mullaart RA, Gabreels FJM. Spina bifida and parental occupation. *Epidemiol* 1996; 7(2):188-193.
- [50] Shaw GM, Velie EM, Schaffer D. Risk of neural tube defect – affected pregnancies among obese women. *JAMA* 1996;275(14):1093-1096.
- [51] Medical Research Council Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet* 1991;338:131-137.
- [52] Wills L, Mehta MM. Studies in "pernicious anemia" of pregnancy. Part I. Preliminary report. *Ind J Med Res* 1930;17:777-792.
- [53] Herbert VD, Colamn N, Folic Acid and vitamin B12. In Shils ME, Young VR (eds): "Modern Nutrition in Health and Disease." 7th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p 388-416.

- [54] Locksmith GJ, Duff P. Preventing neural tube defects: The importance of periconceptional folic acid supplements. *Obstetr & Gynecol* 1998;91(6):1027-1034.
- [55] Shaw GM, Lammer EJ, Wasserman CR, O'Malley CD, Tolarova MM: Risks of orofacial clefts in children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. *Lancet* 1995;346:393-396.
- [56] Tolarova M, Harris J: Reduced recurrence of orofacial clefts after periconceptional supplementation with high-dose folic acid and multivitamins. *Teratology* 1995;51:71-18.
- [57] Hayes C, Werler MM, Willett WC, Mitchell AA: Case-control study of periconceptional folic acid supplementation and oral clefts. *Am J Epidemiol* 1996;143:1229-1234.
- [58] Yang Q, Khoury MJ, Olney RS, Mulinare J: Does periconceptional multivitamine use reduce the risk for limb deficiency in offspring? *Epidemiology* 1997;8:157-161.
- [59] Botto LD, Khoury MJ, Mulinare J, Ericson JD: Periconceptional multivitamin use and the occurrence conotruncal heart defects: results from a population based case-control study. *Pediatrics* 1996;98:911-917.
- [60] Li DK, Daling JR, Mueller BA, Hickok DE, Fantel AG, Weiss NS: Periconceptional multivitamin use in relation to the risk of congenital urinary tract anomalies. *Epidemiology* 1995;6:205-207.
- [61] Romano PS, Waitzman NJ, Scheffler RM, Pi RD. Folic acid fortification of grain: an economic analysis. *Am J Public Health* 1995;85:667-676.
- [62] Cragan JD, Roberts HE, Edmonds LD et al. Surveillance for anencephaly and spina bifida and the impact of prenatal diagnosis- united States, 1985-1994. *MMWR CDC Surveill Summ* 1995;44: No. SS-4.
- [63] Eassien FB, Wannenberg SL. Methionine but not folinic acid or vitamine B12 alters the frequency of neural tube defects in Axd mutant mice. *J Nutr* 1993;123:27-34.
- [64] Coelho CND, Klein NW: Methionine and neural tube closure in cultured rat embryos: Morphological and biochemical analyses. *Teratology* 1990;42:437-451.
- [65] Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: Effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:15227-32.
- [66] Kirke PN, Mills JL, Whitehead AS, Molloy A, Scout JM. Methylentetrahydrofolate reductase mutation and neural tube defects. *Lancet* 1996;348:1037-1038.
- [67] Kang SS, Wong PWK, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N: Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: An inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991;48:536-545.
- [68] Molloy AM, Daly S, Mills JL, Kirke PN, Whitehead AS, Ramsbottom D, et al.: Thermolabile variant of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase associated with low red-cell folates: Implications for folate intake recommendations. *Lancet* 1997;349:1591-1593.
- [69] Kang SS, Zhou J, Wonk PKW, Kowalisyn J, Strokosch G: Intermediate hyperhomocystinemia: Athermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet* 1988;43:414-421.
- [70] Whitehead AS, Gallagher P, Mills JL, Kirke PN, Burke H, Molloy AM, et al.: A genetic defect in 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. *Q J Med* 1995;88:763-766.
- [71] Van der Put NMJ, Steegers-Theunissen RPM, Frosst P, Trijbels FJM, Eskes TKAB, Van der Heuvel LP, et al.: Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. *Lancet* 1995;346:1070-1071.
- [72] Ou CY, Stevenson RE, Brown VK, Schwartz CE, Allen WP, Khoury MJ, et al.: 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet* 1996;63:610-614.
- [73] Toriello HV, Higgins JV: Occurrence of neural-tube defects among first-, second and third degree relatives of probands: Results of a United States study. *Am J Med Genet* 1983;15:601.
- [74] Smithells RW, Sheppard S, Schorah CJ, et al.: Possible prevention of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Lancet* 1980;1:339-40

За контакти:
"Сана-С" ЕООД, гр. София, Разсадника 30, по лиценз на Neopharm Ltd.
e-mail: neopharm@abv.bg