

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ LEKARSKI

Piotr Sawiec

**Badanie asocjacji genów zgodności tkankowej klasy II DRB1
oraz wybranych polimorfizmów w zakresie promotora genu dla TNF α
w stanach dysrafii ośrodkowego układu nerwowego u dzieci**

Praca doktorska

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

Pracę wykonano w Klinice Chorób Dzieci Katedry Pediatrii

Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. med. Jacek J. Pietrzyk

Kraków 2005

*Serdecznie dziękuję wszystkim, którzy okazali mi
pomoc w pisaniu pracy, a szczególnie pracownikom
Zakładu Genetyki Medycznej
Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie,
którzy czynnie pomogli mi w prowadzeniu badań.*

SPIS TREŚCI

1. Wprowadzenie	4
1.1. Genetyka i epidemiologia wad cewy nerwowej	7
1.2. Embriologia i molekularne podstawy neurulacji	10
1.3. Zwierzęce modele wad cewy nerwowej	19
1.4. Budowa i rola MHC	23
1.5. Budowa i rola TNF α w stanach fizjologicznych i patologicznych	26
2. Cel pracy	32
3. Metodologia:	33
3.1. Metody analizy molekularnej.	33
3.1.1. Polimorfizm G \rightarrow A w locus -238 promotora genu dla TNF α	33
3.1.2. Polimorfizm G \rightarrow A w locus -308 promotora genu dla TNF α	35
3.1.3. Geny zgodności tkankowej DRB1	37
3.2. Analiza statystyczna	38
4. Wyniki	40
4.1. Charakterystyka badanych grup	40
4.2. Geny zgodności tkankowej DRB1	41
4.3. Polimorfizmy promotora genu dla TNF α	46
4.4. Haplotypy	52
4.5. Analiza odchylenia od równowagi na skutek sprzężenia dla par alleli.	63
5. Dyskusja	66
5.1. Równowaga Hardy'ego i Weinberga	68
5.2. Geny zgodności tkankowej DRB1	72
5.3. Polimorfizmy promotora genu dla TNF α	79
5.3.1. Polimorfizm G \rightarrow A w locus -308 promotora genu dla TNF α	79
5.3.2. Polimorfizm G \rightarrow A w locus -238 promotora genu dla TNF α	81
5.4. Haplotypy	84
6. Wnioski:	89
7. Streszczenie	91
8. Summary	94
9. Piśmiennictwo	97
10. Załączniki	110

1. Wprowadzenie

Jednym z naczelných elementów pracy lekarza pediatry jest zapobieganie chorobom. Stwierdzenie, że „lepiej zapobiegać, niż leczyć” powstało jeszcze w czasach starożytnych. Jego przesłanie jest wielokierunkowe. Dotyczy ono zarówno kwestii medycznych, gdyż zapobiegając chorobie nie narażamy pacjenta i jego rodziny na związane z nią skutki i cierpienia, jak i społeczno-ekonomicznych, jako że postępowanie takie jest zwykle znacznie tańsze i mniej obciążające społeczeństwo. Najskuteczniejszą i najlepiej ocenianą metodą profilaktyki jest profilaktyka pierwotna, której zadaniem jest zapobieganie wystąpieniu choroby. Rozwój profilaktyki niektórych chorób stanowi jeden z największych postępów medycyny. Szczególnie dotyczy to chorób zakaźnych i szczepień przeciwko nim. Istnieje jednak wiele grup chorób, co do których nie dysponujemy odpowiednimi metodami profilaktyki pierwotnej. Jedną z takich ogromnych grup stanowią choroby wrodzone. Wydaje się, że główną tego przyczyną jest brak jednoznacznie zdefiniowanej etiologii takich chorób. W stosunku do licznych zaburzeń udało się zidentyfikować geny odpowiedzialne za ich wystąpienie. W stosunku do innych, do których należą także stany dysrafii ośrodkowego układu nerwowego, próby identyfikacji czynnika etiologicznego dotychczas zawiodły.

Jedną z metod profilaktyki chorób dziedzicznych jest poradnictwo genetyczne. Zakłada ono sobie wiele celów - z punktu widzenia rodziców chorego dziecka najważniejsze to ustalenie leczenia choroby, która już wystąpiła oraz ocena ryzyka ponownego wystąpienia choroby u ewentualnego rodzeństwa, ponieważ może to rzutować na decyzje rodziców dotyczące poczęcia następnego dziecka. Udzielenie wiarygodnej porady genetycznej wymaga jak najlepszej wiedzy dotyczącej etiologii choroby. W stosunku do chorób monogenowych idealną sytuacją jest określenie diagnozy genotypowej, co pozwala określić sposób dziedziczenia choroby. Większe trudności sprawia określenie ryzyka wystąpienia chorób kompleksowych. Mianem tym określane są choroby, których dziedziczenie wymyka się podstawowemu prawom Mendla. Należą do nich między innymi choroby wielogenowe, czy szerzej pojęte choroby wieloczynnikowe. W stosunku do takich chorób próbuje się ustalić jak najwięcej czynników pozwalających przewidzieć wystąpienie choroby, także czynników dziedzicznych. Jednymi z takich czynników, które można było oznaczać jeszcze przed rozwojem genetyki molekularnej były grupa krwi oraz antygeny zgodności tkankowej. Niewątpliwie jedną z najmocniejszych asocjacji jest występowanie choroby wrzodowej żołądka u osób

z grupą krwi 0 oraz zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa u nosicieli antygeny HLA-B27 (1). O ile ta pierwsza została nieco zapomniana, o tyle obecność HLA-B27 wykorzystuje się powszechnie w diagnostyce zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa. We współczesnej genetyce klinicznej ustalanie asocjacji danej choroby z określoną mutacją lub polimorfizmem stanowi jeden z najważniejszych kierunków badań, gdyż może to pomóc w ustaleniu ryzyka wystąpienia takiej choroby u kolejnego potomstwa.

Wady cewy nerwowej należą do jednych z najcięższych wad wrodzonych. Stanowią olbrzymie obciążenie dla samych chorych, ponieważ powodują znacznego stopnia kalectwo zarówno fizyczne, związane z upośledzeniem funkcjonowania wielu narządów wewnętrznych oraz układu ruchu, jak i obciążenie psychiczne wynikające z pogorszenia kontaktów z rówieśnikami i otoczeniem czy przedłużonej zależności od rodziców. Jakość życia chorych dzieci zależy od różnych aspektów funkcjonowania zależnych od poziomu uszkodzenia, jak również od współistnienia wodogłowa, padaczki, porażenia mózgowego, czy też liczby zabiegów rewizji zastawki komorowo-otrzewnowej. Wodogłowie występuje u 80-85% dzieci z przepukliną oponowo-rdzeniową (2). Stwierdzono również, że pogorszenie jakości życia w bardzo dużym stopniu zależy od punktu widzenia i potrzeb rodziny, a także możliwości zapewnienia dziecku odpowiedniej opieki, na którą bezpośrednio składa się dostępność różnorodnych pomocy rehabilitacyjnych oraz odpowiednie wsparcie udzielane rodzinie (3). Z drugiej strony choroba stwarza niezwykle duże obciążenie ekonomiczne dla systemów ochrony zdrowia, gdyż chorzy narażeni są na liczne powikłania wymagające wielokrotnych zachowawczych i chirurgicznych interwencji lekarskich, które prowadzą do kolejnych problemów zdrowotnych, na przykład alergii na lateks. Wykrycie czynników ryzyka rozwoju wad cewy nerwowej umożliwiłoby opracowanie metod profilaktyki tych wad, a przede wszystkim byłoby niezwykle istotne dla celów poradnictwa genetycznego, pozwalaloby bowiem z większym prawdopodobieństwem określić ryzyko wystąpienia kolejnych przypadków wady w rodzinie probanta. Bardzo ważnym odkryciem jest możliwość zapobiegania wadom cewy nerwowej poprzez podawanie kwasu foliowego kobietom w okresie okołokoncepcyjnym. Badania nad tym zagadnieniem rozpoczęły się w 1976 roku, gdy opisano zmniejszone stężenie różnych mikroelementów i witamin u kobiet w ciąży, które urodziły dziecko z wadą cewy nerwowej (4). Podstawowym czynnikiem odpowiedzialnym za to zjawisko był niedobór kwasu foliowego. Dzięki dalszym badaniom, w 1992 wydano oficjalne zalecenie, aby kobiety planujące zajść w ciążę

przyjmowały tę witaminę (5), a wiele krajów wręcz wprowadziło wzbogacanie mąki w kwas foliowy, aby zapewnić profilaktykę wszystkim potencjalnym matkom, co doprowadziło do znacznej redukcji częstości dysrafii u noworodków (6). Ostatnio pojawia się również możliwość leczenia wad cewy nerwowej u płodu, czego następstwem może być przede wszystkim zmniejszenie odsetka wodogłowia, gdy uda się zapobiec lub cofnąć malformację Chiariego typu II typową dla wad cewy nerwowej (2), szczególnie wobec doniesień, że ekspozycja tkanki płytki nerwowej na płyn owodniowy w dużym stopniu przyczynia się do nasilenia uszkodzeń neurologicznych.

1.1. Genetyka i epidemiologia wad cewy nerwowej

Według aktualnych poglądów, wady cewy nerwowej należą do chorób o etiologii wieloczynnikowej, do których należą także inne zaburzenia wrodzone: zwężenie odźwiernika, izolowany rozszczep podniebienia, stopa końsko-szpotawa, niektóre wady wrodzone serca, a także choroby występujące w późniejszym okresie życia jak: nadciśnienie, cukrzyca, choroba niedokrwienna serca czy nowotwory (7). W przeciwieństwie do chorób monogenowych nie da się łatwo przewidzieć ryzyka wystąpienia zaburzenia u kolejnego członka rodziny. Uważa się, że pojawienie się choroby wynika ze skumulowania się czynników genetycznych oraz środowiskowych powyżej pewnej wartości progowej (próg podatności). W stosunku do chorób wieloczynnikowych, ryzyko ponownego wystąpienia zaburzenia w rodzinie, swoiste dla każdej choroby wieloczynnikowej, ustala się w sposób empiryczny na podstawie obserwacji członków rodziny. Aby chorobę można było uznać jako wieloczynnikową musi ona spełniać kilka kryteriów (7):

- Ryzyko ponownego wystąpienia choroby jest większe, jeżeli wystąpiła ona już u więcej niż jednego członka rodziny.
- Ryzyko ponownego wystąpienia choroby jest tym większe, im cięższa jej postać wystąpiła u probanta.
- Ryzyko ponownego wystąpienia choroby jest większe, jeżeli probant należy do płci, u której choroba występuje rzadziej (typowym przykładem jest zwężenie odźwiernika).
- Ryzyko ponownego wystąpienia choroby jest większe, jeżeli wystąpiła ona wcześniej u krewnych z bliższym stopniem pokrewieństwa.
- Ryzyko ponownego wystąpienia choroby u rodzeństwa lub potomstwa probanta wynosi około \sqrt{f} , gdzie f to częstość występowania choroby w populacji.

Chorobę wieloczynnikową, w przeciwieństwie do monogenowej, charakteryzuje także różna częstość jej występowania u bliźniąt monozygotycznych. Wskaźnik konkordancji (zgodności) określa u jakiego odsetka bliźniąt rozwinie się choroba występująca u drugiego bliźniaka.

Dla cech determinowanych wieloczynnikowo można mówić o zmienności fenotypowej. Zależna jest ona od trzech składników: zmienności środowiskowej, zmienności genetycznej oraz interakcji geny-środowisko. Odsetek zmienności fenotypowej

przypisywany czynnikom genetycznym nosi nazwę odziedziczalności. Czynniki genetyczne mogą mieć natomiast charakter addytywny, dominujący lub epistatyczny (określający interakcję pomiędzy różnymi genami na poziomie DNA, RNA lub białek).

Stany dysrafii ośrodkowego układu nerwowego spełniają większość kryteriów choroby wieloczynnikowej. Istnieją jednak opinie dzielące je na dwie grupy, tak zwane „niezespołowe” wady cewy nerwowej (*nonsyndromic neural tube defects*), czyli takie, które nie stanowią części obrazu jakiegoś szerszego zespołu wad rozwojowych oraz wady „zespołowe”. Właśnie te pierwsze mają charakteryzować się dziedziczeniem wieloczynnikowym, podczas gdy druga grupa może być uwarunkowana mutacją chromosomową jednego genu (8) lub wręcz dużymi defektami cytogenetycznymi (9). Dość dobrze poznano empiryczne ryzyko ponownego wystąpienia choroby oraz jej epidemiologię. Częstość zaburzenia wynosi w różnych populacjach od 0,5-3/1000 (7,10,11); w populacji południowej Polski w końcu lat 80. XX wieku wynosiła ona 0,92-0,94 na 1000 urodzeń (12). Szczególnie duża częstość dotyczy Irlandii, południowej Walii i części Indii i Chin oraz populacji pochodzenia celtyckiego, natomiast znacznie rzadziej występuje ono u rasy czarnej. Znacznie częściej niż z otwartą dysrafią mamy do czynienia z utajonym rozszczepem kręgosłupa, który może występować u około 10% ludzi, przy czym u większości nie daje objawów (13).

Według danych pochodzących z Wielkiej Brytanii (która wraz z Irlandią należą do państw o największej zapadalności sięgającej nawet 7 na 1000 (14), ryzyko wystąpienia wady cewy nerwowej u rodzeństwa dzieci z dysrafią wynosi około 5%, podczas gdy w USA jest o około 2-3% mniejsze, przy czym wystąpienie dysrafii w jednej lokalizacji zwiększa ryzyko wystąpienia wady w innych lokalizacjach. Dane węgierskie wskazują, że ryzyko wystąpienia wady cewy nerwowej zwiększa się do 3%, 12% i 25% odpowiednio, jeżeli wada wystąpiła wcześniej u jednego, dwojga lub trojga rodzeństwa (7). W obszarach o większej częstotliwości występowania dysrafii stwierdza się także większe ryzyko ich wystąpienia u rodzeństwa (10). W populacji Polski południowej stwierdzono, że względne ryzyko ponownego wystąpienia wady w rodzinie posiadającej jedno potomstwo z wadą cewy nerwowej wynosiło 37,5. Ryzyko ponownego wystąpienia przepukliny oponowo-rdzeniowej wynosiło $4,0\% \pm 2,8$ gdy probant był płci męskiej i $2,0\% \pm 2,3$ – gdy płci żeńskiej. Co ciekawe, powtórne wystąpienie przepukliny mózgowej obserwowano wyłącznie wśród rodzeństwa probantów płci żeńskiej (15). Wskaźnik zgodności wynosi dla przepukliny oponowo-rdzeniowej 0,72 dla bliźniąt monozygotycznych i 0,33 dla dizygotycznych. Pozwala to na oszacowanie wskaźnika odziedziczalności, określającego

odsetkowy udział czynników genetycznych w zmienności fenotypowej choroby, który dla przepukliny oponowo-rdzeniowej wynosi 0,78 (7). Z kolei inne badania wskazują, że zwiększone ryzyko wystąpienia dysrafii u kolejnego dziecka występuje jedynie, jeżeli u pierwszego dziecka wystąpiła wysoka wada (powyżej Th₁₂), natomiast przy wadach zlokalizowanych niżej, ryzyko wystąpienia wady u rodzeństwa jest takie samo jak w populacji ogólnej. Gdy oddzielnie rozpatrzono grupy pacjentów z bezmózgowiem i rozszczepem kręgosłupa, również nie stwierdzono istotnie częstszego występowania kolejnych przypadków w rodzinie (16). Dysrafie ośrodkowego układu nerwowego około dwukrotnie częściej występują u płodów płci żeńskiej, jednak ta przewaga znacznie się zmniejsza, jeżeli bierze się pod uwagę żywo urodzone noworodki (10). Czynnikiem ryzyka wystąpienia przepukliny oponowo-rdzeniowej jest również bliskie pokrewieństwo rodziców dziecka (17).

Ryzyko wystąpienia wady cewy nerwowej może być modyfikowane przez popularne czynniki środowiskowe. Powszechnie znany jest profilaktyczny wpływ folianów podawanych w małych dawkach okołokoncepcyjnie. Stwierdzono również, że otyłość u matki jeszcze przed ciążą może zwiększyć ryzyko wystąpienia wady nawet ponad dwukrotnie (18). Mniej znana jest zależność pomiędzy narażeniem matki na azotany i występowaniem dysrafii. Wykazano jednak, że przy dużym stężeniu azotanów w wodzie pitnej ryzyko wystąpienia bezmózgowia może być prawie siedmiokrotnie większe, natomiast zależności takiej nie wykazano w odniesieniu do przepukliny oponowo-rdzeniowej (19).

Niedawno stwierdzono zmniejszone stężenie cynku i seleniu, a zwiększone miedzi i ołowiu u matek dzieci z wadą cewy nerwowej w porównaniu z grupą kontrolną. Autorzy badania, świadomi jego ograniczeń, dokładają kolejną cegiełkę do teorii o wieloczynnikowej etiologii wad cewy nerwowej (20). Dysrafii sprzyja także ekspozycja matki na arsen oraz niektóre leki (kwas walproinowy i karbamazepina, pochodne kumaryny). Nie stwierdzono natomiast różnicy pod względem miejsca zamieszkania (miasto lub wieś) (21). W przeprowadzonym ostatnio przeglądzie systematycznym wykazano, że gorączka we wczesnej ciąży prawie dwukrotnie zwiększa ryzyko rozwoju wady cewy nerwowej (22), a zaburzenia neurulacji w doświadczeniach na zwierzętach z hipertermią wykazano już znacznie wcześniej.

Na etiologię wielogenową wskazują również nieprawidłowości kariotypu stwierdzane u kilkunastu procent płodów z przepukliną oponowo-rdzeniową (23).

Różnorodność tych nieprawidłowości, w tym trisomie lub monosomie różnych chromosomów świadczą o etiologicznej heterogenności dysrafii.

1.2. Embriologia i molekularne podstawy neurulacji

Proces neurulacji u ludzkiego zarodka jest rozciągnięty w czasie. Na poziomie tkankowym obejmuje cztery stadia: tworzenie płytki nerwowej, kształtowanie płytki nerwowej, fałdowanie płytki nerwowej i zamknięcie wytworzonego rowka. Płytkę nerwową tworzy się z najbardziej grzbietowo położonej tkanki ektodermalnej. Około 17-18. dnia po zapłodnieniu tworzą się fałdy nerwowe, które unoszą się a następnie zbliżają ku sobie. Około 22. dnia dochodzi do zetknięcia się fałdów w miejscu pierwszego zamknięcia cewy, które zlokalizowane jest w miejscu tworzącym w przyszłości granicę pomiędzy częścią szyjną i potyliczną (13). Zamykanie cewy nerwowej ma miejsce w obu kierunkach od strefy zamknięcia. Istnieje aktualnie wiele hipotez dotyczących liczby miejsc zamykania cewy nerwowej. Model klasyczny oparty na zarodku ptasim zakłada ciągłość procesu na zasadzie „zamka błyskawicznego”. Z kolei u myszy najbardziej prawdopodobny model to 5 miejsc zamykania się cewy nerwowej (24). U człowieka nie ustalono jednoznacznie w ilu miejscach dochodzi do zamykania się cewy nerwowej. Wielu badaczy uważa, że model pięciomiejscowy najlepiej opisuje zakres oraz częstość wad cewy nerwowej w poszczególnych lokalizacjach, jednak ostatnio coraz więcej dowodów przemawia za tym, że proces ten odbywa się w dwóch lokalizacjach. Pierwsza z nich (punkt α) mieści się w obszarze tyłomózgowia, druga (punkt β) w obszarze przodomózgowia. Od punktu α zamykanie cewy nerwowej postępuje w kierunku doogonowym w sposób ciągły (25). Proces zwany pierwotną neurulacją kończy się około 26-28 dnia po zapłodnieniu zamknięciem tylnego otworu nerwowego zlokalizowanego w dogłowej części odcinka krzyżowego. Tworzenie się cewy nerwowej w odcinkach zlokalizowanych bardziej ogonowo następuje w procesie wtórnej neurulacji, polegającej na tworzeniu kanału w obrębie litego skupiska komórek. Uważa się, że proces wtórnej neurulacji jest podobny u zwierząt o różnym stopniu zaawansowania filogenetycznego (ptaków, ssaków, w tym u ludzi) (26).

Rozwój cewy nerwowej jest procesem bardzo skomplikowanym. Chociaż dość dobrze poznano jego fazy pod względem embriologicznym, nadal nie poznaliśmy mechanizmu regulacji indukcji i dalszego rozwoju cewy nerwowej. Można założyć, że do procesu tego niezbędnych jest kilka molekularnych składników:

- określenie przeznaczenia komórek na poziomie genetycznym
- ekspresja ligandów i receptorów w błonie komórkowej i interakcje między nimi
- reakcje komórek: przekaźnictwo sygnałów prowadzące do zmian biochemicznych, zmian transkrypcji genów, ruchy komórek, przyleganie i aktywność mitotyczna.

U wyższych kręgowców nie udało się jednoznacznie ustalić genów determinujących przeznaczenie komórek tworzących OUN, natomiast rolę tę u płazów spełnia prawdopodobnie kompleks genów ASH (*achaete-scute homologue*) homologiczny do kompleksu AS-C (*achaete-scute*) odkrytego u *Drosophila* (27). Podobne homologiczne geny odkryto także u ssaków, w tym u najlepiej przebadanej myszy; jednym z nich jest MASH1 (*mammalian achaete-scute homologue 1*) (28). Produktami tego kompleksu są czynniki transkrypcyjne z rodziny bHLH (*basic helix-loop-helix*) (np. *Cash1*, *Cath1*, neurogenina 1 i 2), które oddziałując poprzez kolejne czynniki, na przykład kompleks E(Spl) (*enhancer of split complex*) kierunkują rozwój komórek w kierunku układu nerwowego. Jest bardzo prawdopodobne, że różnicowanie się pluripotencjalnych komórek prekursorowych do linii neuralnej zależne jest w dużym stopniu od oddziaływania czynników zawartych w macierzy zewnątrzkomórkowej. Proces taki udało się przeprowadzić *in vitro* inkubując takie komórki w medium zawierającym jeden ze zidentyfikowanych składników macierzy zewnątrzkomórkowej (29).

Istnieją także mechanizmy odpowiadające za hamowanie różnicowania się komórek w struktury nerwowe. Komórka predestynowana do rozwoju w kierunku układu nerwowego ekspozuje na swojej powierzchni ligandy Delta, które wiążą się z białkami receptorowymi Notch. Szlak przekaźnikowy Notch prowadzi do aktywacji białek hamujących transkrypcję kodowanych przez E(spl)-C, a te z kolei bezpośrednio hamują ekspresję genów proneuralnych. Szlak ten najlepiej przebadany u *Drosophila* posiada swoje odpowiedniki u wyższych kręgowców (28). Istnieją również hipotezy zakładające, że rozwój cewy nerwowej zależy od zahamowania różnicowania się komórek epidermalnych, a nie od indukcji (30).

Dalsze procesy prowadzą do ekspresji wielu genów, która to ekspresja ma charakter segmentarny, tzn. w różnych częściach zarodka ekspresji ulegają różne geny. Podobne rozróżnienie dotyczy także grzbietowej i brzusznej części powstającej płytki nerwowej, a w przyszłości także samej cewy nerwowej (np. geny SHH czy rodziny *Pax*). Uważa się, że SHH (*Sonic hedgehog*) stymuluje różnicowanie się komórek w kierunku typu występującego po brzusznej stronie rdzenia kręgowego, natomiast *Pax3* i *Pax7* w kierunku

typu występującego po grzbietowej stronie rdzenia kręgowego (31). Częsteczka SHH produkowana jest w trakcie rozwoju embrionalnego przez komórki linii środkowej (strunę grzbietową i komórki pod płytka nerwową). W doświadczeniach na zwierzętach wykazano, że jej rola polega na hamowaniu apoptozy w obrębie tworzącej się cewy nerwowej (32). Iniekcja przeciwciał przeciw *Shh* prowadziła do śmierci licznych komórek w obrębie cewy nerwowej, podobny efekt obserwowano w mutacjach eliminujących działanie *Shh*. Inna prawdopodobnie istotna w rozwoju cewy nerwowej, cząsteczka *Patched* (*Ptc*), bierze udział w szlaku przekąźnikowym *Shh*.

Ważnym elementem jest także ekspresja poszczególnych białek z rodziny bHLH. *Cash1* ulega ekspresji głównie w grzbietowej części cewy nerwowej, a ekspresja ta jest hamowana przez BMP (31). Neurogenina 1 (*Ngn1*) i 2 (*Ngn2*) ulega ekspresji głównie w komórkach w brzusznej części cewy nerwowej oraz w pasmowatej strefie komórek w części grzbietowej. Ekspresja *Ngn1* jest regulowana przez białka morfogenetyczne kości (*bone morphogenetic protein* – BMP), które w małych stężeniach stymulują, a w dużych hamują ekspresję *Ngn1*. Za zróżnicowanie brzuszno-grzbietowe odpowiada najprawdopodobniej sama struna grzbietowa, gdyż po jej usunięciu na etapie płytki nerwowej w strukturach położonych brzusznie nie dochodziło do ekspresji markerów brzusznych, natomiast wszczepienie dodatkowej struny ektopowo prowadziło do ekspresji markerów brzusznych w sąsiadującej lokalizacji. Molekułą odpowiadającą za tę indukcję jest najprawdopodobniej *Shh* (33).

Markerem charakterystycznym dla komórek płytki nerwowej i występującym na nieodróżnionych komórkach neuralnych jest *Sox1*, *Sox2*, *Gbx2* oraz nestyna (*nestin*) (29). Ekspresja *Sox1* utrzymuje się przez cały okres tworzenia cewy nerwowej, natomiast *Gbx2* generalnie zanika utrzymując się jedynie w regionach tworzących śródmózgowie i tyłomózgowie (29).

W rozwijającej się cewie nerwowej wyróżnia się także charakterystyczny rozkład markerów w osi głowowo-ogonowej. *Hesx1* i *Nkx2.2* charakteryzują strefę tworzącą prawdopodobnie przodomózgowie, *HoxB1* i *Krox20* – poszczególne rombomery tyłomózgowia, *Hoxa7* – tylną ektodermę i okolice tułowia oraz *Shh* – brzuszną część cewy nerwowej. *En1*, *En2* i *Otx1* ulegają ekspresji w rozległym obszarze przedniej części cewy nerwowej w czasie jej zamykania oraz w niektórych częściach tworzących następnie śródmózgowie. *Mash1* pojawia się w *neuroepithelium* przodomózgowia, śródmózgowia i rdzenia kręgowego, *Emx2* – w strefie tworzącej przodomózgowie (ok. 8,5 doby od zapłodnienia). Uważa się, że ekspresja genów występujących w określonych segmentach

cewy nerwowej zależna jest od oddziaływania sąsiadujących tkanek takich jak struna grzbietowa, ektoderma i trzewna endoderma (29). Geny *Hox* (*Homeobox*) to filogenetycznie konserwatywna grupa genów biorących udział w rozwoju zarodka, a w szczególności w wyznaczaniu polaryzacji głowa-tułów. Występują w 4 klastrach, ułożone są obok siebie i ulegają liniowej ekspresji w zależności od położenia tkanki względem osi długiej zarodka. Geny *Hox* występują w układzie segmentarnym także w rozwijającej się cewie nerwowej; można wytyczyć granicę występowania poszczególnych genów, jednak obszary ich oddziaływania nakładają się ze sobą (34). Kodują one specyficzne białka o typie homeodomen, które posiadają zdolność wiązania się i oddziaływania z DNA. Ponieważ posiadają kilka miejsc promotorowych wrażliwych na różne czynniki transkrypcyjne, odpowiadają za tworzenie niezwykle szerokiej grupy struktur embrionalnych, w tym układu nerwowego. Mimo, że myszy z mutacjami genów *Hox* wykazują zaburzenia zamykania się cewy nerwowej, to nie udało się wykazać asocjacji ani sprzężenia markerów w sąsiedztwie genów HOX u człowieka z ryzykiem wady cewy nerwowej (test TDT) (35).

Jednym z istotnych mechanizmów indukcji neurulacji jest hamowanie sygnałów mediowanych przez BMP (36). Taki hamujący wpływ może wykazywać wiele cząsteczek, należących między innymi do nadrodziny TGF- β . BMP-2 i BMP-4, również należące do tej nadrodziny, promują różnicowanie się komórek do tkanki naskórka (27). Doświadczalnie wykazano natomiast, że każda manipulacja blokująca sygnały BMP prowadzi do neuralizacji ektodermy. Mechanizm takiej blokady może polegać na działaniu antagonistów BMP jak również na regulacji transkrypcji. Cząsteczkami wywołującymi takie działanie, zidentyfikowanymi u żab *Xenopus* są *noggin* (*noggin*), chordyna (*chordin*), follistatyna (*follistatin*), *xnr3* oraz *cerberus*, istnieją również cząsteczki analogiczne u ssaków. W odniesieniu do opisanego procesu wysunięto hipotezę, że cała ektoderma domyślnie posiada potencjał do rozwoju w kierunku neuroektodermy, lecz rozwój ten jest hamowany przez obecność swoistych inhibitorów. Zniesienie czynności tych inhibitorów prowadziłyby do neurulacji (33). Stwierdzono także, że mutacja genu jednej z tych cząsteczek nie zaburza wczesnego rozwoju układu nerwowego (36). Właściwość taka może odnosić się również do innych cząsteczek uczestniczących w rozwoju cewy nerwowej i jeszcze bardziej utrudniać prowadzenie badań identyfikujących te cząsteczki. Mutacje wyżej wymienionych cząstek mogą natomiast upośledzać późniejszą fazę rozwoju OUN, na przykład mutacja *noggin* i chordyna zaburza rozwój przodomózgowia (36). Innymi cząsteczkami ulegającymi ekspresji

w obrębie płytki nerwowej i blokującymi ekspresję BMP są między innymi *soxD*, *xiro*, *XBF2* i *geminin*. Szlak sygnałowy czynnika wzrostu fibroblastów (*fibroblast growth factor* – FGF) i *Wnt* prawdopodobnie również odgrywa rolę w rozwoju układu nerwowego; zablokowanie receptora FGF hamuje blokadę BMP i neurulację (36). FGF-4 produkowany między innymi przez organizator odpowiedzialny jest za orientację cewy nerwowej w osi głowa-tyłów. Powoduje on przykładowo ekspresję w komórkach markerów typowych dla doogonowych odcinków rozwijającego się układu nerwowego. FGF-8 z kolei jest jednym z czynników kierujących rozwojem struktur tworzących mózgowie (33). Mutacja genu *Axin* kodującego białko hamujące przekaźnictwo szlaku *Wnt* również prowadzi do zaburzeń rozwoju cewy nerwowej (37).

Ważną rolę w indukcji neurulacji u większości zwierząt, w tym niektórych niższych ssaków odgrywa tzw. organizator (*organizer*). U wielu gatunków posiada on swoistą nazwę (np. węzeł Hensena) i odpowiada on górnej wardze blastoporu. Właściwości swoje zachowuje on także po przeszczepieniu, kiedy to powoduje tworzenie się w przylegającej ektodermie wzorca charakterystycznego dla cewy nerwowej. Z drugiej jednak strony jego usunięcie nie hamuje tworzenia się płytki nerwowej (36). Czynnikiem transkrypcyjnym ulegającym ekspresji w organizatorach wszystkich kręgowców jest HNF3 β , uważany za marker najbardziej brzusznie położonej warstwy cewy nerwowej (*floor plate*). Jednak zahamowanie jego ekspresji, eliminujące czynność węzła (organizatora) nie hamuje indukcji cewy nerwowej (29). Węzeł jest również bogatym źródłem kwasu retinowego, który jak opisano poniżej odgrywa bardzo istotną rolę w rozwoju zarodka, w tym układu nerwowego. Rola kwasu retinowego polega najprawdopodobniej na aktywacji genów *Hox*.

Białka *Pax* charakteryzują się ciekawym rozmieszczeniem przestrzennym w obrębie cewy nerwowej. *Pax3* w trakcie prawidłowego rozwoju embrionalnego ulega ekspresji w grzbietowej części cewy nerwowej (32). Podobna prawidłowość dotyczy *Pax7*, którego ekspresja stymulowana jest oddziaływaniem BMP, natomiast hamowana poprzez działanie SSH (31). *Pax6* po raz pierwszy można wykryć dopiero bezpośrednio po zamknięciu się cewy nerwowej. Ulega ekspresji głównie w częściach pośrednich cewy nerwowej (stymulowanej przez małe stężenie SHH); nie występuje w sklepieniu cewy natomiast w brzusznej części ekspresja jest słaba głównie na skutek jej hamowania przez duże stężenie SHH (31). Ciekawy jest tutaj wpływ szlaku sygnałowego BMP na stężenie *Pax6*. BMP zmniejsza ekspresję tego białka w grzbietowych częściach cewy nerwowej, natomiast zwiększa w brzusznej części cewy, co może prowadzić do zaburzenia tworzenia motoneuronów (wymagających małego stężenia *Pax6*) (31).

Kolejną grupą genów ulegających ekspresji w obrębie zamykającej się cewy nerwowej są geny *Msx*. Obejmuje ona 3 geny, natomiast wzór ich ekspresji nieco różni się u zarodka myszy i kury, aczkolwiek w obu przypadkach ulegają one ekspresji w grzbietowej oraz pośredniej części cewy nerwowej. Niewątpliwie geny te podlegają działaniu BMP, które stymulują ich ekspresję. (31).

Białka *Dbx* odpowiedzialne są za tworzenie niektórych grup neuronów wstawkowych. Ich ekspresja ulega aktywacji pod wpływem kwasu retinowego i SHH, natomiast jest hamowana przez BMP, prawdopodobnie poprzez pośrednictwo *Msx1* (31).

Programowana śmierć komórek bierze udział w morfogenezie *neuroepithelium*. W badaniach doświadczalnych apoptozę obserwowano głównie w dwóch miejscach: po grzbietowej stronie w obrębie łączących się fałdów nerwowych i po stronie brzusznej w bocznych częściach płytki nerwowej. Nadmierna ekspresja genów antyapoptotycznych i zablokowanie genów proapoptotycznych zwiększały liczbę pewnych populacji komórek nerwowych, w niektórych przypadkach (zablokowanie *Casp3*, *Casp9* i *Apaf1*) prowadząc do ciężkich wad wrodzonych ośrodkowego układu nerwowego (32). *Apaf1* jest pierwszym czynnikiem biorącym udział w apoptozie wywołanej uwalnianiem z mitochondriów cytochromu c. Wywołuje kaskadę aktywacji kaspazy 9 i 3 prowadząc do śmierci komórek. Ponieważ jest to podstawowy szlak apoptozy komórek progenitorowych układu nerwowego, unieczynnienie któregoś z tych białek prowadzi do nadmiaru tych komórek powodując prawdopodobnie trudności w zamykaniu się cewy nerwowej. Jednym z mysich modeli wad cewy nerwowej jest fenotyp *fog*. Wykazano niedawno, że odpowiadająca za niego mutacja zlokalizowana jest najprawdopodobniej w genie *Apaf1*, a z całą pewnością zaburza powstawanie cząsteczki *Apaf1* (38). Innym czynnikiem działającym proapoptotycznie jest BMP4 produkowana przez grzbietową ektodermę i mezodermę boczną, a jego działanie może być blokowane przez nogginę (32). Po zamknięciu się cewy nerwowej, białka z rodziny BMP, szczególnie BMP4 i BMP7 mogą być z drugiej strony odpowiedzialne za indukcję ekspresji markerów grzbietowej części cewy nerwowej (33).

Oddzielenie po jednej stronie przysiosowej mezodermy od rozwijającej się cewy nerwowej prowadziło do nasilonej apoptozy po tej stronie, co wskazuje na znaczenie tych komórek w rozwoju OUN (32). Może to mieć związek z brakiem stymulacji rozwoju neuronów pod nieobecność struktur w przyszłości unerwianych przez te komórki (mięśni).

Kolejnym ważnym dowodem na udział apoptozy w zamykaniu się cewy nerwowej są liczne wady cewy nerwowej w obrębie tyłomózgowia u myszy z mutacją *bcl10*, białka bardzo istotnego w regulacji apoptozy (39). U tych myszy stwierdzono bardzo nasiloną

apoptozę w obrębie *neuroepithelium* okolicy dysrafii. Niedawno opublikowano informację, że mutacja genu MEKK4 (*MAP kinase kinase kinase 4*) prowadzi do wad cewy nerwowej u myszy. Kodowane przez ten gen białko bierze udział w regulacji aktywności kinaz MAPK, a przy braku ekspresji MEKK4 dochodzi do nasilonej apoptozy w obrębie tworzącej się cewy nerwowej (40). Jak widać zatem, do dysrafii może prowadzić zarówno nadmierna apoptoza jak i jej zahamowanie.

Tworzenie się struktur układu nerwowego wymaga oddziaływań międzykomórkowych. Biorą w nich udział różnorodne molekuly adhezyjne. Początkowo jest to E-kadheryna, która następnie ustępuje miejsca N-kadherynie uczestniczącej w zamykaniu się cewy nerwowej. Kolejną molekułą adhezyjną w rozwijającym się układzie nerwowym jest NCAM (27,29). Ulega ona ekspresji w ściśle określonym okresie neurulacji i podlega regulacji *Hox3.1* i *Pax3* (25). U żab *Xenopus*, w zarodkach ptasich oraz być może u wyższych kręgowców istotną rolę pełnią także receptory z rodziny integryn, wiążące się z ligandami z rodziny laminin. Ulegają one ekspresji w trakcie neurulacji początkowo w szerokim obszarze rozwijającej się neuroektodermy, a następnie w dogłowej części cewy nerwowej i w strunie grzbietowej. Jej obecność wykazano także w innych strukturach, w których rozwoju dochodzi do migracji komórek w obrębie układu nerwowego i moczowego. Podanie nukleotydów antysensownych blokujących gen integryny w dużym odsetku hamuje neurulację, a w znacznej większości zarodków powoduje różne wady rozwojowe. Zaburzenie ekspresji integryny prowadzi do upośledzonego przylegania komórek neuroektodermy do bogatej w lamininę błony podstawnej (41).

Formowanie cewy nerwowej wymaga ruchu komórek, zarówno biernego, pod wpływem przemieszczających się komórek sąsiednich, jak i czynnego w następstwie pracy białek cytoszkieletu. Zmiana kształtu komórek zachodzi dzięki białkom cytoszkieletu takim jak aktyna, miozyna (42) i wimentyna (27). Bardzo istotne są także połączenia pomiędzy komórkami nabłonkowymi płytki nerwowej (42). Kolejnym elementem niezbędnym do zmiany kształtu komórki są białka tworzące krzyżowe wiązania z aktyną, na przykład MARCKS (*Myristoylated Alanine-Rich C Kinase Substrate*) i MacMARCKS. U ptasich zarodków wykazano, że w trakcie tworzenia się fałdów i zamykania się cewy nerwowej, w wierzchołkowej strefie komórek nabłonka płytki nerwowej dochodzi do kumulacji zarówno aktyny jak i MARCKS. Unieczynnienie tego białka prowadzi jednak do dysrafii jedynie w 25% przypadków, natomiast u 100% zarodków unieczynnienie MacMARCKS prowadzi do bezmózgowia. Okazuje się również, że wyłączenie czynności

(*knock-out*) genu aktyny prowadzi do zaburzeń zamykania się cewy nerwowej w części głowowej nie wpływając natomiast na odcinek w obrębie tułowia (42). Podkreśla to dodatkowo odmiennosc mechanizmów powstawania dysrafii w różnych jej odcinkach. Wady cewy nerwowej występują także u myszy pozbawionych aktywności syntazy skwalenowej biorącej udział w syntezie cholesterolu, który wchodzi przecież w skład błon komórkowych. Brak cholesterolu może zaburzać interakcje pomiędzy błonami i białkami błonowymi (42). Funkcjonowanie elementów cytoszkieletu zależy od wpływów środowiskowych. Wykazano, że inkubacja zarodków w środowisku pozbawionym metioniny prowadzi do dysrafii oraz zaburzeń tworzenia się oczu. W przypadkach tych zaobserwowano niedostateczną metylację niektórych elementów cytoszkieletu, w tym aktyny oraz zaburzony rozkład tych białek w komórce (42).

Ostatnio sugeruje się, że za część przypadków wad cewy nerwowej mogą odpowiadać zaburzenia oddziaływania parakrynnego pomiędzy komórkami, doprowadzające do zaburzenia indukcji niezbędnej do różnicowania się tkanek. Zamykanie cewy nerwowej niewątpliwie wymaga przemieszczania się komórek, zatem zmiany mogą także dotyczyć elementów macierzy międzykomórkowej oraz białek odpowiedzialnych za przyleganie komórek do tych elementów. Komórki zdolne są zmieniać swój kształt i położenie dzięki elementom cytoszkieletu. Niezbędna jest dodatkowo obecność czynnika stymulującego migrację i kierującego jej tor. Uważa się, że bardzo istotną rolę odgrywają tu elementy międzykomórkowe, aczkolwiek szlak migracji może być wytyczany także przez inne przylegające komórki (43). Jednym z podstawowych mediatorów kontaktów międzykomórkowych jest czynnik martwicy guza alfa (*tumor necrosis factor α - TNF α*).

Kerszberg i Changeux stworzyli interesujący komputerowy model tworzenia się cewy nerwowej. Przedstawili hipotetyczny proces uwzględniający różne elementy morfogenezy na poziomie genetycznym, molekularnym i cytologicznym. Prawidłowe zamknięcie się cewy nerwowej wymaga dopasowania wielu procesów: zmiany rozmiarów i kształtów komórek, podziałów komórkowych. Mutacja genów odpowiadających za te procesy może zaburzać tworzenie się cewy nerwowej w różnych mechanizmach. Mutacja *Pax3* przykładowo wpływa na tempo podziałów mitotycznych, a mutacja null HES-1 [odpowiednik E(spl) u myszy] prowadzi do nadmiaru pierwotnej tkanki nerwowej. Na skutek niedopasowania do pozostałych składowych neurulacji, proces zamykania cewy nerwowej może w takich przypadkach ulegać zakłóceniu (27).

Podsumowując, aby doszło do powstania wady cewy nerwowej zaburzeniu musi ulec jeden z procesów biorących udział w tworzeniu cewy:

1. proliferacja komórek
2. zmiana kształtu rozwijającej się neuroektodermy
3. rozwój naczyń zaopatrujących tworzące się struktury nerwowe

Wady cewy nerwowej można podzielić na trzy duże grupy określające ciężkość oraz lokalizację wady. Mogą charakteryzować się także odmienną patogenezą z uwagi na różne pochodzenie embrionalne struktur odpowiedzialnych za powstanie wady.

Pierwszą dużą grupą są wady otwarte obejmujące: bezmózgowie (*anencephalia*), przepuklinę oponowo-rdzeniową (*myelomeningocele*) oraz *craniorhachischisis*. U ich podstawy leży zaburzenie samego procesu neurulacji – zamykania się cewy nerwowej. Wady te zlokalizowane są w jednym z 5 miejsc zamykania się cewy nerwowej, choć również modele zakładające mniejszą liczbę miejsc zamknięcia dobrze tłumaczą lokalizację wad.

Drugą grupę stanowią wady zamknięte o charakterze przepuklin obejmujące: przepuklinę mózgową (*encephalocoele*) oraz przepuklinę oponową (*meningocoele*). Uważa się, że za jej powstanie odpowiedzialne są defekty tworzenia kostnej osłony OUN. Struktury kostne mózgowosłuchowe tworzą się głównie z komórek grzebieni nerwowych, natomiast kręgosłupa – z grzbietowej części mezodermy okołosłuchowej.

Trzecia grupa to wady zamknięte obejmujące: utajony rozszczep kręgosłupa (*spina bifida occulta*), rozszczep rdzenia (*diastatomyelia*) oraz zakotwiczony rdzeń kręgowy (*tethered cord*). Za ich powstanie prawdopodobnie odpowiadają defekty wtórnej neurulacji (13).

Liczba genów, które ulegają ekspresji w trakcie neurulacji jest bardzo duża i potencjalnie ich mutacje mogą prowadzić do powstania wady. Należą do nich geny uczestniczące w proliferacji i apoptozie komórek, przyleganiu komórek, rozwoju naczyń, mitozie, regulacji czynności aktynej, metylacji *de novo*, indukcji płytki nerwowej lub określaniu przeznaczenia komórek.

Bardzo ciekawym odkryciem, które może rzucić zupełnie nowe światło na naszą wiedzę dotyczącą patogenezы wad cewy nerwowej oraz uzasadnić dalsze próby terapii prenatalnej jest zjawisko dalszego różnicowania się i dojrzewania tkanki płytki nerwowej pomimo obecności wady, co może świadczyć o tym, że ciężkie zaburzenia czynności

wynikają nie tylko z niezamknięcia się cewy nerwowej, ale również ze szkodliwego oddziaływania środowiska na eksponowaną tkankę (44).

1.3. Zwierzęce modele wad cewy nerwowej

Patogenezę wielu chorób udało się poznać dzięki badaniom odpowiadających im modeli zwierzęcych. Najlepiej poznano modele dysrafii u myszy. Opisano ich około 60, przy czym w większości przypadków rozwija się egzencefalia (odpowiednik bezmózgowia u człowieka) (25). Można je podzielić na kilka grup zależnie od zmutowanego genu. Do jednej można zaliczyć modele reagujące na suplementację pewnymi substancjami u matki (kwas foliowy, inozytol, metionina). Kolejne to mutacje polegające na inaktywacji genów uczestniczących w regulacji mitozy i czynności aktywności oraz genów odpowiadających za metylację *de novo*. Należą do nich czynniki transkrypcyjne, koaktywatory transkrypcji, receptory powierzchniowe komórki/błonowe, białka sygnałowe oraz uczestniczące w przekazywaniu sygnałów (45). Te ostatnie odpowiadają za większość modeli wad cewy nerwowej, w których udało się zidentyfikować odpowiedzialny gen (46). Jednak niewiele mysich modeli odpowiada izolowanym wadom cewy nerwowej u człowieka. Chodzi między innymi o to, że model taki musi charakteryzować się złożonym mechanizmem dziedziczenia, podobnie jak u człowieka. Modelami takimi są na przykład mutacje *SELH/Bc*, *Abl/Arg* i *Mena/Profilin1* (25). W tym miejscu należy jednak opisać najlepiej przebadane modele, których istota ważna jest dla założenia niniejszej pracy. Nie jest to oczywiście lista wyczerpująca.

Jednym z mysich modeli dysrafii ośrodkowego układu nerwowego jest *brachyury* (gen T). *Brachyury* ulega ekspresji na wczesnym etapie embriogenezy będąc markerem nowo tworzącej się mezodermy, natomiast generalnie nie stwierdza się go w obrębie komórek linii nerwowej (29). Istnieją przypuszczenia, że gen ten jest obiektem działania szlaku przekąźnikowego *Wnt* (26). Jest prawdopodobnie indukowany przez aktywinę A morfogenu oraz czynnik wzrostu fibroblastów (47). Zarodki homozygotyczne pod względem mutacji w obrębie genu T obumierają wewnątrzmacicznie, demonstrując poważne wady wrodzone w obrębie struktur wywodzących się z mezodermy. Myszy heterozygotyczne mają krótkie ogony, wady rozwojowe kręgosłupa, cewy nerwowej (głównie opóźnienie lub brak zamknięcia jej dystalnej części) i jelita w odcinku doogonowym oraz malformacje kręgow odcinka krzyżowego. *Brachyury* koduje białko wiążące się z DNA (charakteryzuje się swoistą domeną wiążącą DNA – *T-box*) pełniące

funkcję aktywatora transkrypcji (14). Badania sugerują, że białko T uczestniczy w kontroli migracji komórek mezodermalnych (26). Struktura genu T jest bardzo konserwatywna. Zidentyfikowano oraz sklonowano gen homologiczny do *brachyury* u licznych zwierząt, a także u człowieka (48). Stwierdzono, że jest on bardzo istotny dla rozwoju struktur mezodermalnych oraz różnicowania struktur struny grzbietowej (47). U człowieka zlokalizowany jest on w regionie 6q27, sąsiaduje zatem z kompleksem antygenów zgodności tkankowej (podobnie jak u myszy) (48). Ciekawe jest współdziałanie pewnych haplotypów kompleksu T u myszy (zawierającego geny MHC) oraz mutacji genu T, w wyniku której powstają różne fenotypowe warianty rozwoju okolicy ogonowej. Niewątpliwie liczba możliwych wariantów tego genu jest duża, natomiast szczegółowym badaniom poddano polimorfizm TIVS₇C (T/C) (w siódmym intronie genu), stwierdzając częstsze występowanie homozygot CC u dzieci z wadą cewy nerwowej (14). W obrębie domeny tego białka wiążącej DNA opisano kolejny wariant Asp177Gly wpływający na stabilność wiązania homodimeru T z DNA. Stwierdzono, że wariant C polimorfizmu częściej współistnieje z wariantem Gly177, jednak znaczenie tego faktu dla ryzyka rozwoju wady cewy nerwowej pozostaje niewyjaśnione. Uważa się wręcz, że mutacje w obrębie tego genu mogą odpowiadać jedynie za niewielki odsetek wszystkich takich wad (14), przede wszystkim wad występujących rodzinnie (48). Istnieją jednak sugestie, że efekt tej mutacji może podlegać modulacji środowiskowej (49). Ponieważ gen T położony jest bardzo blisko kompleksu MHC zarówno u myszy jak i u człowieka, wysunięto hipotezę, że geny zgodności tkankowej mogą mieć udział w rozwoju dysrafii. Badania nad asocjacją HLA z wadami cewy nerwowej przeprowadziło wielu badaczy, jednak nie udało się ustalić jednoznacznie takiej asocjacji.

Istotnym modelem wad cewy nerwowej jest myszy model *curly tail (ct)*. Jest on zależny od głównego genu zlokalizowanego na mysim chromosomie 4 oraz kilku genów modyfikujących na innych chromosomach (50), w tym na chromosomie 17 (51), na którym u myszy zlokalizowane są również geny MHC. U myszy homozygotycznych pod względem *ct* wada cewy nerwowej rozwija się w 54% przypadków na skutek opóźnienia zamknięcia się tylnego otworu nerwowego, zatem znaczna większość wad to dysrafia dystalnego odcinka (52). Model ten cechuje się także zależnością lokalizacji wady od płci. Mianowicie u płodów płci żeńskiej częściej obserwuje się egzencefalię, a u płodów płci męskiej – dysrafię dystalnej części (53). Wady cewy nerwowej u tych myszy cechują się dużą zależnością od czynników środowiskowych, w tym podawanych leków, hipertermii, ale można im w 50% zapobiec podając około 10 dni po zapłodnieniu kwas retinowy

w odpowiedniej dawce lub substancję witaminopodobną – mioinozytol. *Curly tail* jest natomiast modelem opornym na ochronne działanie kwasu foliowego. Paradoksalne jest, że podanie kwasu retinowego w dużych dawkach (zwłaszcza wcześniej, np. około 8,5 dnia) prowokuje powstanie licznych wad wrodzonych, w tym dysrafii, choć zwykle ograniczonej do egzencefalii (53). Kwas retinowy wywiera swoje działanie przez swoiste receptory RAR. Istnieją 3 typy tych receptorów: α , β i γ . Wykazano, że RAR γ ulega ekspresji przed zamknięciem się tylnego otworu nerwowego i właściwie wyłącznie w doogonowej części zarodka, a zanika po zakończeniu neurulacji, natomiast RAR β ulega ekspresji w *neuroepitelium* dopiero po zamknięciu się cewy nerwowej, w bardziej dogłowych i położonych brzusznie regionach. Prawdopodobnie nie odgrywa roli w samej neurulacji, lecz bierze udział w dojrzewaniu neuroblastów na dalszym etapie rozwoju OUN (52). Zauważono, że u homozygot *ct/ct*, u których w dalszym rozwoju pojawia się dysrafia, dochodzi do przestrzennego i ilościowego zaburzenia ekspresji obu tych receptorów. Interesujące jest także, że u homozygot *ct/ct*, które w dalszym etapie rozwijają się prawidłowo, takich zaburzeń dystrybucji tych receptorów nie obserwuje się. Dodatkowo potwierdza to wieloczynnikową etiologię dysrafii, ponieważ pomimo mutacji jednego z modelowych genów, do wady dochodzi tylko w pewnej części przypadków. Stwierdzono, że podanie w odpowiednim czasie kwasu retinowego powoduje przywrócenie właściwej ekspresji opisanych receptorów, przyczyniając się prawdopodobnie do przywrócenia prawidłowego rozwoju cewy nerwowej (52). Zastanawiająca jest rola samego receptora, gdyż u mutantów pozbawionych RAR γ dochodzi jedynie do łagodnych defektów kręgów bez cech dysrafii. Co ciekawsze, mutanty te narażone na teratogenne dawki kwasu retinowego nie rozwijają dysrafii. Wskazuje to na jeszcze jeden patomechanizm zaburzeń neurulacji. Pomimo, że inaktywacja jednego z typów receptorów RAR nie powoduje ciężkiej wady wrodzonej, to zaburzenie dotyczące wszystkich typów RAR jednocześnie u jednego zarodka prowadzi do zespołu ciężkich wad wrodzonych, obejmującego m.in. rozległą wadę cewy nerwowej oraz zaburzenia kręgów. Konfiguracja taka przypomina zespół wad występujący w ciężkim niedoborze witaminy A (prekursora kwasu retinowego) u matki (13). Próby oceny wpływu spożycia mioinozytolu u człowieka na częstość wad cewy nerwowej nie przyniosły przekonujących dowodów. W badaniach retrospektywnych wysunięto podejrzenie, że spożycie mniejsze niż zalecane u kobiet w ciąży może wiązać się z niewielkim ryzykiem wystąpienia bezmózgowia (54), Groenen i wsp. wysunęli teorię, że zmniejszone stężenie mioinozytolu w surowicy matki

również może być czynnikiem ryzyka dysrafii (55). Kwas retinowy zaburza także szlak sygnałowy *Wnt3a* odpowiadający za różnicowanie się i migrację komórek mezodermy (26). Mutacja genu dla białka Cyp26a1 cytochromu 450 hamuje metabolizm kwasu retinowego prowadząc do jego kumulacji i wad wrodzonych, w tym wad cewy nerwowej (56). Van Straaten i wsp., autorzy ostatniego cytowanego artykułu, przedstawili inną teorię, według której mutacja wiąże się z nieprawidłowym osiowym wygięciem zarodka. Ustalili także, że mechaniczne wygięcie zarodka powoduje opóźnienie zamykania się otworu nerwowego (57).

Bent tail to z kolei model myszy zależny od genów zlokalizowanych na chromosomie X. Nie poznano dokładnie genu odpowiadającego za występowanie wad cewy nerwowej. Sugeruje się, że może to być gen kodujący *Zic3*, czynnik transkrypcyjny o budowie palców cynkowych. Czynnikiem ten jest jednym z pierwszych czynników uwalnianych w zarodkach po eliminacji blokady neurulacji powodowanej przez BMP4. Myszy obciążone tą mutacją charakteryzują się krótkim ogonem zagiętym charakterystycznie w jednym lub kilku miejscach, co spowodowane jest nieprawidłowym rozwojem kręgów. Ciekawy jest sposób dziedziczenia wady. Mianowicie ma on charakter dominujący, lecz z niepełną penetracją u osobników żeńskich. Homologiczna mutacja u człowieka genu *ZIC3* powoduje występowanie zespołu wad wrodzonych polegających przede wszystkim na zaburzeniu prawo-lewej symetrii, wśród których mogą również wystąpić wady cewy nerwowej okolicy lędźwiowo-krzyżowej (46). Również wśród ludzi opisano rodziny, w których wady cewy nerwowej dziedziczą się w sposób odpowiadający dziedziczeniu sprzężonemu z chromosomem X (58,59).

Bardzo ważnym i powszechnie znanym modelem mysim jest *Splotch* wywołany mutacją w obrębie genu *Pax3*. Cała klasa genów PAX koduje bardzo konserwatywne czynniki transkrypcyjne, bardzo ważne w rozwoju embrionalnym. Mutacji tej u człowieka odpowiada zespół Waardenburga typu 1, który nie zawiera w swoim obrazie klinicznym dysrafii. Poza sporadycznymi przypadkami, u człowieka nie wykazano, by mutacja któregośkolwiek z genów PAX wywoływała wadę cewy nerwowej (60). Model ten jest o tyle istotny, że podawanie kwasu foliowego zapobiega wadom cewy nerwowej u dużego odsetka myszy *Splotch*, natomiast defekt nasilany jest podawaniem metioniny (13).

Loop tail to szczep myszy charakteryzujący się mutacją w obrębie pierwszego chromosomu o półdominującym sposobie dziedziczenia. Heterozygotyczne myszy charakteryzują się charakterystycznie zapętłonym ogonem, natomiast u homozygot występują wady cewy nerwowej okolicy tyłomózgowia i sąsiadujących segmentów

kręgosłupa. Kibar i wsp. opisali białko Ltap, które pojawia się już na etapie indukcji neuroektodermy. Opisali również polimorfizmy występujące u myszy *Loop tail*. Przypuszcza się, że białko to tworzy kompleksy sygnałowe niezbędne do prawidłowej neurulacji (61). Do podobnych wniosków doszli niezależnie Murdoch i wsp. nazywając to białko Lpp1 (62). Białko to uczestniczy prawdopodobnie w polaryzacji komórek neuroepitelialnych (63).

Płytkopochodny czynnik wzrostowy (*platelet-derived growth factor* - PDGF) bierze udział w rozwoju i różnicowaniu ośrodkowego układu nerwowego (64). Opisano myszy model wady cewy nerwowej *Patch*, w którym dochodzi do mutacji receptora dla PDGF (PDGFRA) (65). Związany jest on również z genem *Pax1*, którego mutacje zaburzają aktywację promotora PDGFRA (66). Joosten i wsp. Zidentyfikowali w obrębie promotora genu dla PDGFRA kilka polimorfizmów, które ułożone w swoiste haplotypy wykazują asocjację z wadami cewy nerwowej u człowieka (66).

Kolejnym opisanym modelem mysim jest mutacja genu F52, białka będącego ligandem dla kinazy białkowej C (podobnie jak MARCKS), ulegającego bogatej ekspresji w obrębie neuroektodermy, a także w wielu innych narządach. Wady cewy nerwowej wystąpiły u 60% homozygot (większość to egzencefalia) i co ciekawe, nie towarzyszą im inne wady wrodzone. (67).

Mniej znany model dysrafii dotyczy mutantów myszy znanych jako *axial defects* (*Axd*). Model jest o tyle istotny, że również podlega wpływom środowiskowym, mianowicie podawanie metioniny zapobiega wystąpieniu wady cewy nerwowej (25).

Pomimo różnorodnych modeli u myszy, u których większość wad dotyczy części mózgowej, w większości przypadków nie udało się wykazać asocjacji analogicznych genów u człowieka z wadami cewy nerwowej (68).

1.4. Budowa i rola MHC

Historia badań nad głównym układem zgodności tkankowej (*Major Histocompatibility Complex* – MHC) sięga końca lat trzydziestych, kiedy Peter Gorer wysunął hipotezę dotyczącą przyczyny odrzucania przeszczepów u myszy. Zapoczątkowało to serię odkryć nad interakcjami międzykomórkowymi, w których pośredniczą MHC różnych klas. HLA (*Human Leukocyte Antigen*), czyli ludzki MHC opisano pod koniec lat 50. XX wieku (69). Izolacja białek antygenów i opisanie ich struktury to przełom lat 70. i 80. ubiegłego wieku. Koniec lat 80. przyniósł opis struktur

w obrębie antygenów zgodności tkankowej, które odpowiadały za wiązanie odpowiednich peptydów. (70).

W skład kompleksu MHC wchodzi 3 klasy genów: I, II, III. Klasa III obejmuje liczne geny m.in. HSP70, składników dopełniacza C4A, C4B, C2, czynnika B (BF) i 21-hydroksylazy (CYP21), a także TNF α . HLA to cząsteczki obecne na różnych komórkach ustroju. HLA typu I występują praktycznie na wszystkich komórkach jądrzastych. HLA typu II występują natomiast przede wszystkim na komórkach pochodzenia szpikowego. Cząsteczki te niewątpliwie biorą udział w licznych oddziaływaniach międzykomórkowych. Uczestniczą przede wszystkim w prezentacji antygenów innym komórkom układu odpornościowego, czyli identyfikacji tych antygenów. W przypadku gdy jest to antygen, na który układ odpornościowy jest „uczulony”, dochodzi do wyzwolenia odpowiedzi immunologicznej. Z drugiej strony jednak wykazano, że HLA klasy I mogą oddziaływać z komórkami NK zapobiegając ewentualnej lizie komórki (71).

Antygeny HLA typu II dzieli się na HLA-DR, HLA-DQ i HLA-DP. Gen DRB1 posiada największą liczbę alleli spośród wszystkich genów zgodności tkankowej klasy II (72), zatem potencjalnie może oddziaływać z największą liczbą rozmaitych antygenów, przez co jego rola wydaje się największa. Za zmienność alleliczną odpowiada polimorfizm w obrębie drugiego eksonu kodującego domenę zewnątrzkomórkową (73). Jak ważna jest rola tego antygeny ilustruje również fakt, że typowanie HLA-DR jest niezbędne przy dobieraniu dawców przeszczepów narządowych.

Antygeny MHC klasy II występują przede wszystkim na komórkach należących do szeroko pojmowanego układu odpornościowego, między innymi na limfocytach B, makrofagach, monocytach, komórkach dendrytycznych oraz aktywowanych limfocytach T. W szczególnych okolicznościach MCH klasy II mogą pojawić się na innych komórkach organizmu pod wpływem interferonu γ (74). Ich główna rola polega na wiązaniu cząsteczek białkowych, a następnie na prezentowaniu ich pomocniczym limfocytom T. Ich cząsteczka ma budowę heterodimeru i składa się z dwóch polimorficznych podjednostek α (33 kDa) oraz β (29 kDa) połączonych wiązaniami niekowalencyjnymi. Obie podjednostki są zakotwiczone w błonie komórkowej, przy czym każda z nich zawiera dwie domeny zewnątrzkomórkowe (α_1 i α_2 , β_1 i β_2), po jednej domenie przezbłonowej i po jednej domenie wewnątrzkomórkowej. Domeny α_1 i β_1 są strukturalnie bardzo podobne do zewnątrzkomórkowych domen MHC I klasy, natomiast

domeny α_2 i β_2 wykazują strukturalną homologię z cząsteczkami z nadrodziny immunoglobulin. Z czynnościowego punktu widzenia najważniejszymi elementami HLA II klasy jest miejsce wiązania peptydu oraz miejsce odpowiedzialne za interakcje z receptorem limfocyta T (*T cell receptor* - TCR). To pierwsze ma postać rowka obwarowanego dwoma łańcuchami białkowymi o konformacji helisy α , którego dno tworzy 8 łańcuchów o konformacji arkusza β . Rowek ten służy do prezentacji peptydów, które wiążą się z cząsteczką MHC licznymi wiązaniami wodorowymi, elektrostatycznymi i siłami van der Waalsa. Łańcuch α kodowany jest przez geny DRA1, natomiast łańcuch β przez geny DRB1. W sąsiedztwie tych genów znajdują się również geny DRB3, DRB4 i DRB5 oraz tak zwane geny rzekome, jednak nie odgrywają one istotnej roli w determinowaniu serologicznego typu antygeny zgodności tkankowej; kodują one odpowiednio antygeny DR52, DR53 i DR51. Peptydy prezentowane przez MHC klasy II pochodzą z endosomów i mogą charakteryzować się różną długością (w przeciwieństwie do prezentowanych przez MHC klasy I).

Polimorfizm antygenów zgodności tkankowej warunkuje różną odpowiedź organizmów na te same białka, co zależne jest od sposobu prezentacji danego białka w kontekście antygeny MHC. Właśnie ta różnica w sposobie prezentacji różnych białek może być odpowiedzialna za skłonność posiadaczy pewnych allotypów HLA do różnych chorób. Geny dla poszczególnych wariantów allelicznych HLA ulegają ekspresji w sposób kodominujący. O ile w przypadku MHC klasy I polimorfizm wykazuje tylko łańcuch α (mogą tworzyć się tylko dwie kombinacje łańcuchów), o tyle w klasie II oba łańcuchy są polimorficzne, zatem możliwe są cztery kombinacje. Pośród cząsteczek klasy II, HLA-DR stanowią pewien wyjątek, ponieważ locus DRA1 kodujący łańcuch α praktycznie nie wykazuje polimorfizmu, zatem polimorfizm tych cząsteczek zależny jest wyłącznie od łańcucha β (a konkretnie od domeny β_2). Również łańcuch β odpowiada za typ serologiczny cząsteczki HLA klasy II Gen DRB1 koduje wysoce polimorficzny łańcuch β odpowiedzialny za główne typy serologiczne HLA klasy II, natomiast DRB3, DRB4 i DRB5 odpowiadają za kodowanie odpowiednio DR52, DR53 i DR51 (69). Dotychczas opisano ponad 350 różnych alleli i stale opisywane są nowe (75).

Istnieje wiele hipotez próbujących ustalić przyczyny tak dużej różnorodności genów MHC. Niewątpliwie były one następstwem jakichś mutacji, których skutki jak zawsze mogą być pozytywne lub negatywne. Faktem jest na przykład względnie rzadkie występowanie homozygot. Selekcja osób pod kątem allelu MHC może mieć miejsce już

w życiu płodowym, dzięki interakcjom pomiędzy matką a płodem. Prowadzi to na przykład do zwiększonej częstości poronień, jeżeli matka i dziecko posiadają więcej niż jeden wspólny antygen HLA. Kolejnym czynnikiem jest lepsza odporność nosicieli niektórych alleli MHC na niektóre zakażenia, na przykład malarię. Osoby homozygotyczne z założenia mogą cechować się gorszą odpornością na niektóre zakażenia. U niektórych zwierząt, na przykład u myszy, zaobserwowano dobór partnera zależnie od MHC, jednak zjawiska tego nie potwierdzono u człowieka (76).

W modelu mysim, antygeny zgodności tkankowej położone są blisko genu T, którego mutacja odpowiada za powstawanie jednego z modeli genetycznych wad cewy nerwowej. W poszukiwaniu homologu tego genu, lub genu z nim sprzężonego, należy niewątpliwie uwzględnić geny kodujące HLA. Przeprowadzono już badania asocjacji niektórych form HLA typu I z wadami cewy nerwowej, natomiast nadal nie przeprowadzono badań oceniających asocjację z HLA typu II. Kontynuacja badań nad asocjacją HLA z wadą cewy nerwowej jest wskazana mimo braku podłoża immunologicznego z uwagi na możliwość sprzężenia z genem rzeczywiście odpowiedzialnym za powstawanie tej wady, a zwłaszcza wobec bliskości kompleksu MHC i genu T. Należy jednak zaznaczyć, że samo wykazanie asocjacji nie świadczy o rzeczywistym przyczynowo-skutkowym jej charakterze. Pod tym względem większą moc ma wykazanie znaczenia haplotypu zawierającego markery wykazujące asocjację z chorobą (77).

1.5. Budowa i rola TNF α w stanach fizjologicznych i patologicznych

Czynnik martwicy guza alfa (*tumor necrosis factor α* – TNF α) pośrednio znany jest ludzkości od drugiej połowy XIX wieku, choć nie od początku wiadano, czemu przypisywać wywoływane przez niego działania. Pierwszym przejawem jego obecności były „samoistne” remisje nowotworów złośliwych pod wpływem zakażenia bakteryjnego. Doprowadziło do stworzenia tzw. toksyny Coleya. Coley, chirurg praktykujący w Nowym Jorku na przełomie XIX i XX wieku, zakażał swoich chorujących na nowotwór pacjentów żywymi bakteriami (wywoływał u nich różę). Był to jeden z pierwszych w historii medycyny przypadków zastosowania nieswoistej szczepionki; jej skuteczność wiąże się prawdopodobnie z indukowaniem wieloważnej odpowiedzi immunologicznej związanej ze stymulacją produkcji oraz uwalniania wielu cytokin, z których główną rolę w działaniu przeciwnowotworowym przypisywano właśnie TNF α . Aktywność samego TNF α wykazali

w 1975 roku Lloyd Old i wsp. (78), stwierdzając, że odpowiedzialny on jest za pojawienie się martwicy krwotocznej guzów nowotworowych. Niezależnie odkryto substancję wywołującą kacheksję w przebiegu przewlekłych chorób, ale dopiero w 1985 roku potwierdzono tożsamość czynnika martwicy nowotworów i kachektyny; w tym samym roku sklonowano gen dla TNF α (79).

Gen TNF α zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 6 w sąsiedztwie genów dla antygenów głównego układu zgodności tkankowej. Zawiera cztery eksony i trzy introny (80). Translacja mRNA genu dla ludzkiego TNF α prowadzi do powstania 233-aminokwasowego polipeptydu związanego z błoną komórkową, który w wyniku usunięcia hydrofobowej sekwencji w przebiegu potranslacyjnej obróbki białek uwalnia 157-aminokwasowy polipeptyd o masie 17 kD (81). Prekursor TNF α to przezbłonowe białko, które następnie na skutek działania metaloproteaz (tzw. enzym konwertujący TNF α – TNF *alpha* converting enzyme – TACE) jest uwalnianie do środowiska (82). Aktywny biologicznie TNF α występuje w formie trimerów połączonych niekowalencyjnie, składających się z identycznych łańcuchów. Biologiczną aktywność zachowuje zarówno postać związana z błoną jak i postać rozpuszczalna, obie postaci zachowują podobną budowę. TNF α należy do nadrodziny białek obejmującej także: LT- α , LT- β , TRAIL (APO-2L) oraz ligandy dla: CD27, CD30, CD40, CD95 (APO-1/Fas), 4-1BB i OX40 (78). Białka te regulują proliferację, aktywację i różnicowanie wielu komórek, mogą indukować także ich śmierć poprzez apoptozę.

Swoje działanie fizjologiczne TNF α wywołuje przez swoiste receptory TNFR1 (p55) i TNFR2 (p75), przy czym za większość aktywności biologicznej odpowiada pierwszy z receptorów. Przyłączenie liganda do TNFR powoduje trimeryzację receptora, która następnie inicjuje szlak przekaźników (83). Geny dla receptorów dla TNF α należą do dużej rodziny genów receptorów dla ligandów takich jak czynnik wzrostu nerwów (NGF), CD27, CD30, CD40, 4-1BB, OX40, TRAMP (DR3 – *death receptor 3*) oraz produkt genu Fas/APO-1 (CD95). Łącznie opisano około 20 receptorów należących do rodziny receptorów dla TNF α (84). Receptor p55, występujący prawie na wszystkich komórkach ssaków, odpowiedzialny jest za cytotoksyczność TNF α wobec komórek nowotworowych oraz zakażonych wirusami natomiast p75 występuje głównie na komórkach pochodzenia szpikowego i odpowiada za efekt ostrej fazy, objawy wstrząsowe i martwicę oraz stymulację limfocytów T; niektóre komórki posiadają oba typy receptorów (85).

Większość komórek wykazuje stabilną ekspresję TNFR1, natomiast ekspresja TNFR2 podlega regulacji znacznie zwiększając się w stanie zapalnym.

Połączenie się cząsteczki TNF α z receptorem wywołuje kaskadę reakcji prowadzących do zwiększenia stężenia wewnątrzkomórkowego diacyloglicerolu, wzrostu aktywności obojętnej sfingomielinazy, aktywacji fosfolipazy A₂, aktywowania czynników transkrypcyjnych (NF-AT, NF κ B, AP-1, c-fos, c-jun) oraz przemiany kwasu arachidonowego w aktywne substancje. Jednym z najwcześniejszych sygnałów jest aktywacja sfingomielinazy wytwarzającej ceramid aktywujący kolejne kinazy białkowe. Za część działań TNFR1 odpowiada wewnątrzkomórkowy fragment receptora homologiczny do „domeny śmierci” receptora Fas, który nie występuje jednak w obrębie wszystkich receptorów z rodziny TNFR. Nazwano go domeną śmierci związaną z receptorem dla TNF α (TNF *receptor-associated death domain* – TRADD). Stwierdzono, że domena ta występuje w obrębie TNFR1, natomiast nie ma jej w TNFR2 (82). Jest ona niezbędna do działania przeciwwirusowego oraz indukcji syntazy NO. Nadmierna jej ekspresja prowadzi do apoptozy oraz aktywacji NF- κ B (83). W 1994 roku odkryto nowe białko tzw. czynnik związany z receptorem dla TNF α (TNF-*receptor-associated factor* – TRAF), będące pośrednikiem w przekazywaniu sygnałów od receptora TNFR2 w głąb komórki (86). Aktualnie znamy 6 takich czynników w organizmach ssaków, natomiast TNFR2 aktywuje tylko TRAF2. Ich różnorodność może tłumaczyć tak wszechstronne działanie czynnika martwicy nowotworów.

Oprócz białek TRAF odkryto także inne cząsteczki wiążące się z wewnątrzkomórkową domeną TNFR2, nazwane następnie komórkowymi inhibitorami apoptozy (*cellular inhibitors of apoptosis proteins* – cIAP), które mogą chronić komórki przed śmiercią (83). Domeny hamujące apoptozę zwane SODD (*silencer of death domains*) zidentyfikowano również w powiązaniu z receptorami TNFR1, zatem stymulacja tego receptora nie musi prowadzić do apoptozy (84).

Czynnik martwicy guza uwalniany jest przez liczne komórki: makrofagi/monocyty, neutrofile, NK, komórki glejowe, adipocyty, keratynocyty, fibroblasty i komórki tuczne, komórki mięśniówki gładkiej, komórki Panetha, komórki mezangium kłębków nerkowych (85) oraz komórki mięśnia sercowego (87). Najsilniejszym bodźcem do wytwarzania TNF α przez makrofagi są lipopolisacharydy (LPS) ścian bakterii Gram-ujemnych, proces ten zachodzi m.in. za pośrednictwem receptora CD14. Po eksperymentalnym podaniu endotoksyny stwierdzono znamienne zwiększenie się stężenia TNF α , które najwyższą wartość osiągało po około 1,5 godzinach, powracając do normy po 6 godzinach (88).

Innymi czynnikami stymulującymi uwalnianie TNF α są cytokiny (IL1, IL2, GM-CSF, CSF-1, IFN γ , LTB $_4$, PAF oraz autokrynnie TNF α), bradykinina, fosfolipaza A2 a także czynniki zakaźne takie jak zarodziec malarii, wirusy, grzyby drożdżopodobne i nieswoiste – promienie rentgenowskie, kryształki moczanów, hemodializa. Jego wydzielanie hamują natomiast IL4, IL6, TGF β oraz deksametazon (89). Obecność TNF α stwierdza się także w surowicy zdrowych ludzi, gdzie jego stężenie wynosi od 0 do 25-30 pg/ml, a także w mleku kobiecym (78). Okres półtrwania TNF α w osoczu wynosi około 7 do 9 minut.

Region promotorowy genu dla TNF α charakteryzuje się licznymi polimorfizmami. U ludzi znaleziono dotychczas przynajmniej 9 polimorfizmów w obrębie genu dla TNF α (90). Najszerzej bada się polimorfizm polegający na podstawieniu guaniny w pozycji -308 adeniną w obrębie promotora genu dla TNF α , który jest o tyle ciekawy, że najprawdopodobniej posiada aktywność regulującą ekspresję tego genu (tzn. zwiększającą aktywność promotora) i tym samym stężenie TNF α w surowicy (91), szczególnie w sprzężeniu z haplotypem HLA-A1, -B8, -DR3, -DQ2 (92), aczkolwiek inni autorzy nie potwierdzają tej obserwacji (81). Wilson i wsp. wysuwają wręcz hipotezę, że polimorfizm ten może odpowiadać za zwiększoną aktywację promotora przez wymieniony wyżej haplotyp (93). Należy zaznaczyć znaczne odchylenie od równowagi alleli tego haplotypu na skutek sprzężenia u mieszkańców Europy (92). Polimorfizm powyższy w 1993 roku odkryli Wilson i wsp. (93).

Innymi często badanymi polimorfizmami promotora są tranzycja G \rightarrow A w pozycji -238 opisana przez D'Alfonso i Richiardi (94), tranzycja C \rightarrow A w pozycji -857 oraz C \rightarrow A w pozycji -863, istnieje także kilka rzadszych polimorfizmów (81,92). Allele polimorfizmu w locus -238 wpływają na kształt helisy DNA, jego odkrywcy wysunęli zatem hipotezę, że mogą one wpływać na aktywność transkrypcyjną promotora. Opisywano także sprzężenie wielu polimorficznych alleli ze sobą (92). Położenie genu TNF α w obrębie antygenów zgodności tkankowej klasy III, w bezpośredniej bliskości klasy I i II, czyni z tego genu wdzięczny obiekt badań genetycznych zarówno na modelach zwierzęcych jak i ludzkich. Stwierdzono znaczną zmienność syntezy TNF α przez makrofagi zależną od genotypu w zakresie antygenów HLA klasy II. HLA-DR3 oraz DR4 korelowały z większą produkcją TNF α , natomiast HLA-DR2 - ze zmniejszoną (90,92). Oprócz wariantów polimorficznych, w obrębie genów dla TNF α istnieje szereg struktur modyfikujących syntezę TNF α . Jedną z nich odkryto u myszy. Stwierdzono, że brak polimorficznego fragmentu w obrębie genu dla TNF α powodował syntezę niezwykle stabilnych cząsteczek mRNA, a przez to

zwiększenie syntezy cytokiny. TNF α produkowany był także przez komórki maziówki normalnie go nieprodukujące, z następstwem w postaci rozwoju nadżerkowego zapalenia stawów (90).

W związku z genetyczną zmiennością genu dla TNF α oraz jej prawdopodobnym wpływem na aktywność transkrypcyjną prowadzi się liczne badania nad rolą tego czynnika w patogenezie wielu chorób, dotychczas nie przeprowadzono jednak badań dotyczących powstawania dysrafii. Brakuje dowodów naukowych na bezpośredni wpływ TNF α na formowanie się cewy nerwowej, istnieje jednak wiele danych mogących pośrednio wskazywać na rolę tej cytokiny w tym procesie. Jej szlak przekąźnikowy bierze natomiast niewątpliwy udział w organogenezie u zarodka człowieka, na przykład w tworzeniu i organizacji struktur układu limfatycznego (84). TNF α może odgrywać rolę w rozwoju innych narządów, ponieważ pobudza angiogenezę, działa mitogenicznie na fibroblasty, indukuje ekspresję wielu cytokin oraz cząsteczek adhezyjnych. Kilka cząsteczek z rodziny TNF α bierze istotny udział w regulacji czynności osteoklastów (95). Opisano również udział innych cząsteczek i receptorów należących do rodziny TNF α /TNFR w rozwoju układu nerwowego oraz różnorodnych struktur ektodermalnych (96).

Jeden ze szlaków przekąźnikowych TNF α opiera się o białka związane z receptorem dla TNF α (TRAF). Na wczesnym etapie rozwoju można wykazać obecność transkryptu TRAF4 w rozwijającym się układzie nerwowym. W doświadczeniach na myszach wykazano, że unieczynnienie genu dla TRAF4 w znacznym odsetku przypadków prowadzi do różnych wad rozwojowych, z których dużą część stanowią wady cewy nerwowej. Najczęściej są one zlokalizowane w dolnych segmentach piersiowych i segmentach lędźwiowych (97). Deficyt innej molekuly z tej rodziny, TRAF6, w dużej części embrionów prowadzi do egzencefalii. Uważa się, że białko to reguluje programowaną śmierć komórki w pewnych regionach mózgu (98). Colas i Schoenwolf niezależnie wymieniają TRAF6 jako jeden z genów kandydatów biorących udział w procesie neurulacji (30).

TNF α odgrywa niewątpliwą rolę w apoptozie. Wydaje się, że wraz z innymi cytokinami indukuje kilka procesów prowadzących do śmierci komórki: mitoptozę – rozpad mitochondriów (poprzez gwałtowną produkcję i uwolnienie wolnych rodników tlenowych) oraz apoptozę – poprzedzoną obrzmieniem mitochondriów i uwolnieniem z nich czynników proapoptotycznych do cytoplazmy. Z drugiej strony, TNF α może także hamować apoptozę, paradoksalnie poprzez indukcję NF κ B, stymulującego następnie

produkcję enzymów zmiatających wolne rodniki, na przykład dysmutazy ponadtlenkowej (99). TNF α może również wpływać na rozwój kości, elementów istotnych przecież w wadach cewy nerwowej, ponieważ silnie stymuluje procesy resorpcji kości oraz hamuje osteogenezę. Aktywuje między innymi tworzenie osteoklastów poprzez wzmaganie lokalnego wydzielania IL6, IL11 oraz GM-CSF (100).

2. Cel pracy

Ponieważ dotychczas u człowieka nie udało się ustalić genu homologicznego dla locus T odpowiadającego za powstawanie wad cewy nerwowej, wskazane wydaje się badanie innych genów zlokalizowanych w obrębie genów HLA.

Celem niniejszej pracy jest zbadanie, czy istnieje asocjacja pomiędzy poszczególnymi wariantami HLA-DR, allelami odpowiedzialnymi za polimorfizmy, tranzycję G→A w pozycji -238 i -308, w obrębie promotora genu dla TNF α , oraz utworzonymi przez nie haplotypami, a ryzykiem rozwoju dysrafii.

Sformułowano następujące hipotezy zerowe:

1. Poszczególne allele genów HLA-DR występują z podobną częstością u pacjentów z wadą cewy nerwowej i w grupie kontrolnej.
2. Allele G i A w locus -238 promotora genu dla TNF α występują z podobną częstością u pacjentów z wadą cewy nerwowej i w grupie kontrolnej.
3. Allele G i A w locus -308 promotora genu dla TNF α występują z podobną częstością u pacjentów z wadą cewy nerwowej i w grupie kontrolnej.
4. Haplotypy obejmujące HLA-DR oraz locus -238 promotora genu dla TNF α wyliczone na podstawie obserwowanych genotypów dla poszczególnych markerów występują z podobną częstością u pacjentów z wadą cewy nerwowej i w grupie kontrolnej.
5. Haplotypy obejmujące HLA-DR oraz locus -308 promotora genu dla TNF α wyliczone na podstawie obserwowanych genotypów dla poszczególnych markerów występują z podobną częstością u pacjentów z wadą cewy nerwowej i w grupie kontrolnej.
6. Haplotypy obejmujące HLA-DR oraz loci -238 i -308 promotora genu dla TNF α wyliczone na podstawie obserwowanych genotypów dla poszczególnych markerów występują z podobną częstością u pacjentów z wadą cewy nerwowej i w grupie kontrolnej.

Wszystkie wyliczenia zostaną wykonane dla całej grupy z wadą cewy nerwowej jak i dla podgrup z wadą cewy nerwowej odcinka lędźwiowego i piersiowego.

3. Metodologia:

Badaniem objęto 111 dzieci z wadami cewy nerwowej prospektywnie rejestrowanych przez Poradnię Mielodysplazji Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w latach 1999-2000. Dzieci te objęte zostały szeroko zakrojonym badaniem genetycznego podłoża dysrafii. Ich rodzice lub sami chorzy w przypadku pełnoletniości wyrazili pisemną zgodę na uczestnictwo w badaniu. Uzyskano również zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego na przeprowadzenie analizy. Poziom wady ustalono wcześniej na podstawie dokumentacji pacjentów obejmującej historię choroby, opis zabiegu operacyjnego oraz dokumentację radiologiczną.

Grupę kontrolną stanowi 113 zdrowych osób z regionu Polski Południowej, zebranych w bazie Zakładu Immunologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego. Materiał ten wykorzystano za zgodą Zakładu Immunologii.^a

W obu grupach przeprowadzono analizę polimorfizmu -238G→A i -308G→A w obrębie promotora genu dla TNF α . W grupie dzieci z wadą cewy nerwowej przeprowadzono typowanie genów HLA-DR, dane dla grupy kontrolnej uzyskano z bazy danych Zakładu Immunologii.

3.1. Metody analizy molekularnej.

3.1.1. Polimorfizm G→A w locus -238 promotora genu dla TNF α

Polimorficzne allele identyfikowano metodą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (*restriction fragment length polymorphism* - RFLP) w oparciu o metodę opisaną przez Grove'a i wsp (101). Metoda ta zakłada stworzenie startera zdegenerowanego, tak, aby utworzyć miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny w przypadku rzadszego allelu A. Badane DNA poddano łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) z użyciem następującej pary starterów:

Forward: 5'-ATCTGGAGGAAGCGGTAGTG-3'

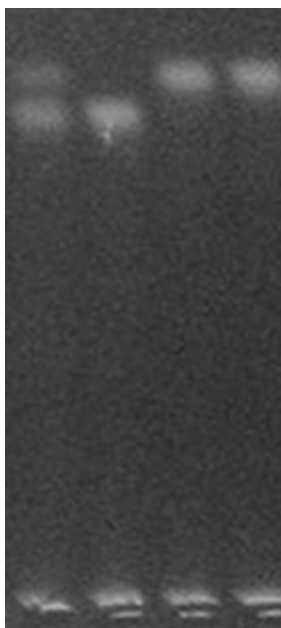
Reverse: 5'-AGAAGACCCCCCTCGGAACC-3'

^a Serdecznie dziękuję Panu prof. dr hab. Markowi Zembali i Pani dr hab. Annie Pituch-Noworolskiej za udostępnienie danych oraz materiału genetycznego grupy kontrolnej.

Reakcję PCR przeprowadzono z użyciem termocyklera Biometra T3 Thermocykler w objętości 25 µl z wykorzystaniem odczynników firmy Biotools, B&M Labs, S.A. (Hiszpania)

Próbkę poddano degeneracji przez 5 minut w temperaturze 95°C, następnie przeprowadzono 30 cykli: 95°C przez 30 sekund, 59°C przez 30 sekund, 72°C przez 30 sekund, po których próbkę poddano temperaturze 72°C przez 7 minut celem połączenia zwiłokrotnionych fragmentów. W reakcji PCR uzyskano fragment o długości 152 par zasad.

Produkt amplifikacji poddano następnie trawieniu enzymem MspI (Fermentas, Litwa) w buforze 1xTango™. Trawione próbki inkubowano w temperaturze 37°C przez noc, a następnego dnia po dodaniu 2 µl buforu (*loading buffer*) produkty trawienia rozdzielano metodą elektroforezy w buforze 1xTBE na 4% żelu agarozowym NuSieve® GTG® Agarose (Cambrex, USA) przez 120 minut. Żel wybarwiano następnie bromkiem etydyny oraz oceniano w świetle ultrafioletowym. W przypadku obecności częstszego allelu G produkt amplifikacji ulegał trawieniu do produktów o długości 131 i 21 par zasad (nić wiodąca) oraz 129 i 23 par zasad (nić komplementarna). Asymetria taka wynika z faktu, że miejsce cięcia nici wiodącej i komplementarnej przez enzym MspI, rozpoznający sekwencję GGCC, jest przesunięte o dwie pary zasad. W trakcie rozdziału elektroforetycznego w podanych warunkach fragmenty o długości 132 oraz 129 par zasad zlewały się w jeden prążek. Homozygota AA widoczna była w postaci jednego prążka o długości około 150 par zasad (względem markera), heterozygota w postaci dwóch prążków o długości około 150 i 130 par zasad (względem markera), natomiast homozygota GG w postaci jednego prążka o długości około 130 par zasad (względem markera) (ryc. 1). W celu walidacji metody przeprowadzono sekwencjonowanie produktów homozygotycznych GG i AA oraz heterozygotycznego dla wybranych osób. Wynik sekwencjonowania był zgodny z wynikiem analizy RFLP, co zwiększa wiarygodność tej metody w analizie polimorfizmu G→A w locus -238 promotora genu dla TNFα (ryc. 6,7,8).



Rycina 1. Polimorfizm w locus -238 promotora genu dla TNF α .
 Obraz homozygot GG (pierwsze dwa od prawej), AA (drugi od lewej), oraz heterozygot GA (pierwszy od lewej).

3.1.2. Polimorfizm G→A w locus -308 promotora genu dla TNF α

Polimorficzne allele identyfikowano metodą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) według metody wcześniej nieopisanej w piśmiennictwie opracowanej w Zakładzie Genetyki Medycznej Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie. Badane DNA poddano łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) z użyciem następującej pary starterów:

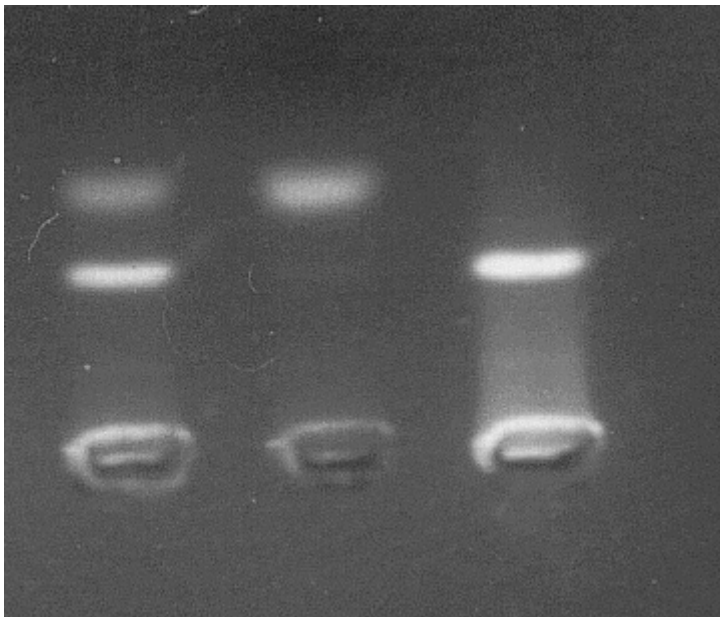
Forward: 5'- AAACAGACCACAGACCTGG-3'

Reverse: 5'-CCATCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'

Reakcję PCR przeprowadzono z użyciem termocyklera Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480, a w późniejszych oznaczeniach za pomocą termocyklera Biometra T3 Thermocykler, w objętości 25 μ l wykorzystując odczynniki Biotools, B & M Labs, S.A. (Hiszpania)

Próbkę poddano degeneracji przez 5 minut w temperaturze 95°C, następnie przeprowadzono 30 cykli: 95°C przez 30 sekund, 59°C przez 30 sekund, 72°C przez 30 sekund, po których próbkę poddano temperaturze 72°C przez 7 minut celem połączenia zwielokrotnionych fragmentów. W reakcji PCR uzyskano fragment o długości 145 par zasad. Następnie produkt amplifikacji poddano trawieniu enzymem BsmFI (New England Biolabs). Próbkę inkubowano przez noc w temperaturze 65°C, a następnego dnia produkty trawienia rozdzielano metodą elektroforezy w buforze 1xTBE na 4% żelu agarozowym NuSieve[®] GTG[®] Agarose (Cambrex, USA) przez 120 minut. Żel wybarwiano następnie bromkiem etydydy oraz oceniano w świetle ultrafioletowym. Enzym BsmFI rozpoznaje

sekwencję GGGAC, dzięki czemu przecina produkt PCR powstały w wyniku amplifikacji genu zawierającego allel G (częstszy), dając fragmenty o długości 74 i 71 par zasad (nić wiodąca) oraz 78 i 67 par zasad (nić komplementarna). Taka asymetria wynika z faktu, że miejsce cięcia nici wiodącej i nici komplementarnej różni się o cztery pary zasad. Homozygota GG widoczna była w postaci jednego prążka długości 70-80 par zasad (względem markera), heterozygota GA w postaci dwóch prążków długości około 70-80 par zasad i 145 par zasad (względem markera) natomiast homozygota AA w postaci jednego prążka długości 145 par zasad (względem markera) (ryc. 2). W piśmiennictwie dotychczas nie opisano metody typowania tego polimorfizmu z użyciem enzymu BsmFI, z tego powodu przeprowadzono walidację tej metody poprzez sekwencjonowanie kilku zamplifikowanych fragmentów dla różnych wariantów allelicznych. Wynik sekwencjonowania jest zgodny z analizą RFLP, co zwiększa wiarygodność tej metody w analizie polimorfizmu -308 G→A w obrębie promotora genu dla TNF α (ryc. 3,4,5).



Rycina 2. Polimorfizm w locus -308 promotora genu dla TNF α . Homozygota AA po prawej, GG pośrodku i heterozygota GA po lewej.

3.1.3. Geny zgodności tkankowej DRB1

Analizę genów zgodności tkankowej przeprowadzono metodą odwrotnej hybrydyzacji produktów amplifikacji metodą PCR znakowanych biotyną, które poddawane są następnie znakowaniu streptawidyną sprzężoną z fosfatazą alkaliczną i uwidaczniane w wyniku barwnej reakcji (INNO-Lipa HLA-DRB1, Innogenetics N.V. Belgia). Reakcję PCR prowadzono w termocyklerze Biometra T3 Thermocykler w warunkach zgodnych z zaleceniami producenta zestawu. Hybrydyzację prowadzono w łaźni wodnej HS-B 20 Digital, IKA Labortechnik. Odczyt alleli na podstawie wzorów prążków prowadzony był manualnie na podstawie tabeli dołączonych do zestawu.

Typowanie antygenów DR metodami molekularnymi staje się ostatnio coraz trudniejsze. Wcześniej antygeny te typowano serologicznie, a wynik takiego typowania był dość jednoznaczny. Aktualnie co roku odkrywanych jest coraz więcej alleli DRB1, natomiast często nie udaje się nowo odkrytym allelom jednoznacznie przypisać typu serologicznego HLA-DR. Mało tego, w miarę aktualizacji nazewnictwa HLA, w odniesieniu do niektórych alleli dochodzi do zmiany typu serologicznego HLA-DR (102,103). Niejednoznaczne bywa również typowanie alleli metodą hybrydyzacji, z uwagi na fakt, że jeden wzór prążków po hybrydyzacji może odpowiadać kilku allelom, zwłaszcza w niektórych zestawieniach heterozygotycznych, ale również homozygotycznych (73). Rozdzielczość stosowanej metody nie pozwala również na identyfikację niektórych alleli, którym aktualnie przypisuje się odmienny typ serologiczny HLA-DR (np. DRB*1508 = DR2). Stale zbierane są dane od badaczy z różnych krajów i baza danych jest regularnie uaktualniana. W odniesieniu do niektórych alleli, odpowiadający im typ serologiczny ustalany jest umownie pod egidą WHO, w ostatnim czasie zastosowano w tym celu także sieci neuronowe oraz obliczenia oparte na metodach maksymalnej wiarygodności. Ponieważ i takie postępowanie nie pozwala na jednoznaczne przypisanie typu serologicznego, stworzono również kategorię „przypisany przez ekspertów”, aby maksymalnie dużej liczbie alleli przypisać typ serologiczny; mimo tego istnieją allele, którym nie udało się przypisać typu serologicznego (104). W związku z tym zamiast typów serologicznych posłużono się oznaczeniami grupowymi alleli. W przypadku wątpliwości w czasie odczytywania allelu posługiwano się częstością występowania różnych alleli i typów serologicznych na terenie Polski (105-108). Uwzględnienie lokalnej częstości jest konieczne, ponieważ w niektórych przypadkach istnieje kilka możliwych kombinacji alleli. W większości przypadków różnica polega tylko na numerze allelu

w poszczególnych podgrupach (tzn. bez zmiany przynależności DRB1), jednak w przypadkach możliwych kombinacji różnych numerów alleli konieczne jest uwzględnienie częstości poszczególnych z nich w danej populacji.

W grupie kontrolnej analiza genów zgodności tkankowej wykonana została w Zakładzie Immunologii za pomocą tej samej metody.

3.2. Analiza statystyczna

W analizie statystycznej wykorzystano bezpłatne oprogramowanie statystyczne: Mstat 4.01 for Windows, PHASE v. 2.1, SISA online statistical analysis (skrypt Java), kalkulator statystyczny wchodzący w skład pakietu Epiinfo (FDA), program udostępniony przez Institut für Humangenetik (Technische Universität München) na stronie <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. Do obliczania równowagi Hardy'ego i Weinberga dla HLA-DRB1 użyto internetowej wersji programu GENEPOP v. 3.4. dostępnej na stronie http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/genepop_op1.html. Wykorzystuje ona dokładny test Hardy'ego i Weinberga (autorstwa Fishera) z użyciem łańcucha Markowa dla podania dokładniejszych wyników. Pozwala na wykonanie obliczeń również w przypadku, gdy brakuje danych dla niektórych osób. Analizę odchylenia od równowagi na skutek sprzężenia dla poszczególnych par alleli wykonano za pomocą internetowej wersji programu LinkDos (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/linkdos.html>) (109).

Zastosowane testy statystyczne to: statystyki opisowe, χ^2 (w razie konieczności z poprawką Yatesa), test Cochran'a i Armitage'a dla trendu, dokładny test Fishera (w razie konieczności z poprawką Bonferroni), test G (*log-likelihood ratio*), test permutacji. Iloraz szans, także w przypadku braku istotności statystycznej, przedstawiono w celu pokazania precyzji obliczeń. W przypadku porównywania częstości poszczególnych alleli HLA-DRB1 zastosowano poprawkę Bonferroni na porównania wielokrotne. W przypadku stwierdzenia istotności statystycznej w teście G wprowadzona zostanie poprawka Williamsa z uwagi na małą liczebność porównywanych grup. W analizie odchylenia od równowagi na skutek sprzężenia wyliczono wartość korelacji r oraz prawdopodobieństwa p za pomocą testu χ^2 . Za znamienne uznano wartości $p < 0,05$ dla testu G porównującego całe grupy oraz dla testu permutacji, $p_c < 0,05$ (p_c oznacza wartość p po wprowadzeniu poprawki Bonferroni) dla porównania częstości poszczególnych alleli lub haplotypów oraz $p < 0,01$ dla analizy odchylenia od równowagi na skutek sprzężenia.

Wyliczenie haplotypów przeprowadzono za pomocą programu PHASE v. 2.1, wykorzystującego metodę Bayesa do konstruowania haplotypów na podstawie genotypów osób niespokrewnionych (110,111). Jest to powszechnie spotykany we współczesnych analizach genetycznych program, stale ulepszany przez jego twórcę. Autorzy dołożyli wszelkich starań, aby sprawdzić wiarygodność wyliczeń programu w oparciu o dane rzeczywiste i symulowane, stwierdzając, że jest on około dwukrotnie dokładniejszy niż metody oparte na algorytmie EM (expectation-maximisation) (110). Bardzo korzystną cechą tego programu jest również możliwość porównania rozkładu wyliczonych haplotypów w obu grupach w oparciu o test permutacji oraz możliwość dokonania obliczeń, jeżeli u niektórych badanych osób brakuje danych dotyczących poszczególnych loci. Dzięki osobistemu kontaktowi z autorem programu jego ustawienia zostały dopasowane do sytuacji będącej obiektem badania. Kolejność położenia poszczególnych loci w obrębie chromosomu 6 to DRB1, TNF α (-238), TNF α (-308) (90). Program uwzględnia również odległość pomiędzy badanymi locus, która pomiędzy HLA-DR i promotorem genu dla TNF α wynosi około 850 tysięcy par zasad (93).

Obliczenia haplotypów przeprowadzono zgodnie z zaleceniami autora programu. Dla sprawdzenia dokładności typowania haplotypów wykonano kilka prób dla każdego zestawienia. Wyniki tych prób były praktycznie identyczne, zatem dokładność typowania haplotypów była duża. Wprowadzając dane do programu PHASE można założyć, czy w danym obszarze dochodzi do rekombinacji fragmentów chromosomów (opcja –MR), czy też takiej rekombinacji nie ma (opcja –MS). Głównym założeniem takiej oceny było sprawdzenie, czy porównanie grup pomiędzy sobą przyniesie inne wyniki przy założeniu obecności i braku rekombinacji. Ponieważ w obu przypadkach nie stwierdzono różnicy pomiędzy grupami, a dane wskazują na rzadkie, mimo dużej rozległości obszaru, występowanie rekombinacji w obrębie MHC (region bardzo konserwatywny - wykazano, że do rekombinacji w regionie HLA dochodzi w mniej niż 1%, dlatego zwykle pełen zestaw alleli na tym samym chromosomie dziedziczy się razem jako haplotyp), zdecydowano się przedstawić wyniki przy założeniu braku rekombinacji (opcja –MS). Dane wynikowe zawierają zarówno szacunkową liczbę poszczególnych haplotypów w danej grupie jak również ich częstość wraz z odchyleniem standardowym.

4. Wyniki

4.1. Charakterystyka badanych grup

Analizą objęto łącznie 111 dzieci z wadą cewy nerwowej oraz 113 osób z grupy kontrolnej. Dzieci z wadą cewy nerwowej analizowano łącznie oraz oddzielnie dla wad o różnej lokalizacji. Dla celów analizy wady podzielono dodatkowo na piersiowe (obejmujące odcinek piersiowy oraz górną część odcinka lędźwiowego) oraz lędźwiowe (rozpoczynające się w odcinku lędźwiowym i zwykle obejmujące również górną część odcinka krzyżowego). Podział taki jest zrozumiały przy uwzględnieniu postulowanych miejsc zamykania się cewy nerwowej u człowieka.

Grupa z wadą cewy nerwowej obejmowała łącznie 59 dziewczynek (53%) oraz 52 chłopców (47%). W grupie z przepukliną okolicy lędźwiowej (75 dzieci) proporcje te to 43 dziewczynki (57%) oraz 32 chłopców (43%), natomiast grupa z przepukliną okolicy piersiowej (31 dzieci) obejmowała 15 dziewczynek i 16 chłopców. Grupa kontrolna obejmowała 61 kobiet (49,6%) oraz 62 mężczyzn (50,4%). Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w rozkładzie płci pomiędzy grupą kontrolną a całą grupą z wadą cewy nerwowej ($p=0,5864$ w teście χ^2), grupą dzieci z przepukliną okolicy lędźwiowej ($p=0,3621$ w teście χ^2 z poprawką Yatesa) oraz grupą dzieci z przepukliną okolicy piersiowej ($p=0,999$ w dokładnym teście Fishera).

Grupa badana obejmowała również dwoje dzieci z przepukliną mózgową, jedno dziecko z wadą cewy nerwowej odcinka ogonowego, jedno dziecko z wadą cewy nerwowej odcinka krzyżowego oraz jedno dziecko z izolowaną przepukliną oponową odcinka piersiowego. Ze względu na niewielką liczebność innych lokalizacji nie analizowano ich oddzielnie, a jedynie w całej grupie wad cewy nerwowej.

Rozkład wariantów analizowanych locus u tych pacjentów był następujący:

Tabela 1. Genotypowanie rzadkich przypadków wad cewy nerwowej (WCN)

Poziom WCN	HLA DRB1	TNF α (-238)	TNF α (-308)
przepuklina mózgową	*07/*04	G/G	G/G
przepuklina mózgową	*11/*11	G/G	G/G
okolica ogonowa	*07/*07	G/A	G/G
okolica krzyżowa	*11/*15	G/G	G/G
przepuklina oponowa okolicy piersiowej	*01/*13	G/G	G/A

4.2. Geny zgodności tkankowej DRB1

Typowanie alleli DRB1 przeprowadzono w całej grupie z wadą cewy nerwowej, jednak w niektórych przypadkach nie uzyskano wyników. Przyczyną mogła być jakość DNA (brak produktu PCR), co jest znanym problemem wykorzystywanej metody analitycznej (producent zaleca wykorzystanie roztworu DNA o określonym stężeniu i jakości, które nie zawsze możliwe jest do uzyskania), lecz w niektórych przypadkach uzyskane wyniki nie pozwalały na wiarygodne określenie allelu. Podobne przypadki spotyka się w piśmiennictwie (112).

W dokładnym teście Hardy'ego i Weinberga nie stwierdzono odchylenia od równowagi dla grupy z wadą cewy nerwowej ($p=0,5818$, $SE=0,0253$) jak i grupy kontrolnej ($p=0,7629$, $SE=0,02$).

Typowa metoda oceny asocjacji HLA w badaniach kliniczno-kontrolnych polega na porównaniu liczby alleli w poszczególnych grupach za pomocą dokładnego testu Fishera z użyciem poprawki Bonferroni na porównania wielokrotne. Nie wykazano znamiennej różnicy w częstości poszczególnych alleli DRB1 pomiędzy całą grupą dzieci z wadą cewy nerwowej oraz grupą kontrolną. Różnica zbliżała się do istotności statystycznej dla DRB1*07 dla całej grupy z wadą cewy nerwowej, jednak wprowadzenie poprawki Bonferroni praktycznie niweluje tę różnicę (Tabela 2).

Tabela 2. Porównanie liczebności alleli HLA-DRB1 dla całej grupy pacjentów z WCN i grupy kontrolnej.

Allel DRB1	WCN (całość)	Grupa kontrolna	p (dokładny test Fishera, dwustronny)	Iloraz szans OR (95% CI)
*01	24	32	$p=0,4745$	0,92 (0,50-1,68)
*03	24	20	$p=0,4265$	1,34 (0,69-2,63)
*04	19	16	$p=0,4826$	1,32 (0,63-2,79)
*07	49	37	$p=0,07061$	1,57 (0,95-2,61)
*08	4	8	$p=0,386$	0,54 (0,12-2,07)
*09	1	4	$p=0,3743$	0,27 (0,01-2,75)
*10	2	1	$p=0,6091$	2,18 (0,11-129,44)
*11	24	31	$p=0,5642$	0,82 (0,45-1,50)
*12	4	9	$p=0,265$	0,47 (0,11-1,73)
*13	20	30	$p=0,2922$	0,70 (0,37-1,32)
*14	5	6	$p=1$	0,90 (0,21-3,61)
*15	22	21	$p=0,7482$	1,15 (0,59-2,27)
*16	10	11	$p=1$	0,99 (0,38-2,56)
razem	208	226		
$p_c=0,0038$.				

Nie wykazano różnicy w częstości poszczególnych alleli DRB1 pomiędzy pacjentami z wadą cewy nerwowej odcinka lędźwiowego a grupą kontrolną. Dla DRB1*13 wartość zbliżała się do granicy istotności statystycznej, lecz po zastosowaniu poprawki Bonferroni różnica uległa zniwelowaniu (Tabela 3).

Tabela 3. Porównanie liczebności alleli HLA-DRB1 dla pacjentów z WCN odcinka lędźwiowego i grupy kontrolnej.

Allel DRB1	WCN (odc. lędźwiowy)	Grupa kontrolna	p (dokładny test Fishera, dwustronny)	Iloraz szans OR (95% CI)
*01	13	32	p=0,1941	0,63 (0,30-1,30)
*03	16	20	p=0,4696	1,35 (0,64-2,85)
*04	14	16	p=0,3293	1,48 (0,66-3,33)
*07	32	37	p=0,1293	1,54 (0,88-2,71)
*08	2	8	p=0,3299	0,40 (0,04-2,05)
*09	1	4	p=0,6536	0,41 (0,01-4,16)
*10	2	1	p=0,5599	3,31 (0,17-196,06)
*11	16	31	p=0,6304	0,82 (0,41-1,64)
*12	4	9	p=0,7733	0,72 (0,16-2,64)
*13	10	30	p=0,08504	0,51 (0,22-1,13)
*14	4	6	p=1	1,09 (0,22-4,71)
*15	17	21	p=0,3804	1,37 (0,66-2,84)
*16	7	11	p=1	1,04 (0,36-3,00)
razem	138	226		
p _c =0,0038.				

Nie wykazano różnicy w częstości poszczególnych alleli DRB1 pomiędzy pacjentami z wadą cewy nerwowej odcinka piersiowego a grupą kontrolną (Tabela 4).

Tabela 4. Porównanie liczebności alleli HLA-DRB1 dla pacjentów z WCN odcinka piersiowego i grupy kontrolnej

Allel DRB1	WCN (odc. piersiowy)	Grupa kontrolna	p (dokładny test Fishera, dwustronny)	Iloraz szans OR (95% CI)
*01	10	32	p=0,6817	1,21 (0,52-2,78)
*03	8	20	p=0,3286	1,58 (0,60-4,07)
*04	4	16	p=1	0,94 (0,22-3,07)
*07	14	37	p=0,2541	1,55 (0,73-3,27)
*08	2	8	p=1	0,94 (0,09-4,89)
*09	0	4	p=0,5827	-
*10	0	1	p=1	-
*11	5	31	p=0,3805	0,57 (0,17-1,58)
*12	0	9	p=0,2119	-
*13	9	30	p=0,6782	1,15 (0,47-2,74)
*14	1	6	p=1	0,62 (0,01-5,28)
*15	4	21	p=0,6168	0,70 (0,17-2,19)
*16	3	11	p=1	1,03 (0,18-4,07)
razem	60	226		
p _c =0,0038.				

Porównanie częstości poszczególnych alleli pomiędzy grupą badaną i kontrolną jest typową metodą badania asocjacji HLA z różnymi stanami chorobowymi. Analiza taka nie oddaje jednak globalnego rozkładu alleli, można więc nie wykryć ewentualnych różnic pomiędzy grupami. Przeprowadzono zatem analizę globalnego rozkładu alleli HLA-DRB1 w grupach z wadą cewy nerwowej i grupą kontrolną.

Nie wykazano różnicy pomiędzy całą grupą pacjentów z wadą cewy nerwowej oraz grupą kontrolną w zakresie globalnego rozkładu alleli DRB1 (Tabela 5).

Nie stwierdzono różnicy w zakresie globalnego rozkładu alleli DRB1 pomiędzy grupą pacjentów z wadą cewy nerwowej odcinka lędźwiowego oraz grupą kontrolną (Tabela 6). Dla różnicy poszczególnych komórek zbliżających się do istotności statystycznej wprowadzono poprawkę Williamsa z uwagi na małą liczebność grup, co nie zmieniło w znaczący sposób wyniku analizy.

Tabela 5. Porównanie globalnego rozkładu alleli DRB1 pomiędzy całą grupą pacjentów z WCN i grupą kontrolną [test G (*log-likelihood ratio*)]

Allel DRB1	WCN (całość)	Grupa kontrolna	G ²	p
*01	24	32		
*03	24	20	1,351	0,2451
*04	19	16	0,4101	0,5219
*07	49	37	1,14	0,2857
*08	4	8	1,697	0,1927
*09	1	4	2,071	0,1502
*10	2	1	0,3033	0,5818
*11	24	31	0,9835	0,3213
*12	4	9	1,828	0,1763
*13	20	30	1,367	0,2424
*14	5	6	0,02033	0,8866
*15	22	21	0,1993	0,6553
*16	10	11	0,0008347	0,977
razem	208	226	11,37	0,4975 (df=12)

Tabela 6. Porównanie globalnego rozkładu alleli DRB1 pomiędzy grupą pacjentów z WCN odcinka łędźwiowego i grupą kontrolną [test G (*log-likelihood ratio*)]

Allel DRB1	WCN (odc. łędźwiowy)	Grupa kontrolna	G ²	p
*01	13	32		
*03	16	20	2,103	0,147
*04	14	16	1,076	0,2996
*07	32	37	1,018	0,3129
*08	2	8	2,016	0,1557
*09	1	4	0,9371	0,333
*10	2	1	0,8543	0,3553
*11	16	31	0,6539	0,4187
*12	4	9	0,3791	0,5381
*13	10	30	2,96 (z poprawką Williamsa 2,922)	0,08535 (z poprawką Williamsa 0,0874)
*14	4	6	0,03916	0,8431
*15	17	21	0,843	0,3585
*16	7	11	0,007652	0,9303
razem	138	226	12,89	0,3773 (df=12)

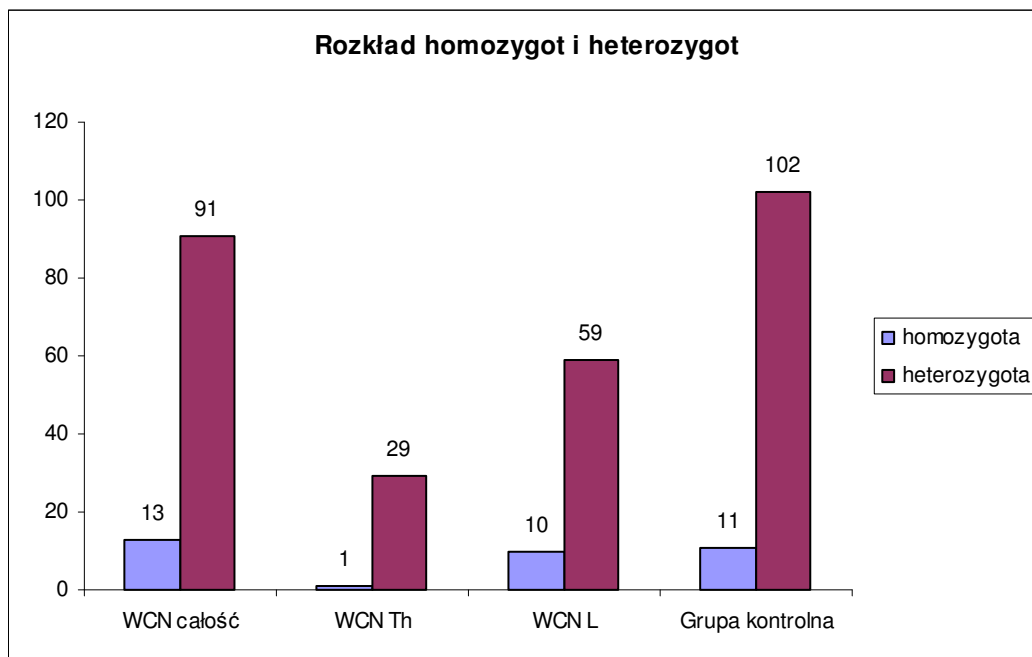
Globalny rozkład alleli DRB1 nie różnił się także pomiędzy grupą pacjentów z wadą cewy nerwowej odcinka piersiowego i grupą kontrolną (Tabela 7). Dla różnicy poszczególnych komórek zbliżających się do istotności statystycznej wprowadzono poprawkę Williamsa z uwagi na małą liczebność grup. Należy zaznaczyć, że wartość p w przypadku DRB1*12 na poziomie istotności statystycznej nie wskazuje na znamiennej asocjacje, ponieważ sam test G nie nadaje się do bezpośredniego porównywania grup o tak

małej liczebności (wymaga to dokładnego testu Fishera), ponadto w przypadku oddzielnego rozpatrywania takich komórek konieczne byłoby zastosowanie poprawki Bonferroni. Test G służy bowiem porównaniu globalnego rozkładu w obu grupach.

Tabela 7. Porównanie globalnego rozkładu alleli DRB1 pomiędzy grupą pacjentów z WCN odcinka piersiowego i grupą kontrolną [test G (*log-likelihood ratio*)]

Allel DRB1	WCN (odc. piersiowy)	Grupa kontrolna	G ²	p
*01	10	32		
*03	8	20	0,1981	0,6563
*04	4	16	0,2841	0,594
*07	14	37	0,1537	0,695
*08	2	8	0,159	0,6901
*09+*10	0	5	2,845	0,09168
*11	5	31	2,01	0,1562
*12	0	9	4,446 (z poprawką Williamsa 4,149)	0,03498 (z poprawką Williamsa 0,0417)
*13	9	30	0,0539	0,8164
*14	1	6	0,2411	0,6234
*15	4	21	0,4327	0,5107
*16	3	11	0,001786	0,9663
razem	60	226	10,83	0,458 (df=11)

Porównano również liczbę homozygot oraz heterozygot w zakresie HLA-DRB1 nie stwierdzając znamiennej różnicy pomiędzy całą grupą z wadą cewy nerwowej i grupą kontrolną [$\chi^2=0,42$, $p=0,5164$, OR=1,32 (0,52-3,36)], pomiędzy grupą z wadą cewy nerwowej odcinka lędźwiowego i grupą kontrolną [$\chi^2=0,95$, $p=0,3296$, OR=1,57 (0,58-4,28)] oraz grupą z wadą cewy nerwowej odcinka piersiowego i grupą kontrolną [$p=0,46$ w dokładnym dwustronnym teście Fishera, OR=0,32 (0,01-2,39)]. Ciekawy jest natomiast zupełny brak homozygot DRB1*07 w grupie z wadą cewy nerwowej odcinka piersiowego, podczas gdy w grupie z wadą cewy nerwowej odcinka lędźwiowego oraz w grupie kontrolnej jest ich po 5 (Rycina 3).

Ryc. 3. Rozkład homozygot i heterozygot w zakresie HLA DRB1

4.3. Polimorfizmy promotora genu dla TNF α

Analiza równowagi Hardy'ego i Weinberga polega na porównaniu wartości obserwowanych oraz oczekiwanych za pomocą testu χ^2 dla jednego stopnia swobody (tylko dla jednego, ponieważ wartości oczekiwane wylicza się z wartości obserwowanych). Uzyskane wyniki wskazują na brak odchylenia od równowagi dla polimorfizmu TNF α (-238)G \rightarrow A. Stwierdzono natomiast odchylenie od równowagi Hardy'ego i Weinberga dla polimorfizmu TNF α (-308)G \rightarrow A w całej grupie badanej ($p=0,029081$), w grupie kontrolnej ($p=0,003847$) oraz w grupie z wadą cewy nerwowej odcinka piersiowego ($p=0,032336$); co ciekawe, nie stwierdzono tego odchylenia w grupie z wadą cewy nerwowej odcinka lędźwiowego ($p=0,353468$).

Dla obu grup porównano liczebność obu alleli (częstość alleliczną) odpowiedzialnych za polimorfizm promotora TNF α (-238) i TNF α (-308). Stwierdzono brak różnicy pomiędzy całą grupą z wadą cewy nerwowej i grupą kontrolną oraz grupą z wadą cewy nerwowej odcinka lędźwiowego i piersiowego a grupą kontrolną w zakresie obu polimorfizmów. Należy jednak zauważyć, że w różnica w zakresie polimorfizmu TNF α (-308)G \rightarrow A pomiędzy grupą z wadą cewy nerwowej odcinka piersiowego i grupą kontrolną zbliżała się do granicy istotności statystycznej.

Tabela 8. Rozkład alleli G i A w pozycji -308 promotora genu dla TNF α . Cała grupa WCN i grupa kontrolna

Allel TNF α (-308)	WCN (całość)	Grupa kontrolna
A	40	32
G	182	194
<p>p=0,3039 w dokładnym dwustronnym teście Fishera; OR (95% CI)=1,332 (0,803-2,212) – dla allelu A jako czynnika ryzyka OR (95% CI)=0,751 (0,452-1,246) – dla allelu G jako czynnika ryzyka</p>		

Tabela 9. Rozkład alleli G i A w pozycji -308 promotora genu dla TNF α . WCN odcinka łędźwiowego i grupa kontrolna

Allel TNF α (-308)	WCN (odc. łędźwiowy)	Grupa kontrolna
A	24	32
G	126	194
<p>p=0,6585 w dokładnym dwustronnym teście Fishera; OR (95% CI)=1,155 (0,65-2,052) – dla allelu A jako czynnika ryzyka OR (95% CI)=0,866 (0,487-1,539) – dla allelu G jako czynnika ryzyka</p>		

Tabela 10. Rozkład alleli G i A w pozycji -308 promotora genu dla TNF α . WCN odcinka piersiowego i grupa kontrolna

Allel TNF α (-308)	WCN (odc. piersiowy)	Grupa kontrolna
A	15	32
G	47	194
<p>p=0,07916 w dokładnym dwustronnym teście Fishera; OR (95% CI)=1,935 (0,969-3,862) – dla allelu A jako czynnika ryzyka OR (95% CI)=0,517 (0,259-1,032) – dla allelu G jako czynnika ryzyka</p>		

Tabela 11. Rozkład alleli G i A w pozycji -238 promotora genu dla TNF α . Cała grupa WCN i grupa kontrolna

Allel TNF α (-238)	WCN (całość)	Grupa kontrolna
A	14	20
G	208	206
<p>p=0,3733 w dokładnym dwustronnym teście Fishera; OR (95% CI)=0,693 (0,341-1,410) – dla allelu A jako czynnika ryzyka OR (95% CI)=1,442 (0,709-2,933) – dla allelu G jako czynnika ryzyka</p>		

Tabela 12. Rozkład alleli G i A w pozycji -238 promotora genu dla TNF α . WCN odcinka lędźwiowego i grupa kontrolna

Allel TNF α (-238)	WCN (odc. lędźwiowy)	Grupa kontrolna
A	9	20
G	141	206
<p>p=0,3325 w dokładnym dwustronnym teście Fishera; OR (95% CI)=0,657 (0,291-1,486) – dla allelu A jako czynnika ryzyka OR (95% CI)=1,521 (0,673-3,437) – dla allelu G jako czynnika ryzyka</p>		

Tabela 13. Rozkład alleli G i A w pozycji -238 promotora genu dla TNF α . WCN odcinka lędźwiowego i grupa kontrolna

Allel TNF α (-238)	WCN (odc. piersiowy)	Grupa kontrolna
A	4	20
G	58	206
<p>p=0,7952 w dokładnym dwustronnym teście Fishera; OR (95% CI)=0,710 (0,234-2,161) – dla allelu A jako czynnika ryzyka OR (95% CI)=1,408 (0,463-4,282) – dla allelu G jako czynnika ryzyka</p>		

Z uwagi na informacje, że allel A w locus TNF α (-308) zwiększa aktywność promotora a allel A w locus TNF α (-238) zmniejsza aktywność promotora genu dla TNF α , porównano również w obu grupach liczbę osób posiadających przynajmniej jeden allel A z liczbą osób nieposiadających tego allelu. Nie stwierdzono różnicy pomiędzy całą grupą pacjentów z wadą cewy nerwowej i grupą kontrolną oraz pomiędzy grupą pacjentów z wadą cewy nerwowej odcinka lędźwiowego lub piersiowego i grupą kontrolną.

Tabela 14. Obecność allelu A w pozycji -308 promotora genu dla TNF α . Cała grupa WCN i grupa kontrolna

Polimorfizm TNF α (-308)	WCN (całość)	Grupa kontrolna
Allel A obecny	33	26
Brak allelu A	78	87
<p>p=0,2895 (dokładny dwustronny test Fishera), OR=1,42 (0,75-2,69)</p>		

Tabela 15. Obecność allelu A w pozycji -308 promotora genu dla TNF α . WCN odcinka łądzwiowego i grupa kontrolna

Polimorfizm TNF α (-308)	WCN (odc. łądzwiowy)	grupa kontrolna
Allel A obecny	21	26
Brak allelu A	54	87
p=0,4928 (dokładny dwustronny test Fishera), OR=1,30 (0,63-2,67)		

Tabela 16. Obecność allelu A w pozycji -308 promotora genu dla TNF α . WCN odcinka piersiowego i grupa kontrolna

Polimorfizm TNF α (-308)	WCN (odc. piersiowy)	grupa kontrolna
Allel A obecny	11	26
Brak allelu A	20	87
p=0,17 (dokładny dwustronny test Fishera); OR=1,84 (0,72-4,69)		

Tabela 17. Obecność allelu A w pozycji -238 promotora genu dla TNF α . Cała grupa WCN i grupa kontrolna

Polimorfizm TNF α (-238)	WCN (całość)	grupa kontrolna
Allel A obecny	14	19
Brak allelu A	97	94
p=0,45 (dokładny dwustronny test Fishera); OR=0,71 (0,34-1,5)		

Tabela 18. Obecność allelu A w pozycji -238 promotora genu dla TNF α . WCN odcinka łądzwiowego i grupa kontrolna

Polimorfizm TNF α (-238)	WCN (odc. łądzwiowy)	grupa kontrolna
Allel A obecny	9	19
Brak allelu A	66	94
p=0,41 (dokładny dwustronny test Fishera); OR=0,67 (0,29-1,58)		

Tabela 18. Obecność allelu A w pozycji -238 promotora genu dla TNF α . WCN odcinka lędźwiowego i grupa kontrolna

Polimorfizm TNF α (-238)	WCN (odc. piersiowy)	grupa kontrolna
Allel A obecny	4	19
Brak allelu A	27	94
p=0,78 (dokładny dwustronny test Fishera); OR= 0,73 (0,23-2,34)		

Biorąc pod uwagę fakt, że allele A obu polimorfizmów wpływają prawdopodobnie na aktywność promotora, można założyć, że znaczenie ma również liczba tych alleli u poszczególnych osób. Z tego powodu porównano grupę dzieci z wadą cewy nerwowej i grupę kontrolną pod względem liczebności genotypów GG, GA i AA dla obu polimorfizmów (tab. 19-24) W przypadku locus TNF α (-308) użyto testu Cochran'a i Armitage'a, ponieważ preferuje się go w sytuacji, gdy grupy wykazują odchylenie od równowagi Hardy'ego i Weinberga (113). W przypadku locus TNF α (-238) użyto testu χ^2 z poprawką Yatesa. Nie wykazano, aby grupy pacjentów z wadą cewy nerwowej, zarówno cała grupa jak i podgrupy pacjentów z wadą odcinka lędźwiowego i piersiowego różniły się od grupy kontrolnej w zakresie rozkładu genotypów polimorfizmów TNF α (-308)G \rightarrow A i TNF α (-238)G \rightarrow A od grupy kontrolnej. W przypadku drugiego z wymienionych polimorfizmów nie stwierdzono homozygot AA w grupie z wadą cewy nerwowej oraz tylko jedną homozygotę AA w grupie kontrolnej.

Tabela 19. Rozkład genotypów w zakresie polimorfizmu TNF α (-308)G \rightarrow A w całej grupie z WCN i w grupie kontrolnej

Genotyp TNF α (-308)	WCN (całość)	Grupa kontrolna
AA	7	6
GA	26	20
GG	78	87
χ^2 (trend) = 0,998, P = 0,3178 (df=1) χ^2 (model) = 0,3347, P = 0,5629 (df=1) Test Cochran'a i Armitage'a		

Tabela 20. Rozkład genotypów w zakresie polimorfizmu TNF α (-308)G \rightarrow A w grupie pacjentów z WCN odcinka lędźwiowego i w grupie kontrolnej

Genotyp TNF α (-308)	WCN (odc. lędźwiowy)	Grupa kontrolna
AA	3	6
GA	18	20
GG	54	87
χ^2 (trend) = 0,2004, P = 0,6544 (df=1) χ^2 (model) = 0,9963, P = 0,3182 (df=1)		

Tabela 21. Rozkład genotypów w zakresie polimorfizmu TNF α (-308)G \rightarrow A w grupie pacjentów z WCN odcinka piersiowego i w grupie kontrolnej

Genotyp TNF α (-308)	WCN (odc. piersiowy)	Grupa kontrolna
AA	4	6
GA	7	20
GG	20	87
χ^2 (trend) = 2,731, P = 0,09842 (df=1) χ^2 (model) = 0,1075, P = 0,743 (df=1)		

Tabela 22. Rozkład genotypów w zakresie polimorfizmu TNF α (-238)G \rightarrow A w całej grupie z WCN i w grupie kontrolnej

Genotyp TNF α (-238)	WCN (całość)	Grupa kontrolna
AA	0	1
GA	14	18
GG	97	94
$\chi^2=1,432, p=0,49$ (df=2)		

Tabela 23. Rozkład genotypów w zakresie polimorfizmu TNF α (-238)G \rightarrow A w grupie z WCN odcinka lędźwiowego i w grupie kontrolnej

Genotyp TNF α (-238)	WCN (odc. lędźwiowy)	Grupa kontrolna
AA	0	1
GA	9	18
GG	66	94
$\chi^2=1,185, p=0,554$ (df=2)		

Tabela 24. Rozkład genotypów w zakresie polimorfizmu TNF α (-238)G \rightarrow A w grupie z WCN odcinka piersiowego i w grupie kontrolnej

Genotyp TNF α (-238)	WCN (odc. piersiowy)	Grupa kontrolna
AA	0	1
GA	4	18
GG	27	94
$\chi^2=0,418$, $p=0,81$ (df=2)		

4.4. Haplotypy

Poniżej zamieszczono wyliczone za pomocą programu PHASE częstości haplotypów (z odchyleniem standardowym SD) oraz wartości (dopasowane przez program) najlepiej określające liczebność poszczególnych haplotypów. U niektórych dzieci z wadą cewy nerwowej nie udało się wytypować HLA-DRB1, program PHASE potrafi jednak wyliczyć najbardziej prawdopodobny allel w danej lokalizacji na podstawie danych pochodzących z analizy genotypów pozostałych członków grupy. Wartość p (prawa kolumna) wyliczona została na podstawie liczebności danego haplotypu uzyskanej za pomocą programu PHASE.

Uzyskane wartości prawdopodobieństwa porównuje się ze skorygowaną wartością p_c po poprawce Bonferroni przedstawioną w dolnej części tabeli. Różnicę uznaje się za znamienne, jeżeli $p < p_c$. Przedstawiono również wynik testu G określający różnicę globalnego rozkładu haplotypów dla całej grupy. Z uwagi na właściwości testu, jeżeli suma wartości w jednym rzędzie była mniejsza niż 3, rzędy takie zostały zsumowane. Ponieważ mogło to niekiedy dawać fałszywie dodatnie wyniki, dodatkowo podano dane po eliminacji grupy zawierającej zsumowane dane.

Porównanie całej grupy z wadą cewy nerwowej oraz grupy kontrolnej w zakresie triallelicznych haplotypów (tab. 25) wykazało brak istotnych różnic pomiędzy grupami w teście permutacji. Test G wykazał natomiast wysoce znamienne różnicę częstości haplotypów dla przedstawionego rozkładu haplotypów, wyliczonego jako najbardziej prawdopodobny. Stwierdzono również znamienne częstsze występowanie haplotypu DRB1*07-(-238)G-(-308)G w grupie z wadą cewy nerwowej niż w grupie kontrolnej ($p=0,001$ przy $p_c=0,00172$).

Nie wykazano różnicy pomiędzy grupą dzieci z wadą cewy nerwowej odcinka piersiowego oraz grupą kontrolną w zakresie triallelicznych haplotypów (tab. 26) w teście

permutacji. Test G wykazał natomiast wysoce znamiennej różnicę globalnej częstości haplotypów dla przedstawionego rozkładu haplotypów, wyliczonego jako najbardziej prawdopodobny. Pomimo znamiennej wartości p w teście Fishera dla dwóch haplotypów nie można tej zależności uznać za istotną statystycznie, ponieważ wartość $p > p_c$.

Porównanie grupy z wadą cewy nerwowej odcinka lędźwiowego oraz grupy kontrolnej w zakresie triallelicznych haplotypów (tab. 27) wykazało brak istotnych różnic pomiędzy grupami w teście permutacji. Test G wykazał natomiast wysoce znamiennej różnicę częstości haplotypów dla przedstawionego rozkładu haplotypów, wyliczonego jako najbardziej prawdopodobny. Pomimo znamiennej wartości p w teście Fishera dla dwóch haplotypów nie można tej zależności uznać za istotną statystycznie, ponieważ wartość $p > p_c$. Należy jednak zauważyć, że w przypadku haplotypu DRB1*07-(-238)G-(-308)G, wartość $p=0,0018$ jest bardzo bliska wartości p_c . Świadczy to o tym, że za istotność statystyczną dotyczącą tego haplotypu dla całej grupy z wadą cewy nerwowej odpowiada głównie różnica w zakresie odcinka lędźwiowego, gdyż dla odcinka piersiowego wartość p bez korekcji na porównania wielokrotne jest jedynie nieznacznie mniejsza od 0,05.

Tabela 25. Porównanie rozkładu haplotypów triallelicznych w całej grupie pacjentów z WCN oraz w grupie kontrolnej

Haplotyp	WCN (całość)			Grupa kontrolna			Wartość p w dokładnym dwustronnym teście Fishera
	Częstość	SD	Liczba haplotypów	Częstość	SD	Liczba haplotypów	
*01GG	0,113783	0,006562	30	0,132508	0,003458	31	p=0,999
*01GA	0,001410	0,002114		0,006033	0,002336	1	p=1
*01AG	0,001557	0,002529		0,003052	0,002826		
*02GG	0,000106	0,000684		0,000000	0,000000		
*03GG	0,015932	0,005429	2	0,029423	0,007090	7	p=0,175
*03GA	0,095978	0,005239	23	0,043492	0,003982	10	p=0,018 [OR=2,5 (1,10-5,78)]
*03AG	0,000000	0,000000		0,013809	0,006680	2	p=0,5
*03AA	0,000000	0,000000		0,001771	0,002653	1	p=1
*04GG	0,088980	0,006644	19	0,061947	0,000000	14	p=0,37
*04GA	0,002186	0,002558		0,008850	0,000000	2	p=0,5
*05GG	0,000269	0,001068		0,000000	0,000000		
*06GG	0,000071	0,000560		0,000000	0,000000		
*07GG	0,162888	0,009526	40	0,089970	0,007374	17	p=0,001 [OR=2,70 (1,43-5,16)]#
*07GA	0,016916	0,005904	3	0,023123	0,003614	6	p=0,503
*07AG	0,049289	0,005565	13	0,049923	0,006947	14	p=0,999
*07AA	0,000836	0,001751		0,000701	0,001617		
*08GG	0,016155	0,003747	4	0,028770	0,004597	7	p=0,544
*08GA	0,003406	0,003068		0,004766	0,004060	1	p=0,999
*08AG	0,000000	0,000000		0,001863	0,002185		
*09GG	0,005285	0,002346	1	0,017699	0,000000	4	p=0,372
*09GA	0,000220	0,000971		0,000000	0,000000		
*10GG	0,009768	0,001687	2	0,004425	0,000000	1	p=0,62
*11GG	0,104213	0,006611	21	0,130543	0,004423	31	p=0,185
*11GA	0,011616	0,002577	3	0,004063	0,003177		p=0,12
*11AG	0,001181	0,001981		0,002562	0,002976		
*12GG	0,013844	0,004022	3	0,034115	0,003614	8	p=0,221
*12GA	0,005183	0,001639	1	0,005708	0,003614	1	p=0,999
*12AG	0,001142	0,001960		0,000000	0,000000		
*13GG	0,073280	0,009257	14	0,110774	0,006076	24	p=0,127
*13GA	0,022042	0,006012	6	0,018458	0,005266	5	p=0,77
*13AG	0,001769	0,002399		0,003511	0,002848	1	p=1
*13AA	0,000568	0,001496		0,000000	0,000000		
*14GG	0,019351	0,003894	4	0,023270	0,001938	5	p=1
*14AG	0,004677	0,003114	1	0,003279	0,001938	1	p=0,999
*15GG	0,100621	0,006801	22	0,081663	0,005381	18	p=0,51
*15GA	0,005026	0,004140		0,007144	0,004384	2	p=0,5
*15AG	0,000000	0,000000		0,004113	0,003582	1	p=1
*16GG	0,035458	0,005608	7	0,037129	0,004102	10	p=0,622
*16GA	0,009915	0,003377	3	0,007633	0,004263	1	p=0,37
*16AG	0,002045	0,002695		0,002909	0,002942		
*16AA	0,000000	0,000000		0,001002	0,002168		

Dla testu Fishera: $p_c=0,00172$ #-istotne statystycznie

Porównanie obu grup (test permutacji), $p=0,29$

Test *log-likelihood ratio*: $G^2 = 44,96$, $p=0,0006944$ (df=19),
po usunięciu zsumowanych danych: $G^2=35,87$, $p=0,007336$ (df=18)

Tabela 26. Porównanie rozkładu haplotypów triallelicznych w grupie pacjentów z WCN odcinka piersiowego oraz w grupie kontrolnej

Haplotyp	WCN (odc. piersiowy)			Grupa kontrolna			Wartość p, dokładny dwustronny test Fishera
	Częstość	SD	Liczba haplotypów	Częstość	SD	Liczba haplotypów	
*01GG	0,161533	0,011894	11	0,131018	0,003910	31	p=0,421
*01GA	0,001973	0,005285		0,007153	0,002567	1	p=1
*01AG	0,002993	0,006270		0,003422	0,002966		
*02GG	0,000338	0,002311		0,000000	0,000000		
*03GG	0,007774	0,011598		0,034507	0,007717	7	p=0,352
*03GA	0,123087	0,009673	8	0,040921	0,004877	10	p=0,032 [OR=3,20 (1,09-9,32)]
*03AG	0,000000	0,000000		0,010917	0,007079	2	p=0,999
*03AA	0,000000	0,000000		0,002151	0,002688	1	p=1
*04GG	0,067167	0,006570	4	0,061947	0,000000	14	p=1
*04GA	0,000000	0,000000		0,008850	0,000000	2	p=0,999
*07GG	0,154860	0,020274	11	0,089321	0,007845	17	p=0,027 [OR=2,65 (1,08-6,43)]
*07GA	0,026674	0,015423		0,023302	0,003475	6	p=0,346
*07AG	0,043991	0,014633	4	0,049584	0,007199	14	p=1
*07AA	0,004317	0,007141		0,001510	0,002262		
*08GG	0,033496	0,004863	2	0,028964	0,004678	7	p=0,999
*08GA	0,000000	0,000000		0,004431	0,003862	1	p=1
*08AG	0,000000	0,000000		0,002003	0,002202		
*09GG	0,000381	0,002450		0,017699	0,000000	4	p=0,58
*10GG	0,000000	0,000000		0,004425	0,000000	1	p=1
*11GG	0,067253	0,008334	4	0,129067	0,005032	31	p=0,186
*11GA	0,017503	0,004502	1	0,004318	0,003263		p=0,215
*11AG	0,000000	0,000000		0,003784	0,003569		
*12GG	0,001479	0,004655		0,035335	0,003832	8	p=0,208
*12GA	0,000000	0,000000		0,004488	0,003832	1	p=1
*13GG	0,097894	0,017957	5	0,109290	0,006458	24	p=0,642
*13GA	0,041057	0,016137	4	0,019176	0,005548	5	p=0,1
*13AG	0,006775	0,008915		0,004278	0,003049	1	p=1
*13AA	0,003099	0,006354		0,000000	0,000000		
*14GG	0,016773	0,003158	1	0,024349	0,002212	5	p=0,999
*14AG	0,000000	0,000000		0,002200	0,002212	1	p=1
*15GG	0,067263	0,006686	4	0,079846	0,006328	18	p=0,999
*15GA	0,000000	0,000000		0,007496	0,004811	2	p=0,999
*15AG	0,000000	0,000000		0,005579	0,003894	1	p=1
*16GG	0,022862	0,010938	1	0,037729	0,004639	10	p=0,47
*16GA	0,024226	0,008064	2	0,007875	0,004875	1	p=0,11
*16AG	0,003343	0,006538		0,001994	0,002559		
*16AA	0,000000	0,000000		0,001074	0,001984		
Dla testu Fishera: $p_c=0,00172$				#-istotnie statystycznie			
Porównanie obu grup (test permutacji), $p=0,56$, grupy nie różnią się od siebie							
Test <i>log-likelihood ratio</i> : $G^2=33,75$, $p=0,009046$ (df=17)							
po usunięciu danych zsumowanych: $G^2=31,13$, $p=0,01295$ (df=16)							

Tabela 27. Porównanie rozkładu haplotypów triallelicznych w grupie pacjentów z WCN odcinka łądźwiowego oraz w grupie kontrolnej

Haplotyp	WCN (odc. łądźwiowy)			Grupa kontrolna			Wartość p, dokładny dwustronny test Fishera
	Częstość	SD	Liczba haplotypów	Częstość	SD	Liczba haplotypów	
*01GG	0,095080	0,008048	13	0,132082	0,004395	31	p=0,144
*01GA	0,000675	0,002011		0,006643	0,002798	1	p=1
*01AG	0,002413	0,003204		0,002868	0,002923		
*02GG	0,000196	0,001125		0,000000	0,000000		
*03GG	0,026997	0,012185	2	0,032787	0,007483	7	p=0,326
*03GA	0,085376	0,010436	15	0,040441	0,005322	10	p=0,055 [OR=2,40 (0,98-5,94)]
*03AG	0,000000	0,000000		0,012701	0,006418	2	p=0,519
*03AA	0,000000	0,000000		0,002567	0,002726	1	p=1
*04GG	0,097074	0,007856	14	0,061947	0,000000	14	p=0,32
*04GA	0,003459	0,003943		0,008850	0,000000	2	p=0,52
*05GA	0,000101	0,000816		0,000000	0,000000		
*06GG	0,000274	0,001323		0,000000	0,000000		
*07GG	0,161117	0,010926	28	0,090683	0,006847	17	p=0,0018 [OR=2,82 (1,42-5,64)]
*07GA	0,016467	0,005684	2	0,022923	0,003923	6	p=0,48
*07AG	0,046289	0,005403	8	0,048416	0,006215	14	p=0,82
*07AA	0,000000	0,000000		0,001694	0,002520		
*08GG	0,010877	0,005228	1	0,027163	0,003878	7	p=0,152
*08GA	0,003898	0,004343	1	0,006045	0,003592	1	p=0,999
*08AG	0,000000	0,000000		0,002191	0,002212		
*09GG	0,007245	0,003127	1	0,017699	0,000000	4	p=0,652
*09GA	0,000583	0,001912		0,000000	0,000000		
*10GG	0,013796	0,001816	2	0,004425	0,000000	1	p=0,566
*11GG	0,105976	0,008114	14	0,130609	0,004680	31	p=0,256
*11GA	0,009940	0,003959	2	0,003322	0,003033		p=0,158
*11AG	0,001203	0,002563		0,003237	0,003502		
*12GG	0,020086	0,006413	3	0,034113	0,003618	8	p=0,537
*12GA	0,007645	0,002396	1	0,005710	0,003618	1	p=0,999
*12AG	0,002323	0,003176		0,000000	0,000000		
*13GG	0,063912	0,008754	9	0,110148	0,006317	24	p=0,139
*13GA	0,010434	0,005444	1	0,018976	0,005325	5	p=0,409
*13AG	0,000000	0,000000		0,003620	0,002853	1	p=1
*14GG	0,021770	0,006346	3	0,023580	0,002079	5	p=0,724
*14AG	0,006529	0,004685	1	0,002969	0,002079	1	p=0,999
*15GG	0,112865	0,010541	22	0,080909	0,005373	18	p=0,042 [OR=1,99 (0,98-4,04)]
*15GA	0,009804	0,008260		0,007618	0,004210	2	p=0,519
*15AG	0,000000	0,000000		0,004393	0,003408	1	p=1
*16GG	0,044605	0,006314	6	0,038124	0,004500	10	p=1
*16GA	0,004300	0,003656	1	0,006709	0,004384	1	p=0,999
*16AG	0,001244	0,002597		0,002595	0,002607		
*16AA	0,000000	0,000000		0,001245	0,002402		

Dla testu Fishera: $p_c=0,00172$ #-istotne statystycznie

Porównanie obu grup (test permutacji), $p=0,37$, grupy nie różnią się od siebie

Test *log-likelihood ratio*: $G^2 = 34$, $p=0,008403$ (df=17)

po usunięciu danych zsumowanych $G^2 = 33,11$, $p=0,007157$ (df=16)

Tabela 28. Porównanie rozkładu haplotypów biallelicznych [DRB1,TNF α (-308)] w całej grupie pacjentów z WCN oraz w grupie kontrolnej

Haplotyp DRB1, -308	WCN (całość)			Grupa kontrolna			Wartość p w dwustronnym dokładnym teście Fishera
	Częstość	SD	Liczba haplotypów	Częstość	SD	Liczba haplotypów	
*01G	0,115249	0,006390	30	0,134785	0,002534	31	0,999
*01A	0,002138	0,002791		0,006808	0,002534	1	p=1
*02G	0,000050	0,000470		0,000000	0,000000		
*03G	0,018424	0,006886	2	0,044252	0,004500	9	p=0,0623 [OR=0,22 (0,02-1,08)]
*03A	0,093484	0,006038	23	0,044244	0,004500	11	p=0,0323 [OR=2,26 (1,02-5,08)]
*04G	0,088064	0,005168	19	0,061947	0,000000	14	p=0,37
*04A	0,002812	0,003063		0,008850	0,000000	2	p=0,5
*06G	0,000107	0,000685		0,000000	0,000000		
*07G	0,214407	0,008593	53	0,139807	0,004242	30	p=0,005 [OR=2,05 (1,22-3,46)]
*07A	0,018870	0,006710	3	0,023910	0,004242	7	p=0,33
*08G	0,017524	0,004305	4	0,031068	0,003762	7	p=0,54
*08A	0,002331	0,002925		0,004330	0,003762	1	p=1
*09G	0,005384	0,002467	1	0,017699	0,000000	4	p=0,37
*09A	0,000237	0,001007		0,000000	0,000000		
*10G	0,009719	0,001737	2	0,004425	0,000000	1	p=0,62
*11G	0,103380	0,005927	21	0,133034	0,003044	31	p=0,185
*11A	0,011966	0,002736	3	0,004134	0,003044		p=0,121
*12G	0,014619	0,003469	3	0,033958	0,003757	8	p=0,22
*12A	0,005330	0,001825	1	0,005865	0,003757	1	p=0,999
*13G	0,073560	0,007783	14	0,112304	0,005379	25	p=0,09 [OR=0,54 (0,26-1,12)]
*13A	0,022776	0,007085	6	0,020439	0,005379	5	p=0,77
*14G	0,024057	0,002772	5	0,026549	0,000000	6	p=0,999
*15G	0,099371	0,005819	22	0,086262	0,004140	19	p=0,625
*15A	0,005573	0,004438		0,006659	0,004140	2	p=0,5
*16G	0,037403	0,004193	7	0,041167	0,004772	11	p=0,476
*16A	0,010049	0,003339	3	0,007506	0,004772		p=0,121
Dla testu Fishera: $p_c=0,0022$				#-istotne statystycznie			
Porównanie obu grup (test permutacji), $p=0,3$							
Test <i>log-likelihood ratio</i> : $G^2 = 43,2$, $p=0,0007491$ (df=18)							
po usunięciu danych zsumowanych: $G^2 = 38,17$, $p=0,002331$ (df=17)							

Porównanie całej grupy dzieci z wadą cewy nerwowej oraz grupy kontrolnej w zakresie biallelicznych haplotypów DRB1 i TNF α (-308) (tab. 28) wykazało brak istotnych różnic pomiędzy grupami w teście permutacji. Test G wykazał natomiast wysoce znamiennej różnicę częstości haplotypów dla przedstawionego rozkładu haplotypów, wyliczonego jako najbardziej prawdopodobny. Pomimo znamiennej wartości p w teście Fishera dla dwóch haplotypów nie można tej zależności uznać za istotną statystycznie, ponieważ wartość $p > p_c$. Należy zwrócić jednak uwagę na haplotyp DRB1*07-TNF α (-

308)G, dla którego wartość $p=0,005$ zbliża się wyraźnie do $p_c=0,0022$. Koreluje to z wartościami dla haplotypów triallelicznych.

Tabela 29. Porównanie rozkładu haplotypów biallelicznych [DRB1,TNF α (-308)] w grupie pacjentów z WCN odcinka piersiowego oraz w grupie kontrolnej

Haplotyp DRB1, -308	WCN (odc. piersiowy)			Grupa kontrolna			Wartość p, dokładny dwustronny test Fishera
	Częstość	SD	Liczba haplotypów	Częstość	SD	Liczba haplotypów	
*01G	0,163241	0,009648	11	0,134357	0,002910	31	p=0,42
*01A	0,002630	0,005959		0,007236	0,002910	1	p=1
*03G	0,010276	0,012253		0,046908	0,005197	9	p=0,21
*03A	0,119961	0,011079	8	0,041588	0,005197	11	p=0,039 [OR=2,90 (1,0-8,25)]
*04G	0,066864	0,005688	4	0,061947	0,000000	14	p=1
*04A	0,000000	0,000000		0,008850	0,000000	2	p=0,999
*07G	0,202304	0,017758	15	0,138823	0,004422	30	p=0,047 [OR=2,09 (0,98-4,41)]
*07A	0,028567	0,016339		0,024894	0,004422	7	p=0,352
*08G	0,033894	0,004869	2	0,029859	0,004171	7	p=0,999
*08A	0,000000	0,000000		0,005539	0,004171	1	p=1
*09G	0,000727	0,003347		0,017699	0,000000	4	p=0,581
*10G	0,000500	0,002796		0,004425	0,000000	1	p=1
*11G	0,066138	0,009814	4	0,132904	0,003357	31	p=0,186
*11A	0,018300	0,005505		0,004264	0,003357		
*12G	0,000705	0,003298		0,034629	0,004105	8	p=0,208
*12A	0,000000	0,000000		0,005194	0,004105	1	p=1
*13G	0,100946	0,017427	5	0,113413	0,005183	25	p=0,641
*13A	0,047687	0,016174	4	0,019331	0,005183	5	p=0,104
*14G	0,016908	0,003459	1	0,026549	0,000000	6	p=0,999
*15G	0,067952	0,007247	4	0,085878	0,004858	19	p=0,793
*15A	0,000000	0,000000		0,007043	0,004858	2	p=0,999
*16G	0,024669	0,008711	1	0,039867	0,005291	11	p=0,472
*16A	0,024790	0,008042	2	0,008806	0,005291		p=0,046 [OR=4,77 (3,81-5,97)]
Dla testu Fishera: $p_c=0,0022$				#-istotne statystycznie			
Porównanie obu grup (test permutacji), $p=0,46$							
Test <i>log-likelihood ratio</i> : $G^2=28,71$, $p=0,01751$ (df=15)							
po usunięciu danych zsumowanych: $G^2=28,7$, $p=0,01146$ (df=14)							

Porównanie grupy dzieci z wadą cewy nerwowej odcinka piersiowego oraz grupy kontrolnej w zakresie biallelicznych haplotypów DRB1 i TNF α (-308) (tab. 29) wykazało brak istotnych różnic pomiędzy grupami w teście permutacji. Test G wykazał natomiast znamiennej różnicę częstości haplotypów dla przedstawionego rozkładu haplotypów, wyliczonego jako najbardziej prawdopodobny. Pomimo znamiennej wartości p w teście Fishera dla trzech haplotypów nie można tej zależności uznać za istotną statystycznie,

ponieważ wartość p jest na granicy znaczenia nawet bez korekcji na porównania wielokrotne i jest znacznie większa od wartości p_c .

Tabela 30. Porównanie rozkładu haplotypów biallelicznych [DRB1,TNF α (-308)] w grupie pacjentów z WCN odcinka lędźwiowego oraz w grupie kontrolnej

Haplotyp DRB1, -308	WCN (odc. lędźwiowy)			Grupa kontrolna			Wartość p, dwustronny dokładny test Fishera
	Częstość	SD	Liczba haplotypów	Częstość	SD	Liczba haplotypów	
*01G	0,096041	0,007447	13	0,135046	0,002804	31	p=0,144
*01A	0,000200	0,001138		0,006547	0,002804	1	p=1,0
*02G	0,000080	0,000726		0,000000	0,000000		
*03G	0,028255	0,009649	2	0,045299	0,004790	9	p=0,211
*03A	0,083421	0,008566	15	0,043197	0,004790	11	p=0,06
*04G	0,095053	0,007486	14	0,061947	0,000000	14	p=0,316
*04A	0,004994	0,004847		0,008850	0,000000	2	p=0,519
*05G	0,000338	0,001462		0,000000	0,000000		
*06G	0,000106	0,000833		0,000000	0,000000		
*07G	0,213588	0,009607	37	0,139596	0,004075	30	p=0,0058 [OR=2,14 (1,21-3,78)]
*07A	0,013790	0,005133	1	0,024121	0,004075	7	p=0,152
*08G	0,008176	0,005682	1	0,028967	0,004210	7	p=0,152
*08A	0,006907	0,004957	1	0,006431	0,004210	1	p=0,999
*09G	0,008099	0,003599	1	0,017699	0,000000	4	p=0,652
*09A	0,000349	0,001486		0,000000	0,000000		
*10G	0,014215	0,002438	2	0,004425	0,000000	1	p=0,566
*11G	0,106675	0,008103	14	0,133999	0,002876	31	p=0,256
*11A	0,010920	0,003740	2	0,003169	0,002876		p=0,158
*12G	0,020438	0,003883	3	0,033498	0,003963	8	p=0,537
*12A	0,008418	0,003132	1	0,006325	0,003963	1	p=0,999
*13G	0,065883	0,008028	9	0,113109	0,005282	25	p=0,102
*13A	0,010635	0,004787	1	0,019634	0,005282	5	p=0,409
*14G	0,028411	0,003230	4	0,026549	0,000000	6	p=0,999
*14A	0,000101	0,000816		0,000000	0,000000		
*15G	0,112476	0,010460	21	0,085087	0,004202	19	p=0,09
*15A	0,009381	0,007395	1	0,007833	0,004202	2	p=0,999
*16G	0,045062	0,004706	6	0,042036	0,004809	11	p=0,803
*16A	0,003842	0,003677	1	0,006636	0,004809		p=0,399
Dla testu Fishera: $p_c=0,0022$				#-istotne statystycznie			
Porównanie obu grup (test permutacji), $p=0,37$, grupy nie różnią się od siebie							
Test <i>log-likelihood ratio</i> : $G^2 = 32,7$, $p=0,0123$ (df=17)							
po usunięciu danych zsumowanych: $G^2 = 32,27$, $p=0,009216$ (df=16)							

Porównanie grupy dzieci z wadą cewy nerwowej odcinka lędźwiowego oraz grupy kontrolnej w zakresie biallelicznych haplotypów DRB1 i TNF α (-308) (tab. 30) wykazało brak istotnych różnic pomiędzy grupami w teście permutacji. Test G wykazał natomiast wysoce znaczącą różnicę częstości haplotypów dla przedstawionego rozkładu haplotypów, wyliczonego jako najbardziej prawdopodobny. Pomimo znaczącej wartości p w teście Fishera dla jednego haplotypu nie można tej zależności uznać za istotną

statystycznie, ponieważ wartość $p > p_c$. Należy zwrócić jednak uwagę, że wartość $p=0,0058$) zbliża się wyraźnie do $p_c=0,0022$. Koreluje to z wartościami dla haplotypów triallelicznych.

Tabela 31. Porównanie rozkładu haplotypów biallelicznych [DRB1,TNF α (-238)] w całej grupie pacjentów z WCN oraz w grupie kontrolnej

Haplotyp DRB1, -238	WCN (całość)			Grupa kontrolna			Wartość p w dwustronnym dokładnym teście Fishera
	Częstość	SD	Liczba haplotypów	Częstość	SD	Liczba haplotypów	
*01G	0,113325	0,006370	24	0,141572	0,002811	32	p=0,32
*01A	0,002520	0,003406		0,002573	0,002811		
*02G	0,000098	0,000650		0,000000	0,000000		
*03G	0,112124	0,005726	31	0,073704	0,005691	17	p=0,032 [OR=2,0 (1,03-3,90)]
*03A	0,000860	0,001995		0,007377	0,005691	3	p=0,25
*04G	0,088457	0,004238	19	0,072072	0,000000	16	p=0,6
*04A	0,001125	0,002059		0,000000	0,000000		
*05G	0,000169	0,000849		0,000000	0,000000		
*06G	0,000148	0,000797		0,000000	0,000000		
*06A	0,000110	0,000690		0,000000	0,000000		
*07G	0,174313	0,006839	43	0,110084	0,005400	23	p=0,0074 [OR=2,12 (1,19-3,79)]
*07A	0,057559	0,006957	13	0,056583	0,005400	14	p=0,999
*08G	0,019074	0,002429	4	0,034219	0,002210	7	p=0,543
*08A	0,000217	0,000955		0,001817	0,002210	1	p=1
*09G	0,005004	0,001493	1	0,018018	0,000000	4	p=0,372
*09A	0,000204	0,000927		0,000000	0,000000		
*10G	0,009333	0,001380	2	0,004505	0,000000	1	p=0,62
*11G	0,113650	0,005764	24	0,136742	0,003478	31	p=0,389
*11A	0,001690	0,002644		0,002898	0,003478		
*12G	0,018195	0,003179	4	0,040541	0,000000	9	p=0,26
*12A	0,001671	0,002383		0,000000	0,000000		
*13G	0,093881	0,005863	20	0,125730	0,003193	30	p=0,177
*13A	0,002712	0,003467		0,004901	0,003193		
*14G	0,018684	0,004093	4	0,024152	0,002165	5	p=1
*14A	0,005542	0,003730	1	0,002875	0,002165	1	p=0,999
*15G	0,103887	0,005327	22	0,088690	0,003737	20	p=0,747
*15A	0,001502	0,002559		0,005904	0,003737	1	p=1
*16G	0,045850	0,004528	10	0,044387	0,001591	11	p=0,999
*16A	0,002464	0,003484		0,000658	0,001591		
Dla testu Fishera: $p_c=0,0028$				#-istotne statystycznie			
Porównanie obu grup (test permutacji), $p=0,47$, grupy nie różnią się od siebie							
Test log-likelihood ratio: $G^2=25,14$, $p=0,04807$ (df=15)							
po usunięciu danych zsumowanych: $G^2=24,12$, $p=0,04429$ (df=14)							

Porównanie całej grupy pacjentów z wadą cewy nerwowej oraz grupy kontrolnej w zakresie biallelicznych haplotypów DRB1 i TNF α (-238) (tab. 31) wykazało brak istotnych różnic pomiędzy grupami w teście permutacji. Test G wykazał natomiast granicznie znamiennej różnicę częstości haplotypów dla przedstawionego rozkładu

haplotypów, wyliczonego jako najbardziej prawdopodobny. Pomimo znamiennej wartości p w teście Fishera dla dwóch haplotypów nie można tej zależności uznać za istotną statystycznie, ponieważ wartość $p > p_c$. Należy zwrócić jednak uwagę, że wartość $p=0,0074$ zbliża się do $p_c=0,0028$ dla haplotypu *07G. Koreluje to z wartościami dla haplotypów triallelicznych.

Tabela 32. Porównanie rozkładu haplotypów biallelicznych [DRB1,TNF α (-238)] w grupie pacjentów z WCN odcinka piersiowego oraz w grupie kontrolnej

Haplotyp DRB1, -238	WCN (odc. piersiowy)			Grupa kontrolna			Wartość p w dwustronnym dokładnym teście Fishera
	Częstość	SD	Liczba haplotypów	Częstość	SD	Liczba haplotypów	
*01G	0,161192	0,009821	11	0,139038	0,002801	32	$p=0,546$
*01A	0,003455	0,006617		0,002555	0,002801		
*02G	0,000172	0,001656		0,000000	0,000000		
*03G	0,131978	0,006764	8	0,074640	0,005657	17	$p=0,203$
*03A	0,000000	0,000000		0,013855	0,005657	3	$p=0,999$
*04G	0,065738	0,004282	4	0,070796	0,000000	16	$p=0,999$
*07G	0,183086	0,016427	11	0,112940	0,006603	23	$p=0,12$
*07A	0,048286	0,013328	4	0,050776	0,006603	14	$p=1$
*08G	0,033296	0,003957	2	0,033161	0,002212	7	$p=0,999$
*08A	0,000000	0,000000		0,002238	0,002212	1	$p=1$
*09G	0,000564	0,002964		0,017699	0,000000	4	$p=0,581$
*10G	0,000579	0,002999		0,004425	0,000000	1	$p=1$
*11G	0,084743	0,007783	5	0,132569	0,003401	31	$p=0,283$
*11A	0,000000	0,000000		0,004600	0,003401		
*12G	0,000834	0,003571		0,039823	0,000000	9	$p=0,213$
*13G	0,142292	0,013274	9	0,129030	0,002907	30	$p=0,834$
*13A	0,008116	0,009218		0,003713	0,002907		
*14G	0,016740	0,003078	1	0,024524	0,002204	5	$p=0,999$
*14A	0,000000	0,000000		0,002025	0,002204	1	$p=1$
*15G	0,066750	0,006554	4	0,087336	0,003751	20	$p=0,795$
*15A	0,000000	0,000000		0,005584	0,003751	1	$p=1$
*16G	0,045113	0,008744	3	0,045523	0,003210	11	$p=1$
*16A	0,004659	0,007310		0,003150	0,003210		
Dla testu Fishera: $p_c=0,0028$				#-istotne statystycznie			
Porównanie obu grup (test permutacji), $p=0,87$							
Test <i>log-likelihood ratio</i> : $G^2 = 15,62$, $P = 0,3373$ ($df = 14$)							
po usunięciu danych zsumowanych: $G^2 = 13,66$, $p=0,3981$ ($df=13$)							

Porównanie grupy dzieci z wadą cewy nerwowej odcinka piersiowego oraz grupy kontrolnej w zakresie biallelicznych haplotypów DRB1 i TNF α (-238) (tab. 32) wykazało brak istotnych różnic pomiędzy grupami w teście permutacji. Podobnie w teście G nie stwierdzono różnicy w częstości haplotypów dla przedstawionego rozkładu haplotypów, wyliczonego jako najbardziej prawdopodobny. Dla żadnego z haplotypów nie uzyskano wartości p sugerujących istotność statystyczną nawet bez poprawki Bonferroni.

Tabela 33. Porównanie rozkładu haplotypów biallelicznych [DRB1,TNF α (-238)] w grupie pacjentów z WCN odcinka lędźwiowego oraz w grupie kontrolnej

Haplotyp DRB1,-238	WCN (odc. lędźwiowy)			Grupa kontrolna			Wartość p, dokładny dwustronny test Fishera
	Częstość	SD	Liczba haplotypów	Częstość	SD	Liczba haplotypów	
*01G	0,094553	0,007730	13	0,138714	0,003015	32	p=0,143
*01A	0,001716	0,002915		0,002879	0,003015		
*02G	0,000087	0,000757		0,000000	0,000000		
*03G	0,113994	0,006912	16	0,075989	0,006029	17	p=0,352
*03A	0,000000	0,000000		0,012506	0,006029	3	p=0,279
*04G	0,099368	0,006203	14	0,070796	0,000000	16	p=0,443
*05G	0,000131	0,000924		0,000000	0,000000		
*06G	0,000172	0,001056		0,000000	0,000000		
*07G	0,178553	0,009691	31	0,111113	0,006149	23	p=0,0065 [OR=2,30 (1,23-4,30)]
*07A	0,046944	0,005321	7	0,052604	0,006149	14	p=0,649
*08G	0,014945	0,003362	2	0,032870	0,002190	7	p=0,326
*08A	0,000000	0,000000		0,002528	0,002190	1	p=1
*09G	0,007949	0,003211	1	0,017699	0,000000	4	p=0,652
*10G	0,014116	0,002377	2	0,004425	0,000000	1	p=0,566
*11G	0,114757	0,008364	16	0,133861	0,003423	31	p=0,428
*11A	0,001170	0,002536		0,003307	0,003423		
*12G	0,027304	0,005819	4	0,039823	0,000000	9	p=0,576
*12A	0,002801	0,003291		0,000000	0,000000		
*13G	0,074735	0,007438	10	0,128735	0,003383	30	p=0,059 [OR=0,47 (0,21-1,03)]
*13A	0,000000	0,000000		0,004008	0,003383		
*14G	0,022625	0,006462	2	0,023790	0,002144	5	p=0,71
*14A	0,005789	0,004950	2	0,002759	0,002144	1	p=0,566
*15G	0,121530	0,006876	23	0,087818	0,003500	20	p=0,068 [OR=1,87 (0,94-3,70)]
*15A	0,000000	0,000000		0,005102	0,003500	1	p=1
*16G	0,049887	0,006946	7	0,045870	0,002825	11	p=1
*16A	0,001579	0,002834		0,002802	0,002825		
Dla testu Fishera: $p_c=0,0028$				#-istotnie statystycznie			
Porównanie obu grup (test permutacji), $p=0,37$, grupy nie różnią się od siebie							
Test log-likelihood ratio: $G^2=28,77$, $P=0,02555$ (df = 16)							
po usunięciu wartości zsumowanych: $G^2=26,73$, $p=0,03105$ (df = 15)							

Porównanie grupy dzieci z wadą cewy nerwowej odcinka lędźwiowego oraz grupy kontrolnej w zakresie biallelicznych haplotypów DRB1 i TNF α (-238) (tab. 33) wykazało brak istotnych różnic pomiędzy grupami w teście permutacji. Test G wykazał natomiast granicznie znamiennej różnicę częstości haplotypów dla przedstawionego rozkładu haplotypów, wyliczonego jako najbardziej prawdopodobny. Pomimo znamiennej wartości p w teście Fishera dla jednego haplotypu nie można tej zależności uznać za istotną statystycznie, ponieważ wartość $p > p_c$. Należy zwrócić jednak uwagę, że wartość $p=0,0065$

zbliża się do $p_c=0,0028$ dla haplotypu *07G. Koreluje to z wartościami dla haplotypów triallelicznych.

4.5. Analiza odchylenia od równowagi na skutek sprzężenia dla par alleli.

Aby umożliwić pełną interpretację danych przedstawiono także wyniki analizy odchylenia par alleli od równowagi na skutek sprzężenia ich loci.

Wykazano odchylenie od równowagi dla pary alleli TNF α (-238)A i HLA DRB1*07 ($p=0,0001$) zarówno w całej grupie z wadą cewy nerwowej jak i w grupie kontrolnej (tab. 34 i 35).

Wykazano odchylenie od równowagi dla pary alleli TNF α (-308)A z HLA DRB1*03 ($p=0,0001$) zarówno dla całej grupy z wadą cewy nerwowej jak i grupą kontrolną, natomiast do granicy istotności statystycznej zbliża się wartość odchylenia od równowagi alleli TNF α (-308)G z HLA DRB1*07 (tab. 36 i 37), czego można się było spodziewać na podstawie analizy haplotypów.

Nie wykazano natomiast znamiennego odchylenia od równowagi dla poszczególnych par alleli locus TNF α (-308) i TNF α (-238).

Tabela 34. Analiza odchylenia od równowagi par alleli HLA DRB1 i TNF α (-238) dla całej grupy z WCN

Allele	r	χ^2	p
*01-G	0,07893	0,65	0,4209
*01-A	-0,07893	0,65	0,4209
*03-G	0,20719	4,46	0,0346
*03-A	-0,20719	4,46	0,0346
*04-G	0,16789	2,93	0,0869
*04-A	-0,16789	2,93	0,0869
*07-G	-0,53726	30,02	0,0001#
*07-A	0,53726	30,02	0,0001#
*08-G	0,07965	0,66	0,4167
*08-A	-0,07965	0,66	0,4167
*09-G	0,03924	0,16	0,6890
*09-A	-0,03924	0,16	0,6890
*10-G	0,05576	0,32	0,5696
*10-A	-0,05576	0,32	0,5696
*11-G	0,14306	2,13	0,1446
*11-A	-0,14306	2,13	0,1446
*12-G	-0,06827	0,48	0,4863
*12-A	0,06827	0,48	0,4863
*13-G	0,04997	0,26	0,6104
*13-A	-0,04997	0,26	0,6104
*14-G	-0,17644	3,24	0,0720
*14-A	0,17644	3,24	0,0720
*15-G	0,18595	3,60	0,0579
*15-A	-0,18595	3,60	0,0579
*16-G	-0,06309	0,41	0,5200
*16-A	0,06309	0,41	0,5200
#istotne statystycznie			

Tabela 35. Analiza odchylenia od równowagi par alleli HLA DRB1 i TNF α (-238) dla grupy kontrolnej

Allele	r	χ^2	p
*01-G	0,16576	3,10	0,0781
*01-A	-0,16576	3,10	0,0781
*03-G	-0,20027	4,53	0,0333
*03-A	0,20027	4,53	0,0333
*04-G	0,17944	3,64	0,0565
*04-A	-0,17944	3,64	0,0565
*07-G	-0,49504	27,69	0,0001#
*07-A	0,49504	27,69	0,0001#
*08-G	0,03582	0,15	0,7033
*08-A	-0,03582	0,15	0,7033
*09-G	0,08464	0,81	0,3683
*09-A	-0,08464	0,81	0,3683
*10-G	0,04175	0,20	0,6572
*10-A	-0,04175	0,20	0,6572
*11-G	0,11798	1,57	0,2098
*11-A	-0,11798	1,57	0,2098
*12-G	0,12997	1,91	0,1671
*12-A	-0,12997	1,91	0,1671
*13-G	0,15232	2,62	0,1054
*13-A	-0,15232	2,62	0,1054
*14-G	0,00610	0,00	0,9483
*14-A	-0,00610	0,00	0,9483
*15-G	0,03852	0,17	0,6822
*15-A	-0,03852	0,17	0,6822
*16-G	-0,00396	0,00	0,9664
*16-A	0,00396	0,00	0,9664
#istotne statystycznie			

Tabela 36. Analiza odchylenia od równowagi par alleli HLA DRB1 i TNF α (-308) dla całej grupy z WCN

Allele	r	χ^2	p
*01-G	0,25223	6,62	0,0101
*01-A	-0,25223	6,62	0,0101
*03-G	-0,75670	59,55	0,0001#
*03-A	0,75670	59,55	0,0001#
*04-G	0,15214	2,41	0,1208
*04-A	-0,15214	2,41	0,1208
*07-G	0,24817	6,41	0,0114
*07-A	-0,24817	6,41	0,0114
*08-G	-0,04156	0,18	0,6717
*08-A	0,04156	0,18	0,6717
*09-G	-0,10236	1,09	0,2965
*09-A	0,10236	1,09	0,2965
*10-G	0,08728	0,79	0,3734
*10-A	-0,08728	0,79	0,3734
*11-G	0,10810	1,22	0,2703
*11-A	-0,10810	1,22	0,2703
*12-G	-0,12467	1,62	0,2036
*12-A	0,12467	1,62	0,2036
*13-G	-0,18249	3,46	0,0627
*13-A	0,18249	3,46	0,0627
*14-G	0,14008	2,04	0,1531
*14-A	-0,14008	2,04	0,1531
*15-G	0,07938	0,66	0,4182
*15-A	-0,07938	0,66	0,4182
*16-G	-0,01355	0,02	0,8901
#istotne statystycznie			

Tabela 37. Analiza odchylenia od równowagi par alleli HLA DRB1 i TNF α (-308) dla grupy kontrolnej

Allele	r	χ^2	p
*01-G	0,13359	2,02	0,1556
*01-A	-0,13359	2,02	0,1556
*03-G	-0,39280	17,43	0,0001#
*03-A	0,39280	17,43	0,0001#
*04-G	-0,06766	0,52	0,4720
*04-A	0,06766	0,52	0,4720
*07-G	-0,04399	0,22	0,6401
*07-A	0,04399	0,22	0,6401
*08-G	-0,04598	0,24	0,6250
*08-A	0,04598	0,24	0,6250
*09-G	0,09843	1,09	0,2954
*09-A	-0,09843	1,09	0,2954
*10-G	0,04855	0,27	0,6058
*10-A	-0,04855	0,27	0,6058
*11-G	0,23379	6,18	0,0129
*11-A	-0,23379	6,18	0,0129
*12-G	-0,02677	0,08	0,7760
*12-A	0,02677	0,08	0,7760
*13-G	-0,05033	0,29	0,5927
*13-A	0,05033	0,29	0,5927
*14-G	0,12168	1,67	0,1959
*14-A	-0,12168	1,67	0,1959
*15-G	0,07604	0,65	0,4189
*15-A	-0,07604	0,65	0,4189
*16-G	-0,04794	0,26	0,6103
*16-A	0,04794	0,26	0,6103
#istotne statystycznie			

5. Dyskusja

We wstępie do dyskusji należy zaznaczyć, że uzyskane wyniki należą do różnych kategorii wiarygodności. Część z nich to obliczenia wykonane na podstawie wyników uzyskanych z rzeczywistego genotypowania, i te należy uznać za najbardziej wiarygodne, natomiast pozostałe oszacowane zostały za pomocą odpowiednich metod statystycznych, zatem w różnym stopniu przybliżają stan rzeczywisty. Nie należy jednak niedoceniać tych drugich, mimo, że na ich podstawie nie można wnioskować o rzeczywistej asocjacji wad cewy nerwowej z wyliczonymi haplotypami. Aktualnie wyniki te mogą ukierunkować przyszłe badania, a ponowne wykazanie takich asocjacji będzie najlepszym dowodem na ich rzeczywiste znaczenie. Ponadto uważa się, że aby asocjację uznać za istotną, należy uzyskać niezwykle małe wartości p , w zasadzie niemożliwe do uzyskania dla pojedynczego badania. Pojawiają się zatem opinie, że do potwierdzenia asocjacji przeprowadzenie kolejnych podobnie zaplanowanych badań jest wręcz konieczne. Co ciekawe, w przypadku powtórnego wykonania takich badań powtarzalne wyniki uzyskiwano jedynie w 16-30% przypadków (114). Wobec uzyskanych wyników nie wydaje się, aby którykolwiek z analizowanych genów można było uznać za gen efektów głównych rozwoju dysrafii.

W niniejszej pracy zastosowano typowy kliniczno-kontrolny model analizy, aktualnie najczęstszy w badaniach genetycznych ukierunkowanych na określenie genetycznej podatności na określone choroby. Moc takiego modelu zależy od wielu czynników, takich jak siła oddziaływania danego locus (wyrażana jako iloraz szans), częstość populacyjna alleli wywołujących chorobę oraz wielkość odchylenia od równowagi na skutek sprzężenia badanego markera z genem rzeczywiście wywołującym chorobę (115). Molekularna heterogenność alleli dodatkowo utrudnia odkrycie takiej asocjacji. Uważa się również, że analiza asocjacji bardziej nadaje się do wykrywania słabego wpływu genów na różne choroby, natomiast analiza sprzężeń do wykrywania mocnego efektu (116), a z dotychczasowych doświadczeń dotyczących analizy podłoża genetycznego dysrafii obecność genu o mocnym efekcie wydaje się mało prawdopodobna.

Problemem wielu badań nad asocjacją wariantów genu $TNF\alpha$ z różnorodnymi chorobami jest sprzężenie tego genu z loci w obrębie MHC. Poza tym kliniczno-kontrolne badania asocjacji z założenia obarczone są błędem mogącym wynikać z trudności w odpowiednim doborze dwóch porównywanych populacji, braku analizy heterozygotycznego lub homozygotycznego występowania markera, a przede wszystkim

niepewności na ile badany fragment zawiera rzeczywisty gen odpowiedzialny za występowanie choroby, a na ile jest jedynie sprzężony z potencjalnym genem. Wydaje się, że ta druga sytuacja ma miejsce częściej. Bardzo duża liczba takich badań, szczególnie w odniesieniu do locus TNF α charakteryzowała się zbyt małą mocą, aby potwierdzić ewentualną asocjację (słaby wpływ genu). Z drugiej strony, w przypadku wykazania takiej asocjacji, wynik taki należy traktować w kategoriach hipotezy, którą należy potwierdzić w kolejnych badaniach (117).

Aby jakiegokolwiek badanie kliniczno-kontrolne było wiarygodne, niezbędne jest upewnienie się, że grupy są do siebie jak najbardziej zbliżone. W niniejszym badaniu wykazano brak różnic pomiędzy grupami w odniesieniu do płci. Obie grupy zawierają również osoby z Małopolski, co jest o tyle istotne, że rozkład pewnych cech genetycznych może różnić się wśród populacji zamieszkujących różne regiony. Może to wynikać z różnego pochodzenia tych populacji. Grupa dzieci z wadą cewy nerwowej obejmuje pacjentów w różnym wieku. Materiał genetyczny pobierano zarówno od małych niemowląt jak i młodzieży. Grupa kontrolna to osoby dorosłe, urozmaicona grupa zdrowych ochotników, potencjalnych dawców szpiku kostnego. W idealnej sytuacji powinna ona zawierać osoby wybrane losowo spośród całej populacji zamieszkującej daną okolicę. Technicznie nie jest to jednak wykonalne, chociażby z tego powodu, że większość wybranych w ten sposób osób nie zgodziłaby się na bezinteresowne, inwazyjne przecież pobranie krwi. Prawdopodobne jest, że osoby, które zgodziłyby się na pobranie krwi, w pewnym stopniu ochotnicy, byłyby zbliżone do grupy ochotniczo zgłaszających się jako dawcy szpiku kostnego. W wielu badaniach genetycznych z grupą kontrolną korzysta się zatem z dostępnego aktualnie materiału genetycznego, który niekoniecznie musi odpowiadać rozkładowi zakłócających cech w populacji. Analiza genetyczna dotyczyła poza tym genów zlokalizowanych na szóstym chromosomie. Aby zakłócić takie oznaczenie konieczna musiałaby być nierównowaga w obu grupach w odniesieniu do cech kodowanych przez inne geny na tym chromosomie, zakładając że obszar HLA mógłby być z takimi cechami sprzężony. Porównanie obu grup pod kątem wszystkich takich cech jest po prostu niemożliwe, zwłaszcza, że część z nich jest zapewne nieznaną. Dla celów niniejszego badania należy zatem założyć podobieństwo grup, ale ostrożnie interpretować wyniki wskazujące na asocjację cechy z jakimś genem lub haplotypem.

5.1. Równowaga Hardy'ego i Weinberga

Jednym z podstawowych elementów analizy genetycznej jest wykazanie zgodności z równowagą Hardy'ego i Weinberga, jednego z paradygmatów genetyki opisującego wzajemną zależność pomiędzy rozkładem genotypów a częstością alleliczną ich składowych. Analiza ta wykonana została dla bilallelicznych polimorfizmów w zakresie promotora genu TNF α . Wykazano brak odchylenia od równowagi dla polimorfizmu TNF α (-238)G \rightarrow A, natomiast stwierdzono odchylenie od równowagi Hardy'ego i Weinberga dla polimorfizmu TNF α (-308)G \rightarrow A dla grupy kontrolnej, całej grupy z wadą cewy nerwowej oraz grupy obejmującej pacjentów z wadą cewy nerwowej odcinka piersiowego, natomiast nie stwierdzono takiego odchylenia dla grupy obejmującej pacjentów z wadą cewy nerwowej odcinka lędźwiowego.

Obecność takiego odchylenia można tłumaczyć wielorako:

- Mała liczebność grupy, co sprzyja błędom w doborze analizowanych osób
- Dobór partnera według cech pozostających w sprzężeniu z analizowanym genem
- Bardzo duża częstość mutacji w populacji lub masywna migracja osób z innej populacji
- Selekcja genotypów, nierówna transmisja pozostałych alleli od rodziców.
- Błędy w genotypowaniu, które w praktyce zdarzają się najczęściej.

Przy całości problemów związanych z interpretacją wyników odbiegających od równowagi Hardy'ego i Weinberga należy zaznaczyć, że odchyleniu temu podlega zarówno grupa badana jak i kontrolna, co w pewnym sensie zbliża te grupy do siebie.

Specyfika wykonywanej tu analizy genetycznej polega na tym, że polimorficzne allele położone są na tym samym chromosomie co geny HLA. HLA uważa się za jeden z bardziej urozmaiconych zespołów loci genowych, a rozkład jego alleli jest odmienny w poszczególnych populacjach zależnie od ich pochodzenia. Mało tego, uważa się, że w lokalizacji tej częstość rekombinacji jest bardzo mała (poniżej 1%) (74). Jest to bowiem bardzo konserwatywny fragment genomu, co nie dziwi biorąc pod uwagę jak ważną funkcję pełni w organizmie. Inni autorzy twierdzą, że rekombinacja w regionie MHC ograniczona jest do kilku tzw. gorących miejsc (*hot spots*) (118). Udowodniono asocjację niektórych alleli HLA z wieloma chorobami u człowieka, w większości o etiologii autoimmunizacyjnej. Zatem częściowa eliminacja z populacji niektórych z tych alleli może być procesem doboru naturalnego zwiększającego zdrowie populacji. Locus genu TNF α

jest mocno sprzężony z locus DRB1 i zwykle jest dziedziczony razem, zatem odchylenie od równowagi Hardy'ego i Weinberga może być następstwem tego sprzężenia. Z analizy wyliczonych haplotypów wynika, że allel A w locus -308 znacząco częściej towarzyszy allelom *03, *07, *13 (53 spośród 69 haplotypów zawierających allel A), a jedynie w pojedynczych przypadkach allelom *16, *15, *12, *11, *08, *04, *01, przy czym rozkład ten jest nieco inny w grupie chorych z dysrafią i w grupie kontrolnej. W grupie dzieci z wadą cewy nerwowej z 39 haplotypów zawierających allel -308A w 23 obecny jest DRB1*03, natomiast w grupie kontrolnej DRB1*03 obecny jest jedynie w 11 z 30 haplotypów zawierających allel -308A. Nie potrzeba wyliczeń, aby stwierdzić, że 6 z 7 przypadków homozygot -308AA w grupie chorych z dysrafią ma przynajmniej jeden allel DRB1*03, w jednym przypadku jest to homozygota w zakresie tego allelu HLA. W grupie kontrolnej na 6 homozygot -308A aż w połowie nie stwierdza się allelu *03. W grupie chorych z wadą cewy nerwowej odcinka piersiowego wszystkie homozygoty -308AA mają przynajmniej jeden allel DRB1*03, a co ciekawe w każdym przypadku allel DRB1*03 jest częścią haplotypu zawierającego allel -308A. W grupie dzieci z dysrafią odcinka lędźwiowego 15 na 17 alleli DRB1*03 jest częścią haplotypu zawierającego allel -308A, natomiast w grupie kontrolnej jest to nieco więcej niż połowa. W analizie wykazano silne odchylenie od równowagi na skutek sprzężenia dla pary alleli TNF α (-308)A i DRB1*03 ($r=0,75670$; $p=0,0001$). Już wcześniej opisywano takie odchylenie dla pary alleli -308A i DR3 (kodowanego przez allel DRB1*03) (91,94) jak również odchylenie od równowagi dla par alleli TNF α (-308G) i DR4 (kodowanego przez allele przez allele DRB1*04) oraz TNF α (-308G) i DR6 (kodowanego przez niektóre allele DRB1*13 i DRB1*14) (119). W toku analizy haplotypów w populacji rasy białej wykazano z kolei odchylenie od równowagi dla par alleli DRB1*03 i TNF α (-308A) oraz DRB1*07 i TNF α (-308G). Wyniki te są podobne do uzyskanych w niniejszej pracy, a przy okazji uzyskane zostały takimi samymi metodami (120). Zgodnie z innym doniesieniem para alleli TNF α (-308A) i DR3 nie tylko wykazuje odchylenie od równowagi, ale również może dodatkowo odpowiadać za zwiększoną syntezę TNF α (117).

Wysunięto również hipotezę o dodatniej selekcji DR3, tzn. o częstszym dziedziczeniu kodujących go alleli od rodziców niż wynikałoby z oczekiwań (czyli 50%/50%). Stwierdzono bowiem znamienne częstsze występowanie tych antygenów w populacji dzieci niż w populacji ich rodziców (121). Autorzy tej hipotezy na podstawie swoich obliczeń uważają, że selekcja ta może mieć miejsce na kilku etapach: tworzenia gamet, a szczególnie spermatogenezy, zapłodnienia oraz wczesnego okresu zarodkowego.

Odmienne prezentuje się również przekazywanie alleli kodujących DR3 zależnie od płci dziecka. Dziewczynki przejmują ten antygen z równą częstością od ojców i od matek, natomiast chłopcy dwukrotnie częściej od ojców niż od matek. Tendencja w kierunku znamiennej statystycznej różnicy rozkładu haplotypów DRB1*03-TNF(-308)A może w tym kontekście odpowiadać za odchylenie od równowagi Hardy'ego i Weinberga.

Porównanie częstości genotypów locus TNF α (-308) z danymi z piśmiennictwa (122-125), sugeruje większą liczbę homozygot AA w danych przedstawionych w niniejszym badaniu, co w największym stopniu odpowiada za odchylenie od równowagi Hardy'ego i Weinberga (wartość χ^2 dla różnicy wartości obserwowanych i oczekiwanych jest tu największa i decydująca o ostatecznym wyniku). Dane z piśmiennictwa dotyczą jednak populacji zagranicznej lub z innych okolic Polski (np. okolic Poznania, Górnego i Dolnego Śląska) lub innych grup (np. pacjentów z otyłością). Wartości częstości allelicznych dla tego polimorfizmu także różnią się według doniesień z różnych części Polski [od 9,3% (126) do 27% (niepublikowane dane własne dotyczące przedwcześnie urodzonych noworodków, oznaczane tą samą metodą, w zgodzie z równowagą Hardy'ego i Weinberga)]. Ocena zgodności z równowagą Hardy'ego i Weinberga polega na porównaniu wartości obserwowanych z oczekiwanymi (wyliczonymi na podstawie obserwowanych) za pomocą różnych testów, najczęściej χ^2 dla jednego stopnia swobody przy układzie dwuallelicznym lub dokładnym testem Hardy'ego i Weinberga. Zdecydowano się jednak porównać również rozkład genotypów w grupie badanej z rozkładem opisywanym dla populacji Wielkopolski (124) za pomocą testu χ^2 . Nie stwierdzono statystycznej różnicy pomiędzy tymi grupami ($p > 0,10$), czyli częstość poszczególnych genotypów w grupie badanej jest podobna do grupy wielkopolskiej traktowanej w tym przypadku jako obserwowaną. Podobna analiza dla grupy kontrolnej wykazała jednak różnicę istotną statystycznie ($p < 0,05$).

Nie jest to jedyny przypadek odchylenia od równowagi Hardy'ego i Weinberga podany w piśmiennictwie. Cipriano i wsp. opisali analizę polimorfizmu TNF α (-308)G \rightarrow A w grupie osób w podeszłym wieku leczonych z powodu bakteryjnego zakażenia dolnych dróg oddechowych oraz zdrowych osób z grupy kontrolnej. W pierwszej z grup stwierdzono zwiększoną częstość alleliczną allelu A, ale co bardziej interesujące również odchylenie od równowagi ($p = 0,045$ – obliczenia własne na podstawie oryginalnych danych z publikacji) (127). Znaczne odchylenie od równowagi, choć niezgłoszone przez autorów ($p = 0,0036$ – obliczenia własne) wykazano również w populacji australijskiej (128), oznaczenie wykonano metodą RFLP najczęściej cytowaną w piśmiennictwie dla tego

polimorfizmu (trawienie restryktazą *NcoI*). Odchylenie od równowagi Hardy'ego i Weinberga stwierdzili również autorzy krakowscy. Zaistniała tu sytuacja odmienna, to znaczy stwierdzono zbyt dużo heterozygot lub zbyt mało homozygot AA w porównaniu do wartości oczekiwanych (obliczenia własne) (125). Zaznaczyć należy, że typowanie wykonywano tu w grupie pacjentów otyłych, co może mieć wpływ na rozkład genotypów, wykazano bowiem, że TNF α może wywierać wpływ na występowanie otyłości i insulinowrażliwości. Stwierdzono na przykład zwiększanie się częstości allelicznej allelu A wraz ze zwiększaniem się wartości wskaźnika względnej masy ciała (129).

Niewątpliwie każda metoda laboratoryjna obarczona jest pewnym błędem oznaczenia. Na pewno dotyczy to metody opartej na polimorfizmie fragmentów restrykcyjnych, która w dużym stopniu zależna jest od wizualnej oceny wyników trawienia. W czasie wykonywania analizy dołożono starań, aby była ona jak najdokładniejsza. W przypadku wątpliwych wyników wynikających z niedostatecznego trawienia oznaczenie takie powtarzano. Ponadto dla kilku przypadków wykonano sekwencjonowanie produktu dla każdego z możliwych genotypów, które potwierdziło poprawność oznaczenia RFLP (ryciny 4, 5, 6, 7, 8, 9 – w rozdziale Załączniki). Ponieważ z wyliczeń skojarzonych z danymi z piśmiennictwa wynika, że za odchylenie od równowagi odpowiada zwiększony odsetek homozygot, przeprowadzono ponowną ocenę zdjęć rozdziału elektroforetycznego produktów trawienia. Z zasady metody RFLP wynika możliwość popełnienia pewnych błędów w przypadku heterozygot, głównie w sytuacji niepełnego trawienia produktu PCR, jednak obraz homozygoty jest tak charakterystyczny, że pomyłkowe jego odczytanie jest mało prawdopodobne. Oczywiście zawsze należy wziąć pod uwagę, że odchylenie od równowagi jest następstwem nielosowego doboru osób do grup. Ponieważ zastosowana tu metoda oznaczania polimorfizmu TNF α (-308)G \rightarrow A nie była wcześniej opisana w piśmiennictwie, nie ma możliwości porównania uzyskanych tu wyników z wynikami innych badaczy uzyskanymi tą samą metodą.

Obliczenie zgodności z równowagą Hardy'ego i Weinberga, chociażby z przybliżeniem, jest o tyle istotne, że większość szacunkowych wyliczeń genetycznych zakłada zgodność genotypów z tą równowagą, a w przypadku braku takiej zgodności wiarygodność takich oszacowań zmniejsza się (130). Z drugiej strony przeprowadzone symulacje wskazują, że odchylenie od równowagi Hardy'ego i Weinberga w rzeczywistości nie ma większego wpływu na wyniki rekonstrukcji haplotypów według algorytmu zaimplementowanego w PHASE (110).

5.2. Geny zgodności tkankowej DRB1

Badanie asocjacji różnych chorób z antygenami układu HLA prowadzone są już od bardzo dawna. Istnieje wiele udowodnionych asocjacji antygenów zgodności tkankowej z różnymi chorobami. Pierwszą odkrytą asocjacją był związek HLA z chorobą Hodgkina. Ustalono również, że większość chorób wykazujących asocjację z HLA to choroby na podłożu autoimmunologicznym oraz nowotwory, natomiast znacznie rzadziej są to choroby zakaźne. Ciekawy jest związek narkolepsji, choroby bez związku z zapaleniem, z DR2, którego obecność zwiększa ryzyko zachorowania około 129 razy. Zastanawiać może, dlaczego osoby posiadające geny predysponujące do choroby nie wyginęły w toku selekcji naturalnej. Uważa się, że geny te muszą w jakiś sposób chronić przed innymi powszechnymi chorobami. Typowym przykładem jest haplotyp HLA DRB1*1302-DQB1*0501 zwiększający odporność na malarię (72).

Asocjacja genu HLA z chorobą może mieć charakter recesywny, jak na przykład w cukrzycy typu 1., lub dominujący, jak w przypadku HLA-B27 i zeszywniającego zapalenia kręgosłupa. U około 1/3 osób spotyka się 12 konserwatywnych haplotypów genów HLA od HLA-B do DR/DQ. W sytuacjach takich wiadomo, że ewentualna asocjacja z pojedynczym allelem w obrębie takiego haplotypu oznacza w rzeczywistości asocjację z całym haplotypem, co niezwykle utrudnia interpretację takich danych. Najczęstszymi rozszerzonymi haplotypami u rasy białej są [HLA-B8, SC01, DR3] oraz [HLA-B7, SC31, DR3].

Ciekawa asocjacja dotyczy wrodzonego przerostu nadnerczy wywołanego mutacją 21-hydroksylazy steroidowej. W Europie stwierdzono asocjację tej choroby z HLA-B14, HLA-B47, HLA-DR1 i HLA-DR7. Okazało się później, że wymienione geny wchodziły w skład konserwatywnych rozszerzonych haplotypów loci obejmujących między innymi gen 21-hydroksylazy. Homozygoty pod względem jednego z tych haplotypów [HLA-B47, FC91,0, DR7] praktycznie zawsze chorują na ciężką postać wrodzonego przerostu nadnerczy (131). Wykazanie asocjacji z jednym allelem haplotypu może zatem doprowadzić do fałszywych wniosków. Z drugiej strony rzadkie występowanie allelu HLA-B47, występującego praktycznie zawsze w obrębie opisanego wyżej rozszerzonego haplotypu, pozwala z dużym prawdopodobieństwem określać nosicieli zmutowanego genu 21-hydroksylazy poprzez identyfikację allelu HLA.

Idea badań asocjacji MHC z wadami cewy nerwowej wynika z bliskości genu T uważanego za jednego z kandydatów warunkujących powstawanie tej wady. Oczywiście

jest, że podobnie jak w przypadku wrodzonego przerostu nadnerczy, niekonieczne sam gen jest odpowiedzialny za powstanie wady, gdyż może on być po prostu mocno sprzężony z innym genem. W związku z tym trwają poszukiwania homologicznego genu u człowieka zlokalizowanego w bliskości genów HLA. Badania nad związkiem układu HLA z wadami cewy nerwowej są dość liczne. Ich wyniki są jednak niejednoznaczne. Części autorów nie udało się wykazać asocjacji poszczególnych antygenów (132,133), podczas gdy inni wykazali asocjację wad cewy nerwowej z antygenem HLA-B27 (134), choć badanie przeprowadzone na innej grupie nie potwierdziło tego faktu (135). Rogala i wsp. stwierdzili na przykład, że u pacjentów z wadą cewy nerwowej odcinka piersiowo-lędźwiowego częstość HLA-B27 (około 50% pacjentów) była około czterokrotnie większa niż w wadach o niższej lokalizacji oraz dwunastokrotnie większa niż w całej populacji (21). Bobrow i wsp. stwierdzili także zwiększoną częstość wad cewy nerwowej u dzieci rodziców posiadających haplotyp A1, B8 (136).

W piśmiennictwie opisano rodziny, u których podejrzewa się silne sprzężenie genu wywołującego wadę cewy nerwowej z HLA. Obserwowano dominujący typ dziedziczenia z niepełną penetracją, natomiast nie ma danych potwierdzających, że gen ten spokrewniony jest z genem T u myszy (137).

W badaniach rodzinnych próbowano również ocenić, czy posiadanie wspólnego antygeny HLA-A, -B lub -DR wpływało na częstość spontanicznych poronień lub wad cewy nerwowej. W kilku badaniach stwierdzono taką skłonność przy wspólnym antygenie HLA-A u obu rodziców, natomiast nie wykazano takiego związku w przypadku antygenów HLA-B i -DR (138). Schacter i wsp. również stwierdzili częstsze współdzielenie alleli HLA-A i -B u rodziców dzieci z wadami cewy nerwowej lub poronieniami w wywiadzie (139). Autorom zarzucano jednak nieprawidłowy dobór grupy kontrolnej. W badaniach przeprowadzonych w Polsce nie potwierdzono jednak tych wyników, ponieważ rozkład par o wspólnych allelach HLA klasy A i B był podobny w grupie z wadą cewy nerwowej i kontrolnej, zatem HLA klasy I u rodziców nie wpływa na wystąpienie dysrafii (135).

W niniejszym badaniu w całej grupie dzieci z wadą cewy nerwowej najczęstszymi grupami alleli DRB1 były *07 (23,6%), *01, *03 i *11 (wszystkie po 11,5%), *15 (10,5%) oraz *13 (9,6%). W grupie kontrolnej najczęstsze allele to *07 (16,4%), *01 (14,2%), *11 (13,7%), *13 (13,3%), *15 (9,3%) oraz *03 (8,8%). Nieco odmienne wyniki uzyskano w innych częściach Polski. W grupie zdrowych dawców okolic Łodzi najczęstsze grupy alleli to *01 (17%), *15 (14,4%), *04 (14,1%), *07 (14%), *03 (10,7%) i *11 (10,7%) (107), w populacji wielkopolskiej *15 (16%), *01 (15%), *07 (12%), *13 (11,6%), *04

(10,54%), *03 (8,1%) (106). Wyraźnie widać, że częstości większości z nich są zbliżone, choć można zaobserwować pewne rozbieżności (głównie *01). Rzuca się natomiast w oczy wyraźna różnica w częstości grupy *07 w badanej grupie z wadą cewy nerwowej oraz grupie kontrolnej, grupie z okolic Łodzi i grupie wielkopolskiej. Częstość *07 w całej grupie z wadą cewy nerwowej oraz w grupach z dysrafia na poziomie lędźwiowym i piersiowym wynosi stale ponad 23%, a różnica zbliżająca się do istotności statystycznej (bez poprawki Bonferroni) pomiędzy całą grupą z wadą cewy nerwowej i grupą kontrolną wynika po prostu z większej liczebności. W świetle podobnej częstości *07 w grupie kontrolnej i populacji z okolicy Łodzi, jak również w większości krajów Europy (tzn. częstość ta jest podobna lub mniejsza) (107), można z pewnym prawdopodobieństwem założyć, że w tym przypadku poprawka Bonferroni jest zbyt konserwatywna i może prowadzić do wyciągnięcia fałszywych wniosków (OR wynosi 1,57). Tę nadmierną konserwatywność poprawki Bonferroni pogłębia także fakt odchylenia od równowagi na skutek sprzężenia dla niektórych par alleli DRB1 i polimorfizmów promotora TNF α [na przykład DRB1*03 i TNF α (-238)A]. Allele DRB1*07 dają bardzo charakterystyczny wzorec prążków na pasku do hybrydyzacji (tylko 2 prążki – 17 i 27), przez co pomyłka w typowaniu tego allelu jest mało prawdopodobna, bo tego typu zestawienie nie występuje w żadnym innym allelu (prążek 17 występuje tylko w tym allelu). Publikacja opisująca częstość poszczególnych fenotypów w zakresie DRB1 (nosicielstwa poszczególnych alleli) nie pozwala na określenie częstości allelicznej. Częstość fenotypu *07 wynosi w tej grupie 23% (108), natomiast w grupie poddanej niniejszemu badaniu odpowiednio 41% w całej grupie z dysrafia i 28% w grupie kontrolnej (różnica pomiędzy grupą z dysrafia i grupą kontrolną istotna statystycznie, $p=0,0438$ w teście χ^2 , OR=1,78). W grupie wrocławskiej oceniano fenotyp DR (antygen) i na jego podstawie wyliczono częstość alleliczną. Antygen DR7 obserwowano u niecałych 28%, co odpowiada częstości allelicznej około 14,5% (105). Jest to wartość zbliżona do grupy kontrolnej, natomiast znacznie odbiegająca od całej grupy dzieci z wadą cewy nerwowej. Inne doniesienie z regionu Polski południowo-zachodniej pokazuje, że częstość alleli *07 wynosi tylko 10,8% (B. Nowakowska, doniesienie osobiste). Istnieje również wyraźna różnica w częstości allelu *04 u dzieci z wadą cewy nerwowej (9,1%) i w grupie kontrolnej (7%) a grupą z okolic Łodzi (14,1%). Może to wskazywać na nieco inny rozkład alleli DRB1, a w konsekwencji na inne pochodzenie tych populacji lub być wynikiem nielosowego doboru populacji.

W badaniach populacji okolicy Łodzi stwierdzono, że odsetek heterozygot w zakresie HLA DRB1 wynosił około 88,3%, natomiast w populacjach europejskich

wynosi około 91-94% (107). W populacji wielkopolskiej odsetek heterozygot to 93% (106). W populacji poddanej niniejszemu badaniu wynosi on 87,5% w całej grupie z dysrafia i 90% w grupie kontrolnej, mieści się zatem pośrodku.

Nie ustalono dotychczas roli, jaką antygeny zgodności tkankowej mogą pełnić na wczesnym etapie rozwoju zarodka, aczkolwiek ich ekspresję stwierdzono już u kilkutygodniowych embrionów. Może to odbywać się na przykład dzięki sprzężeniu z innymi istotnymi genami. W tzw. szerokim regionie MHC obejmującym około 8 milionów par zasad zlokalizowano gen HFE, którego produkt uczestniczy w transporcie żelaza poprzez interakcje z transferyną i jej receptorem. Mutacja tego genu odpowiedzialna jest za powstawanie hemochromatozy. Budowa białka *Hfe* jest homologiczna do cząsteczek HLA. Istnieją hipotezy, że regulacja dostępności żelaza może być jednym z mechanizmów kontrolujących wzrost komórek w trakcie rozwoju zarodka (140), nie wykazano natomiast bezpośredniego wpływu HLA na tę dostępność mimo fizycznej bliskości samych genów. Wykazano jednak zwiększoną częstość antygenów HLA-A3 i HLA-B14 u chorych na hemochromatozę (141), co aktualnie tłumaczy się sprzężeniem loci HLA i HFE. Dzięki temu sprzężeniu odkryto jak rzadko dochodzi do rekombinacji w obrębie tego odcinka genomu. Częstość rekombinacji jest tu jedną z najrzadszych w genomie człowieka i wynosi około 0,19% na 1 milion par zasad (142), czyli około pięciokrotnie rzadziej niż w innych regionach. Z drugiej jednak strony wysunięto koncepcję, że ograniczenie rekombinacji dotyczy tylko niektórych haplotypów, natomiast w przypadku innych alleli HLA crossing-over zachodzi z normalną częstością (140).

Nieco lepiej udowodniony jest wpływ HLA na przetrwanie ciąży. Wykazano bowiem, że zgodność rodziców pod względem alleli różnych locus poszczególnych MHC, a zwłaszcza zgodność pod względem niektórych rozszerzonych haplotypów jest czynnikiem ryzyka utraty ciąży z ilorazem szans sięgających prawie 4,4 (143).

Glushkov i wsp. opisali również inną ciekawą właściwość HLA DR. Mianowicie, jeżeli u obu rodziców występował HLA-DR3, to w żadnym przypadku ich dziecko nie dziedziczyło tego allelu. W przypadku innych alleli stwierdzano, że jeżeli rodzice posiadali inny wspólny antygen HLA-DR, to w żadnym przypadku nie stwierdzono homozygotyczności w zakresie tego allelu u dziecka (121). Odmienny wzorzec dziedziczenia niektórych alleli (także DR5 i DR7) w zależności od płci dziecka badacze tłumaczą możliwością interakcji z genami zlokalizowanymi na chromosomach płciowych. Uważają oni, że MHC wraz z genami kodowanymi na chromosomie Y odpowiadać mogą za interakcje pomiędzy komórką jajową i plemnikiem, pomiędzy komórkami dzielącej się

zygoty oraz pomiędzy zygota a endometrium. Ostateczny wynik tych interakcji może uzależniać zdolność gamet do zapłodnienia oraz zarodka do implantacji w endometrium. Na etapie tym niektóre zarodki mogą być eliminowane. Taka ujemna selekcja może na przykład eliminować zarodki predysponowane do zaburzeń rozwojowych, być może również wad cewy nerwowej. Hipoteza ta zakłada bardzo wczesną ekspresję antygenów HLA II klasy. Dotychczas nie udało mi się jednak zidentyfikować publikacji badających moment ekspresji takich antygenów w rozwijającym się zarodku. Jednak hipoteza udziału HLA II klasy w nawykowych poronieniach, które mają miejsce przed 9 tygodniem ciąży sugeruje bardzo wczesną ich ekspresję (121). Badacze koreańscy stwierdzili obecność cząsteczek DR na tymocytach płodu już przed 12 tygodniem ciąży (144), jednak jest to dość późno z punktu widzenia neurulacji. Jeszcze wcześniej, bo już w 34 dniu po zapłodnieniu, cząsteczki HLA-DR stwierdzono na komórkach linii erytrocytarnej oraz makrofagach w zatokach wątroby (145). Względnie rzadkie występowanie homozygot w zakresie genów HLA, wykazano również w pewnych zamkniętych populacjach zamieszkujących Północną Amerykę. Zjawisko to jak początkowo sądzono wynikało z lepszej przeżywalności osobników heterozygotycznych, lecz później stwierdzono, że ten polimorfizm występuje już u noworodków. Prawdopodobne jest zatem, że po zapłodnieniu dochodzi do negatywnej selekcji zmniejszającej odsetek homozygot HLA. Na szczególne ryzyko poronienia narażone są zarodki homozygotyczne względem HLA oraz wykazujące dużą zgodność w zakresie HLA z matką. Mniejsza liczba homozygot w populacji może wynikać też z ciekawego faktu, że dobór partnerów zależy może również od HLA. Ludzie dobierając sobie partnerów preferują osoby z odmiennym garniturem HLA, przez co odsetek homozygot jest mniejszy niż wynikałoby to z obliczeń na podstawie częstości występowania (72).

Inne antygeny, DR2 i DR6, mogą predysponować do częstych poronień, prawdopodobnie w wyniku interakcji immunologicznej organizmu matki i płodu (146). Można domniemywać, że skoro obecność DR2 związana jest z częstszym występowaniem niedoborów odporności, to eliminacja takiego antygeny już na etapie interakcji pomiędzy układem immunologicznym matki i płodu może zapobiegać występowaniu takiego niedoboru (121). Skoro tak, hipotetycznie może to odnosić się do każdej potencjalnie śmiertelnej lub ciężkiej wady wrodzonej. Inna możliwość to zwiększona lub zmniejszona oporność zarodków wykazujących ekspresję poszczególnych alleli DRB1 na teratogeny środowiskowe. W takiej sytuacji należałoby się spodziewać częstszego występowania pewnych alleli u dzieci z daną wadą wrodzoną. Pewna analogiczna sytuacja ma miejsce na

przykład w przypadku dziewczynek z zespołem Turnera. Wiadomo, że monosomia X jest jedną z najczęstszych aberracji chromosomalnych spotykanych w poronionych płodach, jednak pewna liczba tych płodów przeżywa, co świadczy o tym, że proces naturalnej selekcji wewnątrzmacicznej nie jest doskonały.

Antygenem „sprzyjającym” przeżywalności jest DR5 kodowany przez HLA DRB1*11 i *12, który zwiększa odporność na niektóre zakażenia. Wykazano częste występowanie tych alleli w populacji rosyjskiej (121). W analizowanej grupie obserwowana częstość alleliczna wynosi około 13,5% w całej grupie z dysrafją oraz 17,7% w grupie kontrolnej (różnica nieistotna statystycznie, $p=0,3$ w teście χ^2).

Antygeny DR były już przedmiotem badań u pacjentów z wadą cewy nerwowej. Wykazano mianowicie, że częstość fenotypowa alleli DRB1*07 jest zwiększona u chorych wykazujących uczulenie na lateks (a zwłaszcza z obecnością przeciwciał przeciwko najważniejszemu antygenowi lateksowemu Hev b1) w porównaniu z chorymi bez takiego uczulenia oraz z grupą kontrolną zdrowych osób. Nie wykazano natomiast różnicy w jego częstości fenotypowej pomiędzy grupą z dysrafją a zdrową grupą kontrolną. Z drugiej jednak strony autorzy nie przedstawili częstości allelicznej alleli DRB1 ani charakterystyki grupy z wadą cewy nerwowej pod względem lokalizacji wady, co może mieć pewne znaczenie w interpretacji wyników (147). W niezależnym badaniu dotyczącym osób bez wad cewy nerwowej również potwierdzono związek alergii na lateks z DRB1*07, ale także z DRB1*03 (148), który występuje z podobną częstością w grupie z wadą cewy nerwowej i grupie kontrolnej przedstawianych w niniejszym badaniu.

W analizie niniejszej nie kontrolowano uczulenia na lateks z uwagi na brak dostępu do osób, od których uzyskano DNA. Nie da się jednoznacznie stwierdzić, dlaczego u osób z dysrafją alergii na lateks występuje częściej. Większość badaczy zgadza się, że duży wpływ ma tutaj liczba przebytych zabiegów operacyjnych. Jest ona największa u chorych z wodogłowiem i drenażem komorowo-otrzewnowym i u tych chorych alergii na lateks występuje najczęściej, nawet do 51% (149). Kolejnym czynnikiem ryzyka były zabiegi urologiczne oraz konieczność cewnikowania, a także płeć męska; w grupie tej nie stwierdzono natomiast różnicy w częstości uczulenia na lateks u chorych z drenażem komorowo-otrzewnowym i bez niego (150). Inni autorzy potwierdzają zależność uczulenia na lateks od liczby przebytych zabiegów, nie potwierdzają jednak zależności od płci (151).

DRB1*07 wykazywał również asocjację z innymi chorobami. Nosicielstwo DR7 było na przykład częstsze u osób nieodpowiadających na szczepienie przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B. DR7 wspólnie z DR3 wykazuje asocjację

z glutenowrażliwą enteropatią. DR7 częściej występuje także w łuszczycy. Charakterystyczne jest, że w wielu przypadkach istnienia dwóch markerów wykazujących asocjację z chorobą, układ heterozygotyczny pomiędzy nimi występuje częściej niż każdy z homozygotycznych układów osobno (131). Warto jednak zauważyć, że patogenezą tych chorób obejmuje reakcję immunologiczną, a zatem proces, w którym antygeny HLA z założenia uczestniczą.

Liczni badacze wysuwają hipotezę, że pewne skłonności pacjentów z wadą cewy nerwowej takie jak opóźnienie wzrastania, nawracające zakażenia i uczulenia na lateks nie wynikają z nieprawidłowości anatomicznych oraz zwiększonej liczby zabiegów (a więc i ekspozycji na lateks), ale stanowią element samej patologii prowadzącej do wady. Sugeruje się istnienie zaburzeń proliferacji we wszystkich komórkach ustroju. Takie zaburzenia proliferacji opisywano na przykładzie u myszy *ct*, ale również u dzieci z dysrafia opisano nieprawidłowości proliferacji limfocytów w odpowiedzi na stymulację. Co ciekawe, u dzieci z wadą cewy nerwowej odpowiedź limfocytów na stymulację fitohemaglutyniną była większa niż w grupie kontrolnej (152). Taką nadmierną skłonność komórek do proliferacji opisywano wcześniej w *neuroepithelium*, choć wg niektórych autorów wydaje się ona niezbędna dla prawidłowego przebiegu zamykania się cewy nerwowej (153). TNF α oraz HLA niewątpliwie wywierają wpływ na funkcjonowanie komórek układu odpornościowego jakimi są limfocyty, jednak wobec uzyskanych tu wyników jest mało prawdopodobne, aby ta różnica w proliferacji komórek wynikała z tego oddziaływania.

5.3. Polimorfizmy promotora genu dla TNF α

5.3.1. Polimorfizm G \rightarrow A w locus -308 promotora genu dla TNF α

W przedstawianym badaniu nie udało się wykazać asocjacji poszczególnych alleli polimorfizmu -308G \rightarrow A promotora genu dla TNF α z wadą cewy nerwowej, przy czym dotyczy to zarówno częstości allelicznej jak i rozkładu genotypowego i fenotypowego. Można było oczekiwać takiego wyniku, gdyż jak wspomniano wcześniej nie wykazano bezpośrednio udziału tej cytokiny w neurulacji. Wszelkie założenia opierały się jedynie na teoretycznych przesłankach wynikających ze sprzężenia z głównymi allelami HLA oraz ewentualnym związkiem z częstszym występowaniem pewnych zaburzeń u osób z wadami cewy nerwowej. Należy jednak zaznaczyć, że w przypadku dysrafii odcinka piersiowego, różnica częstości allelicznych pomiędzy tą grupą a grupą kontrolną była na granicy istotności statystycznej. Badacze zakładający zamykanie się cewy nerwowej w różnych miejscach zakładają także różną ekspresję genów i białek w tych miejscach, co mogłoby tłumaczyć także inny rozkład polimorfizmu w zakresie promotora genu dla TNF α .

Ciekawe są znaczne różnice częstości tego polimorfizmu w różnych populacjach na całym świecie. Uważa się, że wśród rasy białej allel A występuje z częstością 16-27%, podczas gdy w Japonii jest on niezwykle rzadki (154,155). Według wyników uzyskanych w niniejszej pracy częstość alleliczna dla allelu A wynosi 18% w grupie z wadą cewy nerwowej i 14% w grupie kontrolnej, są więc to wartości zbliżone do cytowanych w piśmiennictwie dla rasy białej.

Aktywność TNF α odpowiada za wiele chorób układu nerwowego. Wykazano jego niszczące działanie na mielinę poprzez stymulację apoptozy oligodendrocytów. W badaniach na zwierzętach stwierdzono szybkie zwiększenie ekspresji mRNA dla TNF α na skutek zamknięcia tętnicy środkowej mózgu (89). W naczyniach mózgowych cytokiny mogą indukować ekspresję cząsteczek adhezyjnych oraz aktywować komórki mikrogleju oraz proces demielinizacji, z drugiej strony TNF α powoduje proliferację astrocytów. Stwierdzono także, że wpływa on na proliferację oraz różnicowanie nerwowych komórek progenitorowych. Rola TNF α w uszkodzeniu układu nerwowego jest niewątpliwa. Wykazano zwiększenie jego stężenia w mózgu po każdym urazie ośrodkowego układu nerwowego. Z drugiej strony w pewnych sytuacjach, na przykład po podaniu

neurotoksycznie działającego glutaminianu, TNF α może działać neuroprotekcynie. Wady cewy nerwowej różnią się od takich zaburzeń, ponieważ w ich patogenezie proces zapalny nie odgrywa istotnej roli, przynajmniej na etapie neurulacji. Uważa się jednak, że w życiu wewnątrzmacicznym ekspozycja otwartej płytki nerwowej na płyn owodniowy oraz mechaniczny ucisk przez błony owodniowe sprzyja dalszym uszkodzeniom, pogłębiając między innymi zaburzenia unerwienia doogonowo w stosunku do dysrafii (hipoteza „podwójnego uderzenia”) (156). O ile próby chirurgicznego leczenia dysrafii wewnątrzmacicznie przynoszą pewne pozytywne wyniki, o tyle wydaje się mało prawdopodobne, aby stopień uszkodzenia wewnątrzmacicznego i wynik postępowania chirurgicznego zależały od polimorfizmu promotora genu dla TNF α .

Polimorfizm -308G \rightarrow A promotora genu dla TNF α jest jedną z lepiej przebadanych cech genetycznych. Jego znaczenie może wynikać zarówno z domniemanego izolowanego wpływu na produkcję TNF α jak również z faktu, że jest on częścią rozszerzonego haplotypu HLA-A1-B8 -DR3-DQ2 (93). Zgodnie z oczekiwaniami, asocjację wykazano przede wszystkim w chorobach, w których TNF α może wpływać na stan zapalny lub metabolizm. Stwierdzono asocjację tego polimorfizmu z przebiegiem choroby zakaźnej mózgu, opornością na insulinę, otyłością, zwiększonym stężeniem leptyn (81,157), natomiast inne badania nie potwierdziły związku ze stopniem otyłości, stężeniem glukozy na czczo ani stężeniem insuliny (158); nie wykazano także takiej asocjacji z przebiegiem reumatoidalnego zapalenia stawów (124,159) oraz posocznicy (92). Wykazano natomiast silną asocjację allelu -308A z przebiegiem wstrząsu septycznego; allel ten był on znamienne częstszy u osób zmarłych z powodu wstrząsu oraz częściej występował u chorych ze wstrząsem względem zdrowej grupy kontrolnej. Dodatkowo, wszyscy chorzy we wstrząsie septycznym będący homozygotami pod względem tego allelu zmarli, natomiast śmiertelność wśród chorych posiadających allel A była znamienne większa od chorych bez tego allelu (92). Wykazano znamienne asocjację polimorfizmu TNF α (-308)G \rightarrow A z astmą oskrzelową (160) oraz przewlekłym zapaleniem oskrzeli, a także z włókniejącym zapaleniem pęcherzyków płucnych (*fibrosing alveolitis*) (161). Co ciekawe, większe ryzyko rozwoju astmy oskrzelowej stwierdzono dla allelu G związanego ze zmniejszoną ekspresją TNF α (160). Genotyp charakteryzujący się zwiększeniem ekspresji TNF α wykazuje najsilniejszą asocjację z nasileniem procesów odrzucania narządów po przeszczepach (serca, nerek oraz wątroby), szczególnie o typie odrzucania ostrego (162).

Asocjację polimorfizmu w pozycji -308 bada się nie tylko w chorobach zapalnych. Próbowano wykazać asocjację allelu -308A z niewydolnością serca, jednak wyniki badań były negatywne (163). Próbowano analizować jego udział w patogenezie otyłości, miażdżycy naczyń czy też procesach oksydacyjnych (128). Stwierdzono pozytywną asocjację allelu A ze zwiększoną aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej oraz ze zwiększonym stężeniem homocysteiny, natomiast nie wykazano takiej dodatniej asocjacji z otyłością oraz ze zwiększonym wskaźnikiem względnej masy ciała, a także z miażdżycą naczyń wieńcowych, cukrzycą, nadciśnieniem, przebytym zawałem serca lub niestabilną dusznicą bolesną (81,128). Stwierdzono natomiast asocjację haplotypu obejmującego między innymi allel TNF α (-308)A i TNF α (-238)G z chorobą Alzheimera (164). W populacji Polski stwierdzono korelację allelu A w locus -308 z kliniczną remisją nieziarniczego chłoniaka (91).

5.3.2. Polimorfizm G→A w locus -238 promotora genu dla TNF α

Polimorfizm ten jest znacznie mniej przebadany, co wynika zarówno z faktu, że został odkryty później, jak i braku licznych dowodów na jego znaczenie czynnościowe. W grupach opisywanych w niniejszym badaniu częstość alleli tworzących polimorfizm TNF α (-238)G→A była podobna i zbliżona do częstości opisywanych przez jego odkrywców (94). Różnic pomiędzy grupami badanymi a grupą kontrolną nie stwierdzono zarówno w odniesieniu do częstości allelicznej jak i rozkładu genotypowego i fenotypowego.

Mimo, że polimorfizm ten jest dobrze poznany i jest częstym obiektem badań, dotychczas wykazano asocjację jego alleli z niewieloma stanami klinicznymi. Polimorfizm ten wykazuje związek z przebiegiem reumatoidalnego zapalenia stawów (81), zeszytniającego zapalenia stawów kręgosłupa oraz ze zmniejszoną opornością na insulinę (158), aczkolwiek nie wykazano jego wpływu na produkcję TNF α (81). Obecność allelu A łagodziła przebieg reumatoidalnego zapalenia stawów (165). Z kolei Kaluza i wsp. stwierdzili znamienne częstsze występowanie allelu A u chorych na łuszczycę, jednocześnie stwierdzając, że allel ten znamienne zmniejsza syntezę TNF α w odpowiedzi na stymulację (166). Ciekawe obserwacje poczyniono u niemowląt z dysplazją oskrzelowo-płucną. Okazało się, że allel A rzadziej występuje u dzieci z dysplazją oskrzelowo-płucną, a co ciekawsze, homozygoty AA zupełnie na tę chorobę nie chorowały. Można domniemywać, że allel A zmniejszając produkcję TNF α pełni w tym

przypadku funkcję ochronną (167). Wykazano również, że allel A zmniejsza ryzyko zachorowania na niektóre nowotwory złośliwe (168). U chorych na gorączkę reumatyczną w Meksyku stwierdzano częstsze występowanie allelu G w locus -238 oraz częstsze występowanie allelu A w locus -308 (169). TNF α prawdopodobnie również wpływa na rozwój choroby alkoholowej wątroby, przy czym u nosicieli allelu -238A obserwowano cięższą postać choroby (101).

Polimorfizmy w locus -238 oraz -376 promotora genu dla TNF α wykazują wyraźne odchylenie od równowagi na skutek sprzężenia (170). Rzadszy allel polimorfizmu -238A wykazywał takie odchylenie w stosunku do alleli DRB1*03 oraz DRB1*07 (94). W analizowanych tu grupach stwierdzono odchylenie od równowagi dla pary allelu A i DRB1*03 (słaba korelacja) oraz allelu A i DRB1*07 (silna korelacja). W grupie badanej 13 z 14 alleli A występowało razem z DRB1*07, natomiast w grupie kontrolnej związek taki dotyczył 14 spośród 20 alleli A.

Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane w niniejszym badaniu oraz analizę roli polimorfizmu G \rightarrow A w locus -238 promotora genu dla TNF α wydaje się mało prawdopodobne, aby polimorfizm ten miał jakiegokolwiek znaczenie w etiologii wad cewy nerwowej.

Opisane powyżej badania stanowią jedynie niewielki wycinek prac naukowych dotyczących całego szlaku związanego z TNF α . W promotorze genu dla TNF α opisuje się jeszcze inne polimorfizmy, łącznie 11, choć większość z nich jest rzadka (171). Niektóre z nich mają jednak znaczenie czynnościowe. Uważa się na przykład, że polimorfizm TNF α (-863)C \rightarrow A także wpływa na transkrypcję genu dla TNF; zmniejszenie stężenia tej cytokiny wiąże się z allelem -863A, którego obecność wpływa na wiązanie się białek jądrowych z miejscem transkrypcji, a szczególnie czynnika jądrowego NF- κ B (81). Niedawno wykazano asocjację allelu -857C w promotorze genu dla TNF α z nieswoistymi zapaleniami jelit, nie wykazano natomiast takiej asocjacji dla polimorfizmu w locus -308 (172). Polimorfizm ten wpływa również na wiązanie z czynnikami transkrypcyjnymi.

Badania naukowe oprócz wiedzy teoretycznej powinny mieć również znaczenie praktyczne. Rosnące znaczenie ma na przykład farmakogenetyka, nauka o wpływie genów na skuteczność farmakoterapii. Badania takie prowadzono również w odniesieniu do TNF α , głównie w chorobach zapalnych tkanki łącznej. Stwierdzono na przykład, że w chorobach, w których antagoniści czynnika martwicy guza przynoszą wymierne korzyści kliniczne, stężenie tej cytokiny nie musi być zwiększone. W przypadkach reumatoidalnego zapalenia stawów stwierdzono zależność odpowiedzi po podaniu

antagonistów TNF α od polimorfizmu w locus -308 oraz rozszerzonych haplotypów obejmujących fragment chromosomu od genów dla HLA DRB1 do TNF α (171). Polimorfizm ten wpływa również na odpowiedź nowotworów na leczenie (173). W tym ostatnim przypadku na przykład u nosicieli allelu A stwierdzano zwiększone stężenie TNF α . Natomiast we wstrząsie septycznym, mimo wyraźnie zwiększonego stężenia TNF α nie stwierdzono, aby stosowanie antagonistów TNF α łagodziło przebieg choroby (92). Zaznaczyć tu należy, że częstość allelu A zarówno u chorych we wstrząsie septycznym jak i u zmarłych z powodu wstrząsu septycznego była wyraźnie zwiększona.

5.4. Haplotypy

Część dyskusji dotyczącą haplotypów zamieszczono we wcześniejszym rozdziale dyskusji, tutaj przedstawione zostaną zagadnienia bardziej ściśle dotyczące analizy haplotypów.

Jak opisano wcześniej, grupa MHC jest konserwatywnym superlocus, obecnym już u zwierząt na niższym poziomie rozwoju filogenetycznego. Z tego powodu badania nad tym kompleksem powinny obejmować analizę haplotypów. Wykazanie asocjacji wady cewy nerwowej z haplotypem daje większą szansę znalezienia w sąsiedztwie genu współodpowiedzialnego za jej wystąpienie, gdyż zawęża obszar poszukiwań.

Pseudobayesowską metodę zaimplementowaną w programie PHASE służącą do wyliczania rozkładu haplotypów wybrano z kilku powodów. Po pierwsze bardzo łatwo ją zastosować do obliczeń obejmujących wieloalleliczne loci, takie jak kompleks HLA. Po drugie, metoda dość dobrze radzi sobie z rekonstrukcją haplotypów w przypadku brakujących danych, co również sprawia dużą trudność innym metodom rekonstrukcji. W przypadku innych metod, w tym metody opartej na maksymalnej wiarygodności (*maximum likelihood*) istnieje również kilka metod rekonstrukcji haplotypów przy brakujących danych, nie wykazano jednak przewagi którejkolwiek z nich (112). Należy jednak zachować ostrożność przy stosowaniu testów opartych na maksymalizacji wartości oczekiwanej (*expectation maximisation*) wykorzystywanych w większości programów liczących haplotypy, gdy stwierdza się odchylenie od równowagi Hardy'ego i Weinberga, gdyż zaburza to ich wiarygodność (130).

Istnieje kilka metod interpretacji wyników określających częstość poszczególnych alleli HLA (oraz haplotypów je zawierających) w dwóch grupach. W przypadku niniejszego badania posłużono się testem permutacji wykorzystywanym przez program PHASE. Uwzględnia on wszystkie możliwe rozkłady i oblicza prawdopodobieństwo każdego z nich. Najbardziej konserwatywna metoda polega na zastosowaniu dokładnego testu Fishera dla każdego allelu. Jej niedogodność polega na tym, że wymaga zastosowania poprawki Bonferroni na powtórzenia wielokrotne, co znacznie zmniejsza moc takiego testu. Inną metodą porównywania takich grup jest zastosowanie testu G (*log-likelihood ratio*) (174-176). Tworząc tabelę $2 \times N$ wyliczymy następnie dopasowanie grupy badanej i kontrolnej. Oprócz wartości dla całej tabeli otrzymujemy również wartości dla poszczególnych par komórek, dzięki temu w przypadku gdy grupy będą się różnić statystycznie można wnioskować, który allel odpowiada za tę heterogenność. Test G

charakteryzuje się większą dokładnością niż χ^2 (który zresztą jest uproszczeniem testu G). Aby zwiększyć wiarygodność tego testu, w przypadku gdy sumy wartości w jednym rzędzie były <3 łączono wszystkie takie haplotypy w oddzielną klasę (175). W przypadku stwierdzenia wartości bliskich istotności statystycznej wprowadzona została poprawka Williamsa. W trakcie obliczeń okazało się jednak, że uzyskiwano istotną statystycznie różnicę pomiędzy grupami w teście G. Dokładniejsza analiza wykazała, że przyczyną może być duża różnica w liczebności takiej zsumowanej klasy allelicznej, stąd aby uniknąć ewentualnego zafałszowania wyniku podano również wartość p po eliminacji takiej grupy, jednak w żadnym z przypadków stwierdzenia znamiennej różnicy pomiędzy grupami, eliminacja grupy zsumowanej nie niwelowała istotności statystycznej. W nawiązaniu do argumentów podanych na początku dyskusji należy zaznaczyć, że właśnie te obliczenia obarczone są największym ryzykiem błędu, ponieważ wykonywane są na wartościach oszacowanych jako najbardziej prawdopodobne na podstawie obliczeń matematycznych. Do badania rzeczywistej różnicy służy test permutacji zaimplementowany w programie PHASE, uwzględniający wszelkie możliwe rozkłady. Za pomocą tego testu w żadnym z przypadków nie udało się wykazać znamiennej statystycznie różnicy.

PHASE umożliwia porównanie analizowanych grup za pomocą testu permutacji. Z drugiej jednak strony dane uzyskane dla obu grup można porównać za pomocą testu G. PHASE został zaprojektowany między innymi do analizy satelitarnych polimorfizmów. Wylicza i porównuje teoretyczną częstość wszystkich możliwych haplotypów, także nieobecnych w analizowanych grupach, co niewątpliwie zwiększa ryzyko popełnienia błędu II rodzaju. Z drugiej jednak strony konstruuje najbardziej prawdopodobne haplotypy dla każdej osoby. Dzięki tym danym możliwe jest porównanie aktualnie analizowanych grup w celu wykrycia ewentualnej różnicy. Należy zdać sobie sprawę, że przy braku różnicy w teście permutacji, wykazanie różnicy w teście G ma mniejszą wartość, zapobiega jednak nieodrżuceniu hipotezy zerowej jeżeli jest ona prawdziwa. Badanie rozkładu haplotypów oboma metodami spotyka się w piśmiennictwie, często wymieniane jest wręcz jako równoważne. Zaznaczyć jednak należy, że przy małych liczebnościach poszczególnych haplotypów, dokładność testu G jest znacznie mniejsza. Wiarygodność analizy PHASE zwiększa natomiast fakt, że uzyskane wyniki poparte wyliczeniami programu PHASE potwierdzają tezę o odchyleniu od równowagi na skutek sprzężenia dla pary alleli DR3 i allelu A locus -308 promotora genu dla TNF α , o którym donoszono wcześniej w innych publikacjach.

Test permutacji nie wykazał różnic w częstości haplotypów w obu grupach. Natomiast w teście G stwierdzono istotną różnicę w rozkładzie haplotypów biallelicznych i triallelicznych w analizowanych grupach z wyjątkiem porównania haplotypów DRB1-TNF α (-238) w grupie z dysrafją odcinka piersiowego i grupie kontrolnej. Zauważyć należy, że znamienność tych różnic jest znacznie mniejsza w przypadku haplotypów DRB1-TNF α (-238) niż DRB1-TNF α (-308) i haplotypów obejmujących trzy loci. Można z tego wyciągnąć wniosek, że to DRB1-TNF α (-308) odpowiada w największym stopniu za różnicę pomiędzy grupami, co nie dziwi biorąc pod uwagę, że polimorfizm TNF α (-238)G \rightarrow A jest znacznie rzadszy niż TNF α (-308)G \rightarrow A. Oprócz tego z analizy porównań poszczególnych komórek tabeli wynika, że za różnicę pomiędzy grupami odpowiadają głównie różnice w częstości haplotypów zawierających DRB1*03 oraz DRB1*07. W dużym stopniu odpowiadają za nią także haplotypy, które nie występują w jednej z grup, z uwagi na dużą wartość G^2 uzyskiwaną w takim przypadku. Oczywiście jest, że uzyskiwanie 3 haplotypów w jednej grupie i 0 w drugiej przy liczebności ponad 200 w każdej z grup jest nieistotne z racjonalnego punktu widzenia, choć kilka takich zestawień może sprawiać, że różnica pomiędzy grupami osiągnie istotność statystyczną. Zatem w opinii autora znamiennej różnicę pomiędzy całymi grupami wykazaną w teście G^2 należy uwzględnić jedynie w kategoriach eksperymentalnych i wyznaczyć rzeczywiste haplotypy w obu grupach za pomocą analizy sprzężeniowej, co dopiero pozwoli na wykazanie rzeczywistej asocjacji.

Analiza haplotypów trójallelicznych wykazała znamienne częstsze występowanie haplotypu *07GG w całej grupie dzieci z wadą cewy nerwowej w porównaniu z grupą kontrolną. Należy tu jeszcze raz podkreślić, że różnicę tę wyliczono w oparciu o częstości oszacowane matematycznie, a nie oznaczone doświadczalnie, co w dużym stopniu zmniejsza wiarygodność takiego wyniku. Z drugiej jednak strony zastosowano tutaj bardzo konserwatywną poprawkę Bonferroni, której jedną z właściwości jest bardzo znaczne zwiększenie ryzyka popełnienia błędu II rodzaju i mimo jej zastosowania zależność pozostaje statystycznie istotna. Podjęto również próbę „ręcznego” liczenia haplotypów DRB1*07-TNF α (-238)G-TNF α (-308)G w ten sposób, że zidentyfikowane zostały osoby, u których na pewno występuje ten haplotyp, gdyż posiadały one allel DRB1*07 i allele G w zakresie obu polimorficznych loci w obrębie promotora genu dla TNF α . Okazuje się, że w całej grupie z wadą cewy nerwowej jest takich osób 30 (o 10 mniej niż wyliczono statystycznie), a w grupie kontrolnej 17 (tyle samo ile wyliczono statystycznie). Widać zatem, nawet bez statystycznych obliczeń, że różnica jest dość znaczna, a wyliczenia za

pomocą programu PHASE tylko zwiększają jej istotność uwzględniając rozkład pozostałych alleli. Istnieje więc dość duże prawdopodobieństwo, że jest to różnica rzeczywista i przynajmniej należałoby ją zweryfikować w kolejnym badaniu.

Przyjrzenie się wynikom dla haplotypów biallelicznych oraz dla grup dzieci z wadą cewy nerwowej odcinka piersiowego i lędźwiowego pozwala wyciągnąć wniosek, że za różnicę w zakresie haplotypu odpowiada głównie grupa z dysrafia odcinka lędźwiowego. Na przykład w przypadku odcinka piersiowego nie stwierdzono żadnej znamienności statystycznej w zakresie jakiegokolwiek haplotypu DRB1-TNF α (-238). Jeżeli chodzi o haplotypy DRB1-TNF α (-308) jak również o haplotypy trialleliczne to również za różnicę odpowiada głównie grupa z wadą odcinka lędźwiowego. W tym miejscu należy wspomnieć, że grupa z dysrafia odcinka lędźwiowego nie wykazywała odchylenia od równowagi Hardy'ego i Weinberga dla locus TNF α (-308). Uzyskane wyniki wyznaczają dalsze kierunki ewentualnych badań nad asocjacją HLA z wadą cewy nerwowej.

Przeprowadzone analizy nie dają wiarygodnych podstaw do stwierdzenia udziału genów HLA DRB1 oraz polimorfizmów TNF α (-238)G \rightarrow A i TNF α (-308)G \rightarrow A w patogenezie dysrafii ośrodkowego układu nerwowego. Do istotności statystycznej zbliża się różnica w częstości allelicznej w obrębie polimorfizmu TNF α (-308)G \rightarrow A pomiędzy grupą chorych z wadą cewy nerwowej odcinka piersiowego i grupą kontrolną oraz w częstości allelicznej DRB1*07 pomiędzy całą grupą pacjentów z wadą cewy nerwowej i grupą kontrolną, jednak jest to mimo wszystko związek zbyt słaby, szczególnie po wprowadzeniu poprawki na porównania wielokrotne. Jest bardzo prawdopodobne, że w grupie dzieci z wadą cewy nerwowej częściej występuje haplotyp DRB1*07-TNF α (-238)G-TNF α (-308)G, być może przyczyniający się do samego powstawania wad cewy nerwowej lub innych zjawisk towarzyszących tej wadzie (np. częstszej alergii). Uzyskane wyniki wskazują, że względne ryzyko wady cewy nerwowej wynosiłoby w takim przypadku około 2,7. Wyliczenia różnic w zakresie rozkładu wszystkich haplotypów mają raczej wartość poznawczą, generującą hipotezy dla ewentualnych przyszłych badań na innych grupach. Aby je zweryfikować, podobne analizy należy przeprowadzić na wartościach obserwowanych, co możliwe jest tylko przy badaniach rodzinnych. Uzyskane wyniki nie pozwalają wyciągnąć wiarygodnych wniosków istotnych z punktu widzenia poradnictwa genetycznego, co dla tego rodzaju badań jest najbardziej istotne. Ideą poradnictwa jest zapobieganie wystąpieniu choroby genetycznej w przyszłości, chociaż jak wskazują niedawne wyniki uzyskane w Europie Zachodniej, pomimo, że od dawna znamy protekcyjny wpływ suplementacji kwasu foliowego na występowanie wad

cewy nerwowej, a praktyka taka jest powszechnie zalecana przez lekarzy, to częstość wad cewy nerwowej w Europie nie zmieniła się istotnie w ciągu ostatnich kilkunastu lat, co prawdopodobnie jest spowodowane niezbyt ścisłym stosowaniem się do zaleceń dotyczących suplementacji (177). Znaczny sukces odniesiono natomiast w Kanadzie, gdzie dodawanie kwasu foliowego do żywności wprowadzono na skalę ogólnokrajową i uzyskano ponad 78% zmniejszenie częstości wad cewy nerwowej (z 4,36 na 1000 do 0,96 na 1000) (6). Co ciekawe, wprowadzenie podobnej obowiązkowej suplementacji w Stanach Zjednoczonych doprowadziło do zmniejszenia częstości wad cewy nerwowej tylko o 19% (178), natomiast przyczyny takiej różnicy pozostają nieznane. Być może przyczyniają się do niej polimorfizmy w zakresie genu dla białka nośnikowego dla folianów (RFC-1). Allel G tego ostatniego występował częściej w rodzinach obarczonych wadą cewy nerwowej (179). Ogólnie uważa się, że ryzyko związane z tymi mutacjami wynika ze zwiększonego stężenia homocysteiny, istotne jest zatem badanie zarówno dzieci z wadą cewy nerwowej jak też ich matek. Dla celów profilaktyki kwasem foliowym jest również ważne, że u bardzo dużego odsetka matek dzieci z wadą cewy nerwowej stwierdzono przeciwciała przeciwko receptorom dla folianów, co przynajmniej częściowo może tłumaczyć oporność niektórych przypadków na suplementację kwasem foliowym (180).

Wady cewy nerwowej mają etiologię wieloczynnikową. Badanie podłoża genetycznego takiej wady jest niezwykle trudne z uwagi na liczne mechanizmy biorące udział w neurulacji oraz możliwe interakcje pomiędzy produktami różnych genów na różnych poziomach, które mogą na przykład modyfikować wpływ pewnych mutacji. Liczne badania prowadzone nad podłożem tej wady pozwalają mieć nadzieję, że w niedługim czasie będziemy potrafili dokładnie określać ryzyko ponownego wystąpienia choroby w rodzinie, a tym samym pojawi się droga do dalszego zmniejszenia częstości choroby, która tak bardzo pogarsza jakość życia naszych pacjentów.

6. Wnioski:

1. Stwierdzono brak różnicy w rozkładzie alleli HLA DRB1 pomiędzy grupą kontrolną a całą grupą pacjentów z wadą cewy nerwowej oraz grupą pacjentów z wadą cewy nerwowej odcinka piersiowego i lędźwiowego zarówno w bezpośrednim porównaniu rozkładu poszczególnych alleli jak i rozkładu wszystkich alleli. Częstość alleliczna i fenotypowa DRB1*07 w grupie z wadą cewy nerwowej wyraźnie przewyższa odpowiednie wartości w grupie kontrolnej, jak również w grupach z innych regionów Polski, choć różnica nie osiąga istotności statystycznej.
2. Stwierdzono brak różnicy w rozkładzie polimorficznych alleli A i G w locus TNF α (-308) i TNF α (-238) pomiędzy grupą kontrolną a całą grupą chorych z wadą cewy nerwowej oraz grupą chorych z wadą cewy nerwowej odcinka piersiowego i lędźwiowego zarówno w analizie częstości allelicznej jak i fenotypowej.
3. Haplotyp DRB1*07-TNF α (-238)G-TNF α (-308)G występuje znamiennie częściej w całej grupie chorych z wadą cewy nerwowej w porównaniu z grupą kontrolną. Iloraz szans wystąpienia dysrafii u nosiciela takiego haplotypu wynosi 2,7.
4. Istnieje prawdopodobieństwo, że globalne rozkłady haplotypów triallelicznych HLA DRB1-TNF α (-238)-TNF α (-308) oraz biallelicznych HLA DRB1-TNF α (-308) dla wszystkich grup z wadą cewy nerwowej i HLA DRB1-TNF α (-238) dla całej grupy z wadą cewy nerwowej i z wadą cewy nerwowej odcinka lędźwiowego różnią się od analogicznych rozkładów w grupie kontrolnej (test G), jednak z uwagi na ujemny wynik testu permutacji, dane te muszą być potwierdzone na innych grupach.
5. Na podstawie wyników dla grupy badanej i grupy kontrolnej stwierdzono odchylenie od równowagi na skutek sprzężenia dla pary allelu A w locus TNF α (-238) i DRB1*07
6. Na podstawie wyników dla grupy badanej i grupy kontrolnej stwierdzono odchylenie od równowagi na skutek sprzężenia dla pary allelu A w locus TNF α (-308) i DRB1*03

Wobec uzyskanych wniosków nie można aktualnie uznać któregokolwiek z przebadanych polimorfizmów za izolowany czynnik ryzyka rozwoju wady cewy nerwowej. Pewne nadzieje wzbudza znamienne częstsze występowanie haplotypu DRB1*07-TNF α (-238)G-TNF α (-308)G w grupie chorych z dysrafia, jednak z uwagi na fakt, że częstość tego haplotypu została wyliczona metodami statystycznymi, konieczna jest weryfikacja tej różnicy w badaniach rodzinnych umożliwiających przeprowadzenie pełnej analizy sprzężeniowej. Należy tu podkreślić wysoką znamienność statystyczną uzyskanego wyniku, szczególnie wobec zastosowania poprawki Bonferroni. Zakładając, że uzyskany wynik jest prawdziwy, iloraz szans wystąpienia wady cewy nerwowej u nosiciela takiego haplotypu wynosi 2,7. Z punktu widzenia poradnictwa genetycznego, wykorzystanie wyników jest trudne. Aby stwierdzić nosicielstwo haplotypu, konieczne byłoby uzyskanie materiału od płodu. Jest to dość trudne technicznie, a ponieważ wyniki mają charakter statystyczny, ryzyko pobrania materiału prawdopodobnie przewyższałoby uzyskane korzyści. W żaden sposób uzyskane wyniki nie pozwalają natomiast przewidzieć ryzyka wystąpienia wady cewy nerwowej u potomstwa. Jeszcze mniej obiecujące są wyniki dotyczące globalnego rozkładu haplotypów biallelicznych i triallelicznych, ponieważ różnice w tym zakresie wykazano w odniesieniu do wartości wcześniej wyliczonych inną metodą statystyczną, natomiast test permutacji nie wykazał takiej różnicy. Poza ewentualnym potwierdzeniem asocjacji z opisanym wyżej haplotypem trójallelicznym, nie wydaje się, aby prowadzenie dalszych badań nad rolą HLA DRB1 oraz polimorfizmów TNF α (-238)G \rightarrow A i TNF α (-308)G \rightarrow A w etiologii dysrafii było uzasadnione.

7. Streszczenie

Wady cewy nerwowej należą do jednych z najcięższych wad wrodzonych. Stanowią olbrzymie obciążenie dla samych chorych, ponieważ powodują znacznego stopnia kalectwo zarówno fizyczne, związane z upośledzeniem funkcjonowania wielu narządów wewnętrznych oraz układu ruchu, jak i obciążenie psychiczne wynikające z pogorszenia kontaktów z rówieśnikami i otoczeniem czy przedłużonej zależności od rodziców. Jakość życia chorych dzieci zależy od różnych aspektów funkcjonowania zależnych od poziomu uszkodzenia, jak również od współistnienia wodogłowia, padaczki, porażenia mózgowego czy też liczby zabiegów rewizji zastawki komorowo-otrzewnowej. Wykrycie czynników ryzyka rozwoju wad cewy nerwowej umożliwiłoby opracowanie metod profilaktyki tych wad, a przede wszystkim byłoby niezwykle istotne dla celów poradnictwa genetycznego, pozwalaloby bowiem z większym prawdopodobieństwem określić ryzyko wystąpienia kolejnych przypadków wady w rodzinie probanta.

Wady cewy nerwowej należą do chorób kompleksowych o etiologii wieloczynnikowej, dlatego prowadzi się wiele badań w celu ustalenia czynników ryzyka dysrafii, w tym czynników genetycznych. Dobrze przebadano liczne modele wad cewy nerwowej u myszy, z którym w jednym (*brachyury*) wykazano mutację w genie T położonym w obrębie genów zgodności tkankowej. Celem pracy jest próba stwierdzenia, czy jednym z takich czynników u człowieka mogą być polimorfizmy w obrębie genów zgodności tkankowej HLA DRB1 oraz promotora genu dla TNF α (w locus -238 i -308).

Badaniem objęto 111 dzieci z dysrafia ośrodkowego układu nerwowego w opiece Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie, Grupę kontrolną stanowi 113 zdrowych osób z regionu Polski Południowej zebranych w bazie Zakładu Immunologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego. Materiał wykorzystano za zgodą Zakładu Immunologii. Uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego na przeprowadzenie badania.

W obu grupach przeprowadzono analizę polimorfizmu -238G \rightarrow A i -308G \rightarrow A w obrębie promotora genu dla TNF α za pomocą analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP). W grupie z dysrafia wykonano typowanie HLA DRB1 za pomocą metody odwrotnej hybrydyzacji produktów amplifikacji metodą PCR. W przypadku grupy kontrolnej oparto się na wynikach uzyskanych z Zakładu Immunologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie uzyskanych tą samą metodą.

W analizie statystycznej wykorzystano statystyki opisowe, dokładny test Hardy'ego i Weinberga, dokładny test Fishera (w razie konieczności z poprawką Bonferroni), χ^2 (w razie konieczności z poprawką Yatesa), test Cochran'a i Armitage'a dla trendu, test G (*log-likelihood ratio*), test permutacji. Haplotypy wyliczono za pomocą programu PHASE v. 2.1. Analizy statystyczne wykonano również dla wyliczeń uzyskanych za pomocą programu PHASE, aby oszacować ewentualne różnice w globalnym i szczegółowym rozkładzie haplotypów.

Nie stwierdzono różnicy pomiędzy grupą kontrolną oraz całą grupą dzieci z wadą cewy nerwowej oraz podgrupami podzielonymi zależnie od poziomu wady, w zakresie częstości poszczególnych alleli HLA DRB1 jak również w globalnym rozkładzie tych alleli, a także w częstości homozygot i heterozygot HLA DRB1.

Nie stwierdzono różnicy pomiędzy grupą kontrolną oraz całą grupą pacjentów z wadą cewy nerwowej oraz podgrupami podzielonymi zależnie od poziomu wady, w zakresie rozkładu alleli tworzących polimorfizmy TNF α (-238)G \rightarrow A i TNF α (-308)G \rightarrow A w odniesieniu do częstości allelicznych, proporcji homozygot i heterozygot oraz obecności lub braku alleli odpowiedzialnych prawdopodobnie za funkcjonalne znaczenie tych polimorfizmów. Stwierdzono natomiast istotne odchylenie od równowagi Hardy'ego i Weinberga dla polimorfizmu TNF α (-308)G \rightarrow A w grupie kontrolnej oraz w całej grupie dzieci z wadą cewy nerwowej i w podgrupie z wadą odcinka piersiowego.

W zakresie analizy haplotypów stwierdzono znamienne częstsze występowanie haplotypu DRB1*07-TNF α (-238)G- TNF α (-308)G (liczebność wyliczona za pomocą programu PHASE) w całej grupie dysrafii w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0,001$ przy $p_c=0,00172$). Liczebność poszczególnych haplotypów biallelicznych i pozostałych haplotypów triallelicznych w poszczególnych grupach dysrafii i w grupie kontrolnej nie różniła się znamienne. W teście permutacji wykonanym w trakcie wyliczania liczebności haplotypów nie stwierdzono różnicy pomiędzy grupami chorych z wadą cewy nerwowej i grupą kontrolną w zakresie globalnych rozkładów haplotypów biallelicznych i triallelicznych. Różnicę taką natomiast wykazano za pomocą analizy testem G w odniesieniu do liczebności haplotypów triallelicznych (dla wszystkich podgrup) oraz biallelicznych [z wyjątkiem haplotypu DRB1-TNF α (-238) dla grupy z dysrafią odcinka lędźwiowego]. Należy tu również zaznaczyć, że analiza prowadzona była na liczebnościach wyliczonych za pomocą programu PHASE, a nie na liczebnościach obserwowanych.

Wykazano odchylenie od równowagi na skutek sprzężenia dla par alleli TNF α (-238)A z HLA DRB1*07 (p=0,0001) oraz TNF α (-308)A z HLA DRB1*03 (p=0,0001) dla całej grupy dzieci z wadą cewy nerwowej oraz dla grupy kontrolnej.

Wnioski: Przeprowadzone analizy nie dają wiarygodnych podstaw do stwierdzenia udziału genów HLA DRB1 oraz polimorfizmów TNF α (-238)G \rightarrow A i TNF α (-308)G \rightarrow A w patogenezie dysrafii ośrodkowego układu nerwowego. Pomimo stwierdzenia znamiennej różnicy w zakresie liczebności haplotypu DRB1*07-TNF α (-238)G-TNF α (-308)G pomiędzy całą grupą dzieci z wadą cewy nerwowej i grupą kontrolną oraz znamiennych różnic w globalnym rozkładzie haplotypów biallelicznych i triallelicznych, nie można wnioskować o związku patogenetycznym takich haplotypów, gdyż ich liczebność uzyskano metodami statystycznymi. Aby stwierdzić, czy taki związek rzeczywiście istnieje, konieczne jest przeprowadzenie podobnych analiz na wartościach obserwowanych, co możliwe jest tylko przy badaniach rodzinnych.

8. Summary

Neural tube defects are among the most serious congenital malformations. They pose a great burden for the patients themselves, because they are a cause of significant physical disability related to dysfunction of numerous internal organs and the locomotor system, and mental encumbrance due to deterioration of contact with peers and neighbourhood or prolonged reliance on parents. Quality of life of affected children depends on a variety of functional aspects related to defect level, as well as coexistence of hydrocephalus, epilepsy, cerebral palsy and number of revisions of ventriculoperitoneal shunt. Detection of risk factors for neural tube defects could make it possible to develop prophylaxis of these defects, but above all it is genetic counselling that would greatly benefit from this knowledge, as it would allow prediction of risk of further family cases of the defect with higher probability.

Neural tube defects belong to complex diseases with multifactorial aetiology, hence numerous studies aimed at establishing risk factors for dysraphism, including genetic factors. Numerous murine models of neural tube defects have been studied extensively. In one of them (*brachyury*), a mutation was detected in T gene located in the vicinity of the histocompatibility genes. Aim of this work is to establish whether polymorphisms in histocompatibility genes HLA DRB1 and TNF α gene polymorphisms at loci -238 and -308 could be such risk factors in humans.

This study included 111 children with dysraphism of the central nervous system treated in the University Children Hospital in Cracow. A control group consisted of 113 healthy inhabitants of the Southern Poland, whose data was collected in a database of the Department of Immunology of the University Children Hospital. The Department of Immunology kindly gave its consent for using this material. Also the Bioethics Committee of the Jagiellonian University expressed its consent for conduction of this study.

For both groups a restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis was performed for TNF α gene promoter polymorphisms -238G \rightarrow A and -308G \rightarrow A. In the dysraphism group, HLA DRB1 typing was carried out with PCR sequence-specific oligonucleotides reverse dot-blot kits. Data for the control group were based on results obtained in the Department of Immunology with the same method.

Statistical analysis involved descriptive statistics, exact Hardy-Weinberg test, Fisher's exact test (with Bonferroni correction when applicable), χ^2 (with Yates' correction if applicable), Cochran-Armitage trend test, G-test (*log-likelihood ratio* test) and

permutation test. Haplotypes were calculated with PHASE v. 2.1. software. Statistical analyses were also performed for numerical results of PHASE calculations to evaluate potential differences in global and specific distribution of haplotypes.

No difference was found between the control group and the whole neural tube defects group or subgroups distinguished according to defect level, in distribution of alleles of polymorphisms TNF α (-238)G \rightarrow A and TNF α (-308)G \rightarrow A in terms of allelic frequency, proportion of homozygotes and heterozygotes, and presence or absence of alleles possibly responsible for functional significance of these polymorphisms. Significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was identified for polymorphism TNF α (-308)G \rightarrow A in the control group, the whole group with neural tube defects and the thoracic defects subgroup.

The haplotype analysis revealed significantly higher proportion of haplotype DRB107-TNF α (-238)G-TNF α (-308)G (numbers computed with PHASE software) in the whole dysraphism group versus the control group ($p=0.001$, with $p_c=0.00172$). Numbers of individual biallelic and the remaining triallelic haplotypes did not differ significantly between dysraphism groups and the control group. Permutation test, performed when calculating numbers of haplotypes, failed to reveal any difference between neural tube defects groups and the control group in terms of global distribution of biallelic and triallelic haplotypes. In contrast, such difference was demonstrated by G-test analysis with reference to triallelic haplotypes (for all subgroups) and biallelic haplotypes [except for a haplotype DRB1-TNF α (-238) for the lumbar dysraphism group]. It is noteworthy however that this analysis involved numbers calculated with the PHASE software rather than observed numbers.

Linkage disequilibrium was shown for allele pairs TNF α (-238)A-HLA DRB1*07 ($p=0.0001$) and TNF α (-308)A-HLA DRB1*03 ($p=0.0001$) for the whole neural tube defects group and the control group.

Conclusions: The performed analyses provide no reliable grounds to support the role of HLA DRB1 genes and TNF α (-238)G \rightarrow A and TNF α (-308)G \rightarrow A polymorphisms in pathogenesis of the central nervous system dysraphism. Despite finding a significant difference in numbers of DRB1*07-TNF α (-238)G-TNF α (-308)G between the whole neural tube defects group and the control group and significant differences in the global distribution of biallelic and triallelic haplotypes, it is not possible to acknowledge any pathogenetic associations of such haplotypes, as the primary numbers were computed with statistical methods rather than observed experimentally. In order to validate such

correlation, similar analysis should be performed with observed values, and this is possible only with family studies.

9. Piśmiennictwo

1. Mourant A.E. Disease associations with polymorphisms other than HLA. w: Dausset J., Svejgaard A. (red). HLA and disease. Copenhagen: Munksgaard 1977.
2. Rintoul N.E., Sutton L.N., Hubbard A.M., Cohen B., Melchionni J., Pasquariello P.S., Adzick N.S. A new look at myelomeningoceles: functional level, vertebral level, shunting, and the implications for fetal intervention. *Pediatrics*. 2002; 109(3): 409-413.
3. Cate I.M., Kennedy C., Stevenson J. Disability and quality of life in spina bifida and hydrocephalus. *Dev Med Child Neurol*. 2002; 44(5): 317-322.
4. Smithells R.W., Sheppard S., Schorah C.J. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child*. 1976; 51(12): 944-950.
5. Botto L.D., Moore C.A., Khoury M.J., Erickson J.D. Neural-tube defects. *N Engl J Med*. 1999; 341(20): 1509-1519.
6. Liu S., West R., Randell E., Longerich L., O'connor K.S., Scott H., Crowley M., Lam A., Prabhakaran V., McCourt C. A comprehensive evaluation of food fortification with folic acid for the primary prevention of neural tube defects. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2004; 4(1): 20
7. Jorde L.B., Carey J.C., Bamshad M.J., and White R.L. *Medical Genetics*. St. Louis: Mosby 1999.
8. Stegmann K., Boecker J., Richter B., Capra V., Finnell R.H., Ngo E.T., Strehl E., Ermert A., Koch M.C. A screen for mutations in human homologues of mice exencephaly genes *Tfap2alpha* and *Msx2* in patients with neural tube defects. *Teratology*. 2001; 63(5): 167-175.
9. Lynch S.A. Non-multifactorial neural tube defects. *Am J Med Genet C. Semin. Med Genet*. 2005; 135(1): 69-76.
10. Koch M., Fuhrmann W. Epidemiology of neural tube defects in Germany. *Hum Genet*. 1984; 68(2): 97-103.
11. Łodzinski K. Dysrafia. w: Poradowska W. (red). *Chirurgia Wieku Dziecięcego*. Warszawa: PZWL 1992.
12. Pietrzyk J.J. A search for environmental and genetic background for neural tube defects: twenty-five years of experience. *Cent Eur J Public Health*. 1997; 5(2): 86-89.
13. Copp A.J. Neural Tube Defects. w: *Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing 2001.
14. Morrison K., Papapetrou C., Hol F.A., Mariman E.C., Lynch S.A., Burn J., Edwards Y.H. Susceptibility to spina bifida; an association study of five candidate genes. *Ann Hum Genet*. 1998; 62 (Pt 5)379-396.
15. Pietrzyk J.J., Różanski B. Badania genetyczne dzieci z wadami cewy nerwowej (WCN). I. Ryzyko empiryczne i względne. *Pediatr Pol*. 1987; 62(3): 145-149.
16. Frey L., Hauser W.A. Epidemiology of neural tube defects. *Epilepsia*. 2003; 44 (Suppl. 3): 4-13.

17. Murshid W.R. Spina bifida in Saudi Arabia: is consanguinity among the parents a risk factor? *Pediatr Neurosurg.* 2000; 32(1): 10-12.
18. Shaw G.M., Barber R., Todoroff K., Lammer E.J., Finnell R.H. Microsatellites proximal to leptin and leptin receptor as risk factors for spina bifida. *Teratology.* 2000; 61(3): 231-235.
19. Croen L.A., Todoroff K., Shaw G.M. Maternal exposure to nitrate from drinking water and diet and risk for neural tube defects. *Am J Epidemiol.* 2001; 153(4): 325-331.
20. Cengiz B., Soylemez F., Ozturk E., Cavdar A.O. Serum zinc, selenium, copper, and lead levels in women with second-trimester induced abortion resulting from neural tube defects: a preliminary study. *Biol Trace Elem Res.* 2004; 97(3): 225-235.
21. Rogala P., Szulc A., Pawlak A., Glowacki M. Heterogenność kliniczna myelomeningocele w aspekcie wielomiejscowego mechanizmu zamykania cewy nerwowej. *Chir Narządów Ruchu Ortop Pol.* 1995; 60(2): 97-105.
22. Moretti M.E., Bar-Oz B., Fried S., Koren G. Maternal hyperthermia and the risk for neural tube defects in offspring: systematic review and meta-analysis. *Epidemiology.* 2005; 16(2): 216-219.
23. Babcook C.J., Ball R.H., Feldkamp M.L. Prevalence of aneuploidy and additional anatomic abnormalities in fetuses with open spina bifida: population based study in Utah. *J Ultrasound Med.* 2000; 19(9): 619-623.
24. Van Allen M.I. Multisite neural tube closure in humans. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1996; 30(1): 203-225.
25. O'Rahilly R., Muller F. The two sites of fusion of the neural folds and the two neuropores in the human embryo. *Teratology.* 2002; 65(4): 162-170.
26. Catala M. Genetic control of caudal development. *Clin Genet.* 2002; 61(2): 89-96.
27. Kerszberg M., Changeux J.P. A simple molecular model of neurulation. *Bioessays.* 1998; 20(9): 758-770.
28. Vetter M., Harris W. Neural development: bHLH genes. w: *Encyclopedia of Life Sciences.* London: Nature Publishing 2001.
29. Rathjen J., Haines B.P., Hudson K.M., Nesci A., Dunn S., Rathjen P.D. Directed differentiation of pluripotent cells to neural lineages: homogeneous formation and differentiation of a neurectoderm population. *Development.* 2002; 129(11): 2649-2661.
30. Colas J.F., Schoenwolf G.C. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev. Dyn.* 2001; 221(2): 117-145.
31. Timmer J.R., Wang C., Niswander L. BMP signaling patterns the dorsal and intermediate neural tube via regulation of homeobox and helix-loop-helix transcription factors. *Development.* 2002; 129(10): 2459-2472.
32. Charrier J.B., Lapointe F., Le Douarin N.M., Teillet M.A. Anti-apoptotic role of Sonic hedgehog protein at the early stages of nervous system organogenesis. *Development.* 2001; 128(20): 4011-4020.
33. Lumsden A. Vertebrate central nervous system: Pattern formation. w: *Encyclopedia of Life Sciences.* London: Nature Publishing 2002.

34. Manzanares M., Krumlauf R. Mammalian embryo: Hox genes. w: Encyclopedia of Life Sciences, London: Nature Publishing 2001.
35. Volcik K.A., Blanton S.H., Kruzel M.C., Townsend I.T., Tyerman G.H., Mier R.J., Northrup H. Testing for genetic associations in a spina bifida population: Analysis of the HOX gene family and human candidate gene regions implicated by mouse models of neural tube defects. *Am J Med Genet.* 2002; 110(3): 203-207.
36. Harland R. Neural induction. *Curr Opin Genet Dev.* 2000; 10(4): 357-362.
37. Zeng L., Fagotto F., Zhang T., Hsu W., Vasicek T.J., Perry W.L., III, Lee J.J., Tilghman S.M., Gumbiner B.M., Costantini F. The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell.* 1997; 90(1): 181-192.
38. Honarpour N., Gilbert S.L., Lahn B.T., Wang X., Herz J. Apaf-1 deficiency and neural tube closure defects are found in fog mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2001; 98(17): 9683-9687.
39. Ruland J., Duncan G.S., Elia A., del B.B., I, Nguyen L., Plyte S., Millar D.G., Bouchard D., Wakeham A., Ohashi P.S., Mak T.W. Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell.* 2001; 104(1): 33-42.
40. Chi H., Sarkisian M.R., Rakic P., Flavell R.A. Loss of mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 (MEKK4) results in enhanced apoptosis and defective neural tube development. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2005; 102(10): 3846-3851.
41. Lallier T.E., Whittaker C.A., DeSimone D.W. Integrin alpha 6 expression is required for early nervous system development in *Xenopus laevis*. *Development.* 1996; 122(8): 2539-2554.
42. Zolessi F.R., Arruti C. Apical accumulation of MARCKS in neural plate cells during neurulation in the chick embryo. *BMC. Dev. Biol.* 2001; 1(1): 7-
43. Czyż J. Zjawisko kontaktowego naprowadzania komórek. *Postępy Biologii Komórki.* 1993; 20(Suppl. 2): 125-133.
44. Selcuki M., Vatansever S., Inan S., Sancı M., Sayhan S., Bagdatoglu C. Neural tissue continues its maturation at the site of neural tube closure defects: implications for prenatal intervention in human samples. *Childs Nerv Syst.* 2004; 20(5): 313-320.
45. Juriloff D.M., Harris M.J. Mouse models for neural tube closure defects. *Hum Mol Genet.* 2000; 9(6): 993-1000.
46. Klootwijk R., Franke B., van der Zee C.E., de Boer R.T., Wilms W., Hol F.A., Mariman E.C. A deletion encompassing *Zic3* in bent tail, a mouse model for X-linked neural tube defects. *Hum Mol Genet.* 2000; 9(11): 1615-1622.
47. Morrison K., Papapetrou C., Attwood J., Hol F., Lynch S.A., Sampath A., Hamel B., Burn J., Sowden J., Stott D., Mariman E., Edwards Y.H. Genetic mapping of the human homologue (T) of mouse T(Brachyury) and a search for allele association between human T and spina bifida. *Hum Mol Genet.* 1996; 5(5): 669-674.
48. Edwards Y.H., Putt W., Lekoape K.M., Stott D., Fox M., Hopkinson D.A., Sowden J. The human homolog T of the mouse T(Brachyury) gene; gene structure, cDNA sequence, and assignment to chromosome 6q27. *Genome Res.* 1996; 6(3): 226-233.

49. Shields D.C., Ramsbottom D., Donoghue C., Pinjon E., Kirke P.N., Molloy A.M., Edwards Y.H., Mills J.L., Mynett-Johnson L., Weir D.G., Scott J.M., Whitehead A.S. Association between historically high frequencies of neural tube defects and the human T homologue of mouse T (Brachyury). *Am J Med Genet.* 2000; 92(3): 206-211.
50. Neumann P.E., Frankel W.N., Letts V.A., Coffin J.M., Copp A.J., Bernfield M. Multifactorial inheritance of neural tube defects: localization of the major gene and recognition of modifiers in ct mutant mice. *Nat Genet.* 1994; 6(4): 357-362.
51. Letts V.A., Schork N.J., Copp A.J., Bernfield M., Frankel W.N. A curly-tail modifier locus, *mct1*, on mouse chromosome 17. *Genomics.* 1995; 29(3): 719-724.
52. Chen W.H., Morriss-Kay G.M., Copp A.J. Prevention of spinal neural tube defects in the curly tail mouse mutant by a specific effect of retinoic acid. *Dev Dyn.* 1994; 199(2): 93-102.
53. van Straaten H.W., Copp A.J. Curly tail: a 50-year history of the mouse spina bifida model. *Anat Embryol (Berl).* 2001; 203(4): 225-237.
54. Shaw G.M., Carmichael S.L., Yang W., Schaffer D.M. Periconceptional dietary intake of myo-inositol and neural tube defects in offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol. Teratol.* 2005; 73(3): 184-187.
55. Groenen P.M., Peer P.G., Wevers R.A., Swinkels D.W., Franke B., Mariman E.C., Steegers-Theunissen R.P. Maternal myo-inositol, glucose, and zinc status is associated with the risk of offspring with spina bifida. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189(6): 1713-1719.
56. Niederreither K., Abu-Abed S., Schuhbauer B., Petkovich M., Chambon P., Dolle P. Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development. *Nat Genet.* 2002; 31(1): 84-88.
57. van Straaten H.W., Hekking J.W., Consten C., Copp A.J. Intrinsic and extrinsic factors in the mechanism of neurulation: effect of curvature of the body axis on closure of the posterior neuropore. *Development.* 1993; 117(3): 1163-1172.
58. Hol F.A., Geurds M.P., Jensson O., Hamel B.C., Moore G.E., Newton R., Mariman E.C. Exclusion mapping of the gene for X-linked neural tube defects in an Icelandic family. *Hum Genet.* 1994; 93(4): 452-456.
59. Hol F.A., Schepens M.T., van Beersum S.E., Redolfi E., Affer M., Vezzoni P., Hamel B.C., Karnes P.S., Mariman E.C., Zucchi I. Identification and characterization of an Xq26-q27 duplication in a family with spina bifida and panhypopituitarism suggests the involvement of two distinct genes. *Genomics.* 2000; 69(2): 174-181.
60. Hol F.A., Geurds M.P., Chatkupt S., Shugart Y.Y., Balling R., Schrandt-Stumpel C.T., Johnson W.G., Hamel B.C., Mariman E.C. PAX genes and human neural tube defects: an amino acid substitution in PAX1 in a patient with spina bifida. *J Med Genet.* 1996; 33(8): 655-660.
61. Kibar Z., Vogan K.J., Groulx N., Justice M.J., Underhill D.A., Gros P. *Ltap*, a mammalian homolog of *Drosophila Strabismus/Van Gogh*, is altered in the mouse neural tube mutant *Loop-tail*. *Nat Genet.* 2001; 28(3): 251-255.
62. Murdoch J.N., Doudney K., Paternotte C., Copp A.J., Stanier P. Severe neural tube defects in the loop-tail mouse result from mutation of *Lpp1*, a novel gene involved in floor plate specification. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(22): 2593-2601.

63. Lu X., Borchers A.G., Jolicoeur C., Rayburn H., Baker J.C., Tessier-Lavigne M. PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature*. 2004; 430(6995): 93-98.
64. Hoch R.V., Soriano P. Roles of PDGF in animal development. *Development*. 2003; 130(20): 4769-4784.
65. Stephenson D.A., Mercola M., Anderson E., Wang C.Y., Stiles C.D., Bowen-Pope D.F., Chapman V.M. Platelet-derived growth factor receptor alpha-subunit gene (*Pdgfra*) is deleted in the mouse patch (*Ph*) mutation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1991; 88(1): 6-10.
66. Joosten P.H., Toepoel M., Mariman E.C., Van Zoelen E.J. Promoter haplotype combinations of the platelet-derived growth factor alpha-receptor gene predispose to human neural tube defects. *Nat Genet*. 2001; 27(2): 215-217.
67. Wu M., Chen D.F., Sasaoka T., Tonegawa S. Neural tube defects and abnormal brain development in *F52*-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1996; 93(5): 2110 - 2115.
68. Graf W.D., Oleinik O.E. The study of neural tube defects after the Human Genome Project and folic acid fortification of foods. *Eur J Pediatr Surg*. 2000; 10 (Suppl. 1): 9-12.
69. Hansen T.H., Carreno B.M., and Sachs D.H. The Major Histocompatibility Complex. w: Paul W. E. (red). *Fundamental Immunology*, New York: Raven Press, Ltd. 1993.
70. Strominger J.L. Human histocompatibility proteins. *Immunol Rev*. 2002; 185:69-77.
71. Rayburn H., Mandelboim O., Vales-Gomez M., Sheu E.G., Pazmany L., Davis D.M., Strominger J.L. Human NK cells: their ligands, receptors and functions. *Immunol Rev*. 1997; 155:119-125.
72. Penn D. J. Major histocompatibility complex: human. w: *Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing 2001.
73. Buyse I., Decorte R., Baens M., Cuppens H., Semana G., Emonds M.P., Marynen P., Cassiman J.J. Rapid DNA typing of class II HLA antigens using the polymerase chain reaction and reverse dot blot hybridization. *Tissue Antigens*. 1993; 41(1): 1-14.
74. Mehra N. K. Histocompatibility antigens. w: *Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing Group 2001.
75. Marsh S.G., Albert E.D., Bodmer W.F., Bontrop R.E., Dupont B., Erlich H.A., Geraghty D.E., Hansen J.A., Hurley C.K., Mach B., Mayr W.R., Parham P., Petersdorf E.W., Sasazuki T., Schreuder G.M., Strominger J.L., Svejgaard A., Terasaki P.I., Trowsdale J. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Int J Immunogenet*. 2005; 32(2): 107-159.
76. Hedrick P.W. Balancing selection and MHC. *Genetica*. 1998; 104(3): 207-214.
77. Nadel S. Helping to understand studies examining genetic susceptibility to sepsis. *Clin. Exp. Immunol*. 2002; 127(2): 191-192.
78. Szatmary Z. Tumor necrosis factor-alpha: molecular-biological aspects minireview. *Neoplasma*. 1999; 46(5): 257-266.
79. Mannel D.N., Echtenacher B. TNF in the inflammatory response. *Chem Immunol*. 2000; 74:141-161.

80. Nedwin G.E., Naylor S.L., Sakaguchi A.Y., Smith D., Jarrett-Nedwin J., Pennica D., Goeddel D.V., Gray P.W. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res.* 1985; 13(17): 6361-6373.
81. Skoog T., van't Hooft F.M., Kallin B., Jovinge S., Boquist S., Nilsson J., Eriksson P., Hamsten A. A common functional polymorphism (C-->A substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene associated with reduced circulating levels of TNF-alpha. *Hum Mol Genet.* 1999; 8(8): 1443-1449.
82. Wajant H., Scheurich P. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001; 33(1): 19-32.
83. Goeddel D.V. Signal transduction by tumor necrosis factor: the Parker B. Francis Lectureship. *Chest.* 1999; 116(1 Suppl.): 69S-73S.
84. Hehlhgans T., Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology.* 2005; 115(1): 1-20.
85. Jakubisiak M. *Immunologia.* Warszawa: PWN 2002.
86. Wajant H., Henkler F., Scheurich P. The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal.* 2001; 13(6): 389-400.
87. Herrera-Garza E.H., Stetson S.J., Cubillos-Garzon A., Vooletich M.T., Farmer J.A., Torre-Amione G. Tumor necrosis factor-alpha: a mediator of disease progression in the failing human heart. *Chest.* 1999; 115(4): 1170-1174.
88. O'Grady N.P., Tropea M., Preas H.L., Reda D., Vandivier R.W., Banks S.M., Suffredini A.F. Detection of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta during experimental endotoxemia and human sepsis. *J Infect Dis.* 1999; 179(1): 136-141.
89. Saliba E., Henrot A. Inflammatory mediators and neonatal brain damage. *Biol Neonate.* 2001; 79(3-4): 224-227.
90. Ruuls S.R., Sedgwick J.D. Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: lessons from human genetics and animal models. *Am J Hum Genet.* 1999; 65(2): 294-301.
91. Juszczynski P., Kalinka E., Bienvenu J., Woszczek G., Borowiec M., Robak T., Kowalski M., Lech-Maranda E., Baseggio L., Coiffier B., Salles G., Warzocha K. Human leukocyte antigens class II and tumor necrosis factor genetic polymorphisms are independent predictors of non-Hodgkin lymphoma outcome. *Blood.* 2002; 100(8): 3037-3040.
92. Mira J.P., Cariou A., Grall F., Delclaux C., Losser M.R., Heshmati F., Cheval C., Monchi M., Teboul J.L., Riche F., Leleu G., Arbibe L., Mignon A., Delpech M., Dhainaut J.F. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA.* 1999; 282(6): 561-568.
93. Wilson A.G., Symons J.A., McDowell T.L., McDevitt H.O., Duff G.W. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1997; 94(7): 3195-3199.

94. D'Alfonso S., Richiardi P.M. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics*. 1994; 39(2): 150-154.
95. Feng X. Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts. *Gene*. 2005; 350(1): 1-13.
96. Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001; 104(4): 487-501.
97. Regnier C.H., Masson R., Kedinger V., Textoris J., Stoll I., Chenard M.P., Dierich A., Tomasetto C., Rio M.C. Impaired neural tube closure, axial skeleton malformations, and tracheal ring disruption in TRAF4-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2002; 99(8): 5585-5590.
98. Lomaga M.A., Henderson J.T., Elia A.J., Robertson J., Noyce R.S., Yeh W.C., Mak T.W. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) deficiency results in exencephaly and is required for apoptosis within the developing CNS. *J Neurosci*. 2000; 20(19): 7384-7393.
99. Skulachev V.P. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol Aspects Med*. 1999; 20(3): 139-184.
100. Abrahamsen B., Shalhoub V., Larson E.K., Eriksen E.F., Beck-Nielsen H., Marks S.C., Jr. Cytokine RNA levels in transiliac bone biopsies from healthy early postmenopausal women. *Bone*. 2000; 26(2): 137-145.
101. Grove J., Daly A.K., Bassendine M.F., Day C.P. Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1997; 26(1): 143-146.
102. Marsh S.G., Bodmer J.G., Albert E.D., Bodmer W.F., Bontrop R.E., Dupont B., Erlich H.A., Hansen J.A., Mach B., Mayr W.R., Parham P., Petersdorf E.W., Sasazuki T., Schreuder G.M., Strominger J.L., Svejgaard A., Terasaki P.I. Nomenclature for factors of the HLA system, 2000. *Tissue Antigens*. 2001; 57(3): 236-283.
103. Marsh S.G., Albert E.D., Bodmer W.F., Bontrop R.E., Dupont B., Erlich H.A., Geraghty D.E., Hansen J.A., Mach B., Mayr W.R., Parham P., Petersdorf E.W., Sasazuki T., Schreuder G.M., Strominger J.L., Svejgaard A., Terasaki P.I. Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. *Tissue Antigens*. 2002; 60(5): 407-464.
104. Schreuder G.M.T., Hurley C.K., Marsh S.G.E., Lau M., Fernandez-Vina M., Noreen H.J., Setterholm M., Maiers M. The HLA Dictionary 2004: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5 and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR and -DQ antigens. *Int J Immunogenet*. 2005; 32(1): 19-69.
105. Matej H., Nowakowska B., Pacyńska J., Kałamarz M., Baldy-Chudzik K., Bisikiewicz R. HLA-A, B, C, and DR gene and haplotype frequencies in 600 poles by a maximum likelihood method of gene counting. *Arch Immunol Ther. Exp (Warsz.)*. 1992; 40(2): 151-156.
106. Jungerman M., Sanchez-Mazas A., Fichna P., Ivanova R., Charron D., Hors J., Djoulah S. HLA class II DRB1, DQA1 and DQB1 polymorphisms in the Polish population from Wielkopolska. *Tissue Antigens*. 1997; 49(6): 624-628.

107. Krokowski M., Bodalski J., Bratek A., Boitard C., Caillat-Zucman S. HLA class II allele and haplotype distribution in a population from central Poland. *Eur J Immunogenet.* 1998; 25(1): 5-9.
108. Ploski R., Ronningen K.S., Thorsby E. HLA class II profile of a Polish population: frequencies of DRB1, DQA1, DQB1, and DPB1 alleles and DRB1-DQA1-DQB1 haplotypes. *Transplant Proc.* 1996; 28(6): 3431-3432.
109. Garnier-Gere P., Dillmann C. A computer program for testing pairwise linkage disequilibria in subdivided populations. *J Hered.* 1992; 83(3): 239-
110. Stephens M., Smith N.J., Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet.* 2001; 68(4): 978-989.
111. Stephens M., Donnelly P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet.* 2003; 73(6): 1162-1169.
112. Gourraud P.A., Genin E., Cambon-Thomsen A. Handling missing values in population data: consequences for maximum likelihood estimation of haplotype frequencies. *Eur J Hum Genet.* 2004; 12(10): 805-812.
113. Xu J., Turner A., Little J., Bleecker E.R., Meyers D.A. Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: hint for genotyping error? *Hum Genet.* 2002; 111(6): 573-574.
114. Neale B.M., Sham P.C. The future of association studies: gene-based analysis and replication. *Am J Hum Genet.* 2004; 75(3): 353-362.
115. Schaid D.J., McDonnell S.K., Hebring S.J., Cunningham J.M., Thibodeau S.N. Nonparametric tests of association of multiple genes with human disease. *Am J Hum Genet.* 2005; 76(5): 780-793.
116. Risch N., Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science.* 1996; 273(5281): 1516-1517.
117. Knight J.C., Kwiatkowski D. Inherited variability of tumor necrosis factor production and susceptibility to infectious disease. *Proc Assoc Am Physicians.* 1999; 111(4): 290-298.
118. Cullen M., Noble J., Erlich H., Thorpe K., Beck S., Klitz W., Trowsdale J., Carrington M. Characterization of recombination in the HLA class II region. *Am J Hum Genet.* 1997; 60(2): 397-407.
119. Wilson A.G., de Vries N., Pociot F., di Giovine F.S., van der Putte L.B., Duff G.W. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. *J Exp Med.* 1993; 177(2): 557-560.
120. Allcock R.J., Windsor L., Gut I.G., Kucharak R., Sobre L., Lechner D., Garnier J.G., Baltic S., Christiansen F.T., Price P. High-Density SNP genotyping defines 17 distinct haplotypes of the TNF block in the Caucasian population: implications for haplotype tagging. *Hum Mutat.* 2004; 24(6): 517-525.
121. Glushkov A.N., Shabaldin A.V., Stein M.A. Mechanisms of HLA DR Gene Selection in Early Ontogenesis. *Russ J Immunol.* 2001; 6(1): 61-70.

122. Koch M., Rett K., Volk A., Maerker E., Haist K., Weisser M., Rettig A., Renn W., Haring H.U. The tumour necrosis factor alpha -238 G --> A and -308 G --> A promoter polymorphisms are not associated with insulin sensitivity and insulin secretion in young healthy relatives of Type II diabetic patients. *Diabetologia*. 2000; 43(2): 181-184.
123. Lauten M., Matthias T., Stanulla M., Beger C., Welte K., Schrappe M. Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes. *Leukemia*. 2002; 16(8): 1437-1442.
124. Lacki J.K., Moser R., Korczowska I., Mackiewicz S., Muller W. TNF-alpha gene polymorphism does not affect the clinical and radiological outcome of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2000; 19(4): 137-140.
125. Wybrańska I., Malczewska-Malec M., Niedbal S., Naskalski J.W., Dembińska-Kieć A. The TNF-alpha gene NcoI polymorphism at position -308 of the promoter influences insulin resistance, and increases serum triglycerides after postprandial lipaemia in familiar obesity. *Clin Chem Lab Med*. 2003; 41(4): 501-510.
126. Kula D., Jurecka-Tuleja B., Gubala E., Krawczyk A., Szpak S., Jarzab M. Association of polymorphism of LTalpha and TNF genes with Graves' disease. *Folia Histochem Cytobiol*. 2001; 39(Suppl 2): 77-78.
127. Cipriano C., Caruso C., Lio D., Giacconi R., Malavolta M., Muti E., Gasparini N., Franceschi C., Mocchegiani E. The -308G/A polymorphism of TNF-alpha influences immunological parameters in old subjects affected by infectious diseases. *Int J Immunogenet*. 2005; 32(1): 13-18.
128. Wang X.L., Oosterhof J. Tumour necrosis factor alpha G-308→A polymorphism and risk for coronary artery disease. *Clin Sci (Lond)*. 2000; 98(4): 435-437.
129. Brand E., Schorr U., Kunz I., Kertmen E., Ringel J., Distler A., Sharma A.M. Tumor necrosis factor-alpha--308 G/A polymorphism in obese Caucasians. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001; 25(4): 581-585.
130. Dorak M.T. Basic Population Genetics. (uaktual. 16.11.2005), dostępny na stronie: <http://dorakmt.tripod.com/genetics/popgen.html>.
131. Alper C.A. Major Histocompatibility Complex: Disease Associations. w: *Encyclopedia of Life Sciences*. London: Nature Publishing 2001.
132. De Bruyere M., Kulakowski S., Malchaire J., Delire M., Sokal G. HLA gene and haplotype frequencies in spina bifida. *Population and family studies. Tissue Antigens*. 1977; 10(5): 399-402.
133. Bobrow M., Bodmer J.G., Bodmer W.F., McDevitt H.O., Lorber J., Swift P. The search for a human equivalent of the mouse T-locus - negative results from a study of HLA types in spida bifida. *Tissue Antigens*. 1975; 5(4): 234-237.
134. Pietrzyk, J. J. Badania epidemiologiczne, rodzinne i immunogenetyczne w stanach dysrafii ośrodkowego układu nerwowego u dzieci. Rozprawa habilitacyjna. Kraków, 1979.
135. Pietrzyk J.J., Turowski G., Różanski B. Central nervous system malformations in the Krakow region. II. Case control studies on the human leukocyte antigen genotype and haplotype frequencies. *Am J Med Genet*. 1984; 18(1): 89-97.

136. Bobrow M., Bodmer J.G., Bodmer W.F., McDevitt H.O., Lorber J., Swift P. The search for a human equivalent of the mouse T-locus - negative results from a study of HLA types in spina bifida. *Tissue Antigens*. 1975; 5(4): 234-237.
137. Fellous M., Boue J., Malbrunot C., Wollman E., Sasportes M., Van Cong N., Marcelli A., Rebourcet R., Hubert C., Demenais F., Elston R.C., Namboodiri K.K., Kaplan E.B., Fellous M. A five-generation family with sacral agenesis and spina bifida: possible similarities with the mouse T-locus. *Am J Med Genet*. 1982; 12(4): 465-487.
138. Weitkamp L.R., Schacter B.Z. Transferrin and HLA: spontaneous abortion, neural tube defects, and natural selection. *N Engl J Med*. 1985; 313(15): 925-932.
139. Schacter B., Muir A., Gyves M., Tasin M. HLA-A,B compatibility in parents of offspring with neural-tube defects or couples experiencing involuntary fetal wastage. *Lancet*. 1979; 1(8120): 796-799.
140. Rhodes D.A., Trowsdale J. Genetics and molecular genetics of the MHC. *Rev Immunogenet*. 1999; 1(1): 21-31.
141. Simon M., Bourel M., Fauchet R., Genetet B. Association of HLA-A3 and HLA-B14 antigens with idiopathic haemochromatosis. *Gut*. 1976; 17(5): 332-334.
142. Malfroy L., Roth M.P., Carrington M., Borot N., Volz A., Ziegler A., Coppin H. Heterogeneity in rates of recombination in the 6-Mb region telomeric to the human major histocompatibility complex. *Genomics*. 1997; 43(2): 226-231.
143. Ober C., Hyslop T., Elias S., Weitkamp L.R., Hauck W.W. Human leukocyte antigen matching and fetal loss: results of a 10 year prospective study. *Hum Reprod*. 1998; 13(1): 33-38.
144. Park S.H., Bae Y.M., Kim T.J., Ha I.S., Kim S., Chi J.G., Lee S.K. HLA-DR expression in human fetal thymocytes. *Hum. Immunol* 1992; 33(4): 294-298.
145. Trebichavsky I., Nyklicek O. Expression of HLA-DR molecules and some other differentiation antigens within early human fetus. *Folia Biol. (Praha)*. 1992; 38(5): 269-276.
146. Shabaldin A.V., Glushkov A.N. Genetic Aspects of Immunopathology in Prenatal and Postnatal Period. *Russ J Immunol*. 1999; 4(1): 9-18.
147. Rihs H.P., Cremer R., Chen Z., Baur X. Molecular analysis of DRB and DQB1 alleles in German spina bifida patients with and without IgE responsiveness to the latex major allergen Hev b 1. *Clin Exp Allergy*. 1998; 28(2): 175-180.
148. Blanco C., Sanchez-Garcia F., Torres-Galvan M.J., Dumpierrez A.G., Almeida L., Figueroa J., Ortega N., Castillo R., Gallego M.D., Carrillo T. Genetic basis of the latex-fruit syndrome: association with HLA class II alleles in a Spanish population. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 114(5): 1070-1076.
149. Cremer R. The role of shunted hydrocephalus in the development of allergy to latex in patients with spina bifida. *J Allergy Clin Immunol*. 1997; 100(5): 719-
150. Kattan H., Harfi H.A., Tipirneni P. Latex allergy in Saudi children with spina bifida. *Allergy*. 1999; 54(1): 70-73.
151. Gorenstein A., Levine A., Boaz M., Mandelberg A., Serour F. Severity of acid gastroesophageal reflux assessed by pH metry: is it associated with respiratory disease? *Pediatr Pulmonol*. 2003; 36(4): 330-334.

152. Graf W.D., Oleinik O.E. Cell cycle properties in lymphocytes from children with myelomeningocele. *Eur J Pediatr Surg.* 1997; 7(Suppl.): 115-17.
153. Wilson L., Gale E., Maden M. The role of retinoic acid in the morphogenesis of the neural tube. *J Anat.* 2003; 203(4): 357-368.
154. Kamizono S., Yamada A., Higuchi T., Kato H., Itoh K. Analysis of tumor necrosis factor-alpha production and polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene in individuals with a history of Kawasaki disease. *Pediatr Int.* 1999; 41(4): 341-345.
155. Keicho N., Emi M., Nakata K., Taguchi Y., Azuma A., Tokunaga K., Ohishi N., Kudoh S. Promoter variation of tumour necrosis factor-alpha gene: possible high risk for chronic bronchitis but not diffuse panbronchiolitis. *Respir Med.* 1999; 93(10): 752-753.
156. Walsh D.S., Adzick N.S. Foetal surgery for spina bifida. *Semin Neonatol.* 2003; 8(3): 197-205.
157. Speer C.P. Inflammatory mechanisms in neonatal chronic lung disease. *Eur J Pediatr.* 1999; 158(Suppl. 1): S18-S22.
158. Walston J., Seibert M., Yen C.J., Cheskin L.J., Andersen R.E. Tumor necrosis factor-alpha-238 and -308 polymorphisms do not associated with traits related to obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 1999; 48(10): 2096-2098.
159. Wilson A.G. Genetics of tumour necrosis factor (TNF) in autoimmune liver diseases: red hot or red herring? *J Hepatol.* 1999; 30(2): 331-333.
160. Albuquerque R.V., Hayden C.M., Palmer L.J., Laing I.A., Rye P.J., Gibson N.A., Burton P.R., Goldblatt J., Lesouef P.N. Association of polymorphisms within the tumour necrosis factor (TNF) genes and childhood asthma. *Clin Exp Allergy.* 1998; 28(5): 578-584.
161. Whyte M., Hubbard R., Meliconi R., Whidborne M., Eaton V., Bingle C., Timms J., Duff G., Facchini A., Pacilli A., Fabbri M., Hall I., Britton J., Johnston I., Di Giovine F. Increased risk of fibrosing alveolitis associated with interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 162(2 Pt 1): 755-758.
162. Hutchinson I.V., Pravica V., Perrey C., Sinnott P. Cytokine gene polymorphisms and relevance to forms of rejection. *Transplant Proc.* 1999; 31(1-2): 734-736.
163. Torre-Amione G., Bozkurt B., Deswal A., Mann D.L. An overview of tumor necrosis factor alpha and the failing human heart. *Curr Opin Cardiol.* 1999; 14(3): 206-210.
164. Collins J.S., Perry R.T., Watson B., Jr., Harrell L.E., Acton R.T., Blacker D., Albert M.S., Tanzi R.E., Bassett S.S., McInnis M.G., Campbell R.D., Go R.C. Association of a haplotype for tumor necrosis factor in siblings with late-onset Alzheimer disease: the NIMH Alzheimer Disease Genetics Initiative. *Am J Med Genet.* 2000; 96(6): 823-830.
165. Brinkman B.M., Huizinga T.W., Kurban S.S., van der Velde E.A., Schreuder G.M., Hazes J.M., Breedveld F.C., Verweij C.L. Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease? *Br J Rheumatol.* 1997; 36(5): 516-521.

166. Kaluza W., Reuss E., Grossmann S., Hug R., Schopf R.E., Galle P.R., Maerker-Hermann E., Hoehler T. Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol.* 2000; 114(6): 1180-1183.
167. Kazzi S.N., Kim U.O., Quasney M.W., Buhimschi I. Polymorphism of tumor necrosis factor-alpha and risk and severity of bronchopulmonary dysplasia among very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2004; 114(2): e243-e248.
168. Jang W.H., Yang Y.I., Yea S.S., Lee Y.J., Chun J.H., Kim H.I., Kim M.S., Paik K.H. The -238 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with decreased susceptibility to cancers. *Cancer Lett.* 2001; 166(1): 41-46.
169. Hernandez-Pacheco G., Flores-Dominguez C., Rodriguez-Perez J.M., Perez-Hernandez N., Fragoso J.M., Saul A., Alvarez-Leon E., Granados J., Reyes P.A., Vargas-Alarcon G. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with rheumatic heart disease. *J Autoimmun.* 2003; 21(1): 59-63.
170. Patino-Garcia A., Sotillo-Pineiro E., Modesto C., Sierrasesumaga L. Screening of the human tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene promoter polymorphisms by PCR-DGGE analysis. *Mutat Res.* 1999; 406(2-4): 121-125.
171. Kang C.P., Lee K.W., Yoo D.H., Kang C., Bae S.C. The influence of a polymorphism at position -857 of the tumour necrosis factor alpha gene on clinical response to etanercept therapy in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2005; 44(4): 547-552.
172. van Heel D.A., Udalova I.A., De Silva A.P., McGovern D.P., Kinouchi Y., Hull J., Lench N.J., Cardon L.R., Carey A.H., Jewell D.P., Kwiatkowski D. Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF(-kappa)B transcription factors. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(11): 1281-1289.
173. Neben K., Mytilineos J., Moehler T.M., Preiss A., Kraemer A., Ho A.D., Opelz G., Goldschmidt H. Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter predict for outcome after thalidomide therapy in relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood.* 2002; 100(6): 2263-2265.
174. Bugawan T.L., Klitz W., Alejandrino M., Ching J., Panelo A., Solfelix C.M., Petrone A., Buzzetti R., Pozzilli P., Erlich H.A. The association of specific HLA class I and II alleles with type 1 diabetes among Filipinos. *Tissue Antigens.* 2002; 59(6): 452-469.
175. Klitz W., Aldrich C.L., Fildes N., Horning S.J., Begovich A.B. Localization of predisposition to Hodgkin disease in the HLA class II region. *Am J Hum Genet.* 1994; 54(3): 497-505.
176. Long J.C., Williams R.C., Urbanek M. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *Am J Hum Genet.* 1995; 56(3): 799-810.
177. Busby A., Abramsky L., Dolk H., Armstrong B. Preventing neural tube defects in Europe: population based study. *BMJ.* 2005; 330(7491): 574-575.
178. Honein M.A., Paulozzi L.J., Mathews T.J., Erickson J.D., Wong L.Y. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA.* 2001; 285(23): 2981-2986.

179. De Marco P., Calevo M.G., Moroni A., Arata L., Merello E., Cama A., Finnell R.H., Andreussi L., Capra V. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as risk factors for NTDs. *Eur J Pediatr Surg.* 2001; 11 (Suppl 1): S14-S17.
180. Rothenberg S.P., da Costa M.P., Sequeira J.M., Cracco J., Roberts J.L., Weedon J., Quadros E.V. Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect. *N Engl J Med.* 2004; 350(2): 134-142.

10. Załączniki

Załącznik 1. Dane genotypowe i kliniczne pacjentów z wadą cewy nerwowej

Numer próbki	Inicjały	Płeć	Genotyp DRB1	Genotyp TNF α (-238)	Genotyp TNF α (-308)	Poziom wady cewy nerwowej
1	KS	k	*01/*16	G/G	G/G	L
2	IG	k	*11/*15	G/G	G/G	L
3	BS	m	*01/*15	G/G	G/G	L
4	MP	k	*07/*13	G/G	G/A	T
5	AM	k	*03/*07	G/G	G/G	L
6	TM	m	*04/*13	G/G	G/G	L
7	PS	m	*03/*13	G/G	G/A	L
8	AB	k	*09/*03	G/G	G/A	L
9	BJ	m	*11/*03	G/G	G/A	T
10	ST	k	*07/*11	G/A	G/G	L
11	KN	k	*01/*07	G/G	G/G	T
12	WS	m	*15/*03	G/G	G/A	L
13	PG	m	*07/*13	G/A	G/G	T
14	MZ	k	*04/*07	G/G	G/G	T
15	TT	m	*03/*13	G/G	G/A	L
16	MS	k	*10/*13	G/G	G/G	L
17	PN	m	*03/*04	G/G	G/A	L
18	GR	m	*01/*07	G/G	G/G	L
19	KW	m	*11/*13	G/G	G/G	L
20	JB	m	*01/*01	G/G	G/G	L
21	SL	m	*12/*14	G/A	G/G	L
22	KG	k	*07/*11	G/G	G/G	L
23	KT	m	*01/*13	G/G	G/G	T
24	AB	k	*10/*14	G/G	G/G	L
25	AM	k	*12/*13	G/G	A/A	L
26	JJ	m	*03/*15	G/G	G/A	L
27	PB	k	*03/*07	G/G	G/A	L
28	PG	m	*11/*15	G/G	G/G	S
29	MF	m	*14/*15	G/G	G/G	T
30	KK	m	*04/*07	G/G	G/G	T
32	KR	k	*07/*07	G/A	G/G	C
33	MN	k	*11/*15	G/G	G/G	L
34	NR	m	*04/*04	G/G	G/G	L
35	KM	k	*15/*15	G/G	G/G	L
36	MN	k	*04/*16	G/G	G/A	L
37	PR	k	*12/*15	G/G	G/G	L
38	JS	k	*11/*03	G/G	A/A	T
39	BS	m	*07/*07	G/A	G/G	L
40	DB	m	*07/*07	G/A	G/G	L
43	AK	k	*04/*15	G/G	G/G	L
44	MP	k	*07/*13	G/G	G/G	T
45	DW	k	*01/*03	G/G	G/A	T
46	RR	m	*01/*11	G/G	G/G	T
47	MS	k	*08/*15	G/G	G/G	T
48	MK	m	*03/*15	G/G	G/A	L
49	EG	k	*15/*03	G/G	G/A	L

50	BN	k	*07/*14	G/A	G/G	L
51	MJ	m	*01/*11	G/G	G/G	L
52	AC	k	*07/*07	G/G	G/G	L
53	KS	k	*04/*04	G/G	G/G	L
54	JD	m	*01/*04	G/G	G/G	T
55	JG	k	*04/*11	G/G	G/G	L
56	KK	k	*03/*13	G/G	G/A	L
57	KK	k	*01/*16	G/G	G/G	L
58	PS	m	*03/*13	G/G	G/A	T
59	DB	m	*07/*13	G/G	G/A	T
60	MJ	m	*03/*13	G/G	A/A	T
61	JK	m	*01/*11	G/G	G/G	T
62	MŚ	k	*07/*13	G/G	G/G	L
63	AS	k	*07/*16	G/G	G/A	T
64	PE	k	*07/*16	G/G	G/G	L
65	KH	m	-	G/G	G/G	L
66	PS	m	-	G/G	G/G	L
67	MT	m	-	G/G	G/G	L
68	ML	k	-	G/G	G/G	T
69	MS	k	*15/*15	G/G	G/G	L
70	SM	k	*15/*13	G/G	G/G	L
71	KM	m	*04/*11	G/G	G/G	L
72	JH	k	*03/*12	G/G	G/A	L
73	AS	k	*03/*16	G/G	A/A	T
74	PS	m	*04/*03	G/G	G/A	L
75	KM	m	*11/*11	G/G	G/G	E
76	KW	m	-	G/G	G/G	L
77	MM	k	*01/*07	G/A	G/G	L
78	KK	m	*07/*13	G/A	G/A	T
79	KS	m	*07/*14	G/G	G/G	L
80	ZH	k	-	G/G	G/A	L
81	AW	k	*07/*04	G/G	G/G	L
82	AW	m	*01/*13	G/G	G/G	T
83	SŁ	k	*07/*07	G/A	G/G	L
84	MJ	m	*01/*11	G/G	G/G	T
85	NŚ	k	*07/*13	G/G	G/G	L
86	SG	m	*01/*11	G/G	G/G	L
87	AP	m	*07/*15	G/G	G/G	T
88	AK	m	*03/*03	G/G	A/A	T
89	AK	k	*07/*16	G/A	G/G	L
90	DD	k	*07/*15	G/G	G/G	T
91	TN	m	*07/*07	G/A	G/G	L
92	KK	k	*07/*01	G/A	G/G	T
93	KS	k	*07/*15	G/G	G/A	L
94	FM	m	*16/*11	G/G	G/G	L
95	MF	k	*01/*04	G/G	G/G	L
96	DM	m	*07/*16	G/G	G/G	L
97	MK	m	-	G/G	G/G	L
98	EW	k	*01/*04	G/G	G/G	T
99	KH	k	*07/*03	G/G	A/A	L
100	KB	m	*03/*08	G/G	G/A	L
101	PC	k	*07/*16	G/A	G/G	T

102	JS	k	*07/*08	G/G	G/G	T
103	PN	k	*07/*15	G/G	G/G	L
104	TT	m	*11/*01	G/G	G/G	L
105	KG	k	*07/*04	G/G	G/G	L
106	WK	m	*07/*08	G/G	G/A	L
107	MB	m	*11/*15	G/G	G/A	L
108	BM	k	*07/*01	G/G	G/G	L
109	KF	m	*01/*13	G/G	G/A	Meningocele thoracalis
110	DM	m	*07/*04	G/G	G/G	Encephalocele occipitalis
111	PW	k	*07/*11	G/G	G/G	L
112	AO	k	*11/*03	G/G	A/A	L
113	GM	k	*07/*11	G/G	G/G	L
114	JF	k	*01/*11	G/G	G/G	L
płeć: m-męska, k-żeńska						
poziom wady cewy nerwowej: L-odcinek lędźwiowy, T- odcinek piersiowy						

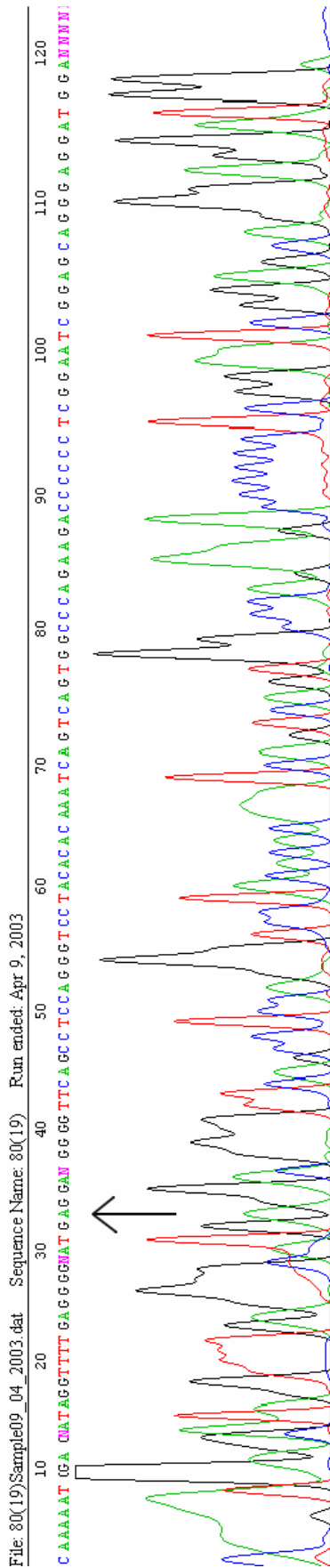
Załącznik 2. Dane genotypowe i kliniczne osób z grupy kontrolnej

Numer próbki	Inicjały	Genotyp DRB1*	Genotyp TNF α (-238)	Genotyp TNF α (-308)	Płeć
1	AC	*01/*11	G/G	G/G	m
2	RJ	*07/*11	G/G	G/G	k
3	PW	*04/*07	G/G	A/A	m
4	MR	*03/*07	G/A	G/G	m
5	AK	*11/*16	G/G	G/G	k
6	FK	*09/*13	G/G	G/G	m
7	KG	*01/*07	G/G	G/G	m
8	JN	*03/*07	G/G	A/A	k
9	LT	*01/*13	G/G	G/G	k
10	MN	*03/*04	G/G	A/A	k
11	KN	*11/*14	G/G	G/G	k
12	AI	*09/*14	G/G	G/G	k
13	AZ	*04/*13	G/G	G/G	k
14	EP	*03/*13	G/G	A/G	k
15	UM	*07/*11	G/A	G/G	k
16	ZS	*01/*04	G/G	G/G	m
17	JB	*04/*11	G/G	G/G	m
18	KW	*11/*13	G/G	G/G	m
19	TK	*01/*13	G/G	G/G	m
20	MR	*03/*15	G/G	A/G	k
21	HK	*03/*07	G/G	G/G	m
22	AA	*01/*16	G/G	G/G	k
23	UB	*04/*11	G/G	G/G	k
24	KB	*01/*07	G/G	G/G	m
25	AM	*12/*13	G/G	G/G	k
26	TK	*01/*15	G/A	G/G	m
27	KB	*07/*15	G/G	G/G	k
28	PJ	*07/*11	G/G	G/G	m
29	MK	*07/*12	G/G	G/G	k
30	TM	*04/*07	G/G	G/G	m
31	SW	*03/*08	G/G	A/G	m
32	DW	*01/*11	G/G	G/G	k
33	MZ	*07/*07	G/G	G/G	k
34	GG	*01/*15	G/G	A/G	m
35	BT	*07/*14	G/G	G/G	k
36	MT	*12/*15	G/G	G/G	m
37	PB	*01/*15	G/G	G/G	m
38	RB	*01/*16	G/G	G/G	m
39	JZ	*01/*16	G/G	G/G	k
40	PC	*01/*01	G/G	G/G	m
41	MM	*01/*07	G/A	G/G	k
42	BW	*15/*16	G/G	G/G	m
43	KK	*01/*04	G/G	G/G	k
44	SW	*07/*13	G/G	G/G	k
45	KS	*12/*15	G/G	A/G	k
46	IB	*04/*15	G/G	G/G	k
47	SŚ	*01/*13	G/G	A/A	m
48	JL	*03/*13	G/G	G/G	k
49	MK	*13/*15	G/G	G/G	k

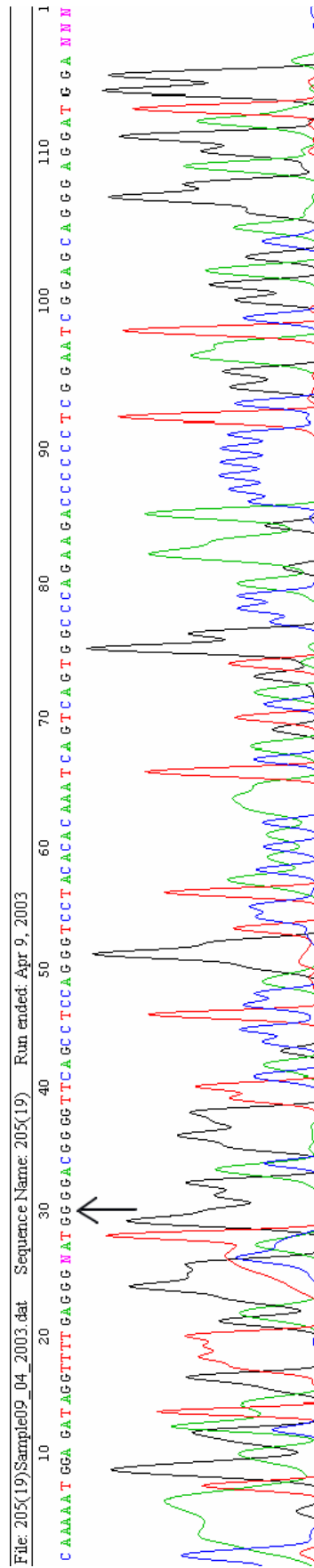
50	AŁ	*11/*13	G/G	G/G	k
51	AA	*08/*11	G/G	G/G	k
52	DF	*03/*07	G/G	A/A	m
53	MS	*07/*07	A/A	G/G	m
54	AW	*03/*13	G/A	G/G	m
55	MJ	*11/*15	G/G	G/G	k
56	AR	*03/*12	G/G	A/G	k
57	PS	*03/*15	G/A	G/G	m
58	ES	*04/*11	G/G	G/G	k
59	MS	*04/*08	G/G	G/G	k
60	KG	*03/*13	G/G	A/G	m
61	AK	*04/*13	G/G	G/G	k
62	PW	*01/*13	G/G	G/G	m
63	PS	*04/*14	G/G	G/G	m
64	JW.	*07/*11	G/G	G/G	k
65	AG	*03/*07	G/A	G/G	k
66	MW	*04/*07	G/G	A/A	m
67	IS	*08/*10	G/G	G/G	k
68	SB	*09/*11	G/G	G/G	m
69	PZ	*01/*03	G/G	A/G	m
70	BD	*13/*16	G/G	A/G	m
71	EG	*08/*13	G/A	G/G	k
72	ZS	*11/*15	G/G	G/G	k
73	MS	*08/*13	G/G	A/G	k
74	JD	*01/*15	G/G	G/G	k
75	AL.	*11/*14	G/A	G/G	m
76	AG	*01/*11	G/G	G/G	k
77	KG	*11/*11	G/G	G/G	k
78	AW	*01/*13	G/G	G/G	k
79	MG	*07/*15	G/A	G/G	m
80	MR	*08/*14	G/G	G/G	k
82	KR	*11/*13	G/G	G/G	m
83	JD	*07/*11	G/A	G/G	k
84	MW	*01/*07	G/G	G/G	m
86	IB	*01/*11	G/G	G/G	k
87	JK	*03/*07	G/A	A/G	k
88	GK	*11/*12	G/G	G/G	k
89	KK	*01/*03	G/G	A/G	k
90	RS	*09/*13	G/G	G/G	m
91	AW	*07/*13	G/G	A/G	k
92	JS	*04/*12	G/G	G/G	m
93	JM	*13/*16	G/G	A/G	m
94	ŁG	*07/*07	G/A	G/G	m
95	MG	*07/*07	G/A	G/G	m
96	JK	*13/*15	G/G	G/G	k
97	ŁK	*12/*16	G/G	G/G	m
98	EF	*13/*13	G/G	A/G	k
99	GD	*13/*13	G/G	G/G	m
100	BO	*01/*01	G/G	G/G	k
101	RG	*07/*16	G/A	A/G	m
102	BŚ	*07/*07	G/A	G/G	k
103	LP	*11/*15	G/G	A/G	m

104	PK	*01/*15	G/G	G/G	m
105	MR	*08/*11	G/G	A/G	m
106	JZ	*01/*11	G/G	G/G	k
107	AN	*11/*16	G/G	G/G	k
108	KJ	*07/*12	G/G	A/G	k
109	KW	*01/*04	G/G	G/G	m
110	BŻ	*01/*11	G/G	G/G	k
111	KF	*03/*07	G/A	G/G	k
112	TM	*11/*15	G/G	G/G	m
113	JD	*15/*15	G/G	G/G	m
114	AK	*03/*16	G/A	A/G	k
115	TS	*03/*13	G/G	G/G	m
płeć: m-męska, k-żeńska					

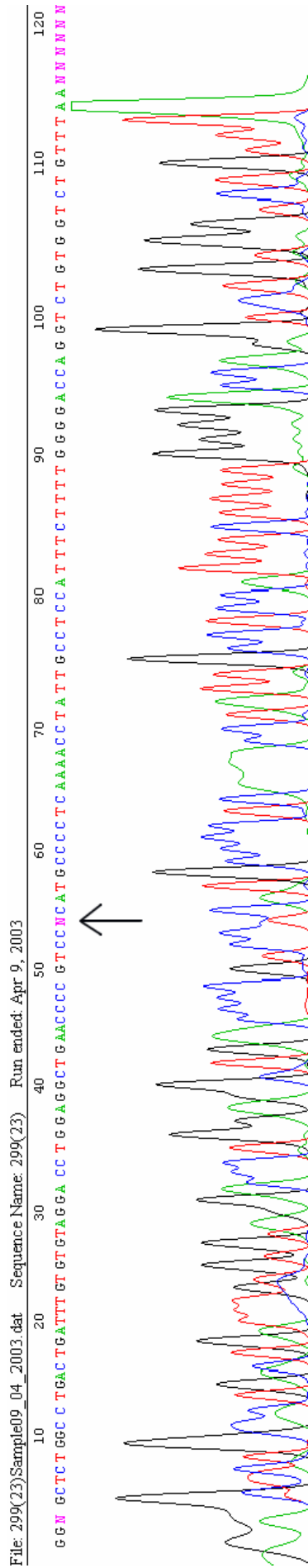
Załącznik 3. Ryciny przykładowych sekwencji



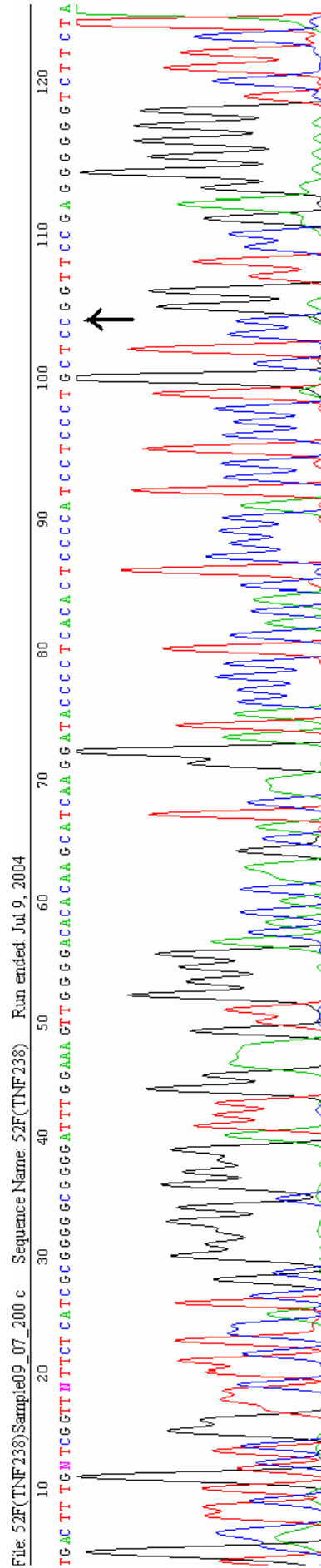
Ryc. 4 Sekwencja produktu z zaznaczonym miejscem polimorfizmu TNF(-308) G→A, homozygota AA



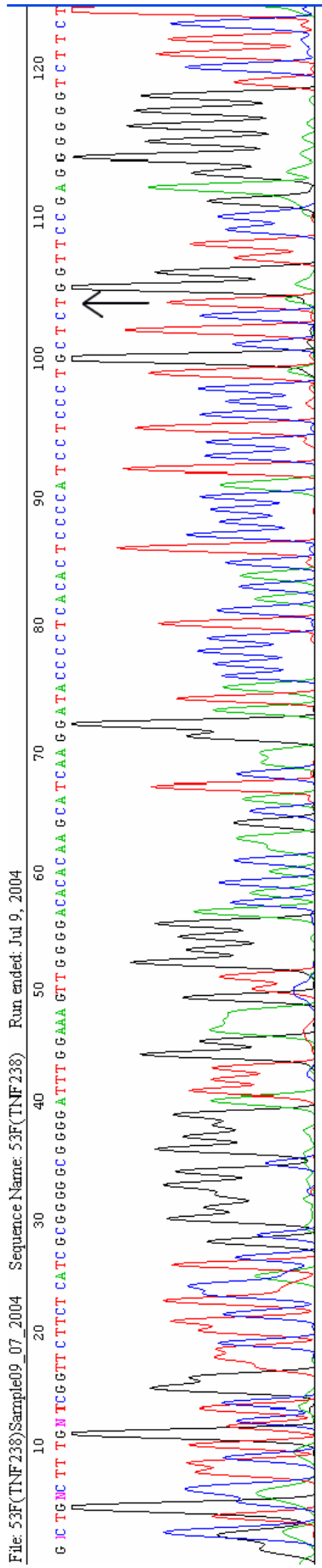
Ryc. 5 Sekwencja produktu z zaznaczonym miejscem polimorfizmu TNF(-308) G→A, homozygota GG



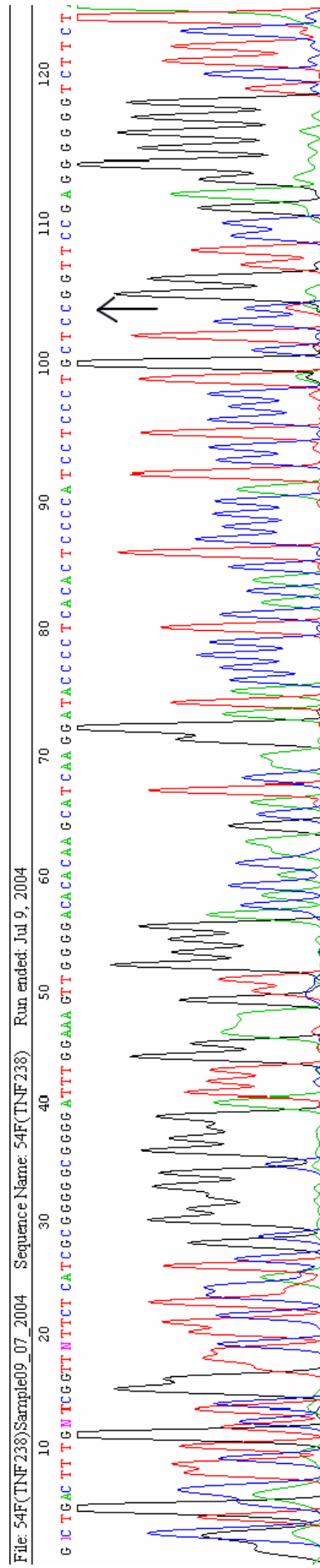
Ryc. 6 Sekwencja produktu z zaznaczonym miejscem polimorfizmu TNF(-308) G→A, heterozygota GA (przedstawiona została bardziej czytelna sekwencja nici komplementarnej, na której heterozygota przyjmie postać CT). W sekwencjonowaniu automatycznym oprogramowanie nie wychwytyje heterozygot. Na heterozygotę wskazują równe wysokości pików cytozyny i tyminy.



Ryc. 7 Sekwencja produktu z zaznaczonym miejscem polimorfizmu TNFα(-238)G→A, homozygota GG (przedstawiona została nici komplementarna, na której homozygota przyjmie postać CC, z uwagi na trudności w sekwencjonowaniu nici kodującej od końca 3').



Ryc. 8 Sekwencja produktu z zaznaczonym miejscem polimorfizmu TNF α (-238)G→A, homozygota AA (przedstawiona została nieć komplementarna, na której homozygota przyjmie postać TT, z uwagi na trudności w sekwencjonowaniu nici kodującej od końca 3’).



Ryc. 9 Sekwencja produktu z zaznaczonym miejscem polimorfizmu TNF α (-238)G→A, heterozygota GA (przedstawiona została nieć komplementarna, na której homozygota przyjmie postać CT, z uwagi na trudności w sekwencjonowaniu nici kodującej od końca 3’).