

# Povezanost mutacija C677T i A1298C gena za metilentetrahidrofolat-reduktazu s rizikom od plućne embolije

---

**Kolundžić, Monika**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:317089>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-13**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Monika Kolundžić**

**Povezanost mutacija C677T i A1298C gena za  
metilentetrahidrofolat-reduktazu s rizikom od  
plućne embolije**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Molekularna dijagnostika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju te Odjelu za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić i suvoditeljstvom dr. sc. Jasne Bingulac-Popović, znanstvene savjetnice.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Karmeli Barišić, na ukazanom povjerenju i pomoći pri izradi diplomskog rada. Veliko hvala mojoj komentorici, dr. sc. Jasni Bingulac-Popović, na iskrenoj posvećenosti, nesebičnoj pomoći i beskrajnom razumijevanju tijekom svakog koraka u stvaranju ovog rada. Zahvaljujem se i susretljivom i srdačnom timu na Odjelu za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu.*

*Najveće hvala mojoj obitelji, za ljubav, ohrabrivanje, suosjećajnost i trpljenje!*

*Hvala mojim prijateljicama i prijateljima koji su mi uljepšali studentske dane i učinili ih nezaboravnima!*

# Sadržaj

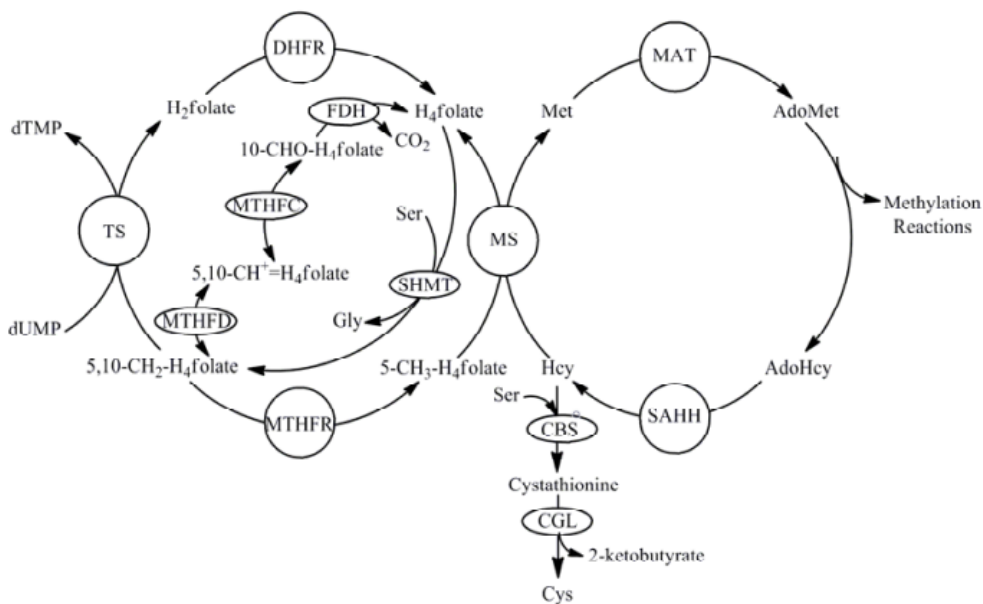
<b>1. Uvod</b> .....	1
1.1. Enzim metilentetrahidrofolat-reduktaza.....	1
1.2. Metabolizam homocisteina i vitamini B.....	3
1.3. Posljedice hiperhomocisteinemije.....	6
1.4. Gen za metilentetrahidrofolat-reduktazu i mutacije.....	7
1.5. Venska tromboembolija.....	9
1.6. Patofiziologija venske tromboembolije.....	10
1.7. Dijagnoza venske tromboembolije.....	11
1.8. Antikoagulacijska terapija venske tromboembolije.....	11
1.9. Plućna embolija.....	12
1.10. Rizični čimbenici venske tromboembolije.....	13
1.11. Genetski rizični čimbenici venske tromboembolije.....	13
1.12. Modulirajuća uloga vitamina B kod mutacija gena za metilentetrahidrofolat-reduktazu.....	16
<b>2. Obrazloženje teme</b> .....	17
<b>3. Materijali i metode</b> .....	18
3.1. Materijali.....	18
3.1.1. Ispitanici.....	18
3.2. Metode.....	20
3.2.1. Izolacija genomske DNA na uređaju QIAcube.....	20
3.2.2. Genotipizacija mutacija metilentetrahidrofolatreduktaze C677T i A1298C pomoću metode real-time PCR – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.....	20
3.2.3. Reagensi za izvođenje metode PCR-a u stvarnome vremenu.....	24
3.2.4. Postupak pripreme reakcijske smjese za PCR u stvarnome vremenu.....	24
3.2.5. Uvjeti real-time PCR.....	25
3.2. Statistička metoda.....	25
<b>4. Rezultati</b> .....	26
4.1. Učestalost pojedinih genotipova MTHFR-a u skupini pacijenata s plućnom embolijom i kontrolnoj skupini.....	26
4.1.1. Zastupljenost pojedinih genotipova MTHFR-a za C677T u skupini pacijenata s plućnom embolijom i kontrolnoj skupini.....	26
4.1.2. Zastupljenost pojedinih genotipova za A1298C mutaciju u skupini pacijenata s plućnom embolijom i kontrolnoj skupini.....	27

4.1.3. Učestalost mutiranog alela za mutacije C677T i A1298C u genu za MTHFR u skupini pacijenata s plućnom embolijom i kontrolnoj skupini.....	27
4.2. Zastupljenost pojedinih genotipova MTHFR-a u skupini pacijenata s plućnom embolijom i kontrolnoj skupini prema spolu.....	28
4.2.1. Zastupljenost mutiranog alela u skupini pacijenata s plućnom embolijom i kontrolnoj skupini prema spolu.....	29
4.3. Učestalost kombinacija genotipova C677T i A1298C ispitanika u skupini pacijenata s plućnom embolijom i kontrolnoj skupini.....	30
<b>5. Rasprava</b> .....	<b>32</b>
<b>6. Zaključci</b> .....	<b>40</b>
<b>7. Literatura</b> .....	<b>42</b>
<b>8. Sažetak/Summary</b> .....	<b>47</b>
<b>9. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card</b> .....	<b>49</b>

# 1. Uvod

## 1.1. Enzim metilentetrahidrofolat-reduktaza

Metilentetrahidrofolat-reduktaza (MTHFR) jedan je od brojnih enzima koji sudjeluju u staničnom ciklusu aktivacije i prijenosa jedinice koju čini skupina s jednim ugljikovim atomom (1C) vezana za folat (kofaktor i nositelj). U reakcijama koje će biti opisane, ova skupina prolazi kroz niz pretvorbi mijenjajući reducirani i oksidirani oblik (5,10-metilen-tetrahidrofolat (THF), 5-metil-THF i 10-formil-THF – svaka s vlastitom drugačijom biosintetskom funkcijom) (Ducker i Rabinowitz, 2017).

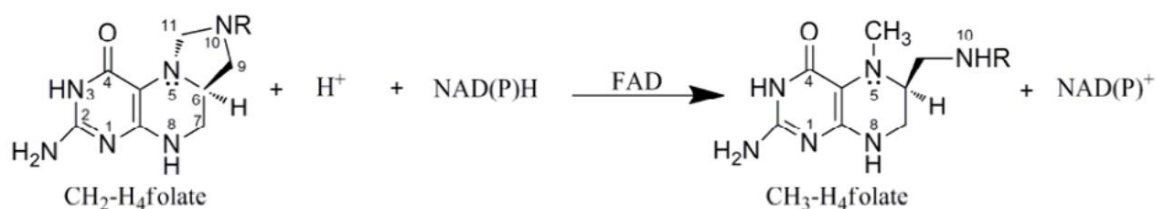


Slika 1. Metabolizam 1C skupine sisavaca

CBS – cistation- $\beta$ -sintaza; CGL – cistation- $\gamma$ -liaza; DHFR – dihidrofolat reduktaza; FDH – 10-formiltetrahidrofolat dehidrogenaza; MAT – metionin adenziltransferaza; MS – metionin sintaza; MTHFC – 5, 10-metilentetrahidrofolat ciklohidrolaza; MTHFD – 5, 10-metiletetrahidrofolat dehidrogenaza; MTHFR – metilentetrahidrofolat reduktaza; SAHH – S-adenozilhomocistein hidrolaza; SHMT – serin hidroksimetiltransferaza; TS – timidilat sintaza (Preuzeto iz: *Methylenetetrahydrofolate reductase: biochemical characterization and medical significance*, Trimmer, 2013)

5, 10-metilen-THF ( $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folata}$ ), čija metilenska skupina potječe od  $\beta$ -ugljikovog atoma iz serina ili formata, ima tri moguća metabolička djelovanja:

1. Uz enzim timidilat-sintazu metilenska skupina prenosi se s 5,10-metilen-THF-a na deoksiuridin-monofosfat (dUMP) koji se reducira do deoksitimidin-monofosfata (dTMP)
2. Uz enzim metilentetrahydrofolat dehidrogenazu 5,10-metilen-THF prevodi se u dva koraka do 10-formil-THF koji sudjeluje u sintezi purina
3. MTHFR katalizira izravnu redukciju do 5-metil-THF ( $\text{CH}_3\text{H}_4\text{folat}$ )



Slika 2. Reakcija katalizirana MTHFR enzimom. Nevalentno vezani flavin adenin dinukleotid (FAD) prima reducirajuće  $\text{H}^+$  ione i prenosi ih na  $\text{CH}_2\text{H}_4$ -folat čime nastaje produkt, 5-metiltetrahydrofolat ( $\text{CH}_3\text{H}_4$ -folat)

(Preuzeto iz: *Methylenetetrahydrofolate reductase: biochemical characterization and medical significance*, Trimmer, 2013)

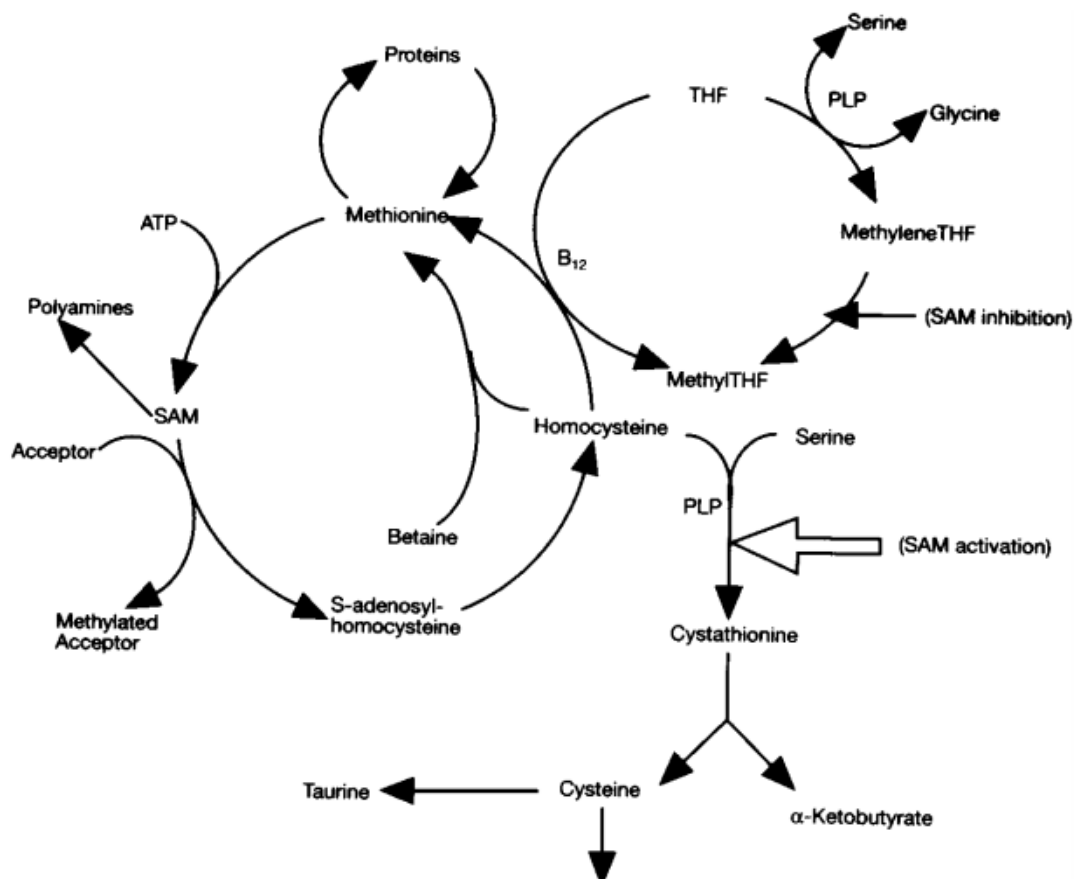
Potonja reakcija definira ulogu MTHFR-a i čini ga ključnim regulatornim enzimom u metabolizmu folata i homocisteina. Produkt te reakcije jest 5-metil-THF. Metionin-sintaza (MS) ovisna o vitaminu B12 katalizira reakciju u kojoj se metilna skupina s donora, 5-metil-THF-a, prenosi na homocistein pri čemu nastaje metionin. (Trimmer, 2013)

Metionin u obliku S-adenozilmetionina (AdoMet) čini najvažniji izvor metilne skupine u reakcijama biosinteze u stanici. AdoMet, reaktivni nositelj metilne skupine, drugi je najčešći enzimski kofaktor (nakon ATP-a) te igra važnu ulogu u epigenetskim, biosintetskim i metaboličkim procesima. Stanice sisavaca ne mogu *de novo* sintetizirati metionin stoga je reakcija remetilacije homocisteina za njih posebno važna. Dakle, metilacija homocisteina omogućuje regeneraciju metilne skupine za ponovnu sintezu metionina (Trimmer, 2013). Metionin se može sintetizirati iz homocisteina i betaina putem neovisnim o folatu, uz betain-homocistein-metiltransferazu (BHMT). Međutim, ekspresija BHMT-a ograničena je na jetru i bubrege, a MS prisutna je u svim tjelesnim stanicama stoga je remetilacija homocisteina primarni put sinteze metionina (Ducker i Rabinowitz, 2016).

## 1.2. Metabolizam homocisteina i vitamini B

Homocistein je aminokiselina sa sulfhidrilnom skupinom koja ne izgrađuje proteine nego nastaje njihovom metaboličkom razgradnjom. Metabolizam homocisteina kombinacija je dvaju metaboličkih puteva; remetilacijskog i transulfuracijskog (Selhub, 1999). Transulfuracijskim metabolizmom uz cistation- $\beta$ -sintazu (CBS) i serin iz homocisteina nastaje cistationin koji se dalje metabolizira u aminokiselinu cistein. U reakciji remetilacije kataliziranoj metionin sintazom, homocistein prima metilnu skupinu od donora, 5-metil-THF-a (ili betaina, reakciju katalizira BHMT), kako bi nastala aminokiselina metionin. Metilkobalamin (reakcijski oblik vitamina B12) je međuprodukt reakcije i prenositelj metilne grupe (Selhub, 1999).

Kao što je prethodno objašnjeno, reakcija s 5-metil-THF-om je dominantna. Dio metionina koji se sintetizira aktivira se adenozinom kako bi nastao AdoMet, ciljna molekula, čija je uloga u stanici prethodno opisana.



Slika 3. Metabolizam homocisteina

SAM – S-adenozilmetionin; THF - tetrahidrofolat; PLP - piridoksal-5-fosfat  
(Preuzeto iz: *Homocysteine metabolism*, Selhub, 1999)



Nusprodukt reakcija metilacije u kojima sudjeluje AdoMet, ciljna molekula, jest S-adenozilhomocistein (AdoHcy). Dakle, navedene reakcije čine konstantni ciklus regeneracije metionina iz homocisteina i ponovnog nakupljanja homocisteina tijekom metilacijskih reakcija kofaktora AdoMet-a. Važno je naglasiti da je hidroliza AdoMet-a reverzibilna reakcija čija je ravnoteža pomaknuta u korist sinteze AdoHcy-a stoga se može reći da, ipak, postoji veća mogućnost nakupljanja ovog metabolita u stanici (Selhub, 1999).

Mala količina homocisteina koja se normalno može naći u cirkulaciji posljedica je staničnog transportnog mehanizma koji pomaže održavanju niske razine potencijalno toksičnog homocisteina u stanici. Prisutnost hiperhomocisteinemije upućuje na to da je došlo do poremećaja u metabolizmu homocisteina. Stanični mehanizam izvoza homocisteina prenosi višak metabolita u cirkulaciju čime sprječava toksična oštećenja stanice, ali izlaže oštećenjima vaskularno tkivo. Poremećaj u metabolizmu može biti posljedica genetskih promjena nekog od enzima uključenih u metabolizam homocisteina ili nutritivne deficijencije jednog ili više vitamina koji, također, sudjeluju u njegovom metabolizmu (Selhub, 1999).

Kada je unos metionina prehranom dostatan i razina metionina u stanicama visoka (nema potrebe za regeneracijom metionina), pojačano je stvaranje AdoMet-a. AdoMet u visokim koncentracijama djeluje kao alosterički inhibitor MTHFR-a, a aktivator CBS-a. Stoga se homocistein koji nastaje kao nusprodukt reakcija metilacije u kojima sudjeluje AdoMet metabolizira transulfuracijskim putem, dok je remetilacijski put, u ovom slučaju suprimiran. U obrnutoj situaciji, kada je unos metionina nedovoljan i razina u stanici nedostatna, sinteza AdoMet-a je smanjena te je remetilacijski put metabolizma homocisteina preferiran (pojačana je potreba za regeneracijom metionina iz homocisteina). Ako postoji poremećaj u sintezi 5-metil-THF-a (smanjena aktivnost MTHFR-a ili deficijencija folata), osim što se smanji sinteza metionina nastaje i problem u rezervnom metaboličkom putu homocisteina. Zbog snižene koncentracije metionina, smanjena je sinteza AdoMet-a stoga ga nema dovoljno za aktivaciju enzima CBS-a. Osim toga, u takvim uvjetima ubrzano se troši AdoMet čime se dodatno otežava aktivacija transulfuracijskog puta. Homocistein se nastavlja nakupljati i nastaje hiperhomocisteinemija (Selhub, 1999).

Kada se naruši remetilacijski put metabolizma homocisteina zbog deficijencije vitamina B12 ili poremećaja rada enzima MS posljedice su drugačije nego ako se taj put metabolizma poremeti na razini sinteze 5-metil-THF-a (funkcionalni poremećaj enzima MTHFR-a ili nedostatak folata) (Selhub, 1999.). U prvom slučaju 5-metil-THF nakupljat će se u stanici, a

sinteza AdoMet-a bit će smanjena. Ipak, posljedice neće biti toliko ozbiljne, jer će nakupljeni 5-metil-THF inhibirati trošenje staničnih zaliha AdoMet-a te će se pojačano aktivirati put katabolizma homocisteina preko enzimske reakcije CBS-a (Selhub, 1999).

Sinteza 5-metil-THF-a prvi je korak ključan u sintezi metionina. Neposredna posljedica poremećaja sinteze 5-metil-THF-a, ili zbog deficijencije folata ili uslijed mutacije gena za MTHFR, smanjuje sintezu metionina. Metabolizam homocisteina usmjerava se prema transulfuracijskom putu. Međutim, u tom slučaju transulfuracijski put nedostatan je u metaboliziranju homocisteina zbog više razloga: smanjena sinteza metionina vodi do sniženja unutarstanične razine AdoMet-a, nedostatak 5-metil-THF-a potiče veću potrošnju AdoMet-a čime se pojačano nakuplja homocisten kao nusprodukt reakcija metilacije (reakcije metilacije glicina uz enzim glicin-metiltransferazu). Povišeni homocistein uz nisku koncentraciju AdoMet-a uzrokuje smanjenu aktivaciju sinteze cistationina, početni korak transulfuracijskog puta (Selhub, 1999).

Za pravilno funkcioniranje metabolizma homocisteina neophodna je dovoljna opskrba stanica vitaminima B skupine. Uz folat koji je u svojim metiliranim oblicima donor metilne skupine i supstrat remetilacijskog puta sinteze metionina, riboflavin (u obliku flavin adenin dinukleotida, FAD) i vitamin B12 su koenzimi, dok je piridoksin koenzim (piridoksal-fosfat - PLP) u reakciji transulfuracije (Selhub, 1999).

Prvu studiju koja je dokazala interakciju između količine dostupnih nutrijenata nužnih za pravilno funkcioniranje metabolizma homocisteina i koncentracije homocisteina u plazmi proveli su Kang i sur (Kang i sur., 1991). Otkriven je obrnuto proporcionalni odnos između koncentracija folata, vitamina B12 i koncentracije homocisteina u plazmi. Pri sniženoj koncentraciji folata dokazano je povećanje razine homocisteina u krvi od, otprilike, 2 puta. Većina pacijenata s niskim folatima ima i nedostatak vitamina B12. Dakle, kada je zaliha folata i vitamina B12 neadekvatna smanjeno je „čišćenje“ homocisteina iz cirkulacije, tj. metabolizam homocisteina je poremećen što vodi do hiperhomocisteinemije (Kang i sur., 1991).

Međutim, istraživanja koja su ispitivala učinkovitost suplemenacije vitaminima B skupine na snižavanje razine homocisteina dala su nekonzistentne rezultate (Santilli i sur., 2016).

### 1.3. Posljedice hiperhomocisteinemije

Hiperhomocisteinemija je povezana s brojnim procesima i promjenama na razini stanice koje imaju utjecaj na patofiziologiju bolesti krvnih žila. Pri povišenoj koncentraciji homocisteina pojačan je proces autooksidacije homocisteina u krvi (pri čemu nastaje homocistin), a posljedica oksidativne aktivnosti jest stvaranje oksidativnih kisikovih vrsta (Santilli i sur., 2016). Zbog pojačanog oksidacijskog stresa inducirana je lipidna peroksidacija na membranama endotelnih stanica te oksidacija lipoproteina u plazmi. Produkti lipidne peroksidacije, poput F<sub>2</sub>-izoprostana mogu potaknuti aktivnost trombocita vežući se za receptore tromboksana na njima (Santilli i sur., 2016). U suvišku homocisteina, trombociti metaboliziraju homocistein do cisteina iz kojeg potom nastaje sumporovodik (H<sub>2</sub>S). H<sub>2</sub>S aktivira metabolizam arahidonske kiseline preko fosfolipaze A<sub>2</sub>, a posljedica je pojačano stvaranje tromboksana A<sub>2</sub> (Santilli i sur., 2016).

Važan učinak povišene koncentracije homocisteina jest njegov utjecaj na aktivnost endotelne sintaze dušikovog oksida (eNOS). Prisutan oksidacijski stres potiče oksidaciju kofaktora eNOS, BH<sub>4</sub>, koji je neophodan za proces združivanja enzima eNOS (engl. coupling). Pošto se smanji količina kofaktora BH<sub>4</sub> mijenja se i stanje enzima eNOS. eNOS prelazi iz združenog oblika u razdvojeni (engl. uncoupled). Združeni eNOS ima aktivnost usmjerenu prema sintezi NO, dok razdvojeni oblik enzima sintetizira kisikov superoksid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Dodatno, BH<sub>4</sub> je potentni čistač radikala (antioksidans) tijekom oksidativnog stresa (Santilli i sur., 2016).

Zbog nakupljanja AdoHcy jedna od posljedica je i inhibicija reakcija metilacije, a potaknuta je homocisteinilacija i posttranslacijske modifikacije proteina. Narušeni su i epigenetički procesi, jer je jedan od ključnih mehanizama kontrole ekspresije gena reakcija metilacije (Santilli i sur., 2016).

Dakle, hiperhomocisteinemija može biti jedan od uzročnika ateroskleroze, srčanog infarkta, perifernih arterijskih bolesti, venske tromboembolije (duboke venske tromboze, plućne embolije) (Moll i Varga, 2015). Povezuje se i s rizikom od spine bifide kod novorođenčadi te s komplikacijama u trudnoći, poput preeklampsije i gubitka fetusa (Moll i Varga, 2015).

Smatra se da je normalna koncentracija homocisteina u krvi < 15 μmol/L. 5-7% opće populacije ima blago do umjereno povećane razine homocisteina. Dakle, homocisteinemija je prilično učestala pojava te se smatra da su uzrok tome generalno često zastupljeni polimorfizmi gena za MTHFR (Moll i Varga, 2015).

#### 1.4. Gen za metilentetrahidrofolat-reduktazu i mutacije

Lokus gena koji kodira za enzim MTHFR jest 1p36.3. Gen za MTHFR sastoji se od 11 egzona i 10 introna te je dugačak 2,2 kb (kilobaza) (Zhang i sur., 2014).

Identificirane su brojne mutacije gena s različitim stupnjem aktivnosti eksprimiranog enzima, stoga i drugačijim opsegom posljedica deficijencije enzima. Mutacije s težom kliničkom slikom pacijenata karakterizirane su aktivnošću enzima od 0-20 % divljeg tipa enzima (bez mutacije), vrlo povišenim koncentracijama homocisteina u krvi i urinu te niskim koncentracijama metionina (Frosst i sur., 1995). Biokemijski pokazatelji u korelaciji su s postotkom aktivnosti MTHFR-a. Klinička slika nositelja mutacija uključuje usporen i poremećen rast i razvoj, gubitak motornih funkcija, bolesti krvnih žila te psihijatrijske i neurološke komplikacije (Frosst i sur., 1995).

Još 1969. godine zanimanje za preuranjene slučajeve aterotromboze i tromboembolije kod pacijenata s izraženom homocistinurijom učinilo je homocistein kandidatom čimbenikom za poremećaje vaskularnog sustava (Kang i sur., 1991).

Čak i uz metode određivanja ukupnog i vezanog homocisteina te otkrivanje genske pozadine poremećaja njegove koncentracije teško je identificirati pojedince koji će zasigurno razviti ozbiljna stanja hiperhomocisteinemije i homocistinurije. To sugerira da postoje i drugi čimbenici koji uvjetuju navedena stanja. Dakle, važno je otkriti i uzeti u razmatranje sve moguće čimbenike predispozicije za neravnotežnu koncentraciju homocisteina te posljedično razvoj kardiovaskularnih bolesti (Kang i sur., 1991).

1988. godine Kang i suradnici otkrili su „novu“ mutaciju u genu za MTHFR sa specifičnom aktivnošću enzima od otprilike 50 % aktivnosti divljeg tipa enzima (Kang i sur., 1991). Karakteristična termolabilnost MTHFR-a primijećena je u *in vitro* uvjetima na 46 °C, što je i dovelo do otkrića ove mutacije. MTHFR C677T mutacija u egzonu 4, u području gena koji kodira za N-terminalnu katalitičku domenu enzima, dovodi do zamjene Ala s Val na 222 mjestu u aminokiselinskom slijedu. Smanjena aktivnost MTHFR-a dovodi do umjerene hiperhomocisteinemije, a Kang i suradnici su 1991. dokazali povezanost otkrivenog termolabilnog enzima i povišenih vrijednosti homocisteina s koronarnom srčanom bolesti (Trimmer, 2013). Klinička slika i biokemijski pokazatelji poremećene funkcije MTHFR enzima izravno su proporcionalni s gubitkom funkcije enzima uslijed mutacije gena za MTHFR. Također, umjerena hiperhomocisteinemija, prisutna kod C677T mutacije, može

varirati ovisno o utjecaju drugih čimbenika (negenetskih), poput niske razine folata (Kang i sur., 1991). Homozigoti za mutirane alele C677T (TT) imaju prosječno 25 % višu koncentraciju homocisteina od tipa bez mutacije (Trimmer, 2013).

1995. uslijedila je studija (Frossta i sur., 1995) koja je detaljnije opisala odnos mutacije C677T i aktivnosti MTHFR-a te termolabilnost enzima. Zamjenom aminokiselina, Ala u Val, tj. zamjenom nukleotida C u T, nastaje specifični slijed u genu, *HinfI*. Mutacija je analizirana kod pacijenata s preuranjenim nastupom vaskularne bolesti, no istraživanje nije rezultiralo konačnim sudom o interakciji mutacije i bolesti. Prosječna aktivnost MTHFR-a u mutiranih homozigota (TT) iznosila je 30 % od normalne aktivnosti (kod CC varijante) (Frossta i sur., 1995). Heterozigoti imali su 65 % rezidualne aktivnosti enzima te su dokazana preklapanja vrijednosti aktivnosti kod skupine homozigota divljeg tipa i heterozigota. Razina izmjerene homocisteina bila je, otprilike, dva puta veća kod mutiranih homozigota nego kod heterozigota i tipa bez mutacije (Frossta i sur., 1995).

Polimorfizam u genu za MTHFR, C677T, generalno je čest u populacijama, a prevalencija se razlikuje ovisno o etničkom podrijetlu i geografskom položaju populacije. U Europi 10-12 % TT homozigota prisutno je u Španjolskoj, Francuskoj, Mađarskoj. Prevalencija je niža u sjevernim zemljama (4-6 %); Finskoj, Nizozemskoj, Rusiji te Njemačkoj. Najveća zastupljenost C677T mutacije u Europi zabilježena je u Italiji, i to s naglaskom na jug Italije, pokrajinu Kampaniju i Siciliju (Wilcken i sur., 2003). Na američkim kontinentima prevalencija MTHFR C677T viša je kod populacija hispanskog podrijetla, srednje zastupljena je kod stanovništva europskog podrijetla, a vrlo niska (1-2 %) kod Afroamerikanaca. Niska zastupljenost mutacije u crnoj rasi u skladu je s onom kod afričke populacije (Wilcken i sur., 2003).

Drugi, manje učestali polimorfizam gena za MTHFR, A1298C, nalazi se u egzonu 7 i uzrokuje zamjenu glutamata s alaninom na položaju 429, u C-terminalnoj, regulatornoj regiji enzima. Mutacija A1298C prvi put je identificirana u studiji karcinoma jajnika (uloga MTHFR-a u povećanju potrebe stanice za folatom) (Weisberg, 1998). 1998. Weisberg i suradnici detaljnije su opisali A1298C mutaciju i njen utjecaj na aktivnost enzima. Zamjenom nukleotida A u C nastaje specifično mjesto u genu, *MboII*. Mutacija A1298C, također, reducira aktivnost MTHFR-a, ali ne u tolikoj mjeri kao mutacija C677T pa je stoga njen utjecaj na razinu homocisteina manji u odnosu na C677T. Budući da se mjesto mutacije nalazi u regiji gena koji kodira za regulatornu domenu proteina pretpostavlja se da mutacija utječe

na regulaciju aktivnosti enzima. Točnije, smatra se da utječe na regulaciju putem AdoMet-a koji alosterički inhibira enzim vezanjem u C-terminalnoj regiji. Mutirani homozigoti za A1298C (CC) imaju otprilike 60 % rezidualne aktivnosti enzima (Weisberg, 1998). Međutim, i u slučajevima kada je izmjerena aktivnost enzima jednaka i kod C677T i A1298C mutacije, polimorfizam A1298C rezultira manjim povišenjem koncentracije homocisteina (Weisberg, 1998).

Polimorfizam A1298C gena za MTHFR povezuje se s rizikom od pobačaja i gubitka fetusa, posebice ako je prisutan i deficit folata te s arterijskom i venskom trombozom (Karmadonova i sur., 2014).

Pod pretpostavkom da je povišenje koncentracije homocisteina posljedica poremećaja metabolizma homocisteina zbog mutacija u genu za važan enzim tog metabolizma, MTHFR, može se zaključiti da navedeni polimorfizmi gena pripadaju rizičnim čimbenicima za vaskularne okluzivne bolesti (Lupi-Herrera, 2018).

## **1.5. Venska tromboembolija**

Venska tromboembolija (VTE) jest bolest krvožilnog sustava karakterizirana poremećenim zgrušavanjem krvi s ponavljajućim akutnim epizodama. Kompleksne je patogeneze u koju su uključeni različiti čimbenici te predstavlja značajni uzrok morbiditeta i mortaliteta u svijetu (Wolberg i sur., 2015).

U skupini kardiovaskularnih bolesti (CVD) VTE po učestalosti zauzima treće mjesto, nakon koronarne bolesti i ishemijskog srčanog udara (Wolberg i sur., 2015). Glavne manifestacije VTE su duboka venska tromboza (DVT) i plućna embolija (PE). Njihova godišnja prevalencija je oko 1-5/1000 (Nizankowska i sur., 2003), iako je teško odrediti egzaktan broj budući da prevalencija varira u različitim populacijama s obzirom na etničko porijeklo populacije i geografsko područje (Liew i Gupta, 2014). Incidencija se povećava na 1/100 godišnje oboljelih u skupini starijih od 55 godina. Među oboljelima više je muških pacijenata, iako žene u reproduktivnoj dobi imaju veći broj oboljelih (Beckman, 2010).

Kao i kod svakog sustava u organizmu tako i koagulacijski sustav krvi teži održavanju homeostatske ravnoteže koja se sastoji od prokoagulacijskih, antikoagulacijskih i fibrinolitičkih čimbenika. Dođe li do pomaka u toj ravnoteži, s jedne strane, rezultat može biti stvaranje patološkog krvnog ugruška.

Mehanizam povezanosti tromboze i embolije prvi puta opisao je njemački liječnik Rudolph Virchow. Tek 100 godina nakon objave njegovog rada opis je dobio naziv Virchow-ova trijada. Trijada uključuje tri grupe čimbenika trombogeneze; hiperkoagulabilnost, promjene u protoku krvi (staza i turbulencije) i poremećaj endotelne funkcije (Wolberg i sur., 2015).

## **1.6. Patofiziologija venske tromboembolije**

U zdravim venama, endotel krvnih žila „osjeća“ tok krvi i stvara površinu koja sprječava nastanak ugruška. Endotel promovira ekspresiju antitrombotskih čimbenika poput Kruppel-sličnog čimbenika 2 koji posreduje stvaranje trombomodulina (djeluje kao transkripcijski faktor). Drugi endotelni čimbenici su inhibitor puta tkivnog faktora (TFPI), heparan sulfat, aktivator tkivnog plazminogena, dušikov monoksid (NO), prostaciklin (Wolberg i sur., 2015). U valvulama vena, koje nemaju laminarni tok krvi i sklone su hipoksiji, pojačana je ekspresija trombomodulina i endotelnog receptora proteina C, što prevenira zgrušavanje krvi (Wolberg i sur., 2015). Antikoagulacijski čimbenici krvi; protein C, protein S i antitrombin inhibiraju lokalno stvaranje tromba. Staza krvi, kao jedan od patogenih čimbenika venske tromboze, uzrokuje endotelnu disfunkciju i ekspresiju staničnih adhezijskih molekula (VCAM-1-adhezijski protein vaskularnih stanica, P-selektin, E-selektin), privlačenje leukocita zidu krvnih žila i inicira endotelnu prokoagulacijsku aktivnost (Wolberg i sur., 2015). Endotelne stanice smanjuju ekspresiju i aktivnost antitrombotskih čimbenika, a potiču aktivnost prokoagulacijskih i antifibrinolitičkih faktora (npr., inhibitor aktivatora plazminogena - PAI1, i tkivnih faktora). Posljedica je akumulacija fibrina i eritrocita te začepljenje vena (Wolberg i sur., 2015).

Za razliku od arterijskih ugrušaka koji su bogati trombocitima (bijeli trombi), venski sadrže manje trombocita, a veći udio eritrocita i fibrina zato se zovu „crveni“ (Wolberg i sur., 2015). Smatra se da eritrociti sami po sebi doprinose stvaranju tromba; agregiraju u područjima sporijeg toka krvi te povećavaju viskoznost krvi, također, izlažu na svoju površinu fosfatidilserin, prokoagulacijski fosfolipid (dio kontaktnog puta aktivacije) (Wolberg i sur., 2015). Neutrofili pridonose VTE-u tako što otpuštaju NET-e (engl. neutrophil extracellular traps) – izvanstanične mreže od DNA, histona i antimikrobnih proteina, koje mogu hvatati trombocite i eritrocite. Neutrofili također mogu potaknuti trombozu oslobađanjem proteaze, elastaze, koja inaktivira antikoagulacijski TFPI, a eksprimira tkivni čimbenik. DNA i RNA mogu aktivirati koagulacijski čimbenik XII (Wolberg i sur., 2015).

Posljedice DVT-a su natečeni i bolni udovi te adematozno i osjetljivo tkivo duž vene zahvaćene trombozom. Može biti i asimptomatska i s PE kao prvom manifestacijom. Najmanje 40 % pacijenata s DVT u proksimalnim venama razvit će PE, i to bez simptoma (Wolberg i sur., 2015).

### **1.7. Dijagnoza venske tromboembolije**

Postavljanje dijagnoze VTE, DVT ili PE, nakon kliničke prezentacije koja postavlja sumnju na iste trebala bi prvo uključiti procjenu mogućih čimbenika rizika. Ako ne postoje evidentni uzročnici koristi se laboratorijski test D-dimera (otpuštaju se u cirkulaciju tijekom razgradnje fibrina iz ugrušaka) kojim se može isključiti VTE, jer ima visoku negativnu prediktivnu vrijednost. Ako su prisutni rizični čimbenici, dijagnoza VTE-a potvrđuje se (ili ipak odbacuje) kompresijskim ultrazvukom za DVT (zamijenio je kontrastnu venografiju) te CT- (engl. computerized tomography) -plućnom angiografijom (CTPA) ili skeniranjem pluća uz izmjenu faza ventilacije-perfuzije za dijagnozu PE (područja pluća zahvaćena plućnom embolijom pokazuju normalan dotok zraka, no nema osvjjetljenja koje označava perfuziju, zbog blokiranog protoka krvi) (Wolberg i sur., 2015). CTPA je najučestaliji dijagnostički test, rendgenskim snimanjem prsa isključuju se upala pluća (pneumonija) ili pneumotoraks, a elektrokardiogramom, akutni infarkt miokarda i perikarditis (Davidson i sur., 2010).

Pacijenti s progresivnom PE su hipotenzivni, imaju velik broj srčanih otkucaja u minuti, nisku saturaciju kisikom (hipoksija), niski parcijalni tlak kisika te prisutnu metaboličku acidozu. Ekstenzivna blokada protoka krvi u pluća uzrokuje naprezanje desne klijetke srca što se može vidjeti ehokardiografijom (ultrazvukom srca). Rezultira dilatacijom desnog dijela srca u pokušaju da potisne krv u blokirane plućne arterije (Davidson i sur., 2010). Posljedice su povećanje plućnog arterijskog tlaka te otpuštanje moždanih natrijuretskih peptida ili njegovih prekursora i troponina (Wolberg i sur., 2015).

### **1.8. Antikoagulacijska terapija venske tromboembolije**

Antikoagulacijska terapija akutnih stanja VTE uključuje tri faze; inicijalna terapija tijekom 5-10 dana, produžena terapija sljedećih 3-6 mjeseci i dugoročna terapija (Wolberg i sur., 2015). Cilj početne terapije jest ograničiti rast tromba, dok ostale preveniraju ponovljeni VTE događaj. Početno liječenje obuhvaća parenteralnu terapiju; nefrakcionirani heparin i.v., s.c. niskomolekularni heparin (LMWH) ili fondaparinuks i antagoniste vitamina K, kao što je



varfarin (Wolberg i sur., 2015). Varfarin ima odgođeno djelovanje (tek nakon nekoliko dana) zato se prvo daje parenteralna terapija. Alternativa varfarinu su direktni oralni antikoagulansi (DOAC) koji se daju u fiksnim dozama i za razliku od varfarina nije potrebno redovito praćenje INR-a (međunarodni normalizirajući omjer). DOAC-i su bolja opcija jer su jednako učinkoviti i smanjuju rizik od rekurentnih VTE, nose manji rizik od krvarenja koje je česta nuspojava varfarina. Pacijenti se mogu liječiti i s rivaroksabanom ili apiksabanom koji direktno inhibiraju faktor Xa. Oralna terapija smanjuje potrebu za parenteralnom, daje se intenzivnije i u većim dozama prvih nekoliko dana (Wolberg i sur., 2015).

Pacijenti s karcinomom uz VTE imaju veći rizik od ponavljajućih epizoda tromboze; kod takvih pacijenata LMWH se pokazao boljim od antagonista vitamina K. Trudnicama se također prepisuje LMWH jer varfarin i DOAC-i prolaze placentu, a varfarin je uz to i teratogen (Wolberg i sur., 2015).

Trombolitska terapija preporuča se pacijentima s masivnom PE koji uz to imaju i hipotenziju. Ta terapija može se dati sistemski ili kateterom izravno u tromb. Primjer takvog lijeka jest alteplaza koja prevodi plazminogen u plazmin. Kod pacijenata koji nemaju hipotenziju trombolitska terapija može dovesti do pojačanog krvarenja uključujući intrakranijalno (Wolberg i sur., 2015).

Produžena terapija traje najmanje 3 mjeseca. Kod pacijenata s nejasnim uzrokom proksimalnog DVT ili PE i malim rizikom od krvarenja preporuča se neograničena terapija, a s drugim takvim događajem i doživotna (Wolberg i sur., 2015).

Vena cava filteri preveniraju da tromb iz dubokih vena dođe do pluća. Oni se uzimaju u obzir samo kod pacijenata s akutnim ekstenzivnim DVT-om s ili bez PE koji imaju kontraindikacije na antikoagulacijsku terapiju, poput ozbiljnih krvarenja i rekurentne VTE unatoč terapiji i kod onih kod kojih je trenutno antikoagulacijska terapija kontraindicirana (operacija ili prije poroda) (Wolberg i sur., 2015).

## **1.9. Plućna embolija**

PE jedno je od najopasnijih stanja kardiovaskularnih poremećaja te jedan od najčešćih uzroka smrtnosti u razvijenim zemljama (Srivastava, 2016). Mortalitet je moguće reducirati brzom dijagnozom i adekvatnom terapijom. U odsustvu liječenja smrtnost doseže i do 30 %, dok pravovremena terapija smanjuje smrtnost na 2-8 % (Karmadonova i sur., 2015). Klinička prezentacija bolesti često je varijabilna i nespecifična što otežava donošenja dijagnoze. U suštini, PE jest stanje u kojem krvni ugrušak putuje iz sistemske cirkulacije i dospijeva u

plućni krvožilni sustav. Većina ugrušaka dolazi iz dubokih vena donjih i gornjih ekstremiteta, tako da se DVT i PE smatraju slijedom iste bolesti, VTE (Elassal i sur., 2014). Ono što je potrebno za ranu dijagnostiku i prevenciju smrtnih ishoda PE jest specifičan biljeg za otkrivanje genetske predispozicije i profilaksu rizične populacije (Basol i sur. 2016).

### **1.10. Rizični čimbenici venske tromboembolije**

I genetski tj. nasljeđeni i okolišni tj. stečeni čimbenici rizika mogu uzrokovati VTE. Zapravo smatra se da je ključna kombinacija više rizičnih čimbenika da bi proces bolesti započeo (Wolberg i sur., 2015).

U većini slučajeva nasljeđena predispozicija za razvoj bolesti ostaje utišana dok se ne pojavi određeni okolišni/stečeni čimbenik koji potakne ispoljavanje bolesti (Nizankowska i sur., 2003).

Najjačim rizičnim čimbenicima, prema mnogim istraživanjima, smatraju se upravo nenasljedni, poput dobi, velikih operacija, hospitalizacije, imobilizacije, karcinoma, oralne kontracepcije, hormonske nadomjesne terapije, trudnoće, dugih putovanja (Srivastava, 2016). Starenjem se smanjuje mišićni tonus te pokretljivost vena i njihovih valvula. Veliki tumori uzrokuju mehaničke opstrukcije vena i zastoj krvi, a postoji i složeni mehanizam patofiziološke povezanosti tumora i VTE-a; aktivacija trombocita tumorskim stanicama te stvaranje prokoagulacijskih čimbenika u tumorskim stanicama, kao i u monocitima i makrofazima podraženim tumorskim antigenima. U trudnoći se povećava viskoznost krvi te koncentracija fibrinogena i aktivnost čimbenika koagulacije, a smanjuje koncentracija antitrombina III. Estrogen i progesteron u oralnim kontraceptivima povećavaju stvaranje prokoagulacijskih čimbenika, a smanjuju antikoagulacijske. Imobilizacija uzrokuje sporost protjecanja krvi u venama, nakupljanje koagulacijskih čimbenika te lokalno oštećenje endotela zbog hipoksije (Gamulin i sur., 2005). Hospitalizacija je jedan od glavnih i ključnih stečenih čimbenika rizika stoga postoje preporuke da bi se rizik od VTE trebao procjenjivati kod svih pacijenata pri primitku u bolnicu (Srivastava, 2016).

### **1.11. Genetski rizični čimbenici venske tromboembolije**

Nasljedna trombofilija najčešći je uzročnik VTE-a u populaciji pacijenata mlađih od 50 godina. (Kreidy, 2014) U prisutnosti nasljednih rizičnih čimbenika važno je obratiti pažnju na

druga rizična stanja koja lako mogu biti okidač tromboembolijskog događaja, npr. uzimanje oralne kontracepcije kod žena (Leniček-Krleža i sur., 2010).

1965. Egeberg je identificirao prvi čimbenik koji je povezoao s pojavom trombofilije kada je istraživao obitelj s nasljednom deficijencijom antitrombina. 1969. prvi put je u korelaciju dovedena i ABO krvna grupa s rizikom od VTE-a. Ranih 1980-ih otkrivena je povezanost proteina C i proteina S s nasljednom trombofilijom, a 90-ih faktor V Leiden i mutacija protrombina G20210A (Rosendaal i Reitsma, 2009).

Među genetskim čimbenicima rizika, snažno djelujućima smatraju se deficijencije prirodnih inhibitora koagulacije (antitrombin, protein C i S). Iako su vrlo rijetke, kod samo 1 % populacije, ipak dovode do ozbiljnog fenotipa sa čak do 10 puta povećanim rizikom od razvoja bolesti (i kod heterozigotnih nositelja) (Rosendaal i Reitsma, 2009). Većina izvještaja o deficijencijama tih čimbenika dolaze iz studija nasljednih obiteljskih oblika VTE-a. Budući da se radi o specifičnim fenotipovima koji su zastupljeni u rijetkim obiteljskim slučajevima treba oprezno tumačiti rezultate, jer tu mogu biti uključeni drugi nasljedni čimbenici koji nisu detektirani.

Antitrombin je ključni inhibitor zgrušavanja. Pripada obitelji serinskih proteaza te djeluje inhibitory i na aktivirane koagulacijske čimbenike poput IX, X, XI i XII. Molekularna osnova greške u sintezi antitrombina može biti vrlo heterogena, najčešće su to *missense* mutacije (Srivastava, 2016).

Protein C svoju antikoagulacijsku funkciju aktivira vezanjem na kompleks trombin-trombomodulin (endotelni receptor trombina) ili na sami trombin. Aktivirana serinska proteaza razgrađuje faktore Va i VIIIa. Protein S služi kao enzimski kofaktor u toj reakciji povećavajući efikasnost same reakcije te je također čimbenik rizika (Srivastava, 2016).

U umjerene genetske čimbenike rizika kao biljezi trombofilije ubrajaju se mutacije: Faktor V Leiden (FVL), protrombin G20210A, genotipovi ABO krvne grupe. FVL je relativno česta mutacija koja se kod bijele rase javlja s prosječnom prevalencijom od 5 %. U skupini oboljelih od VTE ona je zastupljena s prevalencijom > 20 %. Mutacija FVL dovodi do pretjerane aktivnosti faktora V, odnosno rezistencije na aktivirani protein C, što djeluje prokoagulantno te za 3-8 puta povećava rizik od tromboze kod heterozigotnih nositelja, a za 50-100 puta za homozigotne nositelje FVL mutacije. Brojnim studijama utvrđeno je da je FVL mutacija najčešći nasljedni uzročnik trombofilije (Elassal, 2014).

Protrombin G20210A je mutacija koja dovodi do za 30 % povišenih razina protrombina, a time i veće sklonosti zgrušavanju krvi. Ova mutacija je također frekventna i to gotovo

isključivo kod bijele rase. Nositelji mutacije imaju 2-3 puta veći rizik od razvoja VTE-a, a prevalencija među oboljelima je oko 6 % (Rosendaal i Reitsma, 2009).

Poznato je da ABO krvne grupe značajno određuju krvnu razinu koagulacijskog čimbenika VIII, jednog od proteina uključenih u kaskadu zgrušavanja krvi. Točnije, čimbenik VIII i von Willebrandov čimbenik (VWF) podliježu post-translacijskim modifikacijama glikoziltransferazama koje kodiraju ABO geni. Dakle, ABO fenotip korelira s krvnom razinom čimbenika VIII i VWF (Crous-Bou, 2017). Nositelji krvne grupe 0 imaju smanjene razine von Willebrandova faktora, otprilike 25 % manje, što im daje određenu zaštitu u odnosu na druge krvne grupe kada govorimo o sklonosti razvijanju tromboze. Nositelji ne-O krvnih grupa imaju 2-4 puta veći rizik od VTE-a (Rosendaal i Reitsma, 2009). Jukić i sur., 2009. godine istražili su odnos ABO genotipova krvne grupe i rizika od razvoja tromboze u hrvatskoj populaciji. Potvrđena je teza da nositelji ne-O krvnih grupa imaju značajnu genetsku predispoziciju za razvoj tromboze. Točnije, u najvećem riziku su pojedinci s AB ili A<sup>2</sup>B genotipom krvne grupe, slijede ih nositelji BB/O<sup>1</sup>B/O<sup>2</sup>B te O<sup>1</sup>A/O<sup>2</sup>A<sup>1</sup> genotipova. Također, nositelji B alela imaju veću sklonost trombozi od nositelja A alela (Jukić i sur., 2009).

Slabiji utjecaj na razvoj tromboze ima nekoliko genetskih čimbenika. Polimorfizam 4G/5G gena koji kodira za inhibitor aktivatora plazminogena – 1 (PAI-1) također je jedan od genetskih čimbenika VTE. 4G alel povezan je s povećanjem koncentracije PAI-1 u krvi čime se smanjuje fibrinoliza i veća je mogućnost stvaranja ugruška (Hosseini i sur., 2015). Trombotički rizik mutacije u genu za MTHFR, opisan u prethodnim poglavljima, čija je posljedica poremećaj metabolizma homocisteina i shodno tome povišenje koncentracije homocisteina i dalje se istražuje. Mutacije u genu za MTHFR ubrajaju se u tzv. miješani oblik čimbenika rizika, s obzirom da se na njihovo prokoagulantno djelovanje može utjecati protektivno uzimanjem B vitamina i folne kiseline; što nije moguće kod klasično naslijeđenih čimbenika rizika (Reilly i sur., 2013).

Teško je generalizirati kada se radi o klasifikaciji čimbenika rizika za VTE, jer ne postoji konzistentnost u rezultatima istraživanja. Primjerice, u talijanskoj populaciji TT genotip - C677T MTHFR mutacije indiciran je kao neovisni čimbenik rizika VTE-a, dok drugdje nije (Shafia, 2018).

Međutim, treba naglasiti da se svi utvrđeni čimbenici rizika trebaju uzimati u obzir zajedno, jer kombinacija više naslijeđenih genetskih čimbenika može značajno povećati rizik koji bi jedna varijanta samostalno predstavljala (Simone i sur., 2013).

## **1.12. Modulirajuća uloga vitamina B kod mutacija gena za metilentetrahidrofolat-reduktazu**

Povišenje koncentracije homocisteina rezultat je interakcije genetskih i okolišnih utjecaja, odnosno funkcionalnosti enzima i dostupnosti kočimbenika (folata, vitamina B12, riboflavina). Genetski poremećaji vezani su za termolabilnost, tj. gubitak funkcije enzima uključenih u metabolizam homocisteina, dok okolišne faktore čini pravilan unos vitamina ključnih za metabolizam homocisteina.

Brojna istraživanja podržavaju ulogu mutacija gena za MTHFR kao čimbenika rizika za CVD te potencijalnu modulirajuću ulogu vitamina B u značajnosti tog rizika. Razlike u statusu vitamina B mogle bi objasniti velike geografske i populacijske varijacije u utjecaju mutacija na rizik od CVD-a. Stoga se nameću istraživanja uloge interakcije gena-nutrijenata u moduliranju rizika (Reilly i sur., 2013).

Dokazano je da se suplementacijom folne kiseline može smanjiti koncentracija ukupnog homocisteina kod nositelja C677T mutacije u genu za MTHFR (Liew 2015; Karmadonova 2015; Santilli i sur., 2016). Folat stabilizira C677T mutiranu varijantu enzima tako što sprječava njegovo odvajanje od pripadajućeg flavinskog kočimbenika (FAD). (Lucock, 2014) Međutim, nije dokazano da suplementna terapija smanjuje rizik od rekurentnih trombotskih događaja (Santilli i sur., 2016).

Činjenica da se razina homocisteina može smanjiti dodatnim unosom folne kiseline, vitamina B12, riboflavina, piridoksina, a da to smanjenje ne dovodi do korekcije stanja CVD-a može sugerirati da je homocistein jednostavno biljeg povećanog kardiovaskularnog rizika, a ne uzrok istog (Moll i Varga, 2015).

U konačnici, utjecaj MTHFR mutacija na rizik od VTE može biti i pod utjecajem gen-gen i gen-okolišnih interakcija (Zeng J i Zeng Q, 2018). Osim toga, patofiziološki mehanizam VTE-a vrlo je kompleksan i teško je procijeniti koliki udio u njenom razvoju ima jednogenska, točkasta mutacija gena za MTHFR.

## **2. Obrazloženje teme**

Svrha ovog rada jest ispitati zastupljenost sljedećih mutacija u genu za MTHFR: C677T i A1298C, u uzorku hrvatske populacije, istražiti postoji li korelacija između navedenih mutacija i plućne embolije te postoji li povezanost kombinacije mutacija C677T i A1298C s rizikom od razvoja plućne embolije na uzorku hrvatske populacije. Dakle, cilj rada jest utvrditi predstavljaju li mutacije gena za MTHFR, C677T i A1298C, rizične čimbenike za oboljenje od plućne embolije u odabranom uzorku hrvatske populacije.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, Odjelu za molekularnu dijagnostiku, Odsjeku za DNA tipizaciju u periodu od listopada 2019. do srpnja 2020. godine.

Skupinu ispitanika čini 110 pacijenata iz Kliničke bolnice Dubrava i Kliničke bolnice Merkur. Pacijentima je fizikalnim pregledom, laboratorijskim testovima i drugim dijagnostičkim metodama potvrđena dijagnoza PE. Skupinu pacijenata s dijagnozom PE čine 54 žene i 56 muškaraca. Podatak o životnoj dobi 7 od 110 pacijenata je nepoznat. Dakle, medijan dobi preostalih 103 pacijenata (pacijenti kojima je poznata dob) je 71 godina, mod 74 te interkvartilni raspon od 26 godina. Najmlađi pacijent ima 23, a najstariji 95 godina.

Osim mutacije u genu za MTHFR, za skupinu pacijenata s dijagnozom plućne embolije, točnije njih 84, poznati su i podaci o prisutnosti drugih rizičnih čimbenika (pušenje, maligne bolesti, imobilizacija) te mogućih komorbiditeta (DVT, infarkt miokarda – IM, ozljeda, ponavljana PE).



Slika 4. Prisutnosti drugih rizičnih čimbenika (pušenje, maligne bolesti, imobilizacija) i komorbiditeta

Sljedeća analiza odnosi se na skupinu od 84 ispitanika s PE za koje su poznati podaci o prisutnosti drugih rizičnih čimbenika i komorbiditeta. 19 % (N=16) pacijenata s dijagnozom

PE puši ili je nekad tijekom života pušilo, 31 % (N=26) ima aktivnu malignu bolest ili je ista „preboljena“ tijekom života, 12 % ispitanika je nekad tijekom života bilo imobilizirano. 23 % ispitanika uz plućnu emboliju boluje i od DVT-a, a njih 4 % imalo je ponavljane epizode PE, dok je 9 % pacijenata doživjelo IM.

Kontrolnu skupinu čini 101 zdravi dobrovoljni davatelj krvi. Pregledom anamneze i obiteljske povijesti bolesti potvrđeno je da nijedan pojedinac iz kontrolne skupine nema zabilježen slučaj tromboembolijske bolesti. Dob kontrolne populacije, od koje je 48 žena te 53 muškarca, kreće se od 25 do 65 godina. Medijan dobi je 41 godina, a mod 33. Interkvartilni raspon dobi kontrolne skupine je 16.5 godina. Najmlađi zdravi pojedinac ima 23, a najstariji 65 godina.

Tablica 1. Raspodjela ispitanika studije prema spolu

<b>Spol</b>	<b>Pacijenti % (N)</b>	<b>Kontrole % (N)</b>
Žene	49 (54)	48 (48)
Muškarci	51 (56)	52 (53)
Ukupno	110	101

Iz raspodjele ispitanika prema spolu vidljiva je podjednaka zastupljenost žena i muškaraca u dvije skupine, skupini pacijenata i kontrolnoj skupini ispitanika.

Nakon informiranog pristanka skupine pacijenata, prikupljeni su uzorci krvi. Periferni uzorak krvi izvađen je u epruvete sa suhim antikoagulansom K<sub>2</sub>EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) u volumenu od 8,5 ml.



## 3.2. Metode

### 3.2.1. Izolacija genomske DNA na uređaju QIAcube

Za izolaciju DNA iz uzorka pune krvi s antikoagulansom EDTA korišten je komercijalni komplet reagensija QIAamp DNA Blood mini QIAcube kit (QiagenGmbH, Hilden, Njemačka).

QIAcube uređaj je robotska radna stanica za automatiziranu izolaciju nukleinskih kiselina iz širokog spektra materijala (puna krv, *buffycoat*, plazma, serum, kultura stanica, kultura bakterija, tkiva). Izolacija se provodi standardnim QIAGEN kitovima za izolaciju nukleinskih kiselina na kolonama (silika-gel membrane) prema protokolima proizvođača. Izolacija se temelji na procesu vezanja-ispiranja-eluiranja, pri čemu je ključni korak adsorpcija nukleinskih kiselina na silika-gel membranu. Genomska DNA iz pune krvi izolira se iz početnog uzorka volumena 200 µL. Potrebni reagensi za izolaciju su lizirajući pufer, proteaza, apsolutni etanol, puferi za ispiranje (AW1 i AW2) te pufer za eluciju (AE).

Lizirajući pufer razgrađuje stanice čime se oslobađa stanični sadržaj. Proteaza služi za uklanjanje staničnih proteina i oslobađanje nukleinskih kiselina od kompleksa s proteinima. Pomoću apsolutnog etanola, DNA iz uzorka adsorbira se na silika-gel membranu kolone. Zatim se DNA vezana na membranu pročišćava od svih staničnih primjesa puferima za ispiranje do završnog koraka, eluiranja genomske DNA s membrane puferom za eluciju. Izolirana DNA eluirana je u 200 µl pufera za eluciju, visoke je čistoće i prinosa te je spremna za umnažanje lančanom reakcijom polimeraze (PCR) (Kundid, 2018).

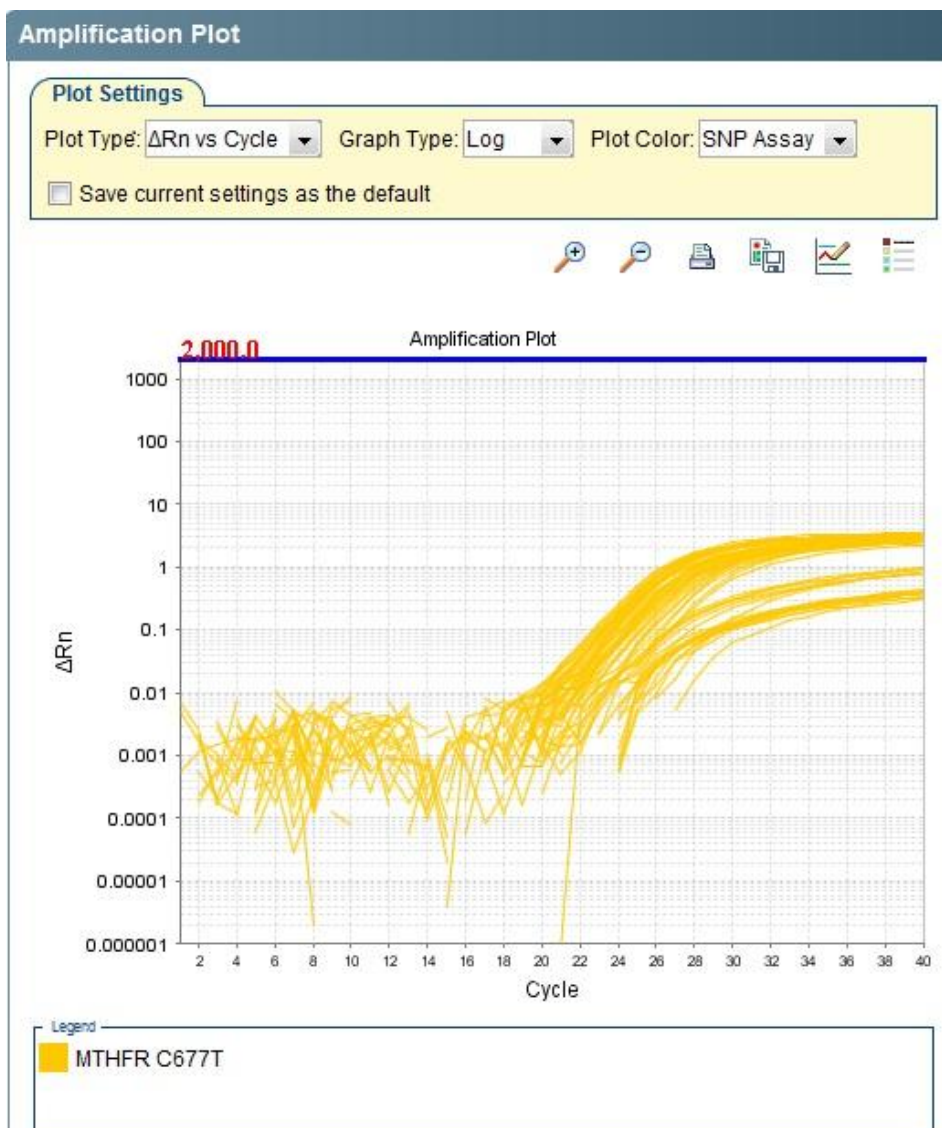
### 3.2.2. Genotipizacija mutacija metilentetrahidrofolatreduktaze C677T i A1298C pomoću metode real-time PCR – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. real-time PCR), osim što omogućuje kvantifikaciju, vrlo je osjetljiva metoda genotipizacije. U ovom istraživanju real-time PCR tehnika upotrebljena je u sklopu metode alelne diskriminacije kako bi se identificirale varijante gena, od kojih su neke posljedica ispitivanih točkastih mutacija u genu za MTHFR (Đogić, 2018).

Real-time PCR inačica je klasične lančane reakcije polimeraze koja omogućuje kontinuirano praćenje nastajanja produkata umnažanja tijekom vremena. U primjenjenoj metodi TaqMan tehnologije detekcije, koristi se dvostruko označena fluorescentna sonda. Emitirajuća boja

(engl. reporter) vezana je za 5' kraj TaqMan sonde, a prigušivač boje (engl. quencher) vezan je za 3' kraj. Tako označen oligonukleotid komplementarno se veže za ciljnu sekvencu u genu. Sve dok su emitirajuća boja i boja-prigušivač zajedno vezane u sondi, prigušivač suprimira fluorescentni signal putem rezonantnog prijenosa fluorescentne energije (FRET). Odnosno, energiju koju emitira reporter boja, prigušivač apsorbira, sve dok je sonda intaktna. U PCR-u u stvarnome vremenu polimeraza katalizira umnažanje gena na koji je vezana početnica (engl. primer). Osim polimerazne aktivnosti, Taq DNA polimeraza ima i 5'-3' egzonukleaznu aktivnost. Tijekom reakcije polimeraza katalizira sintezu komplementarnog lanca i posljedično razgrađuje fluorescentnu TaqMan sondu vezanu na ciljni lanac. Time se reporterska boja oslobađa i udaljava od prigušivača te nastaje fluorescentni signal (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3887036/>).

Metoda PCR-a u stvarnome vremenu omogućuje stalno praćenje nastanka produkta polimerazne reakcije tijekom vremena pomoću intenziteta emisije fluorescencije reporterske boje. Amplifikacijska krivulja grafički prikazuje odnos signala fluorescencije i broja ciklusa umnožavanja. Bazičnu liniju amplifikacijske krivulje čine početni ciklusi umnožavanja u kojima ne dolazi do velike promjene u signalu fluorescencije. Detekcija signala iznad bazične linije označava umnoženi produkt. Thresholdcycle (Ct) vrijednost prikazuje broj ciklusa u kojem intenzitet fluorescencije prelazi intenzitet praga (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754312000043>).



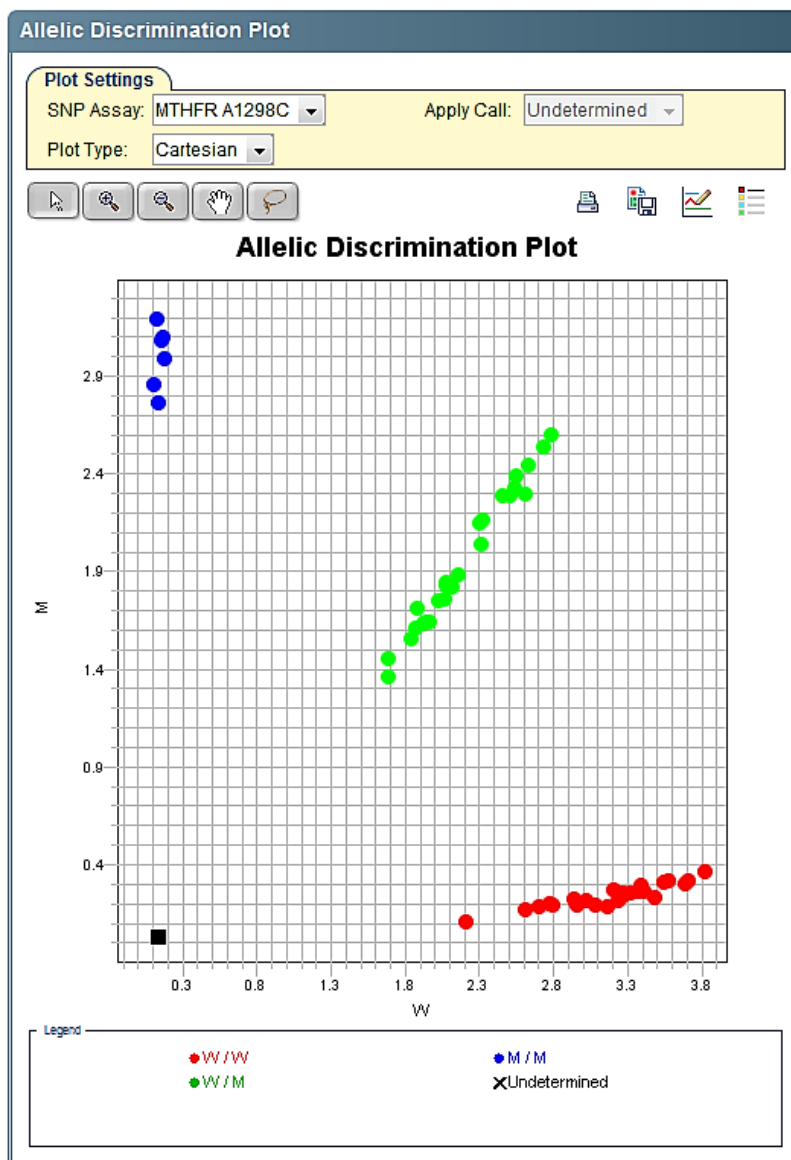
Slika 5. Amplifikacijska krivulja grafički prikazuje odnos signala fluorescencije i broja ciklusa umnožavanja. Količinu umnoženog produkta je moguće pratiti kroz cikluse umnažanja (ispis rezultata s uređaja ABI Prism 7500 Real-time PCR system; Odjel za molekularnu dijagnostiku, odsjek za DNA tipizaciju, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb).

Za genotipizaciju mutacija C677T i A1298C u genu za MTHFR u ovom radu korišten je uređaj ABI Prism 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, SAD).

Metodom alelne diskriminacije (test završne točke) može se odrediti genotip na temelju identifikacije točkaste mutacije u genu, točnije, identificirati varijanta sekvence nukleinske kiseline od interesa. Princip je identičan prethodno opisanoj metodi PCR-a u stvarnome vremenu, samo što se u reakcijsku smjesu dodaje, uz fluorescentnu sondu za divlji tip alela, dodatna TaqMan fluorescentna sonda specifična za mutiranu varijantu gena. Tijekom real-

time PCR ciklusa svaka specifično označena TaqMan sonda veže se za pojedini alel (divlji ili mutirani) te se traženi aleli umnažaju zasebno. Ovisno o tome o kojem se alelu radi proizvest će se specifični fluorescentni signal. Testom alelne diskriminacije uzorci se razvrstavaju na homozigote (divljeg ili mutiranog tipa) i heterozigote.

Flourescentni signal za svaki analizirani uzorak genomske DNA prenosi se na graf. Uz x-os smještaju se uzorci umnoženi kao normalni aleli bez mutacije (divlji tip), a uz osi y uzorci s mutacijom (mutirani tip), dok su uzorci heterozigota s jednim divljim, a drugim mutiranim alelom smješteni u sredini grafa (Đogić, 2018).



Slika 6. Graf alelne diskriminacije prikazuje fluorescentni signal svakog analiziranog uzorka s obzirom na genotip (ispis rezultata s uređaja ABI Prism 7500 Real-time PCR system; Odjel za molekularnu dijagnostiku, odsjek za DNA tipizaciju, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb).

### 3.2.3. Reagensi za izvođenje metode PCR-a u stvarnome vremenu

- Univerzalni TaqManGenotyping Master Mix (Applied Biosystems, SAD)
- CustomTaqMan SNP GenotypingAssay (Applied Biosystems, SAD) - ishodnice i sonde sadržane su u kitu:
  - MTHFR C677T-SNP esej C\_1202883\_20, Chr 1 (rs 1801133)
  - MTHFR A1298C-SNP esej C\_850486\_20, Chr 1 (rs 1801131)
- Bidestilirana voda (Aqua pro injectione, HZTM, Zagreb)
- MicroAmpOptical Tube (0,2 ml) (Applied Biosystems, SAD) - optičke epruvete za PCR
- MicroAmpOptical Cap (Applied Biosystems, SAD) - čepovi za optičke epruvete
- nastavci s filterom 2-100 µl (Eppendorf, Njemačka)
- nastavci s filterom 0,1-10 µl (Eppendorf, Njemačka)

### 3.2.4. Postupak pripreme reakcijske smjese za PCR u stvarnome vremenu

U sterilnom kabinetu s laminarnim protokom zraka pripremljena je reakcijska smjesa za Real-time PCR reakciju na uređaju AB 7500 (Applied Biosystems, SAD).

Reakcijska smjesa sadrži:

12,5 µl Univerzalni TaqMan Master Mix

0,63 µl TaqMan SNP ishodnice i sonde

8,87µl Bidestilirana voda

---

22 µl reakcijske smjese za RT-PCR + 3 µl izolata genomske DNA

Uz ukupnih 22 µL reakcijske smjese za PCR u stvarnome vremenu dodaje se i 3 µL kalupa DNA koja se analizira. Dakle, ukupni volumen svakog uzorka je 25 µl. Uz pripremu reakcijske smjese za nepoznate uzorke, kao dio procesne kontrole umnožavaju se negativna kontrola, u koju se umjesto DNA dodaje bidestilirana voda i 3 pozitivne kontrole s poznatim genotipom MTHFR-a, mutacija C677T/A1298T (divlji tip - bez mutacije, heterozigotni tip - samo jedan mutirani alel, a drugi divlji i homozigotni tip za mutaciju - oba mutirana alela). Nakon završenog pipetiranja epruvete su zatvorene čepovima i stavljene u uređaj za real-time PCR. Odabirom programa definiraju se uvjeti reakcije i započinje umnažanje uz mogućnost praćenja porasta fluorescencije u ciklusima umnažanja (Đogić, 2016).

### 3.2.5. Uvjeti real-time PCR

Tablica 2. Program real-time PCR umnožavanja

<b>UVJETI REAKCIJE PCR</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>VRIJEME</b>
HOLD-aktivacija enzima AmpErase uracil-N-glycosylase	50 °C	2 min.
HOLD-aktivacija AmpliTaq Gold enzima	95 °C	10 min.
40 ciklusa umnožavanja:		
Denaturacija	95 °C	15 sek.
Vežanje početnica i produljenje lanca	60 °C	1 min.
Detekcija fluorescencije	60 °C	

### **3.2. Statistička metoda**

Dobiveni rezultati određivanja genotipova ispitanika za polimorfizme gena za MTHFR, A1298C i C677T, prikazani su pomoću apsolutnih i relativnih frekvencija. Razlike učestalosti pojedinih genotipova C677T i A1298C, u genu za MTHFR, između promatranih skupina analizirane su  $\chi^2$ -testom i testom razlika proporcija uz 95 % granice pouzdanosti (CI).

Razina statističke značajnosti postavljena je na 0,05 u svim analizama. Nul hipoteza  $\chi^2$ -testa bila je da nema razlike u promatranom svojstvu (genotip MTHFR) između skupina s pripadajućim frekvencijama (za pojedini polimorfizam). Kada je dobivena  $\chi^2$  vrijednost manja od granične vrijednosti određene postavljenom p-vrijednosti testa, odbacuje se nul hipoteza i prihvaća alternativna hipoteza, tj. u tom slučaju postoji statistički značajna razlika između skupina u promatranom svojstvu. U testu razlike proporcija, razlika između uspoređenih skupina u promatranom svojstvu smatra se statistički značajnom ako je dobivena p-vrijednost testiranja manja od postavljene razine statističke značajnosti ( $p=0,05$ ) (Šimundić, 2008). Za analizu je korišten statistički program MedCalc Software version 14.8.1.

## 4. Rezultati

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi jesu li mutacije C677T i A1298C u genu za MTHFR rizični čimbenici za razvoj plućne embolije u hrvatskoj populaciji. Dakle, u studiji istraživanja parova sudjelovala je skupina pacijenata s dijagnozom plućne embolije (PE) te kontrolna skupina zdravih pojedinaca (kontrola). U skupini PE bilo je ukupno 110 bolesnika, a u kontrolnoj skupini 101 ispitanik.

### 4.1. Učestalost pojedinih genotipova MTHFR-a u skupini pacijenata s plućnom embolijom i kontrolnoj skupini

#### 4.1.1. Zastupljenost pojedinih genotipova MTHFR-a za C677T u skupini pacijenata s plućnom embolijom i kontrolnoj skupini

Za varijantu C677T MTHFR-a ispitanici (iz skupina PE i kontrole) podjeljeni su u 3 moguća genotipa; divlji tip je nositelj normalnih alela, CC, heterozigoti s alelima CT i mutirani tip je nositelj TT alela. Zastupljenost genotipova izražena je u apsolutnim (N) i relativnim frekvencijama (%).

$\chi^2$  test korišten je kako bi se ispitalo postoji li razlika između dviju skupina s obzirom na zastupljenost prethodno navedenih genotipova za C677T mutaciju. Uz 95 % interval pouzdanosti potvrđena je nul hipoteza testa (dobivena p vrijednosti veća je od postavljene 0,05). Drugim riječima, dokazano je da nema statistički značajne razlike u zastupljenosti mogućih genotipova između skupina, odnosno mutacija C677T u genu za MTHFR podjednako je zastupljena i kod pacijenata s plućnom embolijom i kod zdravih pojedinaca.

Tablica 3. Učestalost pojedinih genotipova za C677T mutaciju u skupini pacijenata s PE i kontrolnoj skupini

MTHFR C677T						
	PE		KONTROLA		$\chi^2$ (95 % CI*)	p
	N	%	N	%		
<b>divlji tip CC</b>	46	41,8	44	43,6	0,17	0,921
<b>heterozigoti CT</b>	49	44,5	45	44,6		
<b>mutirani tip TT</b>	15	13,6	12	11,9		

\*95%- tni interval pouzdanosti

#### 4.1.2. Zastupljenost pojedinih genotipova za A1298C mutaciju u skupini pacijenata s plućnom embolijom i kontrolnoj skupini

Za varijantu A1298C ispitanici su, također, podjeljeni u 3 moguća genotipa; divlji tip je nositelj normalnih alela AA, heterozigoti s alelima AC i mutirani tip je nositelj CC alela. Zastupljenost genotipova izražena je u apsolutnim (N) i relativnim frekvencijama (%).

$\chi^2$  test korišten je kako bi se ispitalo postoji li razlika između dviju skupina, skupine pacijenata s PE i kontrolne skupine koju čine zdrave osobe, u zastupljenosti prethodno navedenih genotipova za mutaciju A1298C MTHFR-a. Uz 95 % interval pouzdanosti potvrđena je nul hipoteza testa (dobivena  $\chi^2$  vrijednost manja je od pripadne granične vrijednosti i p vrijednost veća od 0,05). Drugim riječima, dokazano je da nema statistički značajne razlike u zastupljenosti mogućih genotipova između skupina, odnosno, mutacija A>C podjednako je zastupljena i kod pacijenata s PE i kod zdravih pojedinaca.

Tablica 4. Učestalost pojedinih genotipova za mutaciju A1298C u skupini pacijenata s PE i kontrolnoj skupini

MTHFR A1298C						
	PE		KONTROLA		$\chi^2$ (95 % CI*)	p
	N	%	N	%		
<b>divlji tip AA</b>	49	44,5	45	44,6	0,19	0,909
<b>heterozigoti AC</b>	47	42,7	45	44,6		
<b>mutirani tip</b>	14	12,7	11	10,9		

\*95%- tni interval pouzdanosti

#### 4.1.3. Učestalost mutiranog alela za mutacije C677T i A1298C u genu za MTHFR u skupini pacijenata s plućnom embolijom i kontrolnoj skupini

U tablici 5 prikazana je zastupljenost mutiranog alela za obje mutacije u genu za MTHFR, C677T i A1298C. Navedene su apsolutne i relativne frekvencije ispitanika koji imaju barem jedan mutirani alel u genotipu MTHFR-a.



Tablica 5. Zastupljenost mutiranog alela u genotipovima MTHFR ispitanika za mutacije C677T i A1298C

	C677T				A1298C			
	T		razlika (95 % CI*)	p	C		razlika (95 % CI*)	p
	N	%			N	%		
<b>PE</b>	64	58	2,00 %	0,77	61	55	0,00 %	1
<b>KONTROLA</b>	57	56			56	55		

\*95%-tni interval pouzdanosti

Razlikuju li se skupina pacijenata s PE i kontrolna skupina po zastupljenosti mutiranog alela u genotipovima MTHFR-a za mutacije C677T i A1298C ispitano je pomoću testa razlike proporcija. Već prema relativnim frekvencijama mutiranog alela moguće je pretpostaviti da se dvije skupine gotovo uopće ne razlikuju; u slučaju mutacije A1298C pronađena je potpuna podudarnost pacijenta i zdravih ispitanika. Uz 95 % interval pouzdanosti dobivene su p-vrijednosti (za obje mutacije veće od 0,05) kojima je dokazano da nema statistički značajne razlike između skupina ispitanika u navedenom svojstvu.

#### 4.2. Zastupljenost pojedinih genotipova MTHFR-a u skupini pacijenata s plućnom embolijom i kontrolnoj skupini prema spolu

Tablica 6. Usporedba podskupina žena i muškaraca, skupine ispitanika s PE, prema zastupljenosti genotipova MTHFR-a za C677T i A1298C

GENOTIP		PE		$\chi^2$ (95 % CI*)	p
		ŽENE (N)	MUŠKARCI (N)		
C677T	divlji tip CC	19	27	3,61	0,165
	heterozigot CT	29	20		
	mutirani tip TT	6	9		
A1298C	divlji tip AA	24	25	1,32	0,217
	heterozigot AC	25	22		
	mutirani tip CC	5	9		

\*95 %-tni interval pouzdanosti

$\chi^2$  testom uspoređene su zastupljenosti genotipova (divlji, heterozigot i mutirani tip) kod žena i muškaraca za obje mutacije gena za MTHFR, C677T i A1298C. Dobivenim  $\chi^2$  vrijednostima uz 95 %-tni interval pouzdanosti dokazano je da nema statistički značajne razlike između spolova u učestalosti pojedinog genotipa. Npr., broj žena s mutiranim genotipom, bilo za A1298C ili C677T, ne razlikuje se statistički značajno od broja muškaraca s tim istim genotipom u skupini pacijenata s PE.

Tablica 7. Usporedba zastupljenosti mutiranog tipa kod žena i muškaraca u skupini pacijenata s PE za C677T i A1298C

	<b>C677T</b>	<b>razlika (95% CI*)</b>	<b>p</b>	<b>A1298C</b>	<b>razlika (95% CI*)</b>	<b>p</b>
<b>PE</b>	<b>mutirani tip TT (%)</b>			<b>mutirani tip CC (%)</b>		
<b>ŽENE</b>	11	5,0 %	0,446	9	7 %	0,27
<b>MUŠKARCI</b>	16			16		

\*95 %-tni interval pouzdanosti

Test razlike proporcija korišten je kako bi se ispitalo postoji li razlika u frekvenciji mutiranog genotipa između žena i muškaraca koji boluju od plućne embolije. Razlika između spolova kod varijante C677T je 5 %, a za varijantu A1298C 7 %. Na osnovu dobivenih p-vrijednosti za svaku mutaciju zaključeno je da nema statistički značajne razlike u frekvenciji žena i muškaraca s mutiranim genotipom.

#### 4.2.1. Zastupljenost mutiranog alela u skupini pacijenata s plućnom embolijom i kontrolnoj skupini prema spolu

U tablici 8 prikazane su frekvencije mutiranog alela u genotipovima MTHFR za svaku mutaciju, C677T i A1298C, u žena i muškaraca koji pripadaju skupini ispitanika s plućnom embolijom.

Tablica 8. Usporedba zastupljenosti mutiranog alela u genotipovima MTHFR za mutacije C677T i A1298C između žena i muškaraca u skupini pacijenata s plućnom embolijom (PE)

	<b>C677T</b>			<b>A1298C</b>		
	<b>T (%)</b>	<b>razlika (95% CI*)</b>	<b>p</b>	<b>C (%)</b>	<b>razlika (95% CI*)</b>	<b>p</b>
<b>ŽENE</b>	65			13,0 %		
<b>MUŠKARCI</b>	52	55				

Testom razlike proporcija utvrđeno je da nema razlike između spolova u zastupljenosti mutiranog alela u skupini pacijenata. Za varijantu MTHFR C677T razlika između žena i muškaraca u navedenom svojstvu je 13 %. Iako veća u usporedbi s razlikom između spolova za varijantu A1298C, ipak je dokazano da nema statistički značajne razlike.

#### 4.3. Učestalost kombinacija genotipova C677T i A1298C ispitanika u skupini pacijenata s plućnom embolijom i kontrolnoj skupini

Tablica 9. Prikaz apsolutnih i relativnih frekvencija ispitanika za sve moguće kombinacije genotipova dviju mutacija MTHFR gena u skupini pacijenata s plućnom embolijom i kontrolnoj skupini

kombinacije		PE		KONTROLA		Razlika
C677T	A1298C	N	%	N	%	%
CC	AA	12	10,9	11	10,9	0
CC	AC	20	18,2	22	21,8	3,6
CC	CC	14	12,7	11	10,9	1,8
CT	AA	23	20,9	22	21,8	0,9
CT	AC	26	23,6	23	22,8	0,8
CT	CC	0	0	0	0	0
TT	AA	14	12,7	12	11,9	0,8
TT	AC	1	0,9	0	0	0,9
TT	CC	0	0	0	0	0

Već na temelju vizualne procjene razlike relativnih frekvencija kombinacija genotipova u PE skupini i kontrolnoj skupini može se pretpostaviti da između dviju skupina nema razlike u zastupljenosti ispitanika u pojedinim kategorijama kombinacija (npr. broj ispitanika s mutiranim genotipom jedne i druge mutacije, C677T i A1298C, u obje skupine je 0).

Tablica 10. Usporedba frekvencija kombinacija mutacija C677T i A1298C između PE skupine i kontrolne skupine

<b>KOMBINACIJA</b>		<b>razlika (%)</b>	<b>p*</b>
<b>C677T</b>	<b>A1298C</b>		
<b>divlji tip</b>	<b>heterozigot</b>	3,6	0,514
<b>divlji tip</b>	<b>mutirani tip</b>	1,8	0,687

\*p-vrijednost dobivena testom razlike proporcija

Testom razlike proporcija, provjerena je statistička značajnost razlike između frekvencija kombinacije divljeg tipa za C677T i heterozigota za A1298C te statistička značajnost razlike između frekvencija kombinacije divljeg tipa za C677T i mutiranog tipa za A1298C u skupini PE i kontrolnoj skupini (tablica 10.). Testom je potvrđeno da nema statističke značajnosti u slučajevima kombinacija genotipova koje su navedene. Budući da su testirane frekvencije kombinacija ujedno i najveće razlike relativnih frekvencija (3,6 % i 1,8 %), od svih navedenih u tablici 9, odmah se može zaključiti da između ostalih frekvencija kombinacija, također, nema statistički značajne razlike između pacijenata i zdravih pojedinaca.

## 5. Rasprava

MTHFR važan je enzim u metabolizmu homocisteina. Homocistein nastaje reakcijama metilacije iz AdoMet-a, koji predstavlja jedan od najvažnijih enzimskih kofaktora u biološkim reakcijama (Trimmer, 2013). Dakle, homocistein je razgradni produkt te ga je potrebno metaboličkim putevima ukloniti iz stanice. Remetilacijskim putem, u kojem sudjeluje i MTHFR, iz homocisteina ponovno nastaje metionin (Selhub, 1999). Mutacije gena za MTHFR dokazano utječu na aktivnost enzima, što se u određenoj mjeri ogleda kroz povećanje koncentracije homocisteina. Hiperhomocisteinemija smatra se rizičnim čimbenikom u razvoju venske tromboembolije, u užem smislu i PE (Frosst i sur., 1995).

U kojoj mjeri određena mutacija u genu za MTHFR smanjuje aktivnost enzima? Koliko smanjena aktivnost enzima utječe na povišenje koncentracije homocisteina? Kakav je status vitamina B; folata, cijanokobalamina, riboflavina, piridoksina? Koji su drugi rizični čimbenici prisutni i kakva je njihova interakcija u procesu razvoja venske tromboembolije? – pitanja su koja i dalje suprotstavljaju znanstvenu zajednicu u odgovorima i zasigurno čine povod budućih istraživanja.

Navedeno istraživanje koje je provedeno u skupini bolesnika s PE-om bavilo se ispitivanjem povezanosti dviju mutacija u genu za MTHFR, C677T i A1298C, s plućnom embolijom. Studija je provedena na skupini od 110 pacijenata s PE-om te kontrolnoj skupini od 101 zdravog dobrovoljnog davatelja krvi bez koagulacijskih problema. Svim ispitanicima određen je genotip MTHFR-a s obzirom na mutacije C677T i A1298C. Upotrebom statističkih testova uspoređene su učestalosti mutacija u genu za MTHFR u skupini pacijenata s PE-om i skupini zdravih ispitanika (kontrolna skupina) kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika u zastupljenosti mutacija ciljnog gena između populacije s dijagnozom PE-a i zdrave populacije. Uspoređeni su sljedeći podatci: učestalost pojedinih genotipova za mutacije C677T i A1298C MTHFR-a, učestalost mutiranog alela za C677T i A1298C, zastupljenosti genotipova s obzirom na spol, zastupljenost mutiranih homozigota za C677T i A1298C kod žena i muškaraca u skupini pacijenata, zastupljenosti mutiranog alela prema spolu za C677T i A1298C, učestalost kombinacija genotipova C677T i A1298C.

Niti u jednoj kategoriji usporedbe koja je analizirana nije dokazana statistički značajna razlika između promatranih skupina. Iz navedenih rezultata zaključuje se da u ispitanoj skupini bolesnika s PE-om, mutacije C677T i A1298C MTHFR-a, ne predstavljaju čimbenik rizika za razvoj PE-a, jer je prevalencija mutacija gotovo jednaka kod skupine zdravih i bolesnih osoba. Drugim riječima, navedenim istraživanjem nismo utvrdili povezanost mutacija u genu

za MTHFR i PE, tj. da prisutnost mutacije, C677T ili/i A1298C, čini genetsku predispoziciju za razvoj PE-a u ispitivanoj skupini.

2009. godine, također je provedena retrospektivna studija (engl. case-control study) u hrvatskoj populaciji čiji je primarni cilj bio ispitati povezanost genotipova ABO krvnih grupa, ali i drugih relevantnih gentskih čimbenika rizika (FV Leiden, protrombin G20210A, MTHFR C677T), s razvojem tromboze (Jukić i sur., 2009). Uključeno je 154 pacijenata s dijagnozama VTE (60 pacijenata s DVT-om ili PE-om), kronične venske bolesti i arterijske tromboze i 303 dobrovoljnih davatelja krvi bez trombotičkog rizika. Prema rezultatima studije zaključeno je da je 2 puta veći rizik od tromboze kod nositelja ne-O krvne grupe. Najveći rizik dokazan je kod nositelja AB i A<sup>2</sup>B genotipova, zatim slijede BB/O<sup>1</sup>B/O<sup>2</sup>B te O<sup>1</sup>A/O<sup>2</sup>A<sup>1</sup> (Jukić i sur., 2009). Incidencija mutacije C677T MTHFR-a homozigota u skupini pacijenata bila je 26, a u kontrolnoj skupini 21, čime nije dokazana statistički značajna razlika. Nadalje, omjer izgleda, tj. vjerojatnost da će nastupiti bolest kod nositelja mutiranog genotipa uz 95 % interval pouzdanosti (CI 95 %), za nositelje ne-O krvne grupe uz prisutnu mutaciju C677T bio je 5,61 (CI 2,14-14,73) kod pacijenata s trombozom, a za pacijente s venskom trombozom, specifično, 6,0 (CI 2,3-16,1). Dakle, dokazano je da nositelji ne-O krvne grupe s mutacijom C677T imaju 2 puta veći rizik za razvoj tromboze od nositelja istog fenotipa bez mutacije C677T (Jukić i sur., 2009). No, kada su uspoređene zastupljenosti nositelja O-krvnih grupa pozitivnih na mutaciju C677T MTHFR-a sa zastupljenošću iste skupine krvnih grupa bez mutacije C677T nije pronađena statistički značajna razlika (Jukić i sur., 2009). Stoga je zaključeno da izolirana mutacija C677T MTHFR-a nije rizični čimbenik za razvoj tromboze u ispitivanoj skupini bolesnika, osim ako navedena mutacija nije združena s nekim drugim nasljednim ili nenasljednim čimbenikom (Jukić i sur., 2009). Dakle, ta studija iz 2009. godine je u korelaciji s ovim istraživanjem, uz značajnije manje slučajeva s PE-om među 60 pacijenata s VTE-om i ta je studija samo posredno istražila razinu rizika TT homozigota za C677T mutaciju te se primarno bazirala na analizu interakcije te mutacije s ABO genotipom krvne grupe (Jukić i sur., 2009).

2019. godine provedeno je još jedno ispitivanje učestalosti mutacija C677T i A1298C gena za MTHFR u hrvatskoj populaciji te njihova pojedinačna/kombinirana povezanost s trombotičkim rizikom za razvoj VTE-a na 152 bolesnika s dijagnozom VTE-a i kontrolnoj skupini od 101 dobrovoljnog davatelja krvi bez tromboemboličkih epizoda. Učestalosti genotipova MTHFR-a za mutacije C677T i A1298C, kao ni učestalosti alela nisu se statistički značajno razlikovale između skupine pacijenata i kontrolne skupine. Također, nije bilo statistički značajne razlike niti u zastupljenosti kombinacija genotipova MTHFR-a za C677T i

A1298C između promatranih skupina. U ovoj studiji je, dodatno, ispitana i prisutnost mutacije FVL-a u skupinama. Međutim, ni kombinacije mutacija u genu za MTHFR s FVL-om nisu utjecale na rizik od nastanka VTE-a (Kundid, 2019). Dakle, postoji očigledna koherentnost u ishodima ove retrospektivne studije i sadašnje studije.

U studiji koju su proveli Basol i sur. 2016. godine, u turskoj populaciji na 118 pacijenata ispitana je povezanost mutacija u genu za MTHFR s PE-om. Za C677T mutaciju nije bilo razlike u učestalosti genotipa između skupine pacijenata i kontrolne skupine, dok je razlika u frekvenciji mutiranog alela (T) bila statistički značajna. Za A1298C mutaciju nije dokazana korelacija s PE-om. Uz to, zaključeno je da nositelji kombinacije genotipova bez mutacija (CC i AA) imaju najmanji rizik od razvoja PE-a (Basol i sur., 2016).

Međutim, dvije godine kasnije, također u turskoj populaciji, Bezgin i sur. proveli su istraživanje koje je dalo potpuno suprotne rezultate, ali udio bolesnika s DVT-om bio je puno veći u odnosu na PE (Bezgin i sur., 2018). Studija je uključila 310 pacijenata (14 % pacijenata s DVT-om uz PE, 6 % s izoliranom dijagnozom PE-a, a ostatak samo DVT) i 289 kontrolnih ispitanika (bez CVD-a i VTE-a). Analizirano je ukupno 12 mutacija koje su prethodno svrstane u potencijalne rizične čimbenike VTE-a, među kojima i mutacije u genu za MTHFR, C677T i A1298C. Svim ispitanicima izmjerena je i serumska koncentracija homocistena te je prosječna koncentracija homocisteina bila gotovo jednaka u skupini pacijenata i kontrolnoj skupini ( $p=0,36$ ). Dakle, za razliku od prethodne studije u turskoj populaciji (uvjetno rečeno, jer je navedena skupina premali uzorak populacije), mutacija A1298C pokazala je značajno veću učestalost u skupini pacijenata s izoliranom dijagnozom PE ( $p=0,006$ ) nego što je učestalost te mutacije bila u svim ostalim skupinama (DVT skupina i kontrolna skupina), dok razlika u zastupljenosti C677T mutacije između pojedinih skupina nije bila statistički značajna (Bezgin i sur., 2018).

U kineskoj Han populaciji (224 pacijenta), 2017. godine dokazana je povezanost obje mutacije s rizikom od razvoja PE-a, posebice kod homozigota. OR (95% CI) za mutirane TT homozigote iznosi 1,71 (1,24–2,21), a za CC mutirane homozigote 1,58 (1,24–2,01). Slično kao i u prethodnoj studiji, dokazano je da gen-gen interakcija povećava rizik, kod nositelja mutiranih alela za oba polimorfizma, što nije dokazano u sadašnjoj studiji, a ni u istraživanju Kundid iz 2019 (Li i sur., 2017; Kundid, 2019).

Hosseini i sur. 2015. godine proveli su retrospektivnu studiju u iranskoj populaciji (uzorak od 182 pacijenta s DVT-om). Rezultati studije dokazali su statistički značajnu povezanost DVT-a i mutacija C677T i A1298C s omjerima izgleda uz 95 % CI od 6,0 (2,2–16,4) te 8,3 (4,4–15,8) (Hosseini i sur., 2015).

U rumunjskoj studiji mutacija C677T pokazala je pozitivnu korelaciju s rizikom od razvoja VTE-a. Odabrani su pacijenti (N=90) s idiopatskim oblikom VTE-a među kojima je 19 % bilo homozigota za navedenu mutaciju dok ih je u kontrolnoj skupini bilo zastupljeno samo 7 % (OR= 3,26, 95 %CI (1,14-9,31)). Za mutaciju A1298C nije dokazana povezanost s VTE-om (Hotoleanu i sur., 2013).

2018. godine, Lupi-Herrera i sur. na uzorku od 334 Meksikanca (od čega 212 oboljelih od tromboembolijske bolesti) dokazali su statistički značajnu razliku u učestalosti T alela (C677T mutacija) i razliku između učestalosti parova CC i TT te CT i TT. Također, kod pacijenata s dijagnozom PE-a utvrđena je statistički značajna zastupljenost homozigota (TT) u odnosu na homozigote bez mutacije (CC). Potvrđeno je i da mutirane homozigote gena za MTHFR prati povišenje koncentracije homocisteina u krvi (Lupi-Herrera i sur., 2018).

Studija provedena na 177 bolesnika s PE-om i 461 kontrolnim ispitanikom, u zapadno-sibirskoj populaciji, utvrdila je razliku samo kod TT genotipa C677T mutacije i to kod muškaraca i starijih od 45 godina. Razdioba ostalih alelnih varijanti kod pacijenata s PE-om nije se značajno razlikovala od kontrolne skupine (Karmadonova, 2015).

Ray i sur., proveli su meta analizu MTHFR C677T mutacije u razvoju VTE-a koja je obuhvatila 31 studiju objavljenu u razdoblju od 1990. do 2001. U zajedničkoj skupini pacijenata bio je 4901 slučaj VTE, a u kontrolnoj skupini 7886 zdravih ispitanika. Samo 4 od 31 studije zaključile su pozitivnu korelaciju. Prevalencija TT genotipa u skupini VTE-a bila je svega 14,3 %, dok je u kontrolnoj skupini bila 11,7 %. Uz 95 %-tni interval pouzdanosti dobiven je OR od 1,2 (CI 1,1–1,4), čime je potvrđena granična korelacija MTHFR mutacije i VTE-a (Ray i sur., 2002).

Simone i sur., proveli su 2013. meta analizu radova dostupnih u online bazama koji su objavljeni do 2010.godine, a obuhvatila je retrospektivne studije te kohortne studije na temu povezanosti FVL-a, mutacije protrombina G20210A i C677T mutacije gena za MTHFR s rizikom od VTE-a. Nakon isključenja radova koji se nisu uklapali u zadane kriterije autora, preostalo je analizirati rezultate 2501 pacijenta i 11409 kontrolnih ispitanika. Zaključili su da mutacija C677T ne pokazuje povezanost s rizikom od razvoja VTE-a, u odnosu na ostale 2 mutacije. Ispostavilo se da mutacija C677T ne doprinosi trombotičkom riziku niti u interakciji s druge dvije analizirane mutacije (Simone i sur., 2013).

Zhang i sur. proveli su meta analizu radova na istu temu kako bi se dobio pregled sumarne situacije u kineskoj populaciji. Uključene su 24 studije (2339 slučajeva VTE-a i 4048 kontrolnih ispitanika). Utvrđena je statistički značajna povezanost mutacije u svim genetskim modelima (T alel u usporedbi s C alelom, TT s CC, TT s CT, CT s CC) s razvojem VTE-a. Dakle, na



ispitanoj skupini bolesnika u kineskoj populaciji prisutnost mutiranog alela bilo u heterozigotnom ili homozigotnom genotipu povećava rizik od VTE-a (Zhang i sur., 2014).

Noviju meta analizu objavili su Kinezi, Zeng J. i Zeng Q., 2018. godine, a uključila je 99 studija dostupnih na online bazama radova. 97 studija istražilo je povezanost C677T mutacije s rizikom od VTE-a, a 19 studija bavilo se korelacijom A1298C mutacije s VTE-om. U meta studiji ispitano je 11 istraživanja PE. Suprotno meta analizi iz 2013. godine, zaključeno je da mutacija A1298C značajno korelira s rizikom od PE-a, dok je C677T mutacija predložena kao prediktivni biljeg za razvoj VTE-a, točnije i DVT-a i PE-a, kod bijele rase, istočnih i zapadnih Azijata (Zeng J i Zeng Q, 2018).

Istraživanje u poljskoj populaciji, sa 149 slučajeva VTE-a i 100 kontrolnih, analiziralo je zastupljenost mutacija FVL-a, protrombina G20210A te C677T i A1298C mutacija u genu za MTHFR. Pronađena je razlika u zastupljenosti VTE-a između spolova; veća prevalencija DVT-a i PE-a bila je kod muškaraca. FVL i protrombin G20210A potvrđeni su kao rizični čimbenici. Za mutacije u genu za MTHFR nije utvrđena rizičnost, za C677T OR 0,86 (95 % CI 0,3–2,6), za A1298C OR 0.66 (95 % CI 0,8–6,7). Osim toga, mjerili su i razinu homocisteina kod pacijenata i kontrolnih ispitanika. Koncentracije homocisteina bile su gotovo jednake u obje skupine (Nizankowska i sur., 2003).

Ellasal i sur. proveli su istraživanje, u Egiptu, koje je uključilo 31 pacijenta s dijagnozom PE-om. Važan kriterij uključivanja u studiju bio je da pacijent nema niti jedan poznati dokazani rizični čimbenik za razvoj VTE-a (kontracepcija, hormonska terapija, srčano zatajenje, karcinom, nedavni operativni postupak, produžena imobilizacija, starost). Iako je uzorak premali, na takvom uzorku pacijenata, s idiopatskim oblikom bolesti, može se relativno jasno, bez interferencije drugih rizičnih čimbenika, dokazati ili opovrgnuti korelacija ispitivanih mutacija s PE-om. Analiziran je tip oboljenja, u smislu težine slučaja VTE-a, prisutnosti DVT-a i PE, tromboza na različitim lokacijama u tijelu. Dokazano je da FVL korelira s težinom slučaja VTE-a (višestruke epizode DVT-a, uz PE, i prisutnost tromboze na drugim mjestima) i s rekurentnim oblikom VTE-a. 15 pacijenata (48 %) imalo je mutaciju C677T. Međutim, nije utvrđena značajna razlika u obliku VTE-a, rekurentnosti DVT-a i PE-a te u prisutnosti drugih tromboza između nositelja mutacije i pacijenata bez mutiranog alela. Iako, kod 13 pacijenata - nositelja dviju mutacija (od tri promatrane; FVL, mutacija C677T MTHFR-a i protrombin G20210A) dokazana je statistički značajna korelacija s težinom oblika VTE-a i incidencijom rekurentnog PE-a, što potvrđuje tezu interakcije između gena (Ellasal i sur., 2014). Međutim, nije navedeno koje mutacije su bile istovremeno prisutne kod pacijenata stoga se ne može zaključiti o relativnom doprinosu mutacije gena za MTHFR

riziku razvoja bolesti, a i uzorak od 13 ispitanika premlen je da bi se donio relevantan zaključak.

2018. godine provedena je studija u populaciji Kashmira (Indija), a uključila je 250 pacijenata s dijagnozom VTE-a i 250 zdravih kontrolnih ispitanika. Zastupljenost alela i genotipova C677T polimorfizma gena za MTHFR bila je gotovo jednaka u skupini pacijenata i kontrolnoj skupini. Statistički značajna povezanost mutacije s rizikom od razvoja VTE-a nije pronađena, no među njima je bilo samo 8 bolesnika s PE-om (Shafia i sur., 2018).

Najnovija meta analiza provedena je ove godine, a obuhvatila je 32 studije odabrane prema kriterijima kvalitete autora, od čega je 31 ispitivala rizičnost mutacije C677T, a 6 studija povezanost A1298C mutacije s razvojem VTE-a. Također, 15 studija uključilo je ispitanike azijskog porijekla, a 12 studija ispitanike bijele rase. Sumarni rezultati pokazali su statistički značajnu razliku, između bolesnika i kontrolnih ispitanika, u svim genetskim modelima za C677T mutaciju: CC+CT u usporedbi s TT: OR=0,68 (0,56, 0,83), CC s CT+TT: OR=0,82 (0,72, 0,94), CT s TT: OR=0,65 (0,52, 0,81), CC s TT: OR=0,73 (0,60, 0,89) i C s T: OR=0,80 (0,71, 0,90). Međutim, kada su ispitanike podijelili prema rasi u dvije podskupine, azijati i bijelci, dobiven je zanimljiv rezultat; kod bijele rase ipak nije dokazana značajna povezanost C677T mutacije s rizikom od bolesti. Dakle, još jednom je, u slučaju mutacija u genu za MTHFR i njihove korelacije s VTE-om, potvrđena mogućnost varijabilnosti rezultata istraživanja zbog različitog etničkog podrijetla populacija. Za A1298C mutaciju nije pronađena statistički značajna razlika ni u kojem genetskom modelu i neovisno o rasi ispitanika (Gao M i sur., 2020).

Iako su uzorci ispitanika većine studija, pa tako i ovog istraživanja napravljenog u okviru diplomskog rada, premali da bi se donio zaključak o cijeloj populaciji, sigurno je da sama razdioba mutacija u genu za MTHFR varira u različitim populacijama i ovisi o etničkom porijeklu ispitivane populacije (uzorka populacije). Prema tome, heterogenost rezultata istraživanja može se objasniti različitom razdiobom mutacija gena za MTHFR u općoj populaciji.

Za razliku od isključivo genetskih nasljednih čimbenika rizika za razvoj trombotičkih bolesti kao što su FVL i protrombin G20210A, složenija je situacija kod procjene istog rizika kod tzv. miješanih čimbenika kakve su ispitivane dvije mutacije gena za MTHFR na koje djeluju dodatni nenasljedni čimbenici (vitamini, metabolički produkti) (Reilly i sur., 2013). Jedno od ograničenja naše studije jest i to što ispitanicima nisu izmjerene koncentracije homocisteina, kao ni provjeren status relevantnih vitamina B (vitamin B12, B6, B2, folna kiselina). Podatak o koncentraciji homocisteina dao bi informaciju o učinku mutacije u genu za MTHFR na

aktivnost enzima, a uz status vitamina B ispitanika mogli bismo zaključiti što je uzrokovalo hiperhomocisteinemiju (smanjena aktivnost MTHFR-a ili nedostatne koncentracije vitamina B).

S obzirom na nekonzistentne rezultate dosad provedenih istraživanja i dalje ostaje nesuglasje po pitanju uloge genskih mutacija MTHFR-a i homocisteina u riziku od razvoja VTE-a (stoga i PE-a). Štoviše pojedinci tvrde da nema sigurnih dokaza čak niti o povezanosti hiperhomocisteinemije i kardiovaskularnog rizika te da je povišeni homocistein u izoliranim slučajevima prisutan kod pacijenata s CVD-om. Problem istraživanja povezanosti homocisteina s rizikom od razvoja CVD-a jest to što se koncentracija homocisteina uvijek mjeri tek nakon nastupa bolesti stoga se ne može utvrditi je li homocistein uopće uzrok ili posljedica bolesti (Athysos i sur., 2010; Santili i sur., 2016).

S druge strane, odnos homocisteina i vaskularnih bolesti ovisi i o nasljednim i o stečenim čimbenicima, kao što je prethodno opisano. Sam učinak mutacije u genu za MTHFR na koncentraciju homocisteina u krvi može se modificirati implementacijom folne kiseline (ili drugih vitamina B) kao dodatkom prehrani (Santili i sur., 2016).

Također, i dalje nije jasno smanjuje li se rizik od bolesti smanjenjem razine homocisteina, pretpostavljenog uzročnika patološkog procesa. Odgovor na to pitanje mogao bi objasniti neusklađenost rezultata istraživanja povezanosti MTHFR mutacija i tromboembolijskih bolesti. Ako MTHFR mutacija uzrokuje povećanje koncentracije homocisteina, koje pokreće patofiziološki temelj tromboembolijskih bolesti, uspostavlja li se ravnoteža i sprječava ponovni VTE događaj smanjenjem koncentracije homocisteina?

Studija „Heart Outcomes Prevention Evaluation“ (HOPE) istražila je reverzibilnost učinka povišene koncentracije homocisteina na razvoj CVD-a. Uključeno je 5522 pacijenta s CVD-om ili diabetesom melitusom te barem jednim rizičnim čimbenikom za vaskularne bolesti. Pacijenti su podijeljeni u dvije skupine; skupina koja je primala vitaminsku terapiju (vitamin B12, B6, folat) i placebo skupina, a studija je trajala 5 godina. Razina homocisteina u krvi smanjila se kod ispitanika koji su primali suplemente vitamina, dok je koncentracija homocisteina porasla kod ispitanika s placebo. Međutim, incidencija VTE događaja kroz 5 godina trajanja studije bila je jednaka u obje skupine. Dakle, smanjenje razine homocisteina u krvi folnom kiselinom te vitaminima B12 i B6 nije reduciralo rizik od DVT-a ili PE-a, odnosno nije bilo stvarnog benefita od takve terapije (Athysos i sur., 2010).

VTE, pa tako i PE, bolest je široko zastupljena u populacijama svih rasa i etničkih pripadnosti te je rastući problem javnog zdravstva. Posljedica je složenog patofiziološkog procesa u koji su kumulativnim djelovanjem uključeni brojni čimbenici. Iako su nenasljedni – stečeni

čimbenici rizika najčešći okidač razvoja bolesti, koja u obliku PE nastupa naglo i vrlo često završava smrtnim ishodom, nasljedni čimbenici ipak čine glavnu predispoziciju koja se ne smije zanemariti. Aktivnost znanstvene zajednice i istraživanja potrebna su kako bi se omogućila prevencija, pravovremeno liječenje i smanjili morbiditet i mortalitet bolesti.

U slučaju mutacija u genu za MTHFR i njihove uloge u razvoju VTE-a, stoga i PE-a, potrebno je, također, nastaviti istraživati. Sljedeći korak trebala bi biti opsežna studija koja bi uključila velik (puno veći) broj ispitanika. Uz analizu dviju mutacija, C677T i A1298C, u obzir treba uzeti i prisutnost drugih čimbenika rizika te detaljno ispitati njihove interakcije. Važno je odrediti razinu homocisteina te modulatora koncentracije tog potencijalno štetnog metabolita kako bi se utvrdilo u kojoj mjeri sama mutacija utječe na njegov metabolizam i koncentraciju.

Konačno, uzevši u obzir sve navedeno, treba prosuditi i odgovoriti na pitanje gdje se na ljestvici važnosti, tj. snage učinka nalaze mutacije gena za MTHFR u razvoju patologije VTE-a te je li i u kojim kliničkim slučajevima potrebno i opravdano ispitati njihovu prisutnost.

## 6. Zaključci

- Cilj ovog istraživanja bio je ispitati povezanost dviju mutacija u genu za MTHFR s rizikom od razvoja PE na uzorku hrvatske populacije istraživanjem 110 pacijenata s dijagnozom PE-a te 101 ispitanika iz kontrolne skupine. Rezultati statističkih testova pokazali su da ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti mutacija C677T ( $\chi^2=0,17$ ;  $p=0,921$ ) i A1298C ( $\chi^2=0,19$ ;  $p=0,909$ ) između dviju skupina ispitanika, što znači da na ispitanom uzorku mutacije u genu za MTHFR ne predstavljaju rizični čimbenik za razvoj PE.
- Utvrđena razlika između pojavnosti mutiranog alela između bolesnika i kontrolnih ispitanika, za C677T bila je 2 % ( $p=0,77$ ), bez statističke značajnosti. Za mutaciju A1298C nije dokazana nikakva razlika između ispitivanih skupina (0 %,  $p=1$ ).
- Zastupljenosti pojedinih genotipova MTHFR-a za obje mutacije, prema spolu pokazale su da ne postoji statistički značajna razlika između skupine bolesnika i kontrolne skupine, za C677T ( $\chi^2=3,61$ ;  $p=0,165$ ) te za A1298C ( $\chi^2=1,32$ ;  $p=0,217$ ).
- Usporedbom kombinacija genotipova mutacija C677T i A1298C ispitanika, najveće razlike između promatranih skupina dobivene su za kombinaciju CC, AA (3,6 %) te CC, CC (1,8 %). Međutim, test razlike proporcija potvrdio je da navedene razlike nisu statistički značajne ( $p=0,514$  i  $p=0,687$ ).
- Rezultati naše studije u skladu su s brojnim europskim istraživanjima koja nisu pokazala povećani rizik razvoja plućne embolije uslijed mutacija C677T i A1298C u genu za MTHFR.
- S obzirom da su MTHFR mutacije miješani čimbenici rizika za razvoj VTE-a, potrebna su dodatna ispitivanja homocisteina kao i folata i vitamina B12, uključenih u metabolički put.
- Nepobitna činjenica jest da mutacije u genu za MTHFR, u određenim uvjetima, posrednim učinkom mogu doprinijeti razvoju PE-a. U sljedećim istraživanjima trebalo bi analizirati mutacije C677T i A1298C u kontekstu šire slike, uz više genetskih čimbenika, te na temelju toga stratificirati rizik od plućne embolije.

Posljedica navedenih mutacija C677T i A1298C jest, u određenoj mjeri, smanjena aktivnost MTHFR-a uključenog u metabolizam homocisteina, štetnog nusprodukta metilacijskih reakcija u kojima sudjeluje AdoMet, najznačajniji stanični donor metilne skupine. Međutim,

kontroverznost homocisteina kao rizičnog čimbenika tromboembolijskih bolesti, s jedne strane, proizlazi iz kompleksnosti njegovog metabolizma stoga prisutnost mutacija ne mora nužno imati za posljedicu hiperhomocisteinemiju koja će uvjetno potaknuti kaskadu bolesti. Nedostatna aktivnost MTHFR-a može se kompenzirati drugim metaboličkim putevima razgradnje homocisteina ili pak dovoljnim unosom nutrijenata potrebnih za funkciju remetilacijskog puta metabolizma, folata i vitamina B12.

Dakle, uz određivanje genotipa MTHFR-a, u budućim istraživanjima, poželjno je odrediti i koncentraciju samog homocisteina te folata i drugih vitamina B kako bi se dobio realan status tog metabolita u organizmu.

S druge strane, sama patofiziologija tromboembolijskih bolesti je vrlo složena. Razvoj VTE-a, DVT-a i PE-a, kod svakog pacijenta posljedica je svojstvenog kumulativnog učinka više različitih čimbenika rizika, a vjerojatnost da samo jedan, bilo nasljedni ili nenasljedni, čimbenik rizika uzrokuje nastanak bolesti, vrlo mala. Stoga i ne čudi da su dosadašnja istraživanja na temu mutacija u genu za MTHFR i tromboembolijskih bolesti ishodila nekonzistentne rezultate, jer su ispitivane mutacije samo jedan „kotačić“ u cjelokupnom mehanizmu razvoja bolesti.

## 7. Literatura

- Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Homocysteine: An Emerging Cardiovascular Risk Factor that Never Really Made it. *The Open Clinical Chemistry Journal*, 2010, 3, 19-24.
- Basol N, Karakus N, Savas AY, Kaya I, Karakus K, Yigit S. The importance of MTHFR C677T/A1298C combined polymorphisms in pulmonary embolism in Turkish population. *Medicina vol. 52*, 2016, 3, 5-40.
- Beckman MG, Hooper WC, Critchley SE, Ortel TL. Venous Thromboembolism, A Public Health Concern. *American Journal of Preventive Medicine*, 2010, 38, 495-501.
- Bezgin T, Kaymaz C, Akbal Ö, Fatih Yılmaz F, Tokgöz HC, Özdemir N. Thrombophilic Gene Mutations in Relation to Different Manifestations of Venous Thromboembolism: A Single Tertiary Center Study. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 2018, 24, 100-106.
- Crous-Bou M, Harrington LB, Kabrhel C. Environmental and genetic risk factors associated with venous thromboembolism. *Seminars in Thrombosis Hemostasis*, 2016, 42, 808–820.
- Ducker GS, Rabinowitz JD. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metabolism*, 2017, 25, 27-42.
- Davidson S. Respiratory disease. U: Davidson's Principles and Practice of Medicine. P.T. Reid, J.A. Innes, urednici, Edinburgh, Elsevier, 2010, str. 641.-730.
- Development of TaqMan allelic discrimination based genotyping of large DNA deletions, 2012., <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0888754312000043>, pristupljeno 10.8.2020.
- Đogić V. Radna uputa „Rad na uređaju AB 7500 real-time PCR System“ (RU-OMD-025). Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Odjel za molekularnu dijagnostiku, Zagreb, 2018.
- Đogić V. Radna uputa „Real-time PCR metoda za genetičke biljege trombofilije“ (RU-OMD-026). Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Odjel za molekularnu dijagnostiku, Zagreb, 2016.
- Ellasal G, Hamel H, Elgamal R. Study of some genetic predisposition in pulmonary embolism. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis*, 2014, 63, 1039-1046.
- Frost P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Shepard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics*, 1995, 10, 111-113.

Gamulin S, Marušić M, Kovač Z i suradnici. Patofiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2005, str. 799-801.

Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms by 5' Nuclease Allelic Discrimination, 2014., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3887036/>, pristupljeno 10.8.2020.

Goldhaber SZ. Risk Factors for Venous Thromboembolism. *Journal of the American College of Cardiology*, 2010, 56, 1-7.

Hosseini S, Kalantar E, Hosseini MS, Tabibian S, Shamsizadeh M, Dorgalaleh A. Genetic risk factors in patients with deep venous thrombosis, a retrospective case control study on Iranian population. *Thrombosis Journal*, 2015, 13-35.

Hotoleanu C, Trifa A, Popp R, Fodor D. The Importance of Homozygous Polymorphisms of Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene in Romanian Patients with Idiopathic Venous Thromboembolism. *Balkan Medical Journal*, 2013, 30, 197-203.

Jukić I, Bingulac-Popović J, Đogić V, Babić I, Culej J, Tomičić M, Vuk T, Šarlija D, Balijsa M. ABO Blood Groups and Genetic Risk Factors for Thrombosis i Croatian Population. *Clinical Science*, 2009, 50, 550-558.

Kang S, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase: An Inherited Risk Factor for Coronary Artery Disease. *American Journal of Human Genetics*, 1991, 48, 536-545.

Karmadonova NA, Shilova AN, Kozyreva VS, Subbotovskaya AI, Klevanets JE, Karpenko AA. Association of folate metabolism gene polymorphisms and pulmonary embolism: A case-control study of West-Siberian population. *Thrombosis Research*, 2015, 135, 788-795.

Kreidy R. Influence of Acquired and Genetic Risk Factors on the Prevention, Management, and Treatment of Thromboembolic Disease. *International Journal of Vascular Medicine*, 2014,1- 5.

Kundid R. (2019) *Utjecaj kombinacije MTHFR mutacija C677T i A1298C na trombotički rizik u nastanku venskih tromboembolija*. Diplomski rad. Osijek: Sveučilište u Osijeku, Medicinski fakultet.

Kundid R. Radna uputa „QIACube izolacija nukleinskih kiselina“ (RU-OMD-033). Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Odjel za molekularnu dijagnostiku, Zagreb, 2018.

Leniček-Krleža J, Jakovljević G, Bronić A, Herak DC, Bonevski A, Stepan-Giljević J, Roić G. Contraception-Related Deep Venous Thrombosis and Pulmonary Embolism in a 17-Year-Old Girl Heterozygous for Factor V Leiden, Prothrombin G20210A Mutation, MTHFR C677T and Homozygous for PAI-1 Mutation: Report of a Family with Multiple Genetic Risk



Factors and Review of the Literature. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 2009,10, 37, 24-29.

Liew SC i Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. *European Journal of Medical Genetics*, 2015, 58, 1-10.

Lucock M. Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention? *The BMJ*, 2004, 328, 211–214.

Li X, Weng L, Han B, Dai Y, Cha L, Yan S, Jin E. Association of folate metabolism gene polymorphisms and haplotype combination with pulmonary embolism risk in Chinese Han population. *Mammalian Genome*, 2017.

Lupi-Herrera E, Elena M, Lopez S, de Jesus Lugo-Dimas A, Nunez-Martinez ME, Gamboa R, Huesca-Gomez C, Sierra-Galan LM, Guarner-Lans V. Polymorphisms C677T and A1298C of MTHFR Gene: Homocysteine Levels and Prothrombotic Biomarkers in Coronary and Pulmonary Thromboembolic Disease. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 2018, 25, 1-8.

Miao i sur. Meta-analysis of the relationship between methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and venous thromboembolism in the Caucasian and Asian. *Bioscience Reports*, 2020, 40.

Moll S i Varga EA. Homocysteine and MTHFR Mutations. *Circulation*, 2015,132, 6-9.

Nizankowska-Mogilnicka E, Adamek L, Grzanka P, Domagala TB, M. Sanak, Krzanowski M, Szczeklik A. Genetic polymorphisms associated with acute pulmonary embolism and deep venous thrombosis. *European Respiratory Journal*, 2003, 21, 25–30.

Ray JG, Shmorgun D, Chan WS. Common C677T Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and the Risk of Venous Thromboembolism: Meta-Analysis of 31 Studies. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 2002, 32, 51–58.

Reilly R, McNulty H, Pentieva K, Strain JJ, Ward M. MTHFR 677TT genotype and disease risk: is there a modulating role for B-vitamins? *Proceedings of the Nutrition Society*, 2014, 73, 47–56.

Rosendaal FR i Reitsma PH. Genetics of venous thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2009, 7, 301–304.

Santilli F, Davì G, Patrono C. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase, folate status and atherothrombosis: A mechanistic and clinical perspective. *Vascular Pharmacology*, 2016, 78, 1-9.

Selhub. Homocysteine Metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 1999, 19, 217–546.

Shafia S, Zargara MH, Khana N, Ahmada R, Shahb ZA, Asimic R. High prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20101A mutations in Kashmiri patients with venous thromboembolism. *Gene*, 2018, 654, 1-9.

Simone B, De Stefano V, Leoncini E, Zacho J, Martinelli I, Emmerich J, Rossi E, Folsom AR, Almawi WY, Scarabin PY, den Heijer M, Cushman M, Penco S, Vaya A, Angchaisuksiri P, Okumus G, Gemmati D, Cima S, Akar N, Oguzulgen KI, Ducros V, Lichy C, Fernandez-Miranda C, Szczeklik A, Nieto JA, Torres JD, Le Cam-Duchez V, Ivanov P, Cantu C, Shmeleva VM, Stegnar M, Ogunyemi D, Eid SS, Nicolotti N, De Feo E, Ricciardi W, Boccia S. Risk of venous thromboembolism associated with single and combined effects of Factor V Leiden, Prothrombin 20210A and Methylenetetrahydrofolate reductase C677T: a meta-analysis involving over 11,000 cases and 21,000 controls. *European Journal of Epidemiology*, 2013, 28, 621–647.

Srivastava S. Understanding Genetic Variations as Risk Factors for Development Venous Thrombo-Embolic (VTE). *Advances in Genetic Engineering and Biotechnology*, 2016, 5, 2.

Šimundić AM. Vrste istraživanja. Izbor statističkog testa. U: Osnove biostatistike u svakodnevnoj praksi. Šimundić AM, urednica, Zagreb, Hrvatska komora medicinskih biokemičara, Medicinska naklada, 2008., str. 14-21.

Trimmer EE. Methylenetetrahydrofolate Reductase: Biochemical Characterization and Medical Significance. *Current Pharmaceutical Design*, 2013, 19, 2574-2593.

Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A Second Genetic Polymorphism in Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Associated with Decreased Enzyme Activity. *Molecular Genetics and Metabolism*, 1998, 64, 169-172.

Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Redlund M, Stoll C, Alembik Y, B Dott B, Czeizel AE, Gelman-Kohan Z, Scarano G, Bianca S, Ettore G, Tenconi R, Bellato S, Scala I, Mutchinick OM, López MA, de Walle H, R Hofstra R, L Joutchenko L, Kavteladze L, Bermejo E, Martínez-Frías ML, Gallagher M, Erickson JD, Vollset SE, Mastroiacovo P, Andria G, Botto LD. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *Journal of Medical Genetics*, 2003, 40, 619-625.

Wolberg AS, Rosendaal FR, Weitz JI, Jaffer IH, Agnelli G, Baglin T, Mackman N. Venous thrombosis. *Nature Reviews*, 2015, 1, 1-17.

Zappacosta B, Graziano M, Persichilli S, Di Castelnuovo A, Mastroiacovo P, Iacoviello L. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms:

genotype frequency and association with homocysteine and folate levels in middle-southern Italian adults. *Cell Biochemistry and Function*, 2014, 32, 1-4.

Zeng J i Zeng Q. Correlations between methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and venous thromboembolism: A meta-analysis of 99 genetic association studies. *European Journal of Preventive Cardiology*, 2018, 1-15.

Zhang P, Gao X, Zhang Y, Hu Y, Ma H, Wang W, Wang H, Zhang J, Xu H, Lu Z. Association Between MTHFR C677T Polymorphism and Venous Thromboembolism Risk in the Chinese Population. *Angiology*, 2015, 66, 422-432.

## 8. Sažetak/Summary

Mutacije u genu za metilentetrahidrofolat-reduktazu (MTHFR), C677T i A1298C, uzrokuju smanjenu funkcionalnost i aktivnost MTHFR-a, što zbog nakupljanja metaboličkog nusprodukta homocisteina u stanicama uzrokuje stanje oksidativnog stresa i pokreće niz patoloških procesa koji dovode do hiperkoagulabilnog stanja. Dosadašnja istraživanja mutacija u genu za MTHFR i homocisteina, u ulozi rizičnog čimbenika venskih tromboembolijskih bolesti, kao što je plućna embolija (PE), ishodila su neusklađene rezultate zbog interakcije velikog broja uključenih činitelja. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati povezanost dviju mutacija u genu za MTHFR s rizikom od razvoja PE-a na uzorku hrvatske populacije. U studiju istraživanja parova uključeno je 110 pacijenata s dijagnozom PE-a te 101 dobrovoljni davatelj krvi koji čine kontrolnu skupinu. Izolacija genomske DNA iz uzorka pune krvi učinjena je pomoću komercijalnog kompleta reagencija QIAamp DNA Blood mini QIAcube kit na uređaju QIAcube (Qiagen, Njemačka). Za genotipizaciju mutacija MTHFR-a, C677T i A1298C, metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu korišten je uređaj ABI Prism 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, SAD). Dobiveni rezultati analizirani su  $\chi^2$ -testom i testom razlika proporcija uz 95 % intervale pouzdanosti (CI) i razinu statističke značajnosti od 0,05 (p-vrijednost). Usporedbom zastupljenosti pojedinih genotipova MTHFR-a za C677T nije dobivena statistički značajna razlika između skupine pacijenata s PE-om i kontrolne skupine ( $\chi^2= 0,17$ ;  $p=0,921$ ), kao ni za mutaciju A1298C ( $\chi^2= 0,19$ ;  $p=0,909$ ). Također, ni učestalosti mutiranog alela nisu se statistički značajno razlikovale kod bolesnika i kontrolnih ispitanika. Usporedbom kombinacija genotipova C677T i A1298C ispitanika između skupina, najveće razlike dobivene su za kombinacije CC, AA (3,6 %) te CC, CC (1,8 %). Međutim, test razlike proporcija potvrdio je da navedene razlike nisu statistički značajne ( $p= 0,514$ ;  $p=0,687$ ). Rezultati ove studije pokazali su da na ispitanom uzorku hrvatske populacije, mutacije u genu za MTHFR: C677T i A1298C, ne predstavljaju rizični čimbenik za razvoj plućne embolije.

MTHFR gene mutations, C677T and A1298C, reduce enzyme activity and decrease its function which leads to the accumulation of potentially toxic metabolite homocysteine. The consequence is increased oxidative stress and other pathological processes that provide the state of hipercoagulability. Recent studies on mutations in MTHFR gene and homocysteine in a role of risk factor for venous thromboembolic disorders, including pulmonary embolism, have reported inconsistent results because of interaction of numerous factors. The aim of this study was to examine relationship between two mutations in the MTHFR gene and the risk of pulmonary embolism. This case-control study has included 110 patients with pulmonary embolism and 101 healthy controls (blood donors). Genome DNA from whole blood samples was isolated via commercial kit, QIAamp DNA Blood mini QIAcube kit on QIAcube device (Qiagen, Germany). The genotyping of MTHFR mutations C677T and A1298C was performed using real time polymerase chain reaction on the analyzer ABI Prism 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, USA). Data was tested using statistical methods,  $\chi^2$ -test and comparison of proportions, with confidence intervals of 95 % and the value of statistical significance of 0,05 (p-value). There was no statistically significant difference in presence of the MTHFR C677T genotypes among patients with PE and controls ( $\chi^2= 0,17$ ;  $p=0,921$ ). Same results have been observed for the A1298C mutation ( $\chi^2= 0,19$ ;  $p=0,909$ ). The data regarding the frequency of mutated allele in PE group and control group also showed no significant association with PE. When the combinations of MTHFR C677T and A1298C genotypes were compared, greatest differences between groups have been reported for CC, AA (3,6 %) and CC, CC (1,8 %) combinations. Even though, there was no statistically significant difference between frequencies of the two groups ( $p= 0,514$ ;  $p=0,687$ ). The results of this study demonstrated that MTHFR mutations: C677T and A1298C, does not represent a risk factor for the development of pulmonary embolism.

## **9. Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Povezanost mutacija C677T i A1298C gena za metilentetrahidrofolat-reduktazu s rizikom od plućne embolije

Monika Kolundžić

#### SAŽETAK

Mutacije u genu za metilentetrahidrofolat-reduktazu (MTHFR), C677T i A1298C, uzrokuju smanjenu funkcionalnost i aktivnost MTHFR-a, što zbog nakupljanja metaboličkog nusprodukta homocisteina u stanicama uzrokuje stanje oksidativnog stresa i pokreće niz patoloških procesa koji dovode do hiperkoagulabilnog stanja. Dosadašnja istraživanja mutacija u genu za MTHFR i homocisteina, u ulozi rizičnog čimbenika venskih tromboembolijskih bolesti, kao što je plućna embolija (PE), ishodila su neusklađene rezultate zbog interakcije velikog broja obuhvaćenih činitelja. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati povezanost dviju mutacija u genu za MTHFR s rizikom od razvoja PE-a na uzorku hrvatske populacije. U studiju istraživanja parova uključeno je 110 pacijenata s dijagnozom PE-a te 101 dobrovoljni davatelj krvi koji čine kontrolnu skupinu. Izolacija genomske DNA iz uzorka pune krvi učinjena je pomoću komercijalnog kompleta reagencija QIAamp DNA Blood mini QIAcube kit na uređaju QIAcube (Qiagen, Njemačka). Za genotipizaciju mutacija MTHFR-a, C677T i A1298C, metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu korišten je uređaj ABI Prism 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, SAD). Dobiveni rezultati analizirani su  $\chi^2$ -testom i testom razlika proporcija uz 95 % intervale pouzdanosti (CI) i razinu statističke značajnosti od 0,05 (p-vrijednost). Usporedbom zastupljenosti pojedinih genotipova MTHFR-a za C677T nije dobivena statistički značajna razlika između skupine pacijenata s PE-om i kontrolne skupine ( $\chi^2=0,17$ ;  $p=0,921$ ), kao ni za mutaciju A1298C ( $\chi^2=0,19$ ;  $p=0,909$ ). Također, ni učestalosti mutiranog alela nisu se statistički značajno razlikovale kod bolesnika i kontrolnih ispitanika. Usporedbom kombinacija genotipova C677T i A1298C ispitanika između skupina, najveće razlike dobivene su za kombinacije CC, AA (3,6 %) te CC, CC (1,8 %). Međutim, test razlike proporcija potvrdio je da navedene razlike nisu statistički značajne ( $p=0,514$ ;  $p=0,687$ ). Rezultati ove studije pokazali su da na ispitanom uzorku hrvatske populacije, mutacije u genu za MTHFR: C677T i A1298C, ne predstavljaju rizični čimbenik za razvoj plućne embolije.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 49 stranica, 6 grafičkih prikaza, 10 tablica i 47 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: MTHFR, homocistein, mutacija, C677T, A1298C, plućna embolija, PCR u stvarnome vremenu

Mentorice: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr.sc. Jasna Bingulac-Popović**, znanstvena savjetnica, Hrvatski zavod z transfuzijsku medicinu

Ocjenjivači: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Jasna Bingulac-Popović**, znanstvena savjetnica, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu

**Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2020.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Department of Medical Biochemistry and Hematology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Correlation of C677T and A1298C MTHFR mutations and the risk of pulmonary embolism

Monika Kolundžić

#### SUMMARY

MTHFR gene mutations, C677T and A1298C, reduce enzyme activity and decrease its function which leads to the accumulation of potentially toxic metabolite homocysteine. The consequence is increased oxidative stress and other pathological processes that provide the state of hipercoagulability. Recent studies on mutations in MTHFR gene and homocysteine in a role of risk factor for venous thromboembolic disorders, including pulmonary embolism, have reported inconsistent results because of interaction of numerous factors. The aim of this study was to examine relationship between two mutations in the MTHFR gene and the risk of pulmonary embolism. This case-control study has included 110 patients with pulmonary embolism and 101 healthy controls (blood donors). Genome DNA from whole blood samples was isolated via commercial kit, QIAamp DNA Blood mini QIAcube kit on QIAcube device (Qiagen, Germany). The genotyping of MTHFR mutations C677T and A1298C was performed using real time polymerase chain reaction on the analyzer ABI Prism 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, USA). Data was tested using statistical methods,  $\chi^2$ -test and comparison of proportions, with confidence intervals of 95 % and the value of statistical significance of 0,05 (p-value). There was no statistically significant difference in presence of the MTHFR C677T genotypes among patients with PE and controls ( $\chi^2= 0,17$ ;  $p=0,921$ ). Same results have been observed for the A1298C mutation ( $\chi^2= 0,19$ ;  $p=0,909$ ). The data regarding the frequency of mutated allele in PE group and control group also showed no significant association with PE. When the combinations of MTHFR C677T and A1298C genotypes were compared, greatest differences between groups have been reported for CC, AA (3,6 %) and CC, CC (1,8 %) combinations. Even though, there was no statistically significant difference between frequencies of the two groups ( $p= 0,514$ ;  $p=0,687$ ). The results of this study demonstrated that MTHFR mutations: C677T and A1298C, does not represent a risk factor for the development of pulmonary embolism.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 49 pages, 6 figures, 10 tables and 47 references. Original is in Croatian language.

Keywords: MTHFR, homocysteine, mutation, C677T, A1298C, pulmonary embolism, real-time PCR

Mentors: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry,  
**Jasna Bingulac-Popović, Ph.D.** *scientific advisor*, Croatian Institute of Transfusion Medicine

Reviewers: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Jasna Bingulac-Popović, Ph.D.** *Scientific Advisor*, Croatian Institute of Transfusion Medicine

**Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.