

Ispitivanje pojavnosti mutacija C677T i A1298C u genu za metilentetrahidrofolat-reduktazu u osoba oboljelih od psihičkih bolesti

Benjak, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:163:489894>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Kristina Benjak

**Ispitivanje pojavnosti mutacija C677T i A1298C
u genu za metilentetrahidrofolat-reduktazu u
osoba oboljelih od psihičkih bolesti**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, godina 2019.

Ovaj je diplomski rad prijavljen na predmetu Biokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu pod stručnim vodstvom **dr. sc. Jasne Bingulac-Popović** i voditeljstvom **prof. dr. sc. Karmele Barišić**.

Zahvaljujem **prof. dr. sc. Karmeli Barišić** na mentorstvu, suradnji i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem svojoj komentorici, **dr. sc. Jasni Bingulac-Popović** na dobivenoj prilici za izradu ovog rada kao i na velikom angažmanu tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem **mr. sc. Ani Hećimović** na vremenu i znanju uloženom oko statističke analize rezultata, svim djelatnicima **Odjela za molekularnu dijagnostiku** na nesebičnoj pomoći i ugodnom društvu, a posebno **Višnjici** i **Arijani** na pomoći, savjetima i strpljenju tijekom izvedbe praktičnog dijela rada.

Najveću zahvalnost dugujem svojim brižnim i fleksibilnim roditeljima. Mami koja je naučila imena mojih kolega i kolegija, i tati koji se trudio. Reda radi zahvaljujem se i svom mlađem bratu koji još uvijek misli da studiram na PMF-u...

Hvala mojim prijateljima koji su zadnjih pet godina učinili podnošljivima, najviše onima koji su sa mnom još od osnovnoškolskih dana. Posebno hvala Niki na svim šaljivim, a poučnim prezentacijama, napisanim skriptama, edukativnim videićima i računalnim vještinama koje je podijelila sa mnom, na akrostihovima i ostalim kulturno uzdizujućim sadržajima. Hvala mojim kolegama s faksa na ugodnim druženjima u labosima i neugodnim druženjima na ispitima. Također bih se zahvalila i svim propalim ljubavima zbog kojih sam imala vremena za učenje.

What happens in laminar flow stays in laminar flow.

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Psihičke bolesti.....	1
1.1.1. Klasifikacija psihičkih bolesti.....	1
1.1.2. Shizofrenija.....	4
1.1.2.1. Etiologija shizofrenije.....	4
1.1.2.2. Patofiziologija shizofrenije.....	4
1.1.2.3. Klinička slika, simptomi shizofrenije i dijagnostički postupci.....	4
1.1.3. Poremećaji raspoloženja.....	5
1.1.3.1. Etiologija poremećaja raspoloženja.....	6
1.1.3.2. Patofiziologija poremećaja raspoloženja.....	6
1.1.3.3. Klinička slika, simptomi poremećaja raspoloženja i dijagnostički postupci	6
1.1.4. Poremećaji ličnosti.....	7
1.1.4.1. Etiologija poremećaja ličnosti.....	7
1.1.4.2. Patofiziologija poremećaja ličnosti.....	7
1.1.4.3. Klinička slika, simptomi poremećaja ličnosti i dijagnostički postupci...7	
1.1.5. Bolest ovisnosti.....	8
1.1.5.1. Etiologija bolesti ovisnosti.....	8
1.1.5.2. Patofiziologija bolesti ovisnosti.....	8
1.1.5.3. Klinička slika, simptomi bolesti ovisnosti i dijagnostički postupci.....8	
1.1.6. Liječenje psihičkih bolesti.....	9
1.2. Metilentetrahidrofolat-reduktaza (MTHFR).....	11
1.2.1. Polimorfizmi i mutacije gena za MTHFR.....	13
1.2.2. Polimorfizmi gena za MTHFR i psihičke bolesti.....	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	14
3. MATERIJALI I METODE.....	16
3.1. Ispitanici.....	16
3.2. Izolacija genomske DNA na uređaju QIAcube.....	16
3.2.1. Postupak automatizirane izolacije DNA.....	17
3.2.2. Reagensi za izolaciju DNA.....	18
3.3. Genotipizacija mutacija C677T i A1298C gena za MTHFR pomoću metode real-time PCR (RT-PCR) – lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu.....	18
3.3.1. Alelna diskriminacija.....	19

3.3.2. Reagensi za izvođenje RT-PCR metode.....	21
3.3.3. Postupak pripreme RT-PCR reakcijske smjese.....	21
3.3.4. Program za real-time umnožavanje mutacija u genu za MTHFR.....	22
3.4. Statističke metode.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	23
4.1. Demografska struktura ispitanika.....	23
4.2. Statistička obrada rezultata.....	25
4.2.1. Učestalost pojedinih genotipova mutacije C677T u genu za MTHFR.....	25
4.2.2. Učestalost pojedinih genotipova mutacije A1298C u genu za MTHFR.....	26
4.3. Rasprava	28
5. ZAKLJUČCI.....	32
6. LITERATURA.....	33
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	37/38
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Psihičke bolesti

Mentalno i duševno zdravlje sastavni je dio općeg zdravlja. Mentalni poremećaji izazivaju veliku subjektivnu patnju bolesnika, smanjuju kvalitetu života oboljelih i njihove okoline (Silobrčić Radić i sur., 2004). Prevalencija mentalnih poremećaja u svijetu je 22,1 % (Charlson i sur., 2019). Etiologija psihičkih bolesti nije razjašnjena, smatra se da je riječ o kombinaciji genskih i okolišnih čimbenika te stresa (Cheffer i sur., 2018).

Mentalni poremećaji definiraju se prema postojanju skupova simptoma, a kriteriji za dijagnozu ispunjeni su kada su skupovi simptoma relativno teški, dugotrajni i popraćeni smanjenjem funkcionalne sposobnosti ili invaliditetom. Zbrinjavanje bolesnika s mentalnim poremećajima dovodi do izravnoga ekonomskog opterećenja društva, a i neizravnog zbog smanjene produktivnosti, bolovanja i invalidnosti oboljelih (Silobrčić Radić i sur., 2004).

Osobe s mentalnim zdravstvenim problemima imaju povećani morbiditet i mortalitet u odnosu na bolesnike s tjelesnim bolestima. Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) za ukupno opterećenje bolestima (DALYs) za Hrvatsku, mentalni poremećaji i poremećaji ponašanja na 3. su mjestu vodećih skupina, iza kardiovaskularnih i malignih bolesti, s udjelom od 11,7 %. Daleko najveći postotak opterećenja otpada na unipolarne depresivne poremećaje (43,1 %), slijede poremećaji uzrokovani alkoholom (18,7 %) i anksiozni poremećaji (13,7 %). Skupina mentalnih poremećaja prema broju hospitalizacija sudjeluje s oko 7 % u ukupnom bolničkom pobolu u Hrvatskoj. Najveći broj hospitalizacija za bolesnike s psihičkim bolestima je u dobi od 20 do 59 godina. Mentalni poremećaji su i vodeća skupina po korištenju dana bolničkog liječenja s udjelom od 20-25 % (www.hzjz.hr).

1.1.2. Klasifikacija psihičkih bolesti

Prema Međunarodnoj klasifikaciji bolesti i srodnih zdravstvenih problema, X revizija, Svjetske zdravstvene organizacije (MKB-10), mentalni poremećaji i poremećaji ponašanja (F00-F99) podijeljeni su u skupine: organski mentalni poremećaji uključujući simptomatske

poremećaje; mentalni poremećaji i poremećaji ponašanja uzrokovani uzimanjem psihoaktivnih tvari; shizofrenija, shizotipni i sumanutni poremećaji; poremećaji raspoloženja; neurotički poremećaji, poremećaji vezani uz stres i somatoformni poremećaji; bihevioralni sindromi vezani uz fiziološke poremećaje i fizičke čimbenike; poremećaji ličnosti i ponašanja odraslih; mentalna retardacija; poremećaji psihološkog razvoja; poremećaji u ponašanju i osjećajima koji se pojavljuju u djetinjstvu i u adolescenciji; nespecificiran mentalni poremećaj (Silobrčić Radić i sur., 2004).

Kategorije od F20 do F29 obuhvaćaju shizofreniju i srodne poremećaje. Svaka skupina ovisno o simptomima koji se javljaju sadrži i nekoliko podskupina (www.apps.who.int). Poremećaji raspoloženja označeni su kategorijama od F30 do F39. Svaka epizoda bolesti definira se s obzirom na težinu kao blaga, umjereno teška, teška bez psihotičnih elemenata i teška sa psihotičnim elementima (Begić i sur., 2015). Poremećaji ličnosti obuhvaćaju kategorije od F60 do F69. Oni mogu biti paranoidni, shizoidni, asocijalni, emocionalno nestabilni, histrionični, anankastični, anksiozni i ovisni. Mentalni poremećaji i poremećaji ponašanja uzrokovani uzimanjem psihoaktivnih tvari svrstani su u kategorije od F10 do F19, prema aktivnoj tvari koja je uzeta. Poddioba govori radi li se o akutnoj intoksikaciji, štetnoj uporabi, sindromu ovisnosti, stanju apstinencije, stanju apstinencije s delirijem, psihotičnom poremećaju, amnestičkom sindromu, rezidualnom poremećaju ili psihotičnom poremećaju s kasnim početkom (www.apps.who.int).

Tablica 1. MKB-10 klasifikacija mentalnih poremećaja

Shizofrenija, shizotipni i sumanutni poremećaj	
Šifra	Bolest
F20	Shizofrenija
F21	Shizotipni poremećaj
F22	Perzistirajući sumanutni poremećaji
F23	Akutni i prolazni psihotični poremećaji
F24	Inducirani sumanutni poremećaj
F25	Shizoafektivni poremećaj
F28	Ostali neorganski psihotični poremećaji
F29	Nespecificirana neorganska psihoza

Poremećaji raspoloženja	
Šifra	Bolest
F30	Manična epizoda
F31	Bipolarni afektivni poremećaj
F32	Depresivna epizoda
F33	Povratni depresivni poremećaj
F34	Perzistirajući poremećaji raspoloženja
F38	Ostali poremećaji raspoloženja
F39	Nespecifični poremećaj raspoloženja
Poremećaji ličnosti	
F60	Specifični poremećaji ličnosti
F61	Miješani i ostali poremećaji ličnosti
F62	Trajne promjene ličnosti koje se ne mogu pripisati oštećenju ili bolesti mozga
F63	Poremećaji navika i nagona
F64	Poremećaji spolnog identiteta
F65	Poremećaji seksualne sklonosti
F66	Psihološki i poremećaji ponašanja povezani sa seksualnim razvojem i orijentacijom
F68	Ostali poremećaji ličnosti i ponašanja odraslih
F69	Neoznačeni poremećaj ličnosti i ponašanja u odraslih
Mentalni poremećaji i poremećaji ponašanja uzrokovani uzimanjem psihoaktivnih tvari	
F10	Mentalni poremećaji i poremećaji ponašanja uzrokovani alkoholom
F11	Mentalni poremećaji i poremećaji ponašanja uzrokovani uzimanjem opijata
F12	Mentalni poremećaji i poremećaji ponašanja uzrokovani uzimanjem kanabinoida
F13	Mentalni poremećaji i poremećaji ponašanja uzrokovani uzimanjem sedativa ili hipnotika
F14	Mentalni poremećaji i poremećaji ponašanja uzrokovani uzimanjem kokaina
F15	Mentalni poremećaji i poremećaji ponašanja uzrokovani uzimanjem drugih stimulativnih sredstava, uključujući kofein
F16	Mentalni poremećaji i poremećaji ponašanja uzrokovani uzimanjem halucinogena
F17	Mentalni poremećaji i poremećaji ponašanja vezani uz duhan
F18	Mentalni poremećaji i poremećaji ponašanja uzrokovani hlapljivim otapalima
F19	Mentalni poremećaji i poremećaji ponašanja uzrokovani uzimanjem više droga ili uzimanjem ostalih psihoaktivnih tvari

1.1.2. Shizofrenija

Shizofrenija je skupina duševnih poremećaja kojima je zajedničko postojanje kognitivnih, emocionalnih i bihevioralnih disfunkcija. Incidencija shizofrenije podjednaka je u različitim dijelovima svijeta i iznosi 0,5-1 %. Najčešće se javlja u mlađe odraslo doba (Begić i sur., 2015).

1.1.2.1. Etiologija shizofrenije

Etiologija shizofrenije do danas nije u potpunosti razjašnjena. Smatra se da ulogu u nastanku bolesti imaju genski čimbenici i čimbenici okoline (sociodemografski status, prenatalni i perinatalni čimbenici). Psihotičnu reakciju sličnu shizofreniji mogu uzrokovati i neki lijekovi i egzogene tvari kao što su amfetamini i kanabis (Begić i sur., 2015).

1.1.2.2. Patofiziologija shizofrenije

Složene promjene neurotransmitora koje uzrokuju pozitivne, negativne i kognitivne simptome shizofrenije pokušava objasniti nekoliko teorija. Dopaminska hipoteza temelji se na uočenom povećanju aktivnosti dopaminskog sustava u mezolimbickom (uključen u kontrolu ponašanja) i smanjenje aktivnosti u mezokortikalnom putu (uključen u posredovanje kognitivnih funkcija). Serotoninska teorija vezana je uz otkriće halucinogena (LSD i meskalin) koji dovode do halucinogenog učinka stimulacijom 5-HT_{2A} receptora koji moduliraju otpuštanje dopamina, noradrenalina, glutamata, GABA-e i acetilkolina. Serotonin preko 5-HT_{2A} receptora djeluje na način da smanjuje lučenje dopamina i pridonosi negativnim simptomima i kognitivnim poremećajima. Najnovija teorija patofiziologiju shizofrenije pripisuje i disfunkciji glutamatnog sustava jer se pokazalo da inhibicija NMDA receptora uzrokuje psihoze i kognitivne deficite (Katzung, 2018).

1.1.2.3. Klinička slika, simptomi shizofrenije i dijagnostički postupci

Simptome shizofrenije može se podijeliti na pozitivne, negativne i kognitivne. Pozitivni simptomi su oni koji su dodani normalnom funkcioniranju, a to su: halucinacije, sumanutosti, poremećaji mišljenja i govora. Negativni simptomi označavaju gubitak u odnosu na normalno funkcioniranje, a uključuju: apatiju, abuliju, afektivnu nivelaciju, anhedoniju i autizam. Od

kognitivnih funkcija narušene su pažnja, memorija, sposobnost učenja i psihomotorna brzina (Begić i sur., 2015).

Dijagnostički kriteriji koji se mogu slijediti pri dijagnozi shizofrenije su MKB-10 i DSM-5 kriteriji. Prema MKB-10 kriterijima simptomi su podijeljeni u dvije skupine. Prvu skupinu simptoma čine: nametanje misli, sumanutosti kontrole pokreta tijela, sumanute percepcije, halucinatorni glasovi, trajne bizarne sumanutosti koje su nesukladne bolesnikovoj kulturi i intelektu (nemogući politički, znanstveni ili religiozni identitet, nadljudske moći). Drugoj skupini simptoma pripadaju: perzistentne halucinacije praćene prolaznim sumanutostima, perzistentne precijenjene ideje ili trajno prisutne halucinacije tjednima i mjesecima, disocirano mišljenje, dezorganiziran govor, katatono ponašanje (izrazita zakočenost tijela i održavanje neprirodnog položaja ili izrazita uzbuđenost), negativni simptomi, znatne i trajne promjene ponašanja (gubitak interesa, besciljnost, zaokupljenost sobom, socijalno udaljavanje). Bolesnik mora imati barem jedan simptom iz prve skupine navedenih simptoma ili najmanje dva simptoma iz druge skupine kako bi mu se dijagnosticirala shizofrenija (Begić i sur., 2015).

Simptomi koji su dijagnostički kriterij za shizofreniju prema DSM-5 su sumanutosti, halucinacije, disocirani govor, dezorganizirano ili katatono ponašanje i negativni simptomi. Za uspostavljanje dijagnoze osoba mora imati dva ili više navedenih simptoma od kojih jedan mora biti sumanutost, halucinacije ili disocirani govor (Begić i sur., 2015).

1.1.3. Poremećaji raspoloženja

Poremećaji raspoloženja među najčešćim su psihičkim poremećajima današnjeg doba. Depresija je po učestalosti na četvrtom mjestu svih bolesti u svijetu, a smatra se da će do 2020. biti na drugom mjestu. Poremećaji raspoloženja su klinički entiteti kojima je zajednički simptom poremećeno emocionalno stanje koje utječe na to kako osoba misli, ponaša se i doživljava svijet oko sebe. Emocionalno stanje se može mijenjati prema povišenom ili sniženom raspoloženju (Begić i sur., 2015).

1.1.3.1. Etiologija poremećaja raspoloženja

Svoju ulogu u nastanku poremećaja raspoloženja imaju genetika, neurološki, hormonalni, endokrinološki mehanizmi i kronični stres. Kod razvoja depresije pokazalo se da utjecaj ima i spol, odnosno hormonski čimbenici, pa se tako bolest dvostruko češće javlja kod žena nego kod muškaraca (England i Sim, 2009).

1.1.3.2. Patofiziologija poremećaja raspoloženja

Monoaminska hipoteza razvoja depresije povezuje depresiju sa smanjenom dostupnosti neurotransmitora serotonina, noradrenalina i dopamina ili disfunkcijom njihovih receptora, dok novija neurotrofna hipoteza podlogom depresije smatra promjene neoplastičnosti (neurogeneze i sinapsi) u hipokampusu (Katzung, 2018).

Uzrok promjena raspoloženja kod bipolarnog poremećaja je nepoznat, ali bi mogao biti u svezi s aktivnošću kateholamina. Zamijećeno je da lijekovi koji povećavaju aktivnost kateholamina povećavaju maniju, a smanjuju ju lijekovi koji smanjuju aktivnost dopamina i noradrenalina (Katzung, 2018).

1.1.3.3. Klinička slika, simptomi poremećaja raspoloženja i dijagnostički postupci

Kriteriji za maničnu epizodu su povišeno raspoloženje koje traje najmanje tjedan dana tijekom kojih su prisutna barem tri od sljedećih simptoma: povećano samopouzdanje ili grandiozne ideje, smanjena potreba za spavanjem, velika potreba za govorenjem, ubrzane misli, pažnja povećane vigilonosti, poduzimanje različitih aktivnosti; i znatno oštećenje radnog i socijalnog funkcioniranja (Begić i sur., 2015).

Depresivnu epizodu obilježavaju sniženo raspoloženje i gubitak interesa za svakodnevne aktivnosti. Prema MKB-10 simptomi koje svaki bolesnik mora imati za postavljanje dijagnoze depresije jesu depresivno raspoloženje, gubitak interesa i zadovoljstva u uobičajenim aktivnostima i smanjena energija koji traju najmanje dva tjedna. Uz osnovne simptome često se javljaju i poremećaji spavanja, apetita, koncentracije, pesimizam, smanjeno samopouzdanje, ideje bezvrijednosti, ideje o samoozljeđivanju i samoubojstvu (Begić i sur., 2015).

Prema MKB-10 kriterijima dijagnoza bipolarnog poremećaja raspoloženja postavlja se kada su postojale epizode dvije manije ili hipomanije, depresije i manije ili depresije i hipomanije između kojih je bilo uspostavljeno stanje remisije. DSM-5 dijeli bipolarni poremećaj na tip 1 (postojala je manična epizoda) i tip 2 (izmjenjuju se hipomanične i depresivne faze) (Begić i sur., 2015).

1.1.4. Poremećaji ličnosti

Poremećaj ličnosti je model unutrašnjeg doživljavanja i ponašanja koji izrazito odstupa od očekivanog s obzirom na kulturnu pripadnost, trajan je i nefleksibilan. Početak ima u adolescenciji ili ranoj odrasloj dobi. Prevalencija poremećaja ličnosti u općoj populaciji iznosi od 10 do 15 % (Begić i sur., 2015).

1.1.4.1. Etiologija poremećaja ličnosti

Smatra se da su poremećaji ličnosti rezultat interakcije između genske predispozicije i izloženosti različitim nepovoljnim utjecajima i traumatskim događajima (npr. zlostavljanje u djetinjstvu, roditeljsko zanemarivanje, grubost) (Begić i sur., 2015).

1.1.4.2. Patofiziologija poremećaja ličnosti

Patofiziologija poremećaja ličnosti nije sasvim poznata. Smatra se da disregulacija serotoninskog sustava može uzrokovati smanjenu senzitivaciju 5-HT-1A receptora što pridonosi poremećaju ličnosti. Istražuje se i doprinos uloge oksitocina u nastanku poremećaja ličnosti (Chapman i sur., 2019).

1.1.4.3. Klinička slika, simptomi poremećaja ličnosti i dijagnostički postupci

MKB-10 i DSM-5 kriteriji kod dijagnoze poremećaja ličnosti sukladni su i poremećajem ličnosti smatraju stanje bolesnika u kojem njegovo ponašanje i doživljavanje svijeta trajno odstupa od očekivanog. Do odstupanja dolazi na kognitivnom području (način percipiranja i interpretiranja sebe, drugih i događaja), emocionalnom području (raspon, intenzitet, labilnost i prikladnost emotivnog odgovora), u interpersonalnom funkcioniranju ili u kontroli nagona (Begić i sur., 2015).

1.1.5. Bolest ovisnosti

Prema izvješću UN-ova ureda za droge i kriminal za 2010. godinu, u svijetu oko 200 milijuna osoba drogu uzme barem jedanput godišnje. Prema izvješću Europskog centra za praćenje droga i ovisnosti, marihuanom se koristilo 21,7 %, kokainom 4,2 %, amfetaminom 3,4 %, a ekstazijem 3,1 % odraslih Europljana, dok je u Hrvatskoj procjena o broju ovisnika nepouzdana (Begić i sur., 2015).

1.1.5.1. Etiologija bolesti ovisnosti

Uzroci posezanja za drogom su kompleksni a mogu biti biološki, kulturološki, određene crte ličnosti, psihički i socijalni problemi. Na početku osoba drogu uzima kako bi postigla užitak i zadovoljstvo, a kasnije iz neodoljive potrebe (Begić i sur., 2015).

1.1.5.2. Patofiziologija bolesti ovisnosti

Glavna meta na koju djeluju sredstva koja izazivaju ovisnosti je mezolimbčki dopaminski sustav (centar za ugodu). Povećanje koncentracije dopamina povećava osjećaj ugone. Sredstva koja izazivaju ovisnosti uzrokuju otpuštanje dopamina u nucleus accumbensu što uzrokuje učenje ponašanja koje je dovelo do osjećaja ugone i dovodi do psihičke ovisnosti (Katzung, 2018).

1.1.5.3. Klinička slika, simptomi bolesti ovisnosti i dijagnostički postupci

Klinička slika i dijagnostičke smjernice različite su ovisno o kojoj je ovisnosti riječ. Ovisnost o alkoholu prepoznaje se po pojavi tolerancije i simptoma sustezanja 12 sati nakon posljednjeg uzimanja alkohola. Kod uzimanja opijata klinička slika je obilježena teškom fizičkom i psihičkom ovisnošću i povećanom tolerancijom, a u slučaju neuzimanja droge dolazi do apstinencijske krize (bol, uznemirenost, povraćanje, znojenje, nesаница), a pojavljuju se i znakovi poremećaja fizičkih i psihičkih funkcija. Slične simptome uzrokuje i ovisnost o sedativima i hipnoticima. Simptomi dugotrajnog uzimanja kanabionida su opći gubitak interesa i depresija. Stimulansi dovode do gubitka tjelesne mase, anoreksije, midrijaze, psihoza. Halucinogeni izazivaju psihičku ovisnost i imaju neurotoksične učinke

(poremećaji pamćenja, govora, konvulzije, distonije). Duhan dovodi do kroničnih plućnih bolesti, vaskularnih bolesti i karcinoma (Begić i sur., 2015).

Dijagnosticiranje bolesti ovisnosti otežano je jer su ovisnici skloni prikrivanju ovisnosti. Dijagnoza se postavlja na temelju anamneze, heteroanamneze, psihičkih, neuroloških i tjelesnih smetnji. Pri dijagnosticiranju pomažu i biokemijske tehnike identificiranja sredstava ovisnosti u krvi i urinu (Begić i sur., 2015).

1.1.6. Liječenje psihičkih bolesti

Nema razvijenih lijekova koji mogu dovesti do izlječenja psihičkih bolesti. Farmakoterapija psihičkih bolesti temelji se na liječenju njihovih simptoma (Cheffer i sur., 2018).

Antipsihotici

Antipsihotici otklanjaju sumanute ideje i halucinacije, pridonose reorganizaciji psihičkih funkcija i omogućuju povratak psihotičnog bolesnika u stvarnost (Begić i sur., 2015). Tipični antipsihotici (neuroleptici, prva generacija) su antagonisti D2 receptora, reduciraju neurotransmisiju dopamina i tako djeluju na pozitivne simptome, ali i uzrokuju brojne nuspojave (ekstrapiramidalni sindrom). Prema kemijskoj strukturi dijelimo ih na: fenotijazine (promazin, levomepromazin, tioridazin, flufenazin), butirofenone (haloperidol), dihidroindolone, tioksantene, dibenzepine i difenilbutilpiperidine (www.psychopharmacologyinstitute.com).

Drugoj generaciji antipsihotika (atipični antipsihotici) zajednički je veći afinitet prema 5-HT₂ receptorima nego D₂ receptorima. Osim što su antagonisti 5-HT₂ i D₂ receptora, imaju utjecaj i na druge receptore pa su često i parcijalni agonisti 5-HT_{1A} receptora i antagonisti 5-HT₆ ili 5-HT₇ receptora, a neki utječu i na D₃ receptore. Ova skupina antipsihotika djeluje na pozitivne i negativne simptome shizofrenije, ali pritom uzrokuju metaboličke nuspojave. Predstavnici ove skupine su: klozapin, asenapin, olanzapin, kvetiapin, paliperidon, risperidon, sertindol, ziprasidon i aripiprazol (Katzung, 2017).

Antidepresivi

Antidepresivi se, prema mehanizmu djelovanja, mogu podijeliti u nekoliko skupina. Prvi razvijeni antidepresivi jesu inhibitori monoamino oksidaze (MAOI): izokarboksazid,

tranilcipromin, moklobemid. Oni ireverzibilno i neselektivno vežu MAO-A i MAO-B i na taj način podižu koncentraciju norepinefrina, serotonina i dopamina (Saka, 2016).

Sljedeća skupina antidepresiva su triciklički antidepresivi (imipramin, desimipramin). Oni inhibiraju ponovnu pohranu serotonina i noradrenalina, ali su neselektivni pa djeluju i na histaminske, kolinergičke i α -adrenergičke receptore zbog čega uzrokuju antikolinergičke nuspojave (suha usta, retencija urina, sedacija, mučnina, aritmije). Zbog lošije podnošljivosti i veće opasnosti od predoziranja danas se sve rjeđe koriste. Mirtazapin, amoksapin i maprotilin ubrajamo u tetracikličke antidepresive, a njihovo djelovanje slično je tricikličkim antidepresivima (Katzung, 2017).

Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SSRI) danas su najčešće korišteni antidepresivi zbog širokog spektra djelovanja, dobre podnošljivosti i sigurnosti. Inhibiraju serotoninški transporter (SERT). Na tržištu su prisutni fluoksetin, sertralin, citalopram, escitalopram, paroksetin i fluvoksamin (Katzung, 2017).

Venlafaksin, desvenlafaksin, duloksetin, levomilnacipran, milnacipran selektivni su inhibitori ponovne pohrane serotonina i noradrenalina (SNRI). Oni osim blokade SERT-a blokiraju i transporter noradrenalina (NAT) (Katzung, 2017).

U terapiji depresije koriste se i bupropion koji inhibira ponovnu pohranu serotonina i noradrenalina i modulatori 5-HT receptora. Trazodon i nefazodon antagonisti su 5-HT₂ receptora, dok je vortiooksetin antagonist 5-HT₃, 5-HT₇ i 5-HT_{1D} receptora, parcijalni agonist 5-HT_{1B} receptora i agonist 5-HT_{1A} receptora, a ujedno i inhibitor SERT-a (Katzung, 2017).

Terapija bipolarnog poremećaja

Prije odobrenja ostalih lijekova za liječenje bipolarnog poremećaja glavna terapijska opcija bio je litij. Litij inhibira glikogen sintaza kinazu 3 (GSK3) i na taj način regulira signalne puteve u stanici, što uzrokuje dugotrajne promjene u sinaptičkoj plastičnosti i morfologiji neurona, a koristi se u akutnoj fazi bolesti i prevenciji manije i depresije. Danas su za akutne napadaje i prevenciju manije najčešće korišteni stabilizatori raspoloženja karbamazepin i valproična kiselina. Atipični antipsihotici koji kao indikaciju imaju i bipolarni poremećaj su: aripiprazol, klorpromazin, olanzapin, kvetiapin, risperidon i ziprasidon (Katzung, 2017).

Terapija ovisnosti

Ciljevi u liječenju ovisnosti su smanjiti osjećaj ugone i uživanja u drogi, oslabiti stvorenu memoriju o učincima droge, povećati značenje prirodnih stimulatora centara ugone i prevencija relapsa. Za liječenje ovisnosti o alkoholu koriste se naltrekson, akamprosati i disulfiram. Naltrekson je opioidni antagonist koji blokira μ receptore i smanjuje želju za alkoholom i uživanje u alkoholu. Akamprosati je antagonist NMDA receptora i aktivator GABA-e, a njime se postiže produljenje stanja apstinencije. Disulfiram inhibira aldehid dehidrogenazu i izaziva averziju prema alkoholu jer u konzumaciji zajedno s alkoholom uzrokuje glavobolju, mučninu, povraćanje i hipotenziju (Katzung, 2017).

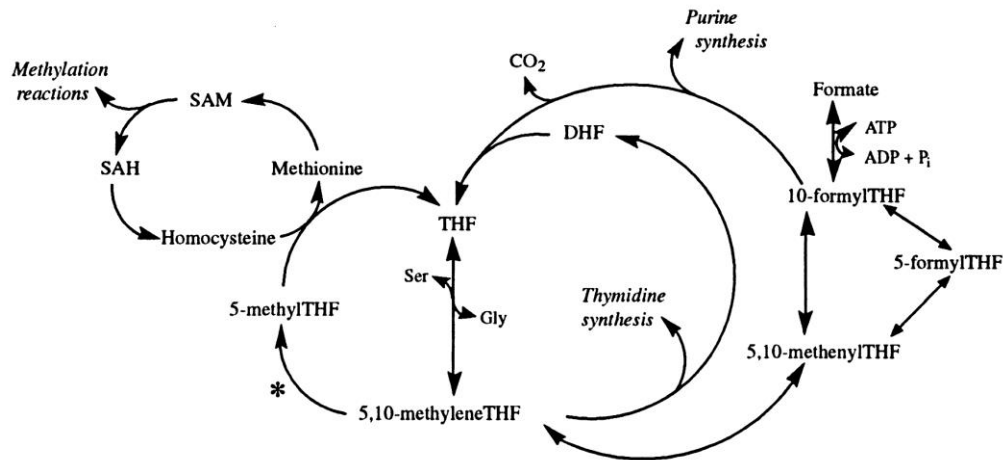
Ovisnost o opioidima (morfin, heroin, kodein, oksikodon) liječi se antagonistima opioidnih receptora (metadon, buprenorfin, morfin sulfat), dok se nalokson koristi kao antidot kod predoziranja (Katzung, 2017).

Terapija ovisnosti o nikotinu uključuje sam nikotin, ali u oblicima iz kojih se postepeno oslobađa i sporo apsorbira. Osim nikotina za terapiju ovisnosti odobreni su bupropion i vareniklin. Bupropion stimulira učinak nikotina na receptore u mozgu. On povećava razinu dopamina i norepinefrina i u manjoj mjeri blokira nACh receptore. Vareniklin je parcijalni agonist nACh receptora pa blokira vezanje nikotina za receptore i njegove učinke (Prochaska i Benowitz, 2006).

1.2. Metilentetrahidrofolat-reduktaza (MTHFR)

MTHFR ključan je enzim u metabolizmu folata. Katalizira pretvorbu 5,10-metilentetrahidrofolata (5,10-metilen-THF) u 5-metilentetrahidrofolat (5-metilen-THF). Sudjeluje i u pretvorbi homocisteina u metionin koju katalizira metionin sintaza uz kofaktor vitamin B12 gdje je 5-metilen-THF donator ugljika. Metionin je prekursor S-adenozilmetionina (SAM) koji je metil donator za pretvorbu metionina nazad u homocistein i metilaciju DNA (Frosst i sur., 1995; Liew i Gupta, 2015). Tetrahidrofolat nastao u reakciji metionin sintaze ponovno se vraća u 5,10-metilen-THF djelovanjem serin-hidroksimetil-transferaze uz kofaktor vitamin B6 (Slika 1.). Postoji i put pretvorbe homocisteina u metionin koji nije ovisan o vitaminu B12, a donator metilne skupine u tom je slučaju betain. Homocistein se također može pretvoriti u cistein u procesu transulfuracije pomoću enzima cistation- β -sintaze (CBS) i cistation- γ -liaze (CSE) koji ovise o vitaminu B6. Dolazi do kondenzacije

homocisteina i serina, nastaje cistationin čijom hidrolizom nastaje cistein i α -ketobutirat koji nakon pretvorbe sudjeluje u Krebsovom ciklusu (Škovierova i sur., 2016).



Slika 1. Metabolizam homocisteina
(preuzeto iz: www.pnas.org)

U ljudi enzim MTHFR smješten je na lokaciji p36.3 1. kromosoma. Veličine je 74,6 kDa, a ekspresija je najveća u testisima, mozgu i bubregu. Sastoji se od N-terminalne katalitičke domene koja veže 5,10-metilen-THF i C-terminalne regulatorne domene koja veže SAM (Wan i sur., 2018).

Smanjena katalitička aktivnost MTHFR povezana je s nekim patološkim stanjima: psihičkim i kardiovaskularnim bolestima, dijabetesom, psorijazom, karcinomima (Liew i Gupta, 2015). Utjecaj MTHFR-a na psihičke bolesti proizlazi iz njezine uloge u metabolizmu folata, homocisteina, vitamina B12 i metilaciji DNA. Psihičke bolesti koje se povezuju s smanjenom katalitičkom aktivnosti MTHFR-a su: shizofrenija, depresija, bipolarni poremećaj, autizam, ADHD (Wan i sur., 2018).

1.2.1. Polimorfizmi i mutacije gena za MTHFR

14 polimorfizma jednog nukleotida (SNP-ova) gena za MTHFR povezano je sa smanjenjem enzimске aktivnosti. Procjenjuje se da do 40 % populacije ima neku od mutacija. C677T i A1298C polimorfizmi najviše pridonose smanjenju aktivnosti enzima. Gen za MTHFR na poziciji 677 može imati C (citozin) ili T (timin). Divlji tip na poziciji 677 ima alel C i aminokiselinu alanin na poziciji 222, dok mutant ima alel T, a na poziciji 222 alanin je zamijenjen valinom (Wan i sur., 2018). Mutacija uzrokuje sintezu termolabilnog enzima što

rezultira smanjenjem enzimske aktivnosti za 70 % kod homozigota (TT genotip), odnosno za 35 % kod heterozigota (CT genotip). Takvo smanjenje aktivnosti enzima dovodi do povećane koncentracije homocisteina i snižene koncentracije folata. (Fan i sur., 2016; Yang i sur., 2016). Folati su uključeni u remetilaciju homocisteonina u metionin. Ako je koncentracija folata snižena, snizuje se i koncentracija metionina, a time i SAM-a. Koncentracija SAH-a onda raste i dolazi do inhibicije metiltransferaze te se posljedično smanjuje kapacitet metilacije DNA (Huemer i sur., 2015).

Na 1298 nukleotidu gena za MTHFR također postoje dvije mogućnosti: A (adenin) i aminokiselina glutaminska kiselina na mjestu 429 ili C (citozin) i aminokiselina alanin na mjestu 429 (Wan i sur., 2018). Prisutstvo mutacija može uzrokovati smanjenje enzimske aktivnosti, ali u manjoj mjeri nego što je to kod C677T mutacija. Mutacije A1298C gena za MTHFR nisu povezane s povišenim koncentracijama homocisteina, niti s nižim koncentracijama folata. Međutim, uočeno je da kombinacija heterozigota 677CT/1298AC genotipa rezultira nižom katalitičkom aktivnosti MTHFR-a nego zasebni heterozigotni genotipovi, dok je koncentracija homocisteina i folata jednaka onoj kod 677TT genotipa (Fan S i sur., 2016).

1.2.2. Polimorfizmi gena za MTHFR i psihičke bolesti

Kod bolesnika s psihičkim bolestima najviše su proučavani C677T i A1298C polimorfizmi u genu za MTHFR i pokazana je značajna povezanost između polimorfizma i smanjenja katalitičke aktivnosti MTHFR-a te metilacije. Metilacija je proces koji regulira gensku ekspresiju i utječe na razvoj i funkciju stanica. Ona ovisi o donoru metilne skupine, SAM-u, koji nastaje u ciklusu metionina gdje 5-metil-THF prenosi metilnu skupinu na homocistein čime nastaje metionin. Metilacija genomske DNA izravno korelira sa statusom folata i razinama homocisteina u plazmi. Nakon analize genotipa, genotipovi TT imali su smanjenu razinu metilacije DNA u usporedbi s CC genotipom. Osobe koje imaju 677TT genotip stoga imaju predispoziciju za blagu hiperhomocisteinemiju jer imaju manje MTHFR-a za stvaranje 5-metil-THF-a koji smanjuje razinu homocisteina, a upravo hiperhomocisteinemija se pokazala jednim od ključnih čimbenika u razvijanju psihičkih bolesti. Hiperhomocisteinemiju može uzrokovati i nizak unos folata prehranom, pa tako nizak unos folata prehranom pridonosi riziku razvoja shizofrenije, ponajviše pojavi negativnih simptoma shizofrenije, pogotovo kod novorođenčadi čije su majke imale deficijenciju folata (Wan i sur., 2018).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Mentalni poremećaji relativno su visoke pojavnosti, često počinju u mlađoj odrasloj dobi, mogućeg su kroničnog tijeka, smanjuju kvalitetu života i znatno sudjeluju u korištenju zdravstvenih resursa. Zbog važnosti i veličine problema mentalni poremećaji u Hrvatskoj, kao i globalno, predstavljaju jedan od prioritetnih javnozdravstvenih problema (www.hzjz.hr).

Veliku ulogu u nastanku psihičkih bolesti imaju genski čimbenici. *MTHFR* je jedan od gena čiji polimorfizmi bitno pridonose nastanku psihičkih bolesti. Prije nekoliko desetljeća zabilježena je smanjena katalitička aktivnost MTHFR-a kod dva pacijenta sa shizofrenijom. Studije su pokazale da uzrok može biti C677T polimorfizam i da pridonosi riziku od pojave shizofrenije. Također postoje istraživanja koja dovode do zaključka da 677TT genotip povećava rizik za nastanak bipolarnog poremećaja i depresije, dok rezultati nekih drugih istraživanja nisu pokazala nikakve povezanosti 677TT genotipa i navedenih bolesti (Wan i sur., 2018). Studija Reifa i suradnika utvrdila je značajnu povezanost A1298C polimorfizma s depresijom i bipolarnim poremećajem, dok Nielsen i suradnici nisu uspjeli pronaći istu poveznost između A1298C polimorfizma i depresije. (Cho i sur., 2017).

Znanstvenici istražuju biopokazatelje koji mogu biti povezani s nastankom, dijagnostikom ili uspješnosti terapije bolesnika s bolestima depresije i psihičkim bolestima. Između ostalog se ispituju mutacije C677T te A1298C gena za MTHFR, koje su uključene u metabolizam homocisteina i folata, a poznato je da mogu biti promijenjeni u bolesnika s psihičkim bolestima.

Diplomski rad je proširenje studije Dr. Vuk Pisk Ispitivanja genotipova ABO krvne grupe kod oboljelih psihičkih bolesnika, ispitivanjem još dva biljega važna za bolesnike oboljele od psihičkih bolesti, a to su mutacije C677T i A1298C gena za MTHFR.

Pretpostavka ovog istraživanja je da postoji povezanost između C677T i A1298C mutacija u genu za MTHFR i pojave psihičkih bolesti u hrvatskoj populaciji. Cilj rada je utvrditi pojavnost obje mutacije u oboljelih od psihičkih bolesti, te ih usporediti s pojavnošću istih mutacija u kontrolnoj skupini u Republici Hrvatskoj. Skupinu bolesnika čine hospitalizirani pacijenti Psihijatrijske bolnice "Sveti Ivan". Kontrolnu skupinu čine zdravi dobrovoljni darivatelji krvi (DDK). Istraživanje se sastoji od izolacije DNA na QIAcube uređaju iz uzorka

periferne krvi s K2EDTA antikoagulansom, ispitivanja polimorfizama pomoću metode lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (real-time PCR) i alelne diskriminacije, te analize dobivenih podataka statističkim testovima. Frekvencije mutacije C677T u kontrolnoj skupini utvrđene su u doktorskoj disertaciji Doc. dr. Prim. Irene Jukić, 2013., a frekvencije A1298C mutacije utvrđene su u diplomskom radu bacc. Renate Kundid te bi bile preuzete za statistički izračun rezultata studije usporedbe parova (case-control study).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

Provedena je studija istraživanja parova (case-control study) koju su odobrila Etička povjerenstva Psihijatrijske bolnice "Sveti Ivan" i Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM). Ispitivanje je provedeno u HZTM, u Odjelu za molekularnu dijagnostiku u ožujku i travnju 2019. godine.

Ispitivanu skupinu činili su hospitalizirani pacijenti Psihijatrijske bolnice "Sveti Ivan" u Zagrebu. Sudjelovalo ih je 155, od toga 75 muškaraca i 75 žena (za 5 osoba nije naveden spol) čija je prosječna dob 44,8 godina (SD=12,1), najmlađi bolesnik imao je 19, a najstariji 71 godinu.

Dijagnozu psihičkih poremećaja postavila su dva psihijatra prema važećoj Međunarodnoj klasifikaciji bolesti. Pacijenti uključeni u studiju imaju različite dijagnoze: 38,7 % pacijenata imalo je dijagnozu psihotičnog poremećaja, 27,1 % dijagnozu bolesti ovisnosti, 26,5 % poremećaj raspoloženja, a 7,7 % pacijenata imalo je kao primarnu dijagnozu poremećaj ličnosti. Gotovo polovica ispitanika (49,3 %) imala je dijagnosticiranu neku od somatskih bolesti, pri čemu je najučestalija bila hipertenzija (17,9 %).

Kontrolnu populacijsku skupinu činili su zdravi, nesrodni DDK. Skupinu čini 101 DDK, od toga 48 žena i 53 muškaraca u dobi od 25 do 65 godina.

Svim je ispitanicima uzet uzorak periferne krvi u volumenu od 8,5 ml (Vacutainer Becton Dickinson, Plymouth, UK) sa suhim antikoagulansom K2EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina).

3.2. Izolacija genomske DNA na uređaju QIAcube

QIAcube uređaj (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka) jest uređaj za automatiziranu izolaciju nukleinskih kiselina iz različitih bioloških uzoraka kao što su puna krv, plazma, kultura stanica. Izolacija se provodi standardnim QIAgen test kompletima za izolaciju nukleinskih kiselina na kolonama s membranama od silika-gela, a prema uputama proizvođača. Postupak

izolacije nukleinskih kiselina obuhvaća sljedeće faze: liza stanica - vezanje nukleinske kiseline na membranu od silika-gela - ispiranje membrane - eluiranje nukleinskih kiselina (Slika 2.).



Slika 2. Prikaz izolacije genomske DNA pomoću Qiagen kolona sa silika-gel membranom (preuzeto iz: www.genoexpress.com)

Lizirajućim puferom (AL) najprije se liziraju stanice iz uzorka pune krvi izuzete na antikoagulans pri čemu pH i ionska jakost lizata sprječavaju vezanje interferirajućih tvari na membranu. Enzimskom reakcijom Proteinaze K uklanjaju se stanični proteini i ostale makromolekule koje bi mogle inhibirati ili ometati PCR reakciju. Pomoću apsolutnog etanola DNA iz liziranog uzorka adsorbira se na QIAamp silika-gel membranu QIAamp spin kolone. DNA vezana na membranu pročišćava se dvostrukim ispiranjem puferima (AW1 i AW2), te eluira s membrane puferom za eluciju (AE). Tako izolirana genomska DNA visokog je stupnja čistoće i prinosa i može se umnažati lančanom reakcijom polimeraze (PCR).

3.2.1. Postupak automatizirane izolacije DNA

U ispitivanju je za izolaciju DNA korišteno 200 μ l uzorka pune krvi s antikoagulansom EDTA uz pomoć komercijalnog test kompleta QIAamp DNA Blood mini QIAcube kit (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka).

Nakon što je QIAcube uređaj nakon uključjenja proveo inicijalizacijski test od 30-ak sekundi, postavljen je nosač s reagensima koji sadrži lizirajući pufer, dva pufera za ispiranje, pufer za eluciju i apsolutni etanol. Nosači za nastavke napunjeni su nastavcima s filterom od 1000 μ l i

200 µl. Na poziciju A postavljena je epruveta od 1,5 ml s otopinom proteinaze K. Adapteri su pripremljeni na način da je kolona sa silika-gel membranom umetnuta na poziciju L1, a epruveta za eluciju na L3 i postavljeni na inkubator s mješalicom. Pripremljeni su uzorci u epruvetama od 2,0 ml i umetnuti u inkubator s mješalicom. Na QIAcube uređaju odabran je protokol QIAamp DNA Blood Mini Kit čime je započet proces automatizirane izolacije DNA. Proces za 12 uzoraka traje 90 minuta.

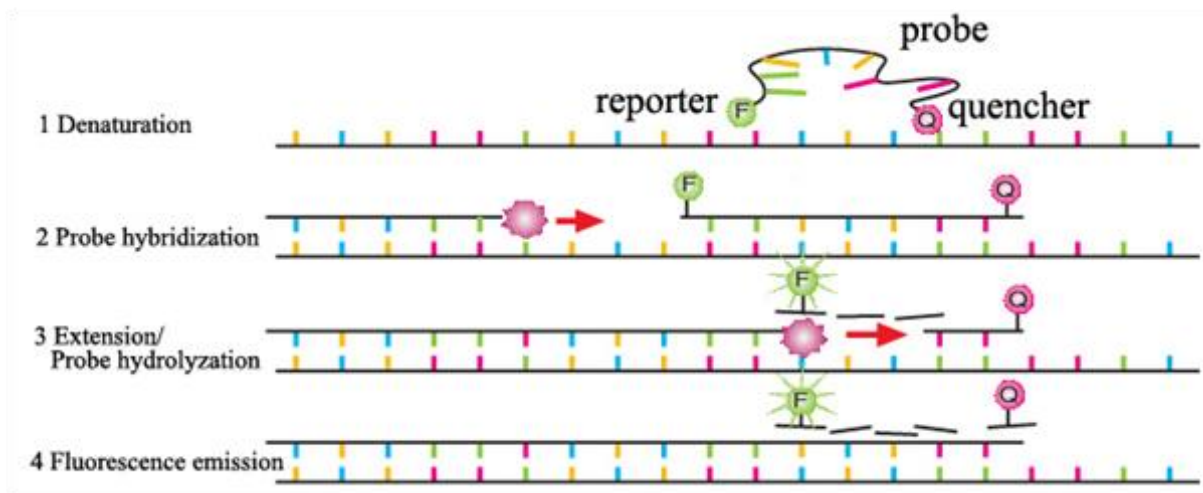
3.2.2. Reagensi za izolaciju DNA

- Lizirajući pufer AL
- Apsolutni etanol
- Pufer za ispiranje AW1
- Pufer za ispiranje AW2
- Pufer za eluciju AE
- Proteinaza K

3.3. Genotipizacija mutacija C677T i A1298C gena za MTHFR pomoću metode real-time PCR (RT-PCR) – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Metoda RT-PCR nastala je iz klasične PCR metode zbog potrebe za kvantifikacijom nastalog produkta u svakom ciklusu umnožavanja. U RT-PCR reakciji produkti reakcije obilježeni su fluorescencijskom bojom i analiziraju se tijekom umnožavanja. Za obilježavanje produkata reakcije RT-PCR koriste se fluorescencijske boje (vežu se na dvolančanu DNA, a pri čemu se emitira fluorescencija koja je razmjerna količini PCR produkta) ili fluorescencijski oligonukleotidi (TaqMan sonde, metoda se zasniva na korištenju neobilježenih specifičnih početnica te specifične obilježene sonde) (Čačev i Kapitanović, 2007).

U ispitivanju korištena je TaqMan real-time PCR metoda (Slika 3.) koja se temelji na hibridizaciji ciljnog slijeda i fluorescentno obilježene oligonukleotidne sonde specifične za pojedini alel, 5' nukleaznoj aktivnosti Taq DNA polimeraze te stvaranju fluorescentnog signala nakon razdvajanja fluorofora (reporter boje, vezane na 5' kraj sonde) od prigušivača (engl. quencher, vezanog na 3' kraj sonde) prilikom cijepanja sonde u PCR reakciji (Gibson, 2006).



Slika 3. Prikaz TaqMan real-time PCR metode

(preuzeto iz: www.picswe.net)

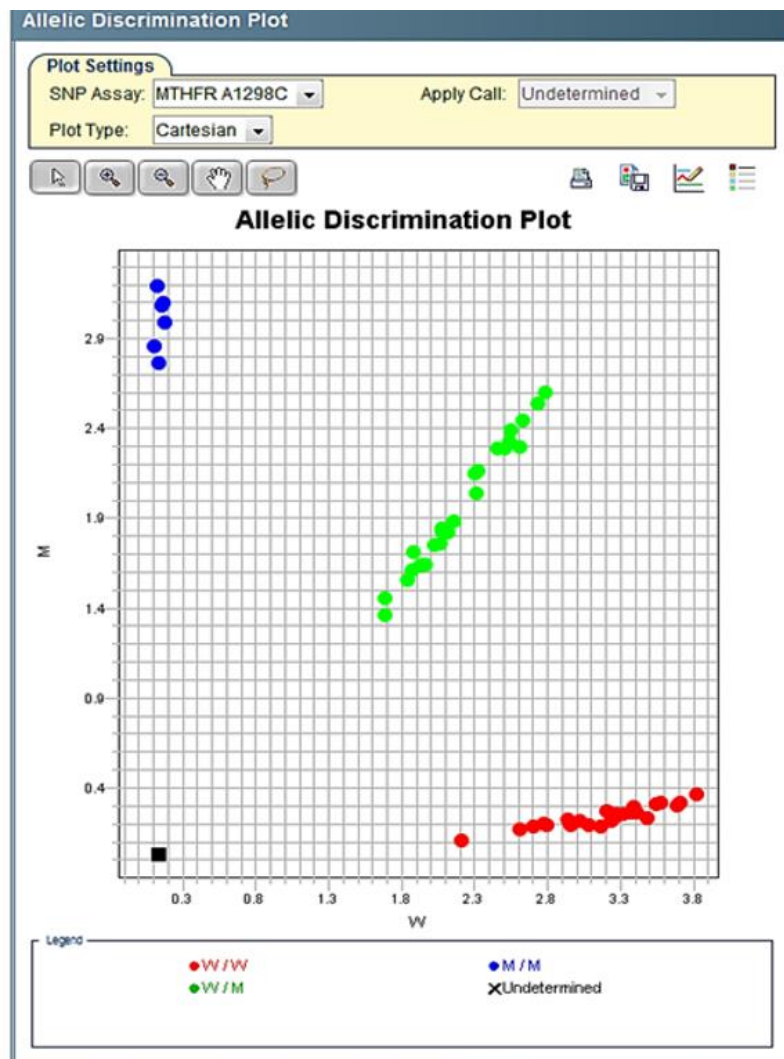
Real-time PCR tehnologija je visoko automatizirana, pri čemu uređaj kontinuirano mjeri fluorescenciju u uzorcima, a software te podatke analizira. Za genotipizaciju mutacija C677T i A1298C gena za MTHFR u ovom radu korišten je uređaj ABI Prism 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, SAD).

3.3.1. Alelna diskriminacija

Za određivanje genotipa na temelju fluorescencije korišten je test alelne diskriminacije, koji određuje genotip na temelju točkaste mutacije SNP u ciljnoj sekvenci. U reakciji se koriste dvije fluorescentne TaqMan sonde, svaka komplementarna pojedinom alelu SNP te obilježena drugim fluoroforom koje emitiraju različitu fluorescenciju. Iz omjera intenziteta fluorescencije reporter boja kojima su označene sonde može se odrediti koji se alel dominantno umnožava. Jedna fluorescentna sonda veže se na tip bez mutacije (engl. wild) i označava kao alel 1, a druga se veže na mjesto mutacije i označava kao alel 2. Test alelne diskriminacije razvrstava nepoznate uzorke na homozigote (uzorci imaju alel 1 ili alel 2) i heterozigote (uzorci koji imaju oba alela: 1 i 2) (Gibson, 2006).

Signal fluorescencije za svaki uzorak smješta se u graf, gdje se detektiraju tri moguća genotipa mutacije. Na osi x prikazani su uzorci umnoženi kao normalni aleli bez mutacije (W,

označeni crvenom bojom), a na osi y uzorci s mutacijom (M, označeni plavom bojom), dok su uzorci heterozigota s jednim normalnim, a drugim mutiranim alelom smješteni u sredini grafa (označeni zelenom bojom). Uzorak negativne kontrole (amplifikacija bez ciljne sekvence) prikazan je kao crni kvadratić na dnu lijeve strane grafa (Slika 4.).



Slika 4. Prikaz rezultata alelne diskriminacije nakon provedenog real-time PCR umnožavanja za MTHFR A1298C mutaciju na uređaju AB 7500 (ispis rezultata s uređaja ABI Prism 7500 Real-time PCR system)

3.3.2. Reagensi za izvođenje RT-PCR metode

Univerzalni TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems, SAD)

Custom TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, SAD) - početnice i sonde sadržane su u test kompletu:

- 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)

MicroAmp Optical Tube (0.2 ml) (Applied Biosystems, SAD) - optičke epruvete za PCR reakciju

MicroAmp Optical Cap (Applied Biosystems, SAD) - čepovi za optičke epruvete

nastavci s filterom 2-100 μ l (Eppendorf, Njemačka)

nastavci s filterom 0.1-10 μ l (Eppendorf, Njemačka)

3.3.3. Postupak pripreme RT-PCR reakcijske smjese

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 μ l Univerzalni TaqMan Master Mix

0,63 μ l TaqMan SNP početnice i sonde

8,87 μ l Bidestilirana voda

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

Svaki uzorak je ukupnog volumena 25 μ l. U svakoj seriji uz reakcijske smjese nepoznatih uzoraka, kao dio procesne kontrole stavljaju se negativna kontrola (s bidestiliranom vodom umjesto izolata genomske DNA) i 3 pozitivne kontrole izolata genomske DNA s poznatim genotipom za mutacije C677T/A1298C (divlji tip - bez mutacije, heterozigotni tip - samo jedan mutirani alel, homozigotni tip - oba mutirana alela). Nakon završenog pipetiranja epruvete se zatvore čepovima i stavljaju u uređaj za real-time PCR. Odabirom programa

definišu se uvjeti reakcije i započinje umnožavanje. Prati se porast fluorescencije u odnosu na broj ciklusa umnožavanja.

3.3.4. Program za real-time umnožavanje mutacija u genu za MTHFR

Tablica 2. Dijelovi RT-PCR reakcije

UVJETI REAKCIJE PCR	TEMPERATURA	VRIJEME
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	

3.4. Statističke metode

Dobiveni rezultati prikazani su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Odnos kategorijskih varijabli testiran je χ^2 -testom i pomoću omjera izgleda (OR) uz 95 % granice pouzdanosti (CI). Razlike učestalosti pojedinih alela između promatranih skupina određene su Testom razlika proporcija.

Razina statističke značajnosti postavljena je na 0,05 u svim analizama. Rezultati skupine bolesnika se smatraju statistički značajnim u odnosu na kontrolnu skupinu ako je $p < 0,05$. Za analizu je korišten statistički program MedCalc Software version 14.8.1.

4. REZULTATI I RASPRAVA

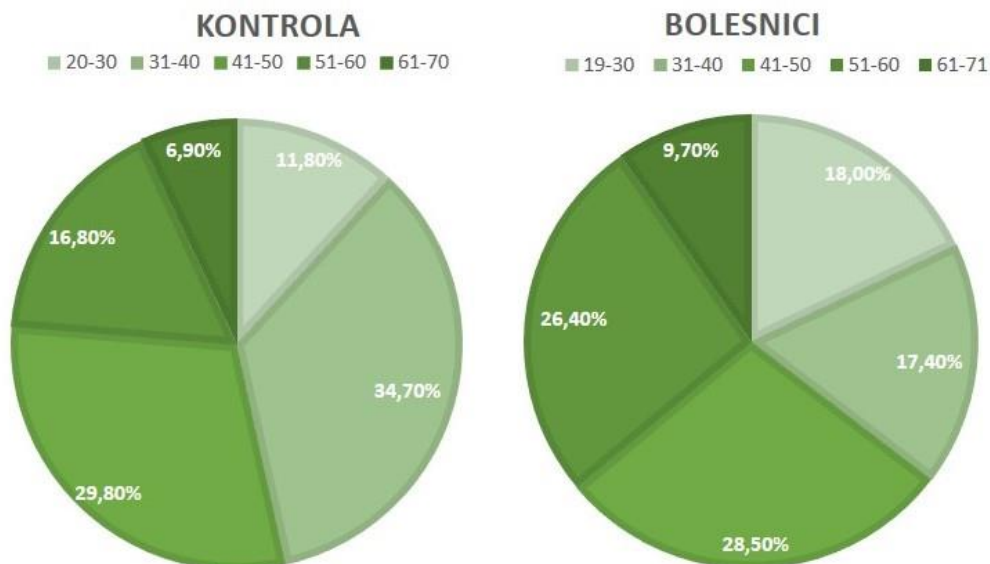
Istraživanje obuhvaća dvije skupine ispitanika. Jednu sačinjavaju bolesnici s psihičkim poremećajima, a drugu kontrolnu - zdravi DDK. U skupini bolesnika bilo je ukupno 155 ispitanika, a u kontrolnoj skupini 101 ispitanik.

4.1. Demografska struktura ispitanika

Tablica 3. Raspodjela ispitanika prema spolu

Spol	Kontrole (n) %	Pacijenti (n) %
ženski	48 (47,5)	75 (50,0)
muški	53 (52,5)	75 (50,0)
Ukupno (n)	101	150

Raspodjelom podataka prema spolu (Tablica 3.) vidljiva je podjednaka zastupljenost među spolovima u obje ispitivane skupine. (Za 5 ispitanika nije naveden spol, pa takvi nisu uzeti u obzir u prethodnoj tablici).



Slika 5. Raspodjela predstavnika kontrolne skupine i ispitivne skupine prema dobi

Najveći broj DDK, predstavnika kontrolne skupine bilo je u dobi između 31-40 godine (34,70 %), a nešto manje u dobi između 41-50 (29,8 %) godine života. Najveći broj bolesnika bilo je u dobi između 41-51 godine (28,50 %), a nešto manje u dobi između 51-60 godine života (26,40 %).

Treba naglasiti da je potpuna usporedba i analiza dvije ispitivane skupine prema dobi statistički nevjerodostojna, iz razloga što se te skupine razlikuju. DDK kao predstavnici zdrave populacije mogu darivati krv samo u rasponu dobi od 18 do 70 godina, dok skupina bolesnika nema dobne granice.

4.2. Statistička analiza rezultata

4.2.1. Učestalost pojedinih genotipova mutacije C677T u genu za MTHFR

Tablica 4. prikazuje učestalost pojedinih genotipova C677T mutacije u genu za MTHFR u skupini pacijenata s psihičkim poremećajima i kontrolnoj skupini. C677T genotipovi prikazani su: homozigotni nositelji za normalne alele C bez mutacije kao CC, heterozigotni nositelji s jednim normalnim, a drugim mutiranim alelom kao CT, homozigotni nositelji alela T s mutacijom kao TT. U skupini bolesnika učestalost TT genotipa iznosi 9,0 %, dok je u kontrolnoj skupini učestalost TT genotipa veća i iznosi 11,9 %. Prikazana je i zasebno učestalost C i T alela. Učestalost mutiranog T alela je kod pacijenata iznosila 33,5 %, dok je kod kontrola bila vrlo slična 34,1 %.

Tablica 4. Učestalost C677T genotipova i alela u genu za MTHFR

MUTACIJA	ALELI	BOLESNICI N (%)	KONTROLNA SKUPINA N (%)	OR (95 % CI) ^a	<i>p</i>
677 (C>T) MTHFR genotipovi	<i>MTHFR</i> (CC)	66 (43)	44 (43,5)	1,04 (0,628-1,727)	0,876
	<i>MTHFR</i> (CT)	74 (48)	45 (44,6)		
	<i>MTHFR</i> (TT)	15 (9)	12 (11,9)		
Alel	C	206 (66,5)	133 (65,8)	0,973 (0,669-1,415)	0,887
	T	104 (33,5)	69 (34,1)		

^a Za divlji tip vs. heterozigot+homozigot

Prema prikazu raspodjele pojedinih 677 (C>T) genotipova u genu za MTHFR i učestalosti pojedinih alela, a prema izračunu omjera izgleda uz 95 % interval pouzdanosti (OR 95 % CI), nije dokazana statistički značajna razlika u pojavnosti pojedinih genotipova i alela kod bolesnika s psihičkim bolestima i kontrolne skupine ($p=0,876$, $p=0,887$).

Tablica 5. prikazuje učestalost pojedinih genotipova za C677T mutaciju u genu za MTHFR u skupini pacijenata s psihičkim poremećajima i kontrolnoj skupini s obzirom na spol.

Tablica 5. Učestalost C677T genotipova u genu za MTHFR prema spolu

MUTACIJA	ALELI	BOLESNICI N (%)				KONTROLNA SKUPINA N (%)			
SPOL		M	Ž	X^2 (df=1) ^a	<i>p</i>	M	Ž	X^2 (df=1) ^a	<i>p</i>
677 (C>T) MTHFR	<i>MTHFR</i> (CC)	36	26	2,98	0,085	25	19	0,58	0,445
	<i>MTHFR</i> (CT)	34	39			23	22		
	<i>MTHFR</i> (TT)	5	10			5	7		

^a Za divlji tip vs. heterozigot+homozigot

χ kvadrat- testom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između genotipa bez mutacije, CC, i genotipa s mutacijom, 677TT, između žena i muškaraca, bez obzira radi li se o skupini bolesnika ili kontrolnoj skupini.

Pojavnost pojedinih genotipova za mutaciju 677 gena za MTHFR ne razlikuje se ni između promatranih skupina, niti između spolova. Također nema razlike u pojavnosti T alela između promatranih skupina i između spolova.

4.2.2. Učestalost pojedinih genotipova mutacije A1298C u genu za MTHFR

Tablica 6. prikazuje učestalost pojedinih genotipova za A1298C mutaciju u genu za MTHFR u skupini pacijenata s psihičkim poremećajima i kontrolnoj skupini. C677T genotipovi prikazani su: homozigotni nositelji za normalne alele A bez mutacije kao AA, heterozigotni nositelji s jednim normalnim, a drugim mutiranim alelom kao AC, homozigotni nositelji alela C s mutacijom kao CC. U skupini bolesnika učestalost CC genotipa iznosi 5,8 %, dok u kontrolnoj skupini učestalost CC genotipa iznosi 10,8 %. Učestalost mutiranog C alela je kod pacijenata iznosila 30,6 %, dok je kod kontrola iznosila 33,2 %.

Tablica 6. Učestalost MTHFR A1298C genotipova i alela

MUTACIJA	ALELI	BOLESNICI N (%)	KONTROLNA SKUPINA N (%)	OR (95 % CI) ^a	<i>p</i>
1298 (A>C) MTHFR	<i>MTHFR</i> (AA)	69(44,5)	45 (44,6)	1,002 (0,605-1,658)	0,995
	<i>MTHFR</i> (AC)	77(49,7)	45 (44,6)		
	<i>MTHFR</i> (CC)	9(5,8)	11 (10,8)		
Alel	A	215(69,4)	135(66,8)	1,123 (0,605-1,658)	0,549
	C	95(30,6)	67(33,2)		

^a Za divlji tip vs. heterozigot+homozigot

Prema prikazu raspodjele pojedinih 1298 (A>C) genotipova gena za MTHFR i učestalosti pojedinih alela, a prema izračunu OR 95 % CI, nije dokazana statistički značajna razlika u pojavnosti pojedinih genotipova i alela kod bolesnika s psihičkim bolestima i kontrolne skupine (p=0,995, p=0,549).

Tablica 7. prikazuje učestalost pojedinih genotipova za A1298C mutaciju u genu za MTHFR u skupini pacijenata s psihičkim poremećajima i kontrolnoj skupini s obzirom na spol.

Tablica 7. Učestalost A1298C genotipova u genu za MTHFR prema spolu

MUTACIJA	ALELI	BOLESNICI N (%)				KONTROLNA SKUPINA N (%)			
		M	Ž	X^2 (df=1) ^a	p	M	Ž	X^2 (df=1) ^a	p
SPOL									
1298 (A>C) MTHFR	<i>MTHFR</i> (AA)	29	39	2,67	0,102	22	23	0,41	0,520
	<i>MTHFR</i> (AC)	40	34			24	21		
	<i>MTHFR</i> (CC)	6	2			7	4		

^a Za divlji tip vs. heterozigot+homozigot

χ kvadrat- testom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između genotipa bez mutacije, AA, i genotipa s mutacijom, 1298 CC, između žena i muškaraca, bez obzira radi li se o skupini bolesnika ili kontrolnoj skupini.

Pojavnost pojedinih 1298 genotipova gena za MTHFR ne razlikuje se značajno između promatranih skupina kao ni između spolova. Također nema razlike u pojavnosti C alela ni između promatranih skupina niti između spolova.

Treba napomenuti da broj kod žena i muškaraca ne odgovara ukupnom N =155, jer kod nekih bolesnika nije naveden spol. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da nema statistički značajnih razlika u pojavnosti kako pojedinih genotipova gena za MTHFR, tako i pojedinih alela, uz p>0,05.

4.3. Rasprava

Psihičke bolesti kao što su shizofrenija, depresija, bipolarni poremećaj, nastaju kao rezultat složenih međudjelovanja genetičkih i okolišnih čimbenika, a povezani su s niskim statusom folata i hiperhomocisteinemijom (Mattson i Shea, 2003). U studijama koje su istraživale povezanost genetičkih čimbenika s rizicima za nastanak psihičkih bolesti, utvrđeni su neki enzimi i proteini čiji polimorfizmi bi mogli biti uključeni u patogenezu psihičkih bolesti jer utječu na promijenjeni metabolizam homocisteina. Enzimi uključeni u patogenezu psihičkih bolesti su MTHFR, cistationin- β -sintaza (C β S), transkobalamin-2-receptor (TCN2), metionin-sintaza-reduktaza (MTRR) (Mitchell i sur., 2014; Eum i sur., 2017).

Hiraoka i Kagawa proučavali su utjecaj polimorfizama u genu za MTHFR na koncentraciju folata. Statistički značajne rezultate dobili su za C677T mutaciju. Pokazalo se da osobe s TT genotipom imaju značajno višu koncentraciju homocisteina i nižu koncentraciju folata u plazmi u odnosu na osobe CT i CC genotipa (Hiraoka i Kagawa, 2017). Istraživanje koje su proveli Li i suradnici u multicentričnoj studiji provedenoj na 480 osoba kineske populacije također je pokazalo nižu koncentraciju folata kod osoba s 677TT genotipom, dok je kod osoba s 1298 CC i AC genotipom zabilježena viša koncentracija folata u odnosu na koncentraciju kod osoba s divljim tipom alela (Li i sur., 2015). Mutacija A1298C smještena je u regulatornoj domeni S-adenozil-metioninskog veznog mjesta, pa ne dolazi do sinteze termolabilnog enzima i većeg utjecaja na koncentraciju serumskog folata. Iako utjecaj A1298C mutacije na serumsku koncentraciju folata pokazuje različite rezultate i zahtijeva daljnja istraživanja, čini se da genotipovi 1298AC i 1298CC mogu biti protektivni čimbenik koji smanjuje rizik od deficita folata (Li i sur., 2015).

S obzirom da se polimorfizmi gena za MTHFR smatraju glavnim čimbenikom koji utječe na koncentraciju folata u plazmi uključenih u patogenezu psihičkih bolesti ovo preliminarno istraživanje je provedeno kako bi se ispitala povezanost mutacija C677T i A1298C s rizikom za nastanak psihičkih bolesti u hrvatskoj populaciji.

Ova je studija obuhvatila 155 ispitanika oboljelih od psihičkih bolesti miješane etiologije. Statistička analiza demografskih podataka nije pokazala značajnu razliku u dobi i spolu između oboljelih od psihičkih bolesti i kontrolne skupine. Analiza dobivenih rezultata koja

obuhvaća pojavnost genotipova i alela za obje ispitivane mutacije C677T i A1298C χ^2 testom, te usporedbu omjera izgleda uz 95 % CI, pokazala je da nema statistički značajne razlike u učestalosti genotipova između skupine oboljelih i kontrolne skupine ($P>0,05$).

Rezultati ranije provedenih studija utjecaja C677T i A1298C mutacija u genu za MTHFR na pojavu psihičkih bolesti u različitim etničkim i geografskim skupinama ispitanika pokazuju različite rezultate. Studija Kempistyja i suradnika provedena u poljskoj populaciji 2006. godine, kod 200 pacijenata s bipolarnim poremećajem, 200 pacijenata s shizofrenijom i 300 kontrola, pokazala je da C677T polimorfizam donosi povećan rizik za nastanak navedenih bolesti (za bipolarni poremećaj $P=0,0003$, za shizofreniju $P=0,0020$) (Kempisty i sur., 2006). Povezanost C677T mutacije i pojave depresije istraživali su Sayadi i suradnici 2016. godine u populaciji Tunižana. Istraživanje je provedeno kod 208 pacijenata s dijagnosticiranom depresijom i 187 kontrola koje su činile osobe bez psihičkih i somatskih bolesti. Sukladno rezultatima naše studije nije utvrđena statistički značajna povezanost C677T mutacije i pojave depresije (Sayadi i sur., 2016). Slična studija provedena je i na populaciji Amerikanaca bijele rase s 82 oboljela i 74 kontrole, a rezultati također ne ukazuju na postojanje statistički značajne povezanosti između C677T mutacije gena za MTHFR i pojave depresije ($P=0,408$) (Lizer i sur., 2011).

Meta analiza Wu i suradnika provedena 2013. godine imala je za cilj ispitati povezanost između C677T polimorfizma u genu za MTHFR i depresije analizom rezultata 26 studija koje uključuju ukupno 4992 oboljela od depresije i 17082 kontrolna uzorka. Rezultati ukazuju da C677T genotip pridonosi povećanom riziku od depresije u cjelokupnoj populaciji (alel T vs. C: $OR=1,13$, 95 % $CI=1,07-1,32$; TT vs. CC: $OR=1,42$, 95 % $CI=1,16-1,75$). Analize prema etnicitetu pokazuju povezanost C677T genotipa kod azijske populacije, dok su za populaciju bijelaca rezultati granični (Wu i sur., 2013).

Rai i suradnici proveli su 2017. godine meta analizu povezanosti A1298C mutacije gena za MTHFR s rizikom od pojave shizofrenije analizom 19 studija koje proučavaju pojavnost 1298 (A>C) genotipa gena za MTHFR kod bolesnika a shizofrenijom. Studije su provedene u različitim zemljama (Koreja, Kina, Rumunjska, Turska, Bugarska, Danska, Njemačka, Norveška, Poljska, Škotska, Španjolska, Švedska, Sirija). Rezultati meta analize potvrdili su postojanje značajne povezanosti A1298C mutacije i razvoja shizofrenije (C vs. A alel: $OR=1,13$, 95 % $CI=1,01-1,27$, $P=0,02$; CC vs. AA: $OR=1,20$, 95 % $CI=1,03-1,39$, $P=0,02$)

(Rai i sur., 2017). Kako bi se ispitala povezanost MTHFR C677T mutacije i pojave bipolarnog poremećaja provedena je meta-analiza 2006. godine koja je uključivala 4 studije. Nije potvrđena statistički značajna povezanost između C677T polimorfizma i bipolarnog poremećaja (Zintzaras 2006).

Zbog složene patogeneze nastanka psihičkih poremećaja, malo je vjerojatno da će polimorfizam u jednoj bazi jednog gena odražavati povećani rizik za razvoj poremećaja, bez međudjelovanja ostalih genskih i okolišnih čimbenika. Genski i okolišni čimbenici različiti su u svakoj populaciji pa se i njihov utjecaj na pojavu psihičkih poremećaja razlikuje (Wu i sur., 2013). Ograničenje naše studije su relativno mali brojevi ispitanih bolesnika, iako su rezultati očekivani i u skladu s meta-analizom za C677T mutaciju u genu za MTHFR i povezanosti sa psihičkim oboljenjima na bjelačkoj populaciji ispitanika, dok su rezultati povezanosti mutacije A1298C vrlo nedostatni za usporedbu.

Iako u literaturi postoje kontradiktorni podaci o varijantama enzima MTHFR-a, hiperhomocisteinemiji i riziku za psihičke bolesti; nije upitno da homocistein štetno djeluje na neurone, krvne žile i moždanu cirkulaciju i na taj način doprinosi padu kognitivne funkcije, demenciji i depresiji. S druge strane, dugotrajno pezystirajući visoki homocistein u plazmi kao posljedica mutacija gena za MTHFR može dovesti do disfunkcije metilacijskih metaboličkih puteva koji su neophodni za sintezu noradrenalina i serotonina, uz neurocitotoksičnost, i oksidativni stres što opet vodi ka razvoju promjena raspoloženja te psihičkih oboljenja u kasnijoj dobi (da Silva, 2017).

Spoznajom uloge promijenjene katalitičke aktivnosti MTHFR u patogenezi dijabetesa, psorijaze, karcinoma, psihičkih, kardiovaskularnih i ostalih bolesti otvaraju se nove terapijske mogućnosti. Suplementacija folatima dobiva na značaju u terapiji psihički oboljelih pacijenata s polimorfizmima MTHFR-a, otkako se pokazalo da pridonosi smanjenju negativnih simptoma shizofrenije i ublažava simptome bolesti, a suplementacija folatima od 400 µg dnevno pomaže u prevenciji psihičkih bolesti jer održava razinu folata i homocisteina na razini jednakoj osobama bez mutacija u genu za MTHFR. Također suplementacija kod trudnica može smanjiti incidenciju defekta neuralne tube, a time i incidenciju shizofrenije. Time identifikacija uloge MTHFR-a i polimorfizama gena za MTHFR u bolesnika koji reagiraju ili ne reagiraju na tradicionalnu farmakološku terapiju dobiva važnu ulogu u uspostavi personaliziranog liječenja psihičkih bolesti (Wan i sur., 2018; Hiraoka i Kagawa,

2017). Suplementacija riboflavinom kod osoba s povišenim krvnim tlakom, a koji imaju 677TT genotip možda otvara mogućnost nefarmakološkog liječenja hipertenzije jer dovodi do smanjenja krvnog tlaka za 6 do 13 mmHg (McNulty i sur., 2016). Toksičnost terapije metotreksatom kod pacijenata s psorijazom povećana je kod osoba 677TT genotipom (Chandran i sur., 2010). Drugim riječima, ispitivanje MTHFR genotipa pacijenata korak je prema personaliziranoj terapiji gdje za svakog pacijenta ponaosob prognoziramo odgovor na određenu terapiju kako bismo poboljšali učinkovitost terapije i smanjili negativne pojave koje se mogu javiti za vrijeme terapije (Wu i Reynolds, 2016).

5. ZAKLJUČCI

1. Cilj ovog ispitivanja bio je utvrditi postoji li povezanost mutacija C677T i A1298C u genu za MTHFR s razvojem psihičkih bolesti u hrvatskoj populaciji. Statistička obrada dobivenih rezultata nije utvrdila postojanje statistički značajne razlike u pojavnosti genotipova CC, CT i TT mutacije C677T (OR 1,04; 95 % CI 0,628-1,727), odnosno AA, AC i CC mutacije A1298C između skupine oboljelih od psihičkih bolesti i skupine zdravih ispitanika. Za A1298C mutaciju (OR 1,002; 95 % CI 0,605-1,658). Također, rezultati pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u pojavnosti C i T, odnosno A i C alela između ispitivanih skupina. Istraživanje nije potvrdilo povezanost C677T i A1298C polimorfizma s razvojem psihičkih bolesti u ispitivanoj populaciji.
2. Rezultati našeg istraživanja u skladu su s rezultatima dosada provedenih istraživanja na populaciji bijelaca koji također ne pokazuju statistički značajnu povezanost mutacija C677T i A1298C u genu za MTHFR s pojavom psihičkih bolesti, iako je dokazano da polimorfizmi gena za MTHFR utječu na razine folata i homocisteina i imaju određenu ulogu u patogenezi psihičkih bolesti.
3. Potrebne su daljnje studije na većem broju ispitanika kako bi se u potpunosti utvrdila uloga *MTHFR* gena kao jednog od najvažnijih enzima u metabolizmu homocisteina, folata, vitamina B6 i B12 u patogenezi psihičkih bolesti u hrvatskoj populaciji.

6. LITERATURA

1. Begić D, Jukić V, Medved V. Psihijatrija. Zagreb, Medicinska naklada, 2015, str. 110, 128-135, 138, 142-159, 160-161, 166-172, 260-262, 339.
2. Chandran V, Siannis F, Rahman P, Pellett FJ, Farewell VT, Gladman DD. Folate pathway enzyme gene polymorphisms and the efficacy and toxicity of methotrexate in psoriatic arthritis. *J Rheumatol*, 2010, 37, 1508-12.
3. Chapman J, Jamil RT, Fleisher C. Borderline Personality Disorder. StatPearls Publishing, 2019, Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430883/>.
4. Charlson F, van Ommeren M, Flaxman A, Cornett J, Whiteford H, Saxena S. New WHO prevalence estimates of mental disorders in conflict settings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 2019, pii: S0140-6736(19)30934-1.
5. Cheffer A, Castillo ARG, Corrêa-Velloso J, Gonçalves MCB, Naaldijk Y, Nascimento IC, Burnstock G, Ulrich H. Purinergic system in psychiatric diseases. *Mol Psychiatry*, 2018, 23, 94-106.
6. Čačev T, Kapitanović S. Određivanje genotipova polimorfizama u jednoj bazi (SNP) metodom TaqMan real-time PCR. U: Metode u molekularnoj biologiji. Zagreb, Institut Ruđer Bošković, 2007, str. 389.
7. Da Silva VC, de Oliveira AC, D'Almeida V. Homocysteine and Psychiatric Disorders, *Journal of Inborn Errors of Metabolism & Screening*, 2017, 5, 1–8.
8. England MJ, Sim LJ. Depression in Parents, Parenting, and Children: Opportunities to Improve Identification, Treatment, and Prevention. U: The etiology of depression. National Academies Press, US, 2009, pii: NBK215118/.

9. Euma S, Kristian Hillb S, Rubinc LH, Carnahand RM, Reillye JL, Ivlevaf EI, Keedyg SK, Tammingaf CK, Pearlsonh GD, Clementzi BA, Gershong ES, Keshavanj MS, Keefek RSE, Sweeneyl JA, Bishop JR. Cognitive burden of anticholinergic medications in psychotic disorders. *Schizophr Res*, 2017, 190, 129–135.
10. Fan S, Yang B, Zhi X, Wang Y, Zheng Q, Sun G. Combined genotype and haplotype distributions of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms. *Medicine*, 2016, 95, pii: md.00000000000005355.
11. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard AC, 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. *Nat Genet*, 1995, 10, 11-13.
12. Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 363, 32-47.
13. Hiraoka M, Kagawa Y. Genetic polymorphisms and folate status. *Congenital Anomalies*, 2017, 57, 142–149.
14. Huemer M, Mulder-Bleile R, Burda P, Froes DS, Suormala T, Zeev BB, Fowler B. Clinical pattern, mutations and in vitro residual activity in 33 patients with severe 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2015, 39, 115–124.
15. Katzung BG, Basic & clinical pharmacology, McGraw-Hill Education, 2018, str. 403-404, 511-520, 524-525, 533, 536-538, 575-576.
16. Kempisty B, Mostowska A, Gorska I, Luczak M, Czerski P, Szczepankiewicz A, Hauser J, Jagodzinski PP. Association of 677C>T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene with bipolar disorder and schizophrenia. *Neurosci Lett*, 2006, 400, 267-271.

17. Kuzman M. Međunarodna klasifikacija bolesti i srodnih zdravstvenih problema. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 2012, str. 267-318.
18. Li WX, Dai SX, Zheng JJ, Liu JQ, Huang LF. Homocysteine Metabolism Gene Polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) Jointly Elevate the Risk of Folate Deficiency. *Nutrients*, 2015, 7, 6670-6687.
19. Liew FC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet*, 2015, 58, 1-10.
20. Lizer MH, Bogdan RL, Kidd RS. Comparison of the Frequency of the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Polymorphism in Depressed Versus Nondepressed Patients. *J Psychiatr Pract*, 2011, 17, 404-409.
21. Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*, 2003, 26, 137-146.
22. McNulty H, Strain JJ, Hughes CF, Ward M. Riboflavin, MTHFR genotype and blood pressure: A personalized approach to prevention and treatment of hypertension. *Mol Aspects Med*, 2017, 53, 2-9.
23. Mitchell ES, Conus N, Kaput J. B vitamin polymorphisms and behavior: Evidence of associations with neurodevelopment, depression, schizophrenia, bipolar disorder and cognitive decline. *Neurosci Biobehav Rev*, 2014, 47, 307-320.
24. Odjel za mentalne poremećaje, 2018., <http://www.hzjz.hr>, pristupljeno 15. 6. 2019.
25. Prochaska JJ, Benowitz NL. The Past, Present, and Future of Nicotine Addiction Therapy. *Annu Rev Med*, 2006, 67, 467-486.
26. Psychopharmacology Institute, 2019., <http://www.psychopharmacologyinstitute.com>, pristupljeno 18. 6. 2019.

27. Rai V, Yadav U, Kumar P, Yadav SK, Gupta S. Methylenetetrahydrofolate reductase A1298C genetic variant & risk of schizophrenia: A meta-analysis. *Indian J Med Res*, 2017, 145, 437-447.
28. Saka C. An Overview of Analytical Methods for the Determination of Monoamine Oxidase Inhibitors in Pharmaceutical Formulations and Biological Fluids. *Crit Rev Anal Chem*, 2016, 47, 1–23.
29. Sayadi MA, Achour O, Ezzaher A, Hellara I, Omezzine A, Douki W, Bousslama A, Gaha L, Najjar MF. CT genotype of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism is protector factor of major depressive disorder in the Tunisian population: a case control study. *Ann Gen Psychiatry*, 2016, 15, 18.
30. Silobrčić Radić M, Hrabak-Žerjavić V, Tomić B. Mentalne bolesti i poremećaji u Republici Hrvatskoj. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 2004, str. 1-2.
31. Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, Sopková J, Drgová A, Červeňová T, Lehotský J. (2016). The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *Int J Mol Sci*, 2016, 17, 1733.
32. Yang Y, Ligthart L, Terwindt GM, Boomsma DI, Rodriguez-Acevedo AJ, Nyholt DR. Genetic epidemiology of migraine and depression. *Cephalalgia*, 2016, 36, 679–691.
33. Wan L, Li Y, Zhang Z, Sun Z, He Y, Li R. Methylenetetrahydrofolate reductase and psychiatric diseases. *Translational Psychiatry*, 2018, 8, 242.
34. Wu KCP, Reynolds NJ. CARD14 mutations may predict response to antitumour necrosis factor- α therapy in psoriasis: a potential further step towards personalized medicine. *Br J Dermatol*, 2016, 175, 17–18.
35. Zintzaras Z. C677T and A1298C methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in schizophrenia, bipolar disorder and depression: a meta-analysis of genetic association studies. *Psychiatr Genet*, 2006, 16, 105–115.

7. SAŽETAK

Psihički poremećaji su poremećaji funkcije neurotransmitora u mozgu koji dovode do nastanka kognitivnih, emocionalnih ili bihevioralnih disfunkcija. U svijetu preko 80 milijuna ljudi pati od psihičkih bolesti, a svake godine broj oboljelih se povećava. Do njihovog razvoja dolazi utjecajem genetičkih čimbenika, okolišnih čimbenika i kroničnog stresa. Kod oboljelih uzrokuju svakodnevnu subjektivnu patnju i smanjuju radnu sposobnost, kvalitetu života bolesnika, ali i njegove okoline.

Metilentetrahidrofolat-reduktaza (MTHFR) je enzim koji ima značajnu ulogu u metabolizmu folata i metilaciji DNA, preko kojih utječe na sintezu neurotransmitora. Promijenjen metabolizam folata patofiziološka je podloga za nastanak psihičkih bolesti. Jedan od uzroka promijenjenog metabolizma folata je smanjena katalitička aktivnost MTHFR-a, kao posljedica genskog polimorfizma. Najznačajnije mutacije u genu za MTHFR povezane s razvojem psihičkih bolesti su C677T i A1298C. Ovo istraživanje je provedeno na 155 hospitaliziranih bolesnika Psihijatrijske bolnice „Sveti Ivan“ u Zagrebu i 101 zdravom dobrovoljnom darivatelju krvi sa svrhom ispitivanja povezanosti mutacija C677T i A1298C gena za MTHFR s razvojem psihičkih bolesti u hrvatskoj populaciji. Svim ispitanicima uzet je uz informirani pristanak uzorak periferne krvi s K2EDTA antikoagulansom. Provedena je izolacija DNA uz pomoć komercijalnog test kompleta QIAamp DNA Blood mini QIAcube kit (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka) na QIAcube uređaju i određivanje genotipova mutacija C677T i A1298C pomoću lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu i alelne diskriminacije. Rezultati su podvrgnuti statističkoj usporedbi pomoću χ^2 -testa, omjera izgleda (OR) uz 95 % granice pouzdanosti (CI) i testom razlika proporcija.

Prema statističkoj usporedbi nije dokazana statistički značajna razlika u pojavnosti pojedinih genotipova i alela kod bolesnika s psihičkim bolestima i kontrolne skupine, za C677T mutaciju (OR 1,04; 95 % CI 0,628-1,727), za A1298C mutaciju (OR 1,002; 95 % CI 0,605-1,658). Rezultati ovog istraživanja nisu pokazali povezanost ispitivanih mutacija u genu za MTHFR s pojavnnošću psihičkih bolesti na ispitivanom uzorku hrvatske populacije.

Ključne riječi: MTHFR-metilentetrahidrofolat-reduktaza, C677T i A1298C mutacije, psihičke bolesti

7. SUMMARY

Psychiatric disorders are neurotransmitter function disorders in the brain that lead to cognitive, emotional or behavioral dysfunction. In the world, over 80 million people suffer from mental illness, and each year the number of patients is increasing. Their development is influenced by genetic factors, environmental factors and chronic stress. Psychiatric disorders cause everyday subjective suffering and reduce work ability, quality of life of a patient, but also his / her environment.

Methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) is an enzyme that plays a significant role in the metabolism of folate and methylation of DNA, which it affects the synthesis of neurotransmitters. Changed folate metabolism is a pathophysiological basis for the development of mental illness. One of the causes of the changed metabolism of folate is reduced activity of the MTHFR enzyme as a consequence of gene polymorphism. The most significant MTHFR mutations associated with the development of psychiatric diseases are C677T and A1298C. This study was conducted on 155 hospitalized patients of the Psychiatric Hospital "Sveti Ivan" in Zagreb and 101 healthy volunteer blood donors to examine the correlation of MTHFR C677T and A1298C mutations with the development of mental illnesses in Croatian population. All subjects was taken a peripheral blood sample with K2EDTA anticoagulant with informed consent. DNA isolation with a commercial test kit QIAamp DNA Blood mini QIAcube kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) on the QIAcube device was performed and MTHFR mutation genotypes were detected by real-time chain reaction polymerase and allelic discrimination. Results were subjected to statistical comparison by χ^2 -test, odds ratio (OR) with 95 % confidence interval (CI) and with proportional difference test.

There was no statistically significant difference in the occurrence of individual genotypes and alleles in patients with mental illness and control group, C677T mutation (OR 1,04, 95 % CI 0,628-1,727), A1298C mutation (OR 1,002, 95 % CI 0,605 -1,658). The results of this study did not demonstrate the correlation of both MTHFR mutations with the occurrence of mental illnesses on the examined sample of the Croatian population.

Key words: MTHFR-methyltetrahydrofolate-reductase, C677T and A1298C mutations, psychiatric disorders

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ISPITIVANJE POJAVNOSTI MUTACIJA C677T I A1298C U GENU ZA METILENTETRAHIDROFOLAT-REDUKTAZU U OSOBA OBOLJELIH OD PSIHIČKIH BOLESTI

Kristina Benjak

SAŽETAK

Psihički poremećaji su poremećaji funkcije neurotransmitora u mozgu koji dovode do nastanka kognitivnih, emocionalnih ili bihevioralnih disfunkcija. U svijetu preko 80 milijuna ljudi pati od psihičkih bolesti, a svake godine broj oboljelih se povećava. Do njihovog razvoja dolazi utjecajem genetičkih čimbenika, okolišnih čimbenika i kroničnog stresa. Kod oboljelih uzrokuju svakodnevnu subjektivnu patnju i smanjuju radnu sposobnost, kvalitetu života bolesnika, ali i njegove okoline.

Metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) je enzim koji ima značajnu ulogu u metabolizmu folata i metilaciji DNA, preko kojih utječe na sintezu neurotransmitora. Promijenjen metabolizam folata patofiziološka je podloga za nastanak psihičkih bolesti. Jedan od uzroka promijenjenog metabolizma folata je smanjena katalitička aktivnost MTHFR-a, kao posljedica genskog polimorfizma. Najznačajnije mutacije u genu za MTHFR povezane s razvojem psihičkih bolesti su C677T i A1298C. Ovo istraživanje je provedeno na 155 hospitaliziranih bolesnika Psihijatrijske bolnice „Sveti Ivan“ u Zagrebu i 101 zdravom dobrovoljnom darivatelju krvi sa svrhom ispitivanja povezanosti mutacija C677T i A1298C gena za MTHFR s razvojem psihičkih bolesti u hrvatskoj populaciji. Svim ispitanicima uzet je uz informirani pristanak uzorak periferne krvi s K2EDTA antikoagulansom. Provedena je izolacija DNA uz pomoć komercijalnog test kompleta QIAamp DNA Blood mini QIAcube kit (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka) na QIAcube uređaju i određivanje genotipova mutacija C677T i A1298C pomoću lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu i alelne diskriminacije. Rezultati su podvrgnuti statističkoj usporedbi pomoću χ^2 -testa, omjera izgleda (OR) uz 95 % granice pouzdanosti (CI) i testom razlika proporcija.

Prema statističkoj usporedbi nije dokazana statistički značajna razlika u pojavnosti pojedinih genotipova i alela kod bolesnika s psihičkim bolestima i kontrolne skupine, za C677T mutaciju (OR 1,04; 95 % CI 0,628-1,727), za A1298C mutaciju (OR 1,002; 95 % CI 0,605-1,658). Rezultati ovog istraživanja nisu pokazali povezanost ispitivanih mutacija u genu za MTHFR s pojavnosću psihičkih bolesti na ispitivanom uzorku hrvatske populacije.

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

Rad sadrži: 39 stranica, 5 grafičkih prikaza, 7 tablica i 35 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: MTHFR-metilentetrahidrofolat-reduktaza, C677T i A1298C mutacije, psihičke bolesti

Mentori: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Jasna Bingulac-Popović, viši znanstveni suradnik, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb

Ocjenjivači: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Jasna Bingulac-Popović, viši znanstveni suradnik, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb
Dr. sc. Željka Vanić, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Medical Biochemistry and Hematology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

EXAMINATION OF METHYLENETETRAHYDROFOLATE-REDUCTASE MUTATIONS C677T AND A1298C IN PERSONS WITH MENTAL ILLNESSES

Kristina Benjak

SUMMARY

Psychiatric disorders are neurotransmitter function disorders in the brain that lead to cognitive, emotional or behavioral dysfunction. In the world, over 80 million people suffer from mental illness, and each year the number of patients is increasing. Their development is influenced by genetic factors, environmental factors and chronic stress. Psychiatric disorders cause everyday subjective suffering and reduce work ability, quality of life of a patient, but also his / her environment.

Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is an enzyme that plays a significant role in the metabolism of folate and methylation of DNA, which it affects the synthesis of neurotransmitters. Changed folate metabolism is a pathophysiological basis for the development of mental illness. One of the causes of the changed metabolism of folate is reduced activity of the MTHFR enzyme as a consequence of gene polymorphism. The most significant MTHFR mutations associated with the development of psychiatric diseases are C677T and A1298C. This study was conducted on 155 hospitalized patients of the Psychiatric Hospital "Sveti Ivan" in Zagreb and 101 healthy volunteer blood donors to examine the correlation of MTHFR C677T and A1298C mutations with the development of mental illnesses in Croatian population. All subjects was taken a peripheral blood sample with K₂EDTA anticoagulant with informed consent. DNA isolation with a commercial test kit QIAamp DNA Blood mini QIAcube kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) on the QIAcube device was performed and MTHFR mutation genotypes were detected by real-time chain reaction polymerase and allelic discrimination. Results were subjected to statistical comparison by χ^2 -test, odds ratio (OR) with 95 % confidence interval (CI) and with proportional difference test.

There was no statistically significant difference in the occurrence of individual genotypes and alleles in patients with mental illness and control group, C677T mutation (OR 1.04, 95 % CI 0.628-1.727), A1298C mutation (OR 1.002, 95 % CI 0.605 -1.658). The results of this study did not demonstrate the correlation of both MTHFR mutations with the occurrence of mental illnesses on the examined sample of the Croatian population.

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

Thesis includes: 39 pages, 5 figures, 7 tables and 35 references. Original is in Croatian language.

Keywords: MTHFR-methylenetetrahydrofolate-reductase, C677T and A1298C mutations, psychiatric disorders

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

Reviewers: **Karmela Barišić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Jasna Bingulac-Popović, Ph.D. *Research Scientist*, Croatian Institute for Transfusion Medicine, Zagreb
Željka Vanić, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2019.