Utjecaj kombinacije MTHFR mutacija C677T i A1298C na trombotički rizik u nastanku venskih tromboembolija

Kundid, Renata

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:325592

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijska dijagnostika

Renata Kundid

UTJECAJ KOMBINACIJE MTHFR MUTACIJA (C677T I A1298C) NA TROMBOTIČKI RIZIK U NASTANKU VENSKIH TROMBOEMBOLIJA

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijska dijagnostika

Renata Kundid

UTJECAJ KOMBINACIJE MTHFR MUTACIJA (C677T I A1298C) NA TROMBOTIČKI RIZIK U NASTANKU VENSKIH TROMBOEMBOLIJA

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u Odjelu za molekularnu dijagnostiku, Odsjeku za DNA tipizaciju, Petrova 3, Zagreb.

Mentor rada: Doc. prim. dr. sc. Irena Jukić, spec. transfuzijske medicine

Rad ima 43 lista, 10 tablica i 5 slika.

Zahvaljujem mentoru, doc. dr. sc. Ireni Jukić, Ravnateljici Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, na prihvaćanju mentorstva, konstruktivnim savjetima i izdvojenom vremenu za izradu ovog rada.

Posebna zahvala voditeljici odjela u kojem radim, dr. sc. Jasni Bingulac-Popović, znanstvenoj savjetnici iz Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, Odjelu za molekularnu dijagnostiku na svim oblicima podrške, razumijevanju, stručnim savjetima i nesebičnoj pomoći.

Veliko hvala svim djelatnicima Odjela za molekularnu dijagnostiku, Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, posebno mojoj Višnji.

Zahvaljujem mag. Ivani Babić, za stručne i prijateljske savjete, izdvojenom vremenu i osvrtu na rad.

Hvala Milivoju Hercegu na pomoći u grafičkom oblikovanju rada.

Dr. sc. Ani Hećimović, dr. med. iz Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu zahvaljujem na pomoći pri statističkoj obradi rezultata.

Hvala mojoj obitelji na podršci i ljubavi.

Sadržaj

1.UVOD 1
1.1. Metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) 1
1.2. Metabolizam homocisteina i uloga enzima MTHFR 1
1.3. Klinički najvažnije MTHFR mutacije (C677T i A1298C) 3
1.4. Učestalost MTHFR mutacija u populacijama 4
1.5. Venske tromboembolije 5
1.6. VTE i MTHFR mutacije 5
1.7. VTE, MTHFR i FV Leiden 7
1.8. VTE, MTHFR mutacija i homocistein 8
2. CILJEVI 9
3. MATERIJALI I METODE 10
3.1. Materijali 10
3.1.1. Ispitanici 10
3.2. Metode 11
3.2.1. Izolacija genomske DNA na uređaju QIAcube 11
3.3. Genotipizacija mutacija metilentetrahidrofolat reduktaze C677T i A1298C te FV Leiden pomoću metode real-time (RT-PCR) – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu . 12
3.3.1. Alelna diskriminacija 13
3.3.2. Reagensi za izvođenje RT-PCR metode 14
3.3.3. Postupak pripreme RT-PCR reakcijske smjese 15
3.3.4. Program za real-time umnožavanje MTHFR mutacija 16
3.4. Statističke metode 16
4. REZULTATI 17
4.1. Demografska struktura ispitanika 17
4.2. Učestalost pojedinih genotipova mutacije MTHFR C677T 18
4.3. Učestalost genotipova mutacije MTHFR A1298C 19
4.4. Učestalost pojedinih kombinacija MTHFR C677T i A1298C genotipova 21
4.5. Ispitivanje razdiobe podataka prema Hardy-Weinbergovoj ravnoteži 22
5. RASPRAVA 24
6. ZAKLJUČAK 28
7. SAŽETAK 29
8. SUMMARY 30
9. LITERATURA 31
10. ŽIVOTOPIS 37

Popis kratica:

BH4 – tetrahidrobiopterin

CBS – cistation B sintaza

DDK – dobrovoljni darivatelji krvi

DVT – duboka venska tromboza

F V Leiden – mutacija u genu koagulacijskog faktora V

Hyc – Homocistein

K_2EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

MS – metionin-sintetaza

MTHFR - metilentetrahidrofolat reduktaza

PCR – polimeraza lančana reakcija

PE – plućna embolija

PT G20210A – mutacija u genu koagulacijskog faktora II

RT-PCR – real time PCR, PCR u stvarnom vremenu

SAH – S-adenozilcistein

SAM – S-sdenozilmetionin

SNP – single nucleotide polymorphism (polimorfizam u jednoj bazi)

VTE – venske tromboembolije

1.UVOD

1.1. Metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR)

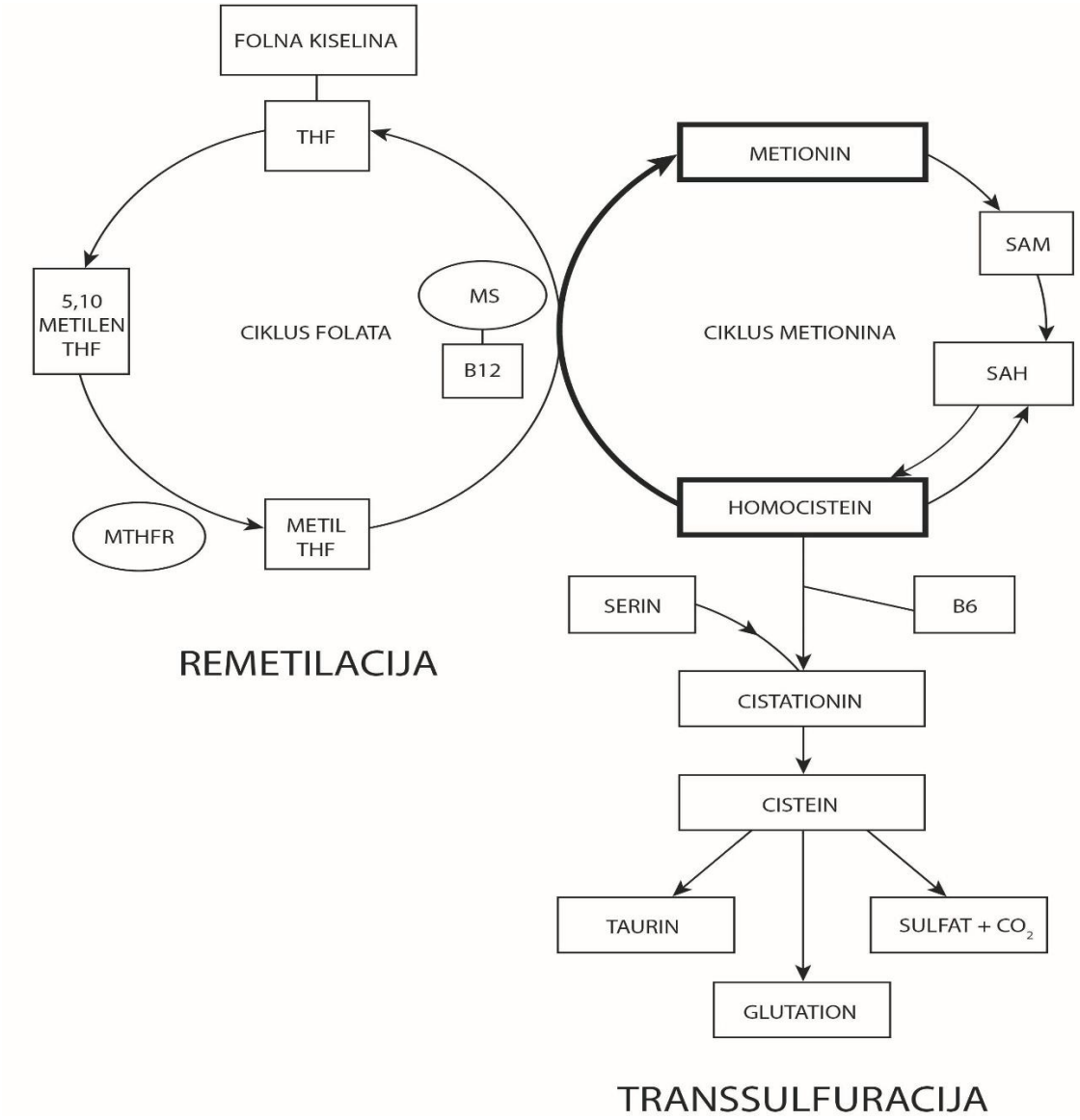
Metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) je enzim koji sudjeluje u ciklusu metilacije, a kodira ga MTHFR gen smješten na kratkom kraku 1. kromosoma. Metilentetrahidrofolat reduktaza katalizira pretvorbu 5,10-metilentetrahidrofolata u aktivni oblik 5-metiltetrahidrofolat koji je neophodan za remetilaciju homocisteina (potencijalno toksične aminokiseline) u metionin, pomoću kofaktora flavina i vitamina B12. Metilacija je neophodna za mnoge funkcije u našem organizmu: promjenu ekspresije gena, aktivaciju i inaktivaciju enzima, regeneraciju tkiva, smanjenje upale, detoksikaciju, odgovor na stanični stres i starenje (1).

1.2. Metabolizam homocisteina i uloga enzima MTHFR

Homocistein (Hcy) je aminokiselina koja se ne nalazi u prirodnim proteinima pa cjelokupni Hcy u organizmu potječe iz metabolizma esencijalne aminokiseline metionina (2). Metabolizam Hcy odvija se kroz dvije osnovne reakcije: transsulfuracijom i metilacijom (slika 1). Oko 50 % Hyc katabolizira se transsulfuracijom gdje Hcy i serin tvore cistation koji prelazi u cistein, dok ostalih 50 % Hcy ulazi u ciklus metilacije. U ciklusu metilacije, Hyc nastaje demetilacijom metionina. Metionin iz proteina prehrane sadrži metilnu skupinu koja se aktivira konverzijom sa S-adenozilmetioninom (SAM). Produkt svih metilacija je S-adenozilhomocistein (SAH) koji se hidrolizira u Hyc. SAH je jaki kompetitor SAM-a na različitim mjestima i tako priječi metilaciju. Omjer SAM/SAH može biti upotrjebljen kao pokazatelj stanja metilacije. Ako je ravnoteža metionina negativna uz nisku koncentraciju SAM-a, Hyc se izravno prebacuje na put remetilacije metionin-sintetaze (MS) u metionin. Vitamini B6, B_{12} i folna kiselina su kofaktori, a metiltetrahidrofolat (MTHF) je supstrat u toj reakciji. MTHF nastaje u reakciji koju katalizira MTHFR (metilentetrahidrofolat reduktaza). MTHFR je jaki neizravni pokretač remetilacije Hyc.

Svaka neuravnotežena remetilacija Hyc može rezultirati hiperhomocisteinemijom. Najvažniji uzrok hiperhomocisteinemije je prehrana siromašna vitaminima i proteinima ili genetski poremećaj u sintezi enzima MS i MTHFR. Takvi bolesnici imaju povišenu koncentraciju Hyc, homocisteinuriju, nisku koncentraciju metionina, neurološke simptome,

mentalnu zaostalost uz promjene krvožilnog sustava (3). Homocistein je prvi puta definiran i izmjeren u mokraći mentalno retardirane djece 1962. godine (2).



Slika 1. Metabolizam homocisteina (prilagođeno prema: Muačević-Katanec D. (3))

1.3. Klinički najvažnije MTHFR mutacije (C677T i A1298C)

Točkaste mutacije (SNP-single nucleotide polymorphism) na kromosomu 1 gena za MTHFR uzrokuju termičku labilnost enzima pa tako posljedično smanjuju njegovu aktivnost i mogućnost vezanja folata. Otkriveno je više od 50 mutacija MTHFR gena. Najviše su istražene mutacije: C677T (rs1801133) koja izaziva supstituciju alanina u valin (Ala→Val) i A1298C (rs1801131) mutacija koja dovodi do supstitucije glutamina u alanin (Glu→Ala) promijenjenog proteina (1, 4).

Enzim metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) je ključni enzim u metabolizmu homocisteina pa njegov deficit uzrokuje hiperhomocisteinemiju. Još je 1995. godine Frosst sa suradnicima objavio da je povišena razina homocisteina u krvi rizik za nastanak cerebrovaskularnih i kardiovaskularnih bolesti (1). Točkaste mutacije na kromosomu 1 gena za MTHFR na nukleotidnim pozicijama 677 C-T i 1298 A-C uzrokuju termičku labilnost i za oko 50 % smanjuju aktivnost enzima, što smanjuje mogućnost vezanja folata. Homozigotni nositelji C677T i/ili A1298C mutacije mogu imati povišeni homocistein u plazmi, što uz deficit folata i vitamina B6, B12 u prehrani predstavlja rizični čimbenik za razvoj tromboze (1, 4). Enzim MTHFR kao rizični čimbenik za razvoj trombotičkih simptoma bolesti i trombofilije nije međutim isključivo genetički čimbenik, nego se smatra miješanim faktorom, s obzirom da se dodatkom vitamina u prehrani značajno može ublažiti njegov utjecaj na razvoj tromboembolija (5). Iz toga proizlazi da se zaštitni utjecaj na homozigotne nositelje C677T mutacije može postići dovoljnim unosom vitamina B6, B12 i folne kiseline.

Druga, klinički važnija MTHFR mutacija A1298C, tek je nedavno postala predmetom istraživanja. Ta mutacija također snižava enzimsku aktivnost, no ne tako intenzivno kao C677T. Uslijed A1298C mutacije ne povezuju se povišeni Hcy ili snižene koncentracije folata. Navodi se njena povezanost s Downovim sindromom kod Azijaca, bolestima depresije zajedno uz C677T mutaciju, zbog toga što A1298C mijenja konverziju MTHF u BH4 (tetrahidrobiopterin), važan kofaktor proizvodnje neurotransmitera i sinteze dušikovih oksida (6). U radovima iz Azije spominje se i povezanost A1298C mutacije s muškom neplodnošću (7).

1.4. Učestalost MTHFR mutacija u populacijama

Prevalencija obje MTHFR mutacije razlikuje se po učestalosti u rasama i pojedinim populacijama. Prevalencija homozigotnih nositelja TT za C677T MTHFR mutaciju u bijelaca i Azijata iznosi 30 % u odnosu na Afroamerikance 11 % (8).

Prevalencija homozigota za MTHFR 677TT mutaciju u nekim područjima u Europi iznosi od 10 % do 12 %, Španjolskoj, Francuskoj, Mađarskoj i sjevernoj Italiji, dok je znatno niža, od 4 % do 6 % u Finskoj i Nizozemskoj (9). Iznimka je južna Italija, naime u talijanskoj regiji Campania prevalencija TT alela je 26 %, a na Siciliji 20 %. Godine 2015. je objavljena prva populacijska studija o prevalenciji MTHFR C677T mutacije u Bosni i Hercegovini na 100 nesrodnih zdravih osoba s rezultatom od 10 % za 677TT genotip (10). U Americi najviša prevalencija TT alela je u Meksiku, 32 % za populaciju Hispanaca, dok je u Atlanti u populaciji bijelaca 11 %, a najniža u Alberti 6 %. U Australiji u populaciji bijelaca prevalencija TT alela iznosi 7,5 %. Na sjeveru Kine zabilježena je prevalencija od 19 % (9). Najniža prevalencija u svijetu pronađena je u Somaliji 1,5 % (11). Nameće se zaključak da je učestalost TT alela najniža od svih etničkih skupina kod afričkih crnaca (12).

Populacijske učestalosti MTHFR A1298C alela su dosad manje istražene. Homozigotnih nositelja za CC alel u Kanadi je nađeno 10 %, u Nizozemskoj slično, oko 9 % (12), dok ih je u iranskoj populaciji samo 4 % (13). Rezultati učestalosti klinički značajnih alela obje MTHFR mutacije na 104 uzorka talijanske novorođenčadi s područja centralne i južne Italije pokazali su 25 % 677TT i 12,5 % 1298CC alela (14).

U Hrvatskoj je Žuntar sa suradnicima 2003. objavila rezultate ispitivanja MTHFR C677T mutacije u studiji slučajeva i kontrola na 298 zdravih osoba kao kontrolne skupine iz područja Zagreba i njegove okolice s rezultatima od 6 % TT alela (15). Godine 2004. je Lovričević sa suradnicima objavio rezultate studije mutacije MTHFR 677CT na 228 predstavnika hrvatske populacije gdje je nađeno 9,21 % TT alela (16). Godine 2009. je Jukić sa suradnicima na 303 uzorka dobrovoljnih darivatelja krvi kao kontrolne skupine objavila rezultate učestalosti homozigotnih alela za C677T mutaciju od 10,5 % TT alela (17). Alfirević je sa suradnicima 2010. godine u studiji slučajeva i kontrola na 106 zdravih kontrolnih uzoraka utvrdila učestalost TT alela od 7 % (18). Dobiveni rezultati hrvatske zdrave populacije ne razlikuju se od prosjeka za europsku populaciju bijelaca.

Veća učestalost 1298C alela nalazi se u istočnoj Aziji, slijede Europa, Afrika i Sjeverna Amerika (6). U Hrvatskoj do danas nije objavljena ni jedna populacijska studija vezana uz MTHFR A1298C mutaciju.

1.5. Venske tromboembolije

Venske tromboembolije (VTE) su potencijalno fatalna stanja koja se javljaju u gotovo svim kliničkim granama medicine. Uključuju dva odvojena klinička entiteta, a to su venska tromboza i plućna embolija (PE). Najčešće sijelo venske tromboze su duboki venski sustavi donjih ekstremiteta. Duboka venska tromboza (DVT) donjih ekstremiteta je u 90 % slučajeva ishodište PE-a. Etiologija VTE-a je multičimbenična, a prema Virchowljevom trijasu se sastoji od tri elementa (hiperkoagulabilnost, oštećenje endotela i venska staza). Rizični čimbenici mogu biti nasljedni i stečeni, a povezuju se izravno ili neizravno s dva ili sva tri elementa iz trijasa (19, 20). Incidencija DVT je 80 slučajeva na 100 000 osoba godišnje (21). Dob je važan čimbenik za razvoj VTE-a i učestalost raste s porastom dobi u oba spola. Nakon 65. godine se učestalost VTE-a udvostručuje, a godišnja incidencija za osobe starije od 75. godina iznosi čak 1 na 100 (22, 23).

Epidemiološko istraživanje VTE-a u Hrvatskoj je pokazalo sličnu incidenciju kao i druga velika internacionalna istraživanja. Incidencija je iznosila 1,2 na 1000 stanovnika i za razliku od ostalih istraživanja, veća je učestalost zabilježena kod pripadnica ženskog spola (56,3 %) što može biti i odraz dobno-spolne strukture Hrvatske i uzorka u istraživanju jer je udio žena u Hrvatskoj veći u starijoj populaciji, a muškaraca u mlađoj dobi (5).

1.6. VTE i MTHFR mutacije

Venske tromboembolijske bolesti jedan su od vodećih uzroka pobola i smrtnosti u razvijenom svijetu. Određivanje nasljednih čimbenika trombofilije doprinosi boljem razumijevanju etiologije i sprečavanju razvoja bolesti. Mutacija MTHFR C677T je povezana s

nastankom mnogih bolesti: bolestima krvožilnog sustava, neurološkim bolestima, psorijazom, dijabetesom i razvojem karcinoma (24).

Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti prevalenciju polimorfizama MTHFR C677T / A1298C i trombotičkog rizika u nastanku venskih tromboembolija usporedbom alela bolesnika i zdravih ispitanika u našoj populaciji. Imajući na umu ozbiljnost ovih dijagnoza, a svakako mogućnost prevencije, nameće se zaključak da je važno ustanoviti čimbenike koji mogu utjecati na prevenciju razvoja bolesti, njeno pravovremeno dijagnosticiranje, a samim time i smanjenje smrtnosti.

Uloga MTHFR polimorfizama C677T i A1298C u povezanosti s VTE-om je kontroverzna, neki autori pokazuju povezanost, a neki dokazuju suprotno (25-27).

Heterozigotni nositelji obje MTHFR mutacije nemaju povećani rizik za razvoj tromboze (8, 9, 28, 29).

Pregledom literature vidljivo je da nositelji TT alela mutacije C677T imaju veću povezanost s razvojem tromboze u odnosu na mutaciju A1298C, no svakako manji trombotički rizik u odnosu na FV Leiden mutaciju. To je vjerojatno i stoga što MTHFR mutacije nisu isključivo genetičkog porijekla nego su metabolički povezane s vitaminima, ali ovisi i o izboru skupine bolesnika.

U Makedoniji Spiroski i sur. 2008. nisu utvrdili utjecaj kombinacija MTHFR C677T/A1298C mutacija za nastanak duboke venske tromboze (DVT) (30).

Iste godine u Sloveniji na uzorku od 295 bolesnika s venskom trombozom dokazano je da bolesnici s MTHFR C677T mutacijom imaju povećani rizik za nastanak venske tromboze samo u starijoj dobi (31).

Marzi i suradnici su u retrospektivnoj studiji od 2005. do 2014. pratili učestalost genetičkih čimbenika rizika u 120 bolesnika s dubokom venskom trombozom (DVT) i 45 bolesnika s plućnom embolijom (PE) u istočnoj Hrvatskoj. Učestalost alela i genotipa polimorfizama MTHFR C677T nije se razlikovala između slučajeva i kontrola (32). Dok je u Turskoj populaciji Basol dokazao povezanost između kombinacija mutacija MTHFR C677T/A1298C i nastanka plućne embolije (PE) (33).

U studiji povezanosti ABO krvnih grupa i mutacija trombofilnih čimbenika, koja je provedena u Hrvatskoj na 154 pacijenta, nađena je povezanost između nositelja ne-00 krvne grupe, kao i MTHFR C677T mutacije koji imaju 5,7 puta veći rizik za razvoj tromboze (17) .

U drugom ispitivanju povezanosti ABO krvnih grupa, protrombotičkih čimbenika, između kojih je ispitivana i C677T mutacija, nije pronađena povezanost s nastankom infarkta miokarda (34).

1.7. VTE, MTHFR i FV Leiden

Genetička osnova FV Leiden mutacije je točkasta mutacija u genu koagulacijskog faktora V koja izaziva supstituciju G→A na mjestu 1691 u eksonu 10 (35). Znanstvenici su se bavili proučavanjem i odnosa mutacije FV Leiden, kao najviše zastupljenog genetičkog rizičnog čimbenika s drugim čimbenicima trombofilije na razvoj tromboembolija, tromboza i kardiovaskularnih bolesti pa tako i u kombinaciji s mutacijom C677T MTHFR.

Prema radu Cattaneo i sur., homozigotni nositelji MTHFR 677TT mutacije nemaju rizik za nastanak duboke venske tromboze (DVT), dok u kombinaciji s mutacijom za faktor V Leiden imaju povećan rizik, s obzirom da nositelji TT alela utječu na povećanje homocisteina u plazmi, što je poznati čimbenik rizika za DVT (36).

Keijzer sa suradnicima je istraživao povezanost između faktora V Leiden, MTHFR 677TT i rizika za nastanak venske tromboze uključujući 2 547 pacijenata. Ova metaanaliza nije pokazala povezanost FV Leiden i MTHFR kao kombiniranog čimbenika rizika s venskom trombozom (27).

Opsežna zbirna meta analiza 31 studije napravljena na 11 239 slučajeva i 21 521 kontrola nije pokazala da homozigotni nositelji 677TT MTHFR (OR: 1.38; 95 % CI: 0.98–1.93) imaju rizik od VTE-a, dok su FVL i PT20210A potvrđeni kao umjereni faktori rizika.
Ipak, dvostruki nositelji dviju genetskih varijanti proizveli su značajan utjecaj na rizik od VTE-a, ali slabiji nego što se ranije mislilo (37).

U studiji koja je provedena na uzorku 101 trudnice u Hrvatskoj s komplikacijom VTE-a nađena je učestalost 677TT alela od 19,8 %. Dokazano je da su kombinacije mutacija FV Leiden i MTHFR C677T povezane sa smrti fetusa i pobačajem (38).

1.8. VTE, MTHFR mutacija i homocistein

Osobe koje su homozigotni nositelji 1298CC mutacije nemaju povišenu koncentraciju Hcy, dok se heterozigotni nositelji kombinacije mutacija C677T/A1298C ponašaju slično kao 677TT homozigoti, imaju povišenu koncentraciju Hcy i sniženu folnu kiselinu (12).

Tsai je sa suradnicima ispitivao povezanost serumskog homocisteina i polimorfizma (MTHFR) C677T s rizikom od venske tromboembolije (VTE) u prospektivnoj studiji u SAD-u. Ispitana su 303 bolesnika s VTE-om i 635 kontrola iz populacijske skupine od 21 680 odraslih ispitanika iz šest američkih zajednica. Nositelji polimorfizma MTHFR C677T nisu bili izloženi većem riziku za VTE-a, nego oni s CC genotipom. Prospektivni podaci pokazali su, u najvećoj mjeri, slabu vezu između homocisteina i rizika za VTE, s većom povezanošću među mlađim sudionicima studije. Zaključili su da MTHFR 677TT nije rizičan faktor za VTE (39).

Sørensen i sur. su istraživali prevalenciju cistation B sintaze (CBS) i polimorfizma (MTHFR) c.677C>T u danskih bolesnika s Hcy≥50 μM i povezanost s kliničkim manifestacijama. Proučavana je kohorta 184 bolesnika sa srednjom i teškom hiperhomocisteinemijom (Hcy ≥ 50 μM). TT alel MTHFR mutacije C677T utvrđen je kod čak 49 % bolesnika. Najistaknutija klinička slika među pacijentima bila je tromboza. Na temelju dobivenih podataka studije, zaključili su da u slučaju arterijske ili venske tromboze kod osoba mlađih od 40 godina, Hcy bi trebao biti dio probira trombofilije. Kada je vrijednost Hcy između 50 i 100 μM genotipizacija za MTHFR 677 je relevantna, a kada se radi o Hcy>100 μM uz MTHFR bi trebalo genotipizirati i CBS mutaciju (40).

2. CILJEVI

• Ispitati učestalost pojavnosti MTHFR mutacija C677T i A1298C na uzorku hrvatske populacije

• Ispitati postoji li povezanost MTHFR C677T / A1298C mutacija i trombotičkog rizika u nastanku venskih tromboembolija (svake mutacije zasebno i obje mutacije u kombinaciji)

• Ispitati postoji li povezanost MTHFR C677T mutacije i FV Leiden mutacije kao kombiniranog čimbenika rizika za razvoj tromboembolija

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Ispitanici

Nakon odobrenja Etičkog povjerenstva Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu provedena je studija istraživanja parova (eng. *case-control studies*).

Ispitivanje je učinjeno u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, u Odjelu za molekularnu dijagnostiku, Odsjeku za DNA tipizaciju u razdoblju od lipnja 2018. do veljače 2019. godine. Kontrolnu populacijsku skupinu na 101 uzorku krvi predstavljaju zdravi, nesrodni dobrovoljni darivatelji krvi koji ni u osobnoj ni obiteljskoj anamnezi nisu imali tromboemboličkih epizoda. Uzorci krvi dobrovoljnih darivatelja krvi čine skupinu sačinjenu od 48 žena i 53 muškaraca u dobi od 25 do 65 godina.

Drugu skupinu ispitanika sačinjavaju bolesnici s klinički i laboratorijski potvrđenom dijagnozom venskih tromboembolija. Prikupljena su 152 uzorka krvi bolesnika, uz njihov prethodni informirani pristanak. Uzorci krvi prikupljeni su u Odjelu za molekularnu dijagnostiku i Odsjeku za trombocitna i leukocitna protutijela i hemostazu Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, Zagreb, te u Klinici za tumore, pri Kliničkom bolničkom centru „Sestre Milosrdnice“, Zagreb. Ispitivana skupina bolesnika sačinjena je od 77 žena i 75 muškarca u dobi od 18 do 86 godina. Dijagnoza je potvrđena fizikalnim pregledom, laboratorijskim nalazima (D-dimeri) i Duplex-ultrazvučnom metodom.

Svim ispitanicima, bolesnicima i kontrolnoj skupini uzet je uzorak periferne krvi u volumenu od 8,5 ml (Vacutainer Becton Dickinson, Plymouth, UK) sa suhim antikoagulansom K_2EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina).

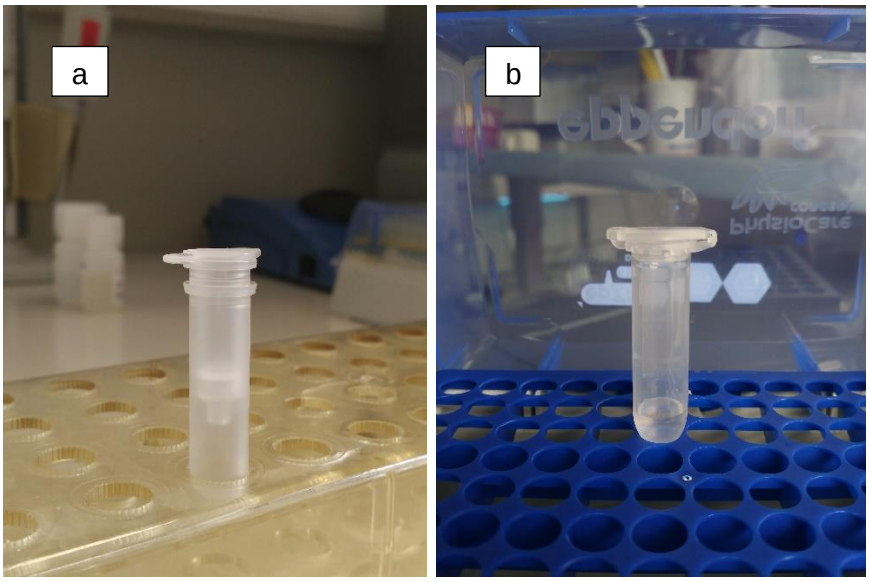
3.2. Metode

3.2.1. Izolacija genomske DNA na uređaju QIAcube

QIAcube uređaj (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka) je robotska radna stanica za automatiziranu izolaciju nukleinskih kiselina iz širokog spektra materijala (puna krv, plazma, kultura stanica i dr.). Izolacija se provodi standardnim QIAgen kitovima za izolaciju nukleinskih kiselina na kolonama (silika-gel membrane) prema protokolima proizvođača na principu liza-vezanje-ispiranje-eluiranje.

U našem ispitivanju za izolaciju DNA korišteno je 200 µl uzorka pune krvi s antikoagulansom EDTA pomoću komercijalnog kita QIAamp DNA Blood mini QIAcube kit (Qiagen GmbH, Hilden, Njemačka).

Lizirajući pufer (AL) vrši lizu uzorka pri čemu pH i ionska jakost lizata sprječavaju vezanje interferirajućih tvari na membranu. Enzimskom reakcijom proteinaze K uklanjaju se stanični proteini i druge makromolekule koje bi mogle inhibirati ili ometati PCR reakciju. Pomoću apsolutnog etanola DNA iz liziranog uzorka se adsorbira na QIAamp silika gel membranu QIAamp spin kolone. DNA vezana na membranu pročišćava se dvostrukim ispiranjem s puferima (AW1 i AW2) te eluira s membrane puferom za eluciju (AE). Izolirana genomska DNA je visokog stupnja čistoće i prinosa. Proces automatizirane izolacije DNA za 12 uzoraka na uređaju QIAcube traje 90 minuta. Izolirana DNA eluirana je u 200 µl pufera za eluciju AE. Izolat DNA se zatim može umnažati polimeraznom lančanom reakcijom (PCR).



Slika 2. a) Prikaz Qiagen kolone sa silika-gel membranom

b) Izolat DNA

Odjel za molekularnu dijagnostiku, Odsjek za DNA tipizaciju, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb-fotografirala autorica

3.3. Genotipizacija mutacija metilentetrahidrofolat reduktaze C677T i A1298C te FV Leiden pomoću metode real-time (RT-PCR) – lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

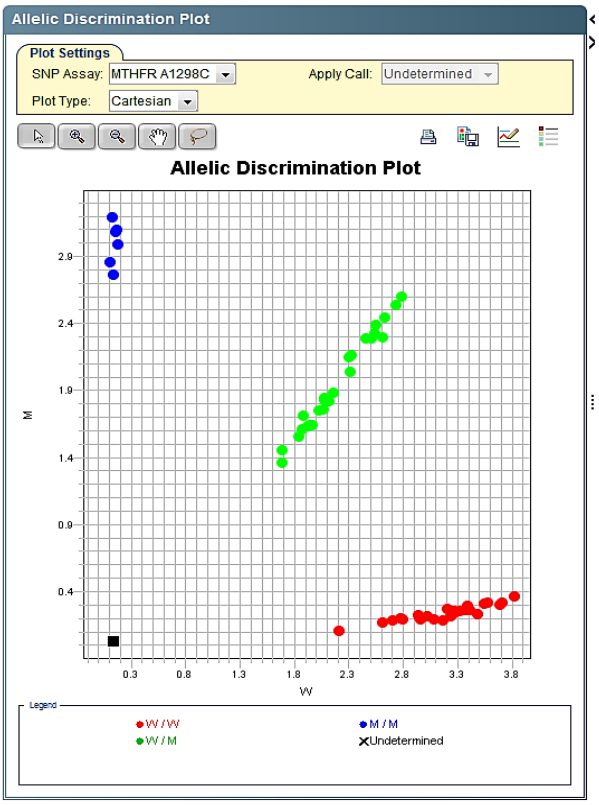
Real-time PCR metoda je inačica klasične polimerazne reakcije čija osjetljivost je povećana uvođenjem fluorescentnih proba. U RT-PCR reakciji koristi se dvostruko označena fluorescentna proba. Reporter boja (emitirajuća) emitira fluorescentnu svjetlost vezana za 5′ kraj TaqMan probe, dok je prigušivač boje (eng. *quencher* – onaj koji gasi) vezan za 3′ kraj. Tijekom umnažanja dolazi do komplementarne hibridizacije probe za ciljnu sekvencu te njene razgradnje kao posljedice 5′-3′egzonuklearne aktivnosti Taq DNA polimeraze koja razgrađuje fluorescentnu probu i dovodi do oslobađanja reporter boje. Ovim procesom se prigušivač fluorescencije udaljava od reporter (emitirajuće) boje i nema blokade emisije. Signal fluorescencije se normalizira u odnosu na intenzitet emisije referentne boje (pasivna referenca) koja je uključena u reakcijsku smjesu. 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. *Treshold cycle* (Ct) vrijednost prikazuje broj ciklusa u kojem intenzitet fluorescencije prelazi intenzitet praga. Real-time PCR tehnologija je visoko automatizirana, pri čemu uređaj kontinuirano mjeri fluorescenciju u uzorcima, a softver te podatke analizira (41). Za genotipizaciju mutacija metilentetrahidrofolat reduktaze C677T i A1298C te FV Leiden u ovom radu korišten je uređaj ABI Prism 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, SAD).

3.3.1. Alelna diskriminacija

U ovom radu korišten je test alelne diskriminacije (AD), odnosno test završne točke nakon RT-PCR umnožavanja i dobivene fluorescencije koji određuje genotip na temelju točkaste mutacije SNP (eng. *single nucleic polymorphism*) u ciljnoj sekvenci. U reakciji se koriste dvije fluorescentne TaqMan probe koje omeđuju ciljnu sekvencu na mjestu SNP-a. Iz omjera intenziteta fluorescencije reporter boja kojima su označene probe (FAM i VIC) može se odrediti koji se alel dominantno umnožava. Jedna fluorescentna proba veže se na tip bez mutacije (eng. *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) (42, 43).

Signal fluorescencije za svaki uzorak smješta se u graf, gdje se lako detektiraju tri moguća genotipa mutacije. Na osi x prikazani su uzorci umnoženi kao normalni aleli bez mutacije (W-eng. wild, 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 3. 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; Odjel za molekularnu dijagnostiku, Odsjek za DNA tipizaciju, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb)

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) - ishodnice i probe 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)
- FV Leiden
- Ishodnice: FVLF 5'-GAA AGG TTA CTT CAA GGA CAA AAT ACC T-3'
  FVLR 5'-AGA CAT CGC CTC TGG GCT AAT AG-3'

- Probe: FVL1- **FAM** 5'-TAT TCC TCG CCT GTC C-3'
  FVL2- **VIC** 5'-TAT TCC TTG CCT GTC CAG-3'

● 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 - 100µl (Eppendorf, Njemačka)

● nastavci s filterom 0.1 - 10µl (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 µl univerzalni TaqMan Master Mix

0,63 µl TaqMan SNP ishodnice i probe

8,87 µl bidestilirana voda

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

Svaki uzorak je ukupnog volumena 25 µl. U svakoj seriji uz reakcijske smjese za nepoznate uzorke, kao dio procesne kontrole stavljaju se negativna kontrola (s bidestiliranom vodom umjesto izolata genomske DNA kao kalupa) i 3 pozitivne kontrole izolata genomske DNA s poznatim genotipom MTHFR mutacija C677T/A1298T/FV Leiden (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 s čepovima i stavljene u uređaj za real-time PCR. Odabirom programa definiraju se uvjeti reakcije i započinje umnožavanje uz mogućnost praćenja porasta fluorescencije u odnosu na broj ciklusa umnožavanja.

3.3.4. Program za real-time umnožavanje MTHFR mutacija

Tablica 1. Dijelovi RT-PCR reakcije

Uvjeti reakcije PCR	**Temperatura**	**Vrijeme**
HOLD-aktivacija enzima AmpErase uracil-N-glikosilaza	50 ºC	2 min.
HOLD-aktivacija AmpliTaq Gold enzima	95 ºC	10 min.
40 ciklusa umnožavanja: Denaturacija Vezanje početnica i produljenje lanca	 95 ºC 60 ºC	 15 sek. 1 min.
Detekcija fluorescencije	60 ºC	

3.4. Statističke metode

Dobiveni rezultati prikazani su apsolutnim i relativnim učestalostima. 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 softver verzije 14.8.1.

4. REZULTATI

U istraživanju su obuhvaćene dvije skupine ispitanika. Jednu sačinjavaju bolesnici s venskim tromboembolijama, a drugu kontrolnu - zdravi dobrovoljni darivatelji krvi koji ni u osobnoj ni obiteljskoj anamnezi nisu imali tromboembolijskih epizoda. U skupini bolesnika bilo je ukupno 152 ispitanika, a u kontrolnoj 101 ispitanik.

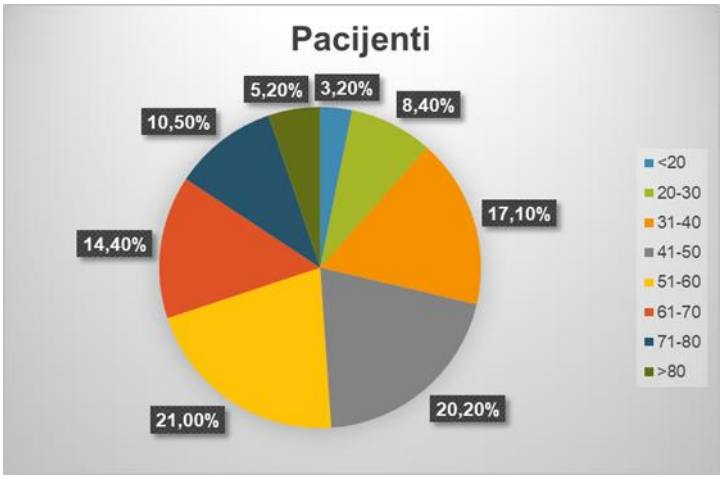
4.1. Demografska struktura ispitanika

Tablica 2. Raspodjela ispitanika prema spolu

Spol	Kontrole (N) %	Pacijenti (N) %
žene	48 (47,5)	77 (50,7)
muškarci	53 (52,5)	75 (49,3)
Ukupno (n)	101	152

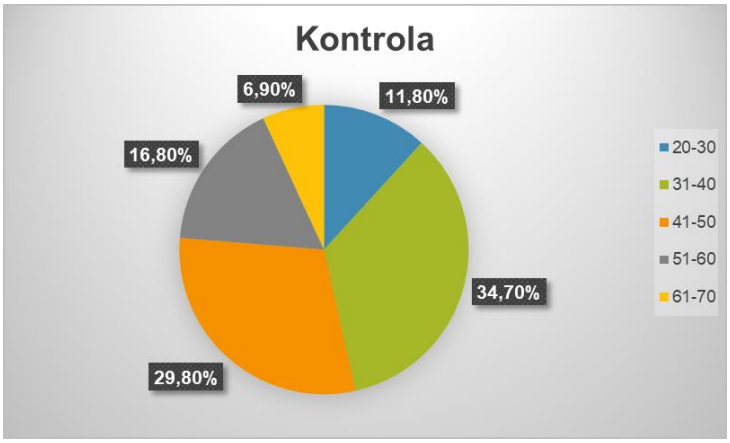
Raspodjelom podataka prema spolu (tablica 2) vidljiva je podjednaka zastupljenost među spolovima u obje ispitivane skupine.

Statistička analiza demografskih podataka nije pokazala značajnu razliku između dvije promatrane skupine prema spolu, uz p = 0,619.



Slika 4. Raspodjela bolesnika prema dobi u postotcima

Najveći broj bolesnika 21,00 % je bio u dobi između 51 - 60 godine. Malo manje, 20,20 % bilo je pacijenata u dobi 41 - 50 godine.



Slika 5. Raspodjela predstavnika kontrolne skupine prema dobi

Najveći broj dobrovoljnih darivatelja krvi, predstavnika kontrolne skupine bilo je u dobi između 31 - 40 godine (34,70 %), a nešto manje 29,80 % u dobi između 41 - 50 godine života.

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

4.2. Učestalost pojedinih genotipova mutacije MTHFR C677T

U tablici 3 je prikazana učestalost pojedinih genotipova za MTHFR C677T mutaciju u skupini pacijenata s venskim tromboembolijama i kontrolnoj skupini.

MTHFR C677T genotipovi prikazani su kao homozigotni nositelji za normalne alele C bez mutacije kao CC, zatim heterozigotni nositelji s jednim normalnim, a drugim mutiranim alelom kao CT genotip i homozigotni nositelji alela T kao TT genotip. U skupini bolesnika učestalost TT genotipa iznosi 15,8 %, dok je u kontrolnoj skupini učestalost TT genotipa niža i iznosi 11,9 %. Prikazana je i zasebno učestalost C i T alela. Učestalost mutiranog T alela je kod pacijenata iznosila 36,2 %, dok je kod kontrola bila vrlo slična 34,2 %.

Tablica 3. Učestalost MTHFR C677T genotipova i alela

Mutacija	Genotipovi i aleli	Bolesnici N = 152 (%)	Kontrolna skupina N = 101 (%)	OR* (95% CI)†	*p‡*
MTHFR 677 (C>T)	CC	71(46,7)	44(43,6)	0,880 (0,53-1,46)	0,623
	CT	57(37,5)	45(44,6)		
	TT	24(15,8)	12(11,9)		
	C	185(63,8)	133(65,8)	0,941 (0,62-1,33)	0,641
	T	105(36,2)	69(34,2)		

* OR- Omjer izgleda (od eng. Odds ratio)

† CI – Interval pouzdanosti za divlji tip vs. heterozigot+homozigot (od eng. Confidence interval)

‡ p vrijednost je dobivena χ^2 testom

Prema prikazu raspodjele pojedinih MTHFR677 (C > T) genotipova 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 venskim tromboembolijama i kontrolne skupine (p = 0,623, p = 0,641).

4.3. Učestalost genotipova mutacije MTHFR A1298C

U tablici 4 je prikazana učestalost pojedinih genotipova za MTHFR A1298C mutaciju u skupini pacijenata s venskim tromboembolijama i kontrolnoj skupini.

Homozigotnih nositelja za genotip 1298AA bilo je 49,3 % kod skupine bolesnika, a kod kontrolne skupine 44,6 %. Heterozigotnih nositelja AC bilo je 40,8 % i 44,6 %, dok je homozigotnih nositelja za mutaciju CC bilo 9,9 % kod bolesnika u odnosu na kontrolnu skupinu 10,9 %. Učestalost mutiranog C alela kod pacijenata je bila 30,3 %, a kod kontrola vrlo slična 33,2 %.

Tablica 4. Učestalost MTHFR A1298C genotipova i alela

Mutacija	Genotipovi i aleli	Bolesnici N=152 (%)	Kontrolna skupina N=101 (%)	OR* (95 % CI)†	*p‡*
MTHFR 1298 (A>C)	AA AC CC	75 (49,3) 62 (40,8) 15 (9,9)	45 (44,6) 45 (44,6) 11 (10,8)	0,825 (0,49 - 1,37)	0,455
	C	92 (30,3)	67 (33,2)	0,874 (0,59 - 1,28)	0,491
	A	212 (69,7)	135 (66,8)		

* OR- Omjer izgleda (od eng. Odds ratio)

† CI – Interval pouzdanosti za divlji tip vs. heterozigot+homozigot (od eng. Confidence interval)

‡ p vrijednost je dobivena χ^2 testom

Prema prikazu raspodjele pojedinih MTHFR 1298 (A > C) genotipova 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 venskim tromboembolijama i kontrolne skupine (p = 0,455, p = 0,491).

Tablica 5. Usporedba pojavnosti MTHFR C677T mutacija između skupine bolesnika s VTE-om i kontrolne skupine prema spolu

Mutacija	Genotipovi i aleli	Bolesnici N=152 (%)				Kontrolna skupina N=101 (%)			
		Muškarci	Žene	*(df=1)§*	*p‡*	Muškarci	Žene	*(df=1)§*	*p‡*
MTHFR 677 (C>T)	CC	34(45,3)	37(48,0)	0,12	0,738	25(47,2)	19(39,6)	0,58	0,445
	CT	29(38,7)	28(36,4)			23(43,4)	22(45,8)		
	TT	12(16,0)	12(15,6)			5(9,4)	7(14,6)		
	C	97(57,1)	102(66,2)	2,88	0,09	73(68,9)	60(62,5)	0,90	0,341
	T	73(42,9)	52(33,8)			33(31,1)	36(37,5)		

‡ p vrijednost je dobivena χ^2 testom

§ - Stupanj slobode (od eng. Degrees of freedom)

Statističkom analizom nije dokazana statistički značajna razlika u pojavnosti pojedinih MTHFR677 genotipova i alela prema spolu u obje skupine ispitanika. Razlika pojavnosti TT genotipova je nešto viša kod muškaraca (42,9 %) nego kod žena (33,8 %) u skupini bolesnika, što nije statistički značajno. U kontrolnoj skupini ta je razlika minimalna.

Tablica 6. Usporedba pojavnosti MTHFR A1298C mutacija između skupine bolesnika s VTE-om i kontrolne skupine prema spolu

Mutacija	**Genotipovi i aleli**	**Bolesnici N = 152 (%)**				**Kontrolna skupina N = 101 (%)**			
		Muškarci	**Žene**	***(df=1)§***	***p‡***	**Muškarci**	**Žene**	***(df=1)§***	***p‡***
MTHFR 1298 (A>C)	AA	37(49,3)	38(49,3)	0,0001	0,998	22(41,5)	23(47,9)	0,41	0,520
	AC	31(41,3)	31(40,3)			24(45,3)	21(43,8)		
	CC	7(9,3)	8(10,4)			7(13,2)	4(8,3)		
	C	45(30,0)	47(30,5)	0,001	0,922	38(35,8)	29(30,2)	0,72	0,396
	A	105(70,0)	107(69,5)			68(64,2)	67(69,8)		

‡ p vrijednost je dobivena χ^2 testom

§ - Stupanj slobode (od eng. Degrees of freedom)

Pojavnost pojedinih MTHFR 1298 genotipova ne razlikuje se između promatranih skupina kao ni između spolova, naprotiv, u skupini bolesnika rezultati su gotovo identični. Također nema razlike u pojavnosti C alela ni između promatranih skupina ni između spolova.

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da nema statistički značajnih razlika u pojavnosti kako pojedinih MTHFR genotipova, tako i pojedinih alela, uz $p > 0,05$.

4.4. Učestalost pojedinih kombinacija MTHFR C677T i A1298C genotipova

U tablici 7 je prikazana razdioba učestalosti kombinacija genotipova za dvije MTHFR mutacije (C677T i A1298C) između promatranih skupina bolesnika i zdravih kontrola izražena postotnim udjelom (%).

Tablica 7. Učestalost kombinacija MTHFR C677T i A1298T genotipova

C677T	**TT(%)**	**CT(%)**	**TT(%)**	**CC(%)**	**TT(%)**	**CT(%)**	**CT(%)**	**CC(%)**	**CC(%)**
A1298C	**CC(%)**	**CC(%)**	**AC(%)**	**CC(%)**	**AA(%)**	**AC(%)**	**AA(%)**	**AA(%)**	**AC(%)**
Pacijenti	0	0	0	15(9,7)	24(15,8)	27(17,8**)**	30(19,7)	21(13,8)	35(23,2)
Kontrola	0	0	0	11(10,9)	12(11,9)	23(22,8)	22(21,8)	11(10,8)	22(21,8)

Iz rezultata za kombinacije dvije MTHFR mutacije vidljivo je da je kombinacija 677CC/1298AC najučestalija kod promatrane skupine bolesnika (23,2 %), dok je to u kontrolnoj skupini kombinacija 677CT/1298AC (22,8 %). Četverostruka kombinacija za MTHFR mutacije 677TT/1298CC nije nađena u obje skupine.

Statističkom analizom nije dokazana statistički značajna razlika u zastupljenosti kombinacija MTHFR C677T i A1298C u obje skupine ispitanika, p = 0,841.

4.5. Ispitivanje razdiobe podataka prema Hardy-Weinbergovoj ravnoteži

Tablica 8. Distribucija genotipova MTHFR C677T mutacije

Mutacija	**Genotip**	**Očekivane učestalosti (%)**	**Kontrolna skupina (%)**	**Dobivene/Očekivane frekvencije (H-W zakon)‖**	***p‡***
677 (C>T) MTHFR	CC	43,3	43,6	1,01	0,995
	CT	45,0	44,6	0,99	
	TT	11,7	11,9	1,02	

‡ p vrijednost je dobivena χ^2 testom

‖ Hardy-Weinbergov zakon

Tablica 9. Distribucija genotipova MTHFR A1298C mutacije

Mutacija	Genotip	Očekivane učestalosti (%)	Kontrolna skupina (%)	Dobivene/Očekivane frekvencije (H-W zakon)‖	*p‡*
1298 (C>A) MTHFR	AA	44,6	44,6	1,00	0,998
	AC	44,4	44,6	1,01	
	CC	11,0	10,9	0,99	

‡ p vrijednost je dobivena χ^2 testom

‖ Hardy-Weinbergov zakon

Odnos između učestalosti MTHFR genotipova u odnosu na očekivane populacijske učestalosti analiziran je pomoću testa Hardy-Weinberg ravnoteže. Distribucija genotipova u kontrolnoj skupini je jako slična očekivanoj distribuciji po Hardy-Weinbergovom zakonu, što ukazuje na statistički vjerodostojnu usporedbu sa skupinom bolesnika.

4.6. Ispitivanje povezanosti MTHFR C677T mutacije i FV Leiden mutacije kao kombiniranog čimbenika rizika za razvoj tromboembolija

Pregledom literature uočena je povezanost faktor V Leiden (G1691A) i MTHFR 677TT genotipa kao kombiniranog čimbenika rizika za nastanak tromboembolija.

Tablica 10. Distribucija kombiniranih genotipova MTHFR C677T mutacije uz FV Leiden mutaciju (G1691A)

Kombinacija mutacija	Pacijenti	Kontrolna skupina	*(df=1)§*	*p‡*
677TT/1691GA	6	1	1,91	0,167
Ukupno (N)	152	101		

‡ p vrijednost je dobivena χ^2 testom

§ - Stupanj slobode (od eng. Degrees of freedom)

Naši rezultati nisu pokazali povezanost između ove dvije mutacije i rizika za nastanak venskih tromboembolija, p = 0,167.

5. RASPRAVA

Venske tromboembolije vodeći su uzrok invaliditeta i na trećem mjestu uzroka smrti od kardiovaskularnih bolesti u svijetu. Najveći rizici za nastanak VTE-a su velike operacije, traume, imobilizacija i maligna oboljenja. Umjerenim rizicima smatraju se genetički ili stečeni rizici tijekom života. Od genetičkih rizika najzastupljeniji su mutacija faktor V Leiden, nositelji ne-00 genotipova ABO krvne grupe, mutacija protrombin G20210A (faktor II), dok su stečeni: način života, pretilost, pušenje i alkohol, oralni kontraceptivi, nadomjesna hormonska terapija, upalne bolesti crijeva. Niski rizik za pojavu VTE-a imaju ostale genetičke varijante (44).

Epidemiologija obiteljske povezanosti s VTE-om pokazuje složenost ove dijagnoze. Obiteljska anamneza VTE-a kod srodnika prvog stupnja povezana je s dva do tri puta povećanim relativnim rizikom za nastanak VTE-a. Obiteljska sklonost VTE-u predstavlja zbroj zajedničkih okolišnih i genetskih čimbenika. Međutim, studije obolijevanja blizanaca, proširenih obitelji i supružnika ukazuju na slabu uključenost zajedničkih okolišnih čimbenika u obiteljsku sklonost za VTE (45).

Korisnost testiranja trombofilije u kliničkoj praksi i dalje je predmet rasprave, jer studije nisu pokazale smanjenje rizika za povratne tromboembolije (VTE) u bolesnika s trombozom. Probir za ispitivanje rizika za trombofiliju indiciran je odabranim pacijentima. Osobito kod mladih pacijenata, ženama u reproduktivnoj dobi poznavanje genetičkog trombofilnog defekta može pomoći u specifičnim situacijama te smanjiti rizik od VTE događaja. Izbjegavanje rizičnih čimbenika na koje se može utjecati, uz profilaksu tromboembolijskih postupaka može se uvesti za odabrane bolesnike. Sveobuhvatna obrada koja uključuje osobnu i obiteljsku anamnezu, klinički pregled i rezultati laboratorijskih ispitivanja, uključujući nasljednu trombofiliju, i dalje su korisna u procjeni kumulativnog rizika i liječenja skupine pacijenata s rizikom od VTE-a (46).

U ovom radu provedena je studija istraživanja parova između skupine 152 bolesnika s klinički i laboratorijski potvrđenom dijagnozom VTE-a i kontrolne skupine od 101 zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi bez tromboemboličkih epizoda. Treba naglasiti da su dobrovoljni darivatelji krvi koji dolaze u Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu s područja Zagreba i zagrebačke regije reprezentativan uzorak hrvatske populacije. Ispitivana je skupina od 152 bolesnika s VTE-om koji su klinički i laboratorijski imali potvrđenu dijagnozu venskih tromboembolija (venske tromboembolije, duboke venske tromboze, plućne embolije i venski tromboflebitisi).

Kako bismo statistički potvrdili vjerodostojnu usporedbu populacijske skupine sa skupinom bolesnika, poduzeli smo provjeru distribucije genotipova između dviju skupina prema Hardy-Weinbergovom zakonu. Zastupljenost među spolovima bila je podjednaka u obje ispitivane skupine.

U Hrvatskoj dosad nije objavljena ni jedna populacijska studija vezana uz MTHFR A1298C mutaciju. Dobiveni rezultati učestalosti genotipova za mutaciju MTHFR A1298C bili su: 44,6 % AA, 44,6 % AC i 10,8 % CC u zdravoj hrvatskoj populaciji.
Usporedbom omjera izgleda između skupine VTE bolesnika i kontrola za MTHFR A1298C mutaciju nije utvrđena statistička značajnost OR = 0,825, 95 % CI (0,49 - 1,37); kao ni u učestalosti C i A alela, ni između spolova.

U rumunjskoj populaciji Hotoleanu i sur. zaključili su da samo homozigotni nositelji MTHFR 677TT polimorfizma imaju povećan rizik za pojavu VTE-a, dok MTHFR A1298C polimorfizam nije povezan s rizikom nastanka VTE-a (47). Nasuprot tome, u studiji od 310 pacijenata s VTE-om u Turskoj, MTHFR A1298C mutacija pokazala je značajno veću učtestalost u bolesnika s plućnom embolijom u usporedbi s DVT (P = 0,006) i s kontrolnom skupinom (48).

Učestalost pojedinih MTHFR C677T genotipova u našem istraživanju ne razlikuje se značajno između promatranih skupina bolesnika (15,8 % TT) i zdravih kontrola (11,9 % TT), uz OR = 0,880, 95 % CI (0,53 - 1,46), p = 0,623. Razlika pojavnosti TT genotipova je nešto viša kod muškaraca (42,9 %) nego kod žena (33,8 %) u skupini bolesnika, što nije statistički značajno. Minimalna je bila i razlika između učestalosti T alela koja iznosi 36,2 % kod bolesnika nasuprot 34,2 % u kontrolnoj skupini. Prema dobivenim rezultatima za obje MTHFR mutacije može se zaključiti da nema statistički značajnih razlika u pojavnosti, kako pojedinih MTHFR genotipova, tako i pojedinih alela, uz $p > 0,05$.

Ray i suradnici 2002. godine ispitivali su učinak mutacije C677T na rizik za nastanak venskih tromboembolija na 31 dotada objavljenoj studiji (4 901 bolesnika i 7 886 kontrola) i utvrdili su da je prevalencija TT genotipova blago povišena (14,3 %) u odnosu na kontrole (11,7 %), dajući granično povišeni rizik (49). U radu Brazilaca, T alel C677 MTHFR mutacije navodi se kao rizični čimbenik za razvoj arterijskih i venskih tromboza, a više talijanskih studija navodi TT genotip kao neovisni čimbenik koji je povezan s venskim tromboembolijama, uz niske razine folata i hiperhomocisteinemiju (50).

Ograničenje naše studije je što se ispitanicima nije određivala razina homocisteina, s obzirom da i samo blago povišeni homocistein povećava rizik za VTE. Međutim velika većina

drugih studija na brojnim populacijama koje su ispitivale povezanost MTHFR mutacija s rizikom za razvoj VTE nije pokazala statističku korelaciju, što je u skladu i s našim rezultatima.

Liu i suradnici su pokazali da homozigotne varijante, posebice kombinacija obje MTHFR mutacije značajno utječu na rizik za nastanak VTE-a. Smatraju kako bi ta informacija pomogla u ranoj intervenciji i profilaksi VTE-a (51).

Iz naših rezultata ispitivanja učestalosti kombinacije obje MTHFR mutacije vidljivo je da je kombinacija 677CC/1298AC najučestalija kod promatrane skupine bolesnika (23,2 %), dok je to u kontrolnoj skupini kombinacija heterozigotnih genotipova 677CT/1298AC (22,8 %). U našoj studiji nismo mogli uspoređivati obje skupine s obzirom na nosilaštvo kombinacije obje MTHFR mutacije, jer ni u jednoj promatranoj skupini nije nađen ni jedan nositelj oba homozigotna genotipa MTHFR (TT i CC). Vjerojatno je uzrok tome relativno mali broj sudionika obje ispitivane skupine, ali i relativno mala učestalost homozigotnog genotipa CC za MTHFR A1298C mutaciju u hrvatskoj populaciji (10,9 %).

U metaanalizi koja je obuhvaćala 24 studije te 2 339 kliničkih slučajeva i 4 048 kontrola Zhang sa sur. je u kineskoj populaciji izvijestio o riziku za nastanak VTE-a koji se manifestirao kao DVP ili PE u povezanosti s MTHFR C677T mutacijom. Ova mutacija je česta u Kini, a glavno javno zdravstveno pitanje je bilo je li probir za MTHFR C677T mutaciju koristan i relevantan za predviđanje rizika od VTE-a (52).

Zeng i sur 2018. ispitali su 99 izabranih studija za procjenu korelacije između mutacija MTHFR C677T/A1298C i rizika od VTE-a. Prvobitna analiza korelacije za mutaciju MTHFR A1298C nije pokazala povezanost s VTE-om. Daljnje analize podskupina prema etničkoj pripadnosti sudionika i tipu bolesti pokazale su da je MTHFR A1298C mutacija značajno povezana s rizikom za razvoj plućne embolije. Za MTHFR C677T mutaciju utvrđena je značajna povezanost s rizikom od VTE-a i plućne embolije te može poslužiti kao potencijalni biološki biljeg za VTE (53).

Pregledom literature uočena je povezanost mutacije FV Leiden i MTHFR 677TT genotipa kao kombiniranog čimbenika rizika za nastanak venskih tromboembolija (36).

Shafia i sur. su u indijskoj populaciji dobili rezultate povezanosti mutacija FV Leiden i mutacije protrombin G20210A s povećanim rizikom od VTE, dok povezanost rizika s MTHFR C677T nije pronađena (50).

Jusić-Karić i sur. su istraživali učestalost i povezanost FV Leiden, FII Protrombin, MTHFR C677T mutacije i nastanak duboke venske tromboze u populaciji Bosne i Hercegovine. Ispitivanje je obuhvatilo 111 tromboembolijskih bolesnika i 207 zdravih

ispitanika. U studiji su potvrdili povezanost FVL i FII mutacije s DVT. Aleli i učestalost genotipa MTHFR C677T mutacije nisu se značajno razlikovali između slučajeva i kontrola (54).

Naši rezultati nisu pokazali povezanost između FVL i C677T MTHFR mutacije i rizika za nastanak venskih tromboembolija. Ne postoji statistički značajna razlika u udjelu nositelja FVL i 677TT mutacije kod pacijenata s VTE-om u odnosu na kontrolnu skupinu, uz vjerojatnost da je rezultat takav zbog ograničenja istraživanja, relativno male skupine bolesnika. Cattaneo i sur. su istraživanjem bolesnika s VTE-om iz Italije dokazali povezanost FV Leiden i MTHFR TT mutacije, uz naglasak da je u talijanskoj populaciji visoka učestalost 677TT mutacija (36).

Zaključno, naši rezultati istraživanja parova između skupine 152 bolesnika s VTE-om i kontrolne skupine 101 dobrovoljnih darivatelja krvi nisu pokazali da se učestalosti genotipova MTHFR C677T i A1298C, kao ni učestalosti T i C alela statistički značajno razlikuju između ispitivanih skupina. Rezultati provedene studije nisu pokazali utjecaj pojedinačnih mutacija C677T i A1298C, kao ni kombinacije obje MTHFR mutacije na trombotički rizik u nastanku venskih tromboembolija. Nije nađena povezanost između F V Leiden i MTHFR CC mutacija i nastanka VTE-a.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti slijedeći zaključci:

- U Hrvatskoj dosad nije objavljena ni jedna populacijska studija vezana uz MTHFR A1298C mutaciju. Dobiveni rezultati pojavnosti genotipova za mutaciju MTHFR A1298C bili su: 44,6 % AA, 44,6 % AC i 10,8 % CC u zdravoj hrvatskoj populaciji.
- Dobiveni rezultati pojavnosti homozigotnih genotipova za mutaciju MTHFR C677T bili su: 15,8 % TT u skupini bolesnika s venskim tromboembolijama nasuprot 11,9 % TT u kontrolnoj skupini (OR = 0,880, 95 % CI (0,53 - 1,46), p = 0,623. Utvrđena učestalost T alela bila je 36,2 % kod bolesnika nasuprot 34,2 % kod kontrolne skupine (OR = 0,941, 95% CI (0,62 - 1,33), p = 0,641).
- Dobiveni rezultati pojavnosti homozigotnih genotipova za mutaciju MTHFR A1298C bili su: 9,9 % CC u skupini bolesnika s venskim tromboembolijama nasuprot 10,9% CC u kontrolnoj skupini (OR = 0,825, 95 % CI (0,49 - 1,37), p = 0,455). Utvrđena učestalost C alela bila je 30,3 % kod bolesnika nasuprot 33,2 % kod kontrolne skupine (OR = 0,874, 95 % CI (0,59 - 1,28), p = 0,491).
- Učestalosti genotipova MTHFR C677T i A1298C, kao ni učestalosti T i C alela nisu se statistički značajno razlikovale između promatranih skupina bolesnika s venskim tromboembolijama i zdravih kontrola.
- Statistički značajna razlika nije dobivena ni usporedbom MTHFR mutacija između spolova. Razlika pojavnosti TT genotipova je nešto viša kod muškaraca 42,9 % nego kod žena 33,8 % u skupini bolesnika.
- Usporedba svih kombinacija za MTHFR C677T i A1298C genotipove nije pokazala statističku značajnost između promatranih skupina. Ni jedan bolesnik s VTE-om nije bio nositelj oba homozigotna genotipa MTHFR mutacija 677TT/1298CC.
- Naši rezultati nisu pokazali povezanost između bolesnika s venskim tromboembolijama koje su istodobno nositelji mutacije faktor V Leiden (G1691A) i MTHFR 677TT genotipa i rizika za nastanak venskih tromboembolija uz $\chi^2 = 1,91$ i p = 0,167.

7. SAŽETAK

Utjecaj kombinacije MTHFR mutacija (C677T i A1298C) na trombotički rizik u nastanku venskih tromboembolija

Uvod: Mutacije gena za metilentetrahidrofolat reduktazu (MTHFR) 677CT i 1298 AC uzrokuju termičku labilnost i smanjenu aktivnost enzima. Homozigotni nositelji genotipova TT i CC imaju povišeni homocistein u plazmi, što uz deficit folata i vitamina B12 predstavlja rizični čimbenik za razvoj venskih tromboembolija (VTE), jednog od vodećih uzroka pobola i smrtnosti u svijetu.

Ciljevi istraživanja: Ispitati učestalost MTHFR mutacija C677T i A1298C u hrvatskoj populaciji te njihovu pojedinačnu/kombiniranu povezanost s trombotičkim rizikom te povezanost mutacija C677T i FV Leiden kao kombiniranog čimbenika rizika za razvoj VTE-a.

Materijali i metode: Nakon odobrenja Etičkog povjerenstva i informiranog pristanka provedena je studija istraživanja parova između skupine 152 bolesnika s klinički i laboratorijski potvrđenom dijagnozom VTE-a i kontrolne skupine od 101 dobrovoljnih darivatelja krvi bez tromboemboličkih epizoda. Nakon izolacije DNA pomoću QIAamp DNA Blood mini kita na uređaju QIAcube (Qiagen, Njemačka), genotipovi mutacija određeni su pomoću RT-PCR na uređaju ABI 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, SAD).

Rezultati: Učestalosti genotipova MTHFR C677T i A1298C, kao ni učestalosti T i C alela nisu se statistički značajno razlikovale između skupine bolesnika i kontrolne skupine. Usporedba kombinacija za MTHFR C677T i A1298C genotipove nije pokazala statističku značajnost između promatranih skupina. Ni jedan bolesnik s VTE-om nije bio nositelj oba homozigotna genotipa MTHFR mutacija. Naši rezultati nisu pokazali povezanost između bolesnika s VTE-om koji su nositelji mutacija faktor V Leiden (G1691A) i MTHFR 677TT i rizika za nastanak VTE-a.

Zaključak: Rezultati provedene studije nisu pokazali utjecaj pojedinačnih kao ni kombinacije mutacija na trombotički rizik u nastanku venskih tromboembolija.

Ključne riječi: FV Leiden mutacija; metilentetrahidrofolat reduktaza; trombotički rizik; venske tromboembolije

8. SUMMARY

The effect of a combined MTHFR mutation (C677T and A1298C) on the thrombotic risk of venous thromboembolism

Introduction: Gene mutations for methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677CT and 1298 AC cause thermal lability and reduced enzyme activity. Homozygous carriers of genotypes TT and CC exhibit elevated homocysteine in plasma, and together with folate deficiency and vitamin B12 is a risk factor for the development of venous thromboembolism (VTE), one of the leading causes of stroke and mortality in the world.

Research Objectives: Investigate the incidence of MTHFR mutations C677T and A1298C in the Croatian population and their individual/combined effect on thrombotic risk and the correlation of mutations C677T and FV Leiden as a combined risk factor for VTE development.

Materials and Methods: Following approval from the Ethics Committee and the informed consent, a case-control study was conducted among a group of 152 patients with clinically and laboratory confirmed VTE diagnoses as well as a control group of 101 voluntary blood donors without thromboembolic episodes. After DNA isolation using QIAamp DNA Blood mini kits on the QIAcube instrument (Qiagen, Germany), genotype mutations were determined using RT-PCR (real-time polymerase chain reaction) on the ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

Results: The frequency of genotypes MTHFR C677T and A1298C, as well as the frequency of T and C allele, did not exhibit a statistically significant difference between patient groups and the controls. Comparing combinations for MTHFR C677T and A1298C genotypes did not show any statistical significance among the observed groups. Not one VTE patient was a carrier of both homozygous genotype MTHFR mutations. Our results did not show a correlation between VTE patients who are carriers of the factor V Leiden (G1691A) and MTHFR 677TT and the risk of VTE.

Conclusion: Our results did not provide evidence of any effects from either single or combined mutations on the thrombotic risk of venous thromboembolism.

Key words: FV Leiden mutation; methylentetrahydrofolate reductase; thrombotic risk; venous thromboembolism

9. LITERATURA

1. Frosst P, Blom HJ, Milos R. A candidate genetic risk factor for vascular disease, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet 1995;10:111-13.
2. Bolander-Gouaille C. Determination of homocysteine: whay, when and how. Stockholm: Bryne Offset. 1999;11-54.
3. Muačević-Katanec D, Merkler A, Fumić K, Barić I, Merkler M, Reiner Ž. Homocistinurija u odraslih bolesnika-važnost ranog prepoznavanja u dječjoj i adolescentnoj dobi. Pediatr Croat. 2014;58:208-15.
4. Trimmer EE. Methylenetetrahydrofolate reductase: biochemical characterization and medical significance. Current Pharmaceutical Design. 2013;19(14):2574-93.
5. Pulanić D, Gverić-Krečak V, Nemet-Lojan Z, Holik H, Coha B, Babok-Flegarić R, i sur. Venous thromboembolism in Croatia – Croatian Cooperative Group for Hematologic Diseases (CROHEM) study. Croat Med J. 2015;56(6):550-7.
6. Fan S, Yang B, Zhi X, Wang Y, Zheng Q, Sun G. Combined genotype and haplotype distributions of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms: A cross-sectional descriptive study of 13,473 Chinese adult women. Medicine (Baltimore). 2016; 95(48):e5355.
7. Yang Y, Luo YY, Wu S, Tang YD, Rao XD, Xiong L, i sur. Association between C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene and risk of male infertility: a meta-analysis. Genet Mol Res. 2016;26:15(2).
8. Pepe G, Camacho Vanegas O, Giusti B, Brunelli T, Marcucci R, Attanasio M, i sur. Heterogeneity in world distribution of the thermolabile C677T mutation in 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase. Am J Hum Genet. 1998;63:917-20.
9. Wilcken B, Bamforth F, Li Z, Zhu H, Ritvanen A, Redlund M, i sur. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetereahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. J Med Genet. 2003;40(8):619-25.
10. Adler G, Agnieszka G, Valjevac A, Czerska E, Kiseljakovic E, i sur. Prevalence of genetic prothrombotic risk factors: 1691G > A FV, 20210G > A PT and677C > T MTHFR mutations in the Bosnian population. Ann Hum Biol. 2015;42(6):576-80.

11. Abdi AA, Osman A. Prevalence of common hereditary risk factors for thrombophilia in Somalia and identification of a novel Gln544Arg mutation in coagulation factor V. J Thromb Thrombolysis. 2017;44(4):536–43.
12. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. Am J Epidemiol. 2000;1;151(9):862-77.
13. 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. Thromb J. 2015;10;13:35.
14. Zapacosta B, Romano L, Persichilli S, Cutrone lA, Graziano M, i sur. Genotype prevalence and allele frequencies of 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms in Italian newborns. LabMedicine; 2009; 40: 732-6.
15. Žuntar I, Topić E, Vukosavić D, Vuković V, Demarin V, Begonja A, i sur. Croatian population data for the C677T polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase: frequencies in healthy and atherosclerotic study groups. Clin Chim Acta. 2003;335(1-2):95-100.
16. Lovričević I, Franjić BD, Tomičić M, Vrkić N, De Syo D, Hudorović N, i sur. 5,10-Methylentetrahydrofolate reductase (MTHFR)677 C→T genetic polymorpism in 228 Croatian Volunteers. Coll Antropol. 28(2);2004,647-54.
17. Jukic I, Bingulac-Popovic J, Dogic V, Babic I, Culej J, Tomicic M, i sur. ABO blood groups and genetic risk factors for thrombosis in Croatian population. Croat Med J. 2009;50(6):550-8.
18. Alfirević Z, Simundic A-M, Nikolac N, Sobocan N, Alfirevic I, Stefanovic M, i sur. Frequency of factor II G20210A, factor V Leiden, MTHFR C677T and PAI-1 5G/4G polymorphism in patients with venous thromboembolism: Croatian case-control study. Biochem Med. 2010;20;229-35.
19. Blann A, Lip G. Venous thromboembolism. BMJ. 2006;332(7535):215-9.
20. Kaushansky K, Lichtman M, Beutler E, Kipps T, Seligsohn U, Prchal J. Williams Hematology. 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2010.
21. Silverstein M, Heit J, Mohr D, Petterson T, O´Fallon W, Melton III L. Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. A 25-year population based study. Arch intern med. 1998;158(6):585-93.
22. Cushman M. Epidemiology and risk factors for venous thrombosis. Semin Hematol. 2007;44(2):62-9.

23. Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d'Etude de la Thrombosede Bretagne Occidentale. Thromb Haemost. 2000;83(5):657-60.
24. Liew SC, Gupta ED. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. Eur J Med Genet. 2015;58(1):1-10.
25. Bezemer ID, Doggen CJ, Vos HL, Rosendaal FR. No association between the common MTHFR 677C>T polymorphism and venous thrombosis: results from the MEGA study. Arch Intern Med. 2007;167(5):497-501.
26. Naess IA, Christiansen SC, Romundstad PR, Cannegieter SC, Blom HJ, Rosendaal FR, i sur. Prospective study of homocysteine and MTHFR 677TT genotype and risk for venous thrombosis in a general population-results from the HUNT 2 study. Br J Haematol. 2008;141(4):529-35.
27. Keijzer MB, Borm GF, Blom HJ, Bos GM, Rosendaal FR, den Heijer M. No interaction between Factor V Leiden and hyperhomocysteinemia or MTHFR 677TT genotype in venous thrombosis. Results of a meta -analysis of published studies and a large case-only study. Thromb Haemost. 2007;97(1):32-7.
28. Mayor-Olea A, Callejon G, Palomares AR, Jimenez AJ, Gaitan MJ, Rodriguez A, i sur. Human genetic selection on the MTHFR 677 C>T polymorphism. BMC Med Genet. 2008;9:104.
29. Gueant-Rodriguez RM, Gueant JL, Debard R, Thirion S, Hong LX, Bronowicki Jp, i sur. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status a comparative study in Mexican, West African, and European populations. Am J Clin Nutr. 2006;83(3):701-7.
30. Spiroski I, Kedev S, Antov S, Arsov T, Krstevska M, Dzhekova-Stojkova S, i sur. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR-677 and MTHFR-1298) genetic polymorphisms with occlusive artery disease and deep venous thrombosis in Macedonians. Croat Med J. 2008;49(1):39-49.
31. Bedencic M, Bozic M, Peternel P, Stegnar M. Major and potential prothrombotic genotypes in patients with venous thrombosis and in healthy subjects from Slovenia. Pathophysiol Haemost Thromb. 2008;36(2):58-63.
32. Marczi S, Tokić S, Krajina N, Glavas-Obrovac Lj The association of factor V Leiden, prothrombin G20210A, MTHFR C677T and PAI-1 5G/4G polymorphisms with deep vein thrombosis and pulmonary embolism in Estern Croatia. Zadar 2014. Book of

Abstracts of the Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology. The Interplay of Biomolecules. HDBMB 2014 Sep 24-27;111-111. Zadar, Croatia.

33. 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 (Kaunas). 2016;52(1):35-40.
34. Jukic I, Bingulac-Popovic J, Dogic V, Hecimovic A, Babic I, Batarilo I, i sur. Evaluation of ABO blood groups as a risk factor for myocardial infarction. Blood Transfus. 2013;11(3):464-5.
35. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, i sur Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature. 1994;369:64-7.
36. Cattaneo M, Tsai MY, Bucciarelli P, Taioli E, Zighetti ML, Bignell M, i sur. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene (C677T) increases the risk for deep-vein thrombosis in patients with mutant factor V (factor V:Q506). Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997;17(9):1662-6.
37. Simone B, De Stefano V, Leoncini E, Zacho J, Martinelli I, Emmerich J, i sur. Risk of venous thromboembolism associated with single and combined effects of Factor V Leiden, Prothrombin 20210A and Methylenetethraydrofolate reductase C677T: a meta-analysis involving over 11,000 cases and 21,000 controls. Eur J Epidemiol. 2013;28(8):621-47.
38. Lenz B, Samardzija M, Drenjancevic D, Zibar D, Samardzija M, Milostic-Srb A. The investigation of hereditary and acquired thrombophilia risk factors in the development of complications in pregnancy in Croatian women. J Matern Fetal Neonatal Med. 2016;29 (2):264-9.
39. Tsai AW, Cushman M, Tsai MY, Heckbert SR, Rosamond WD, Aleksic N, i sur. Serum homocysteine, thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), and venous thromboembolism: Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE). Am J Hematol. 2003;72(3):192-200.
40. Sørensen JT, Gaustadnes M, Stabler SP, Allen RH, Mudd SH, Hvas AM. Molecular and biochemical investigations of patients with intermediate or severe hyperhomocysteinemia. Mol Genet Metab. 2016;117(3):344-50.
41. Kapitanović S, Slade N. Real-time PCR (Metodološki tečajevi u biologiji i medicini) Zagreb: Institut Ruđer Bošković; 2004.

42. Čačev T, Kapitanović S. Određivanje genotipova polimorfizama u jednoj bazi (SNP) metodom TaqMan real-time PCR. Metode u molekularnoj biologiji. Zagreb: Institut Ruđer Bošković; 2007. p. 389-391.
43. Allelic Discrimination Getting Started Guide, Applied Biosystems. Foster City: USA; 2005.
44. Wolberg AS, Rosendaal FR, Weitz JI, Jaffer IH, Agnelli G, Baglin T, i sur.Venous thrombosis. Nat Rev Dis Primers. 2015;7:1:15006.
45. Zöller B, Li X, Ohlsson H, Ji J, Memon AA, Svensson PJ, i sur. Epidemiology of Familial Aggregation of Venous Thromboembolism. Semin Thromb Hemost. 2016;42(8):821-32.
46. Colucci G, Tsakiris DA. Thrombophilia Screening: Universal, Selected, or Neither? Clin Appl Thromb Hemost. 2017;23(8):893-9.
47. 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 Med J. 2013;30(2):197-203.
48. Bezgin T, Kaymaz C, Akbal Ö, Yılmaz F, Tokgöz HC, Özdemir N. Thrombophilic Gene Mutations in Relation to Different Manifestations of Venous Thromboembolism: A Single Tertiary Center Study. Clin Appl Thromb Hemost. 2018;24(1):100-6.
49. 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. Pathophysiol Haemost Thromb. 2002;32(2):51-8.
50. Shafia S, Zargar MH, Khan N, Ahmad R, Shah ZA, Asimi R. High prevalence of factor V Leiden and prothrombin G20101A mutations in Kashmiri patients with venous thromboembolism. Gene. 2018;15;654:1-9.
51. Liu F, Silva D, Malone MV, Seetharaman K. MTHFR A1298C and C677T Polymorphisms are Associated with increased risk of venous thromboembolism: a retrospective chart rewiev study. Acta Haematol 2017;138(4):208-15.
52. Zhang P, Gao X, Zhang Y, Hu Y, Ma H, Wang W, i sur. Association between MTHFR C677T polymorphism and venous thromboembolism risk in the Chinese population: a meta-analysis of 24 case-controlled studies. Angiology. 2015;66(5):422-32.
53. Zeng J, Zeng Q. Correlations between methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and venous thromboembolism: A meta-analysis of 99 genetic association studies. Eur J Prev Cardiol. 2018; 22:2047487318799467.

54. Jusić-Karić A, Terzić R, Jerkić Z, Avdić A, Pođanin M. Frequency and association of 1691 (G>A) FVL, 20210 (G>A) PT and 677 (C>T) MTHFR with deep vein thrombosis in the population of Bosnia and Herzegovina. Balkan J Med Genet. 2016;2;19(1):43-50.

10. ŽIVOTOPIS

Renata Kundid

Datum i mjesto rođenja: 14.08.1976.

Adresa stanovanja: Paška 2, 10360 Sesvete, Zagreb

Broj telefona: 0915422124

E-mail: renata.kundid@gmail.com

OBRAZOVANJE

1991. – 1995. – Zdravstveno učilište Zagreb, smjer zdravstveno-laboratorijski tehničar

1995. – 1996. – Pripravnički staž, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Petrova 3, Zagreb

1996. – 1998. – Visoka zdravstvena škola Zagreb, smjer medicinsko-laboratorijski inženjer

Od ožujka 1999. - Zaposlena u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, Petrova 3, Zagreb

2000. – Tečaj iz transfuzijske medicine, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Petrova 3, Zagreb

2001. – Internal QMS Auditor Training Course ISO 9000:2000

2005. – Razlikovna godina, Zdravstveno veleučilište u Zagrebu, studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike

2011. - Internal QMS Auditor Training Course ISO 9001:2008

2016. - Internal QMS Auditor Training Course ISO 9001:2015