

# Povezanost polimorfizama gena za metilentetrahidrofolat reduktazu i multiple skleroze

---

**Pavlović, Monika**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:553592>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-02**

*Repository / Repozitorij:*

**BIotech**

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA  
Diplomski sveučilišni studij  
„Biotehnologija u medicini“

*Monika Pavlović*

*Povezanost polimorfizama gena za metilentetrahidrofolat reduktazu i  
multiple skleroze*

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
FAKULTET BIOTEHNOLOGIJE I RAZVOJA LIJEKOVA  
Diplomski sveučilišni studij  
„Biotehnologija u medicini“

*Monika Pavlović*

*Povezanost polimorfizama gena za metilentetrahidrofolat reduktazu i  
multiple skleroze*

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

Mentor rada: prof. dr. sc. Nada Starčević Čizmarević

UNIVERSITY OF RIJEKA  
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY AND DRUG DEVELOPMENT  
Graduate university program  
„Biotechnology in medicine“

*Monika Pavlović*

*Association between methylenetetrahydrofolate reductase gene  
polymorphisms and multiple sclerosis*

Master thesis

Rijeka, 2024.

Diplomski rad obranjen je dana XX.rujna 2024.

pod povjerenstvom:

1.

2.

3.

Rad ima 66 stranica, 16 slika, 19 tablica i 42 literaturna navoda.

## Sažetak

Multipla skleroza (MS) kronična je autoimuna bolest s neurodegenerativnim posljedicama, koju karakteriziraju upalna područja, demijelinizacija i degeneracija aksona. Etiologija ove bolesti još uvijek nije u potpunosti razjašnjena zbog kompleksne veze između okolišnih čimbenika, genetske predispozicije i virusne infekcije pri čemu ovi faktori u većoj ili manjoj mjeri mogu igrati ulogu u riziku za razvoj bolesti te nisu međusobno isključivi. Jedan od gena asociiran s podložnošću za MS je MTHFR gen. Polimorfne varijante gena, MTHFR C677T i MTHFR A1298C, rezultiraju reduciranom aktivnošću enzima kodiranog pripadnim genom. Time je narušen balans metabolizma folata i metionina, što uzrokuje povećane razine neurotoksičnog homocisteina i slobodnih radikala, koji oštećuju mijelin te smanjene razine S-adenozilmetiona neophodnog za remijelinizaciju. Dosadašnja istraživanja u različitim populacijama pokazala su nedosljednosti u rezultatima u pokušaju da povežu polimorfizme s predispozicijom za MS. Ovo istraživanje provedeno je PCR-RFLP metodom na 200 MS bolesnika i 200 kontrolnih ispitanika u svrhu definiranja uloge MTHFR polimorfizama u predispoziciji za MS i kliničkoj ekspresiji bolesti. Obradom rezultata otkriveno je da polimorfizmi MTHFR C677T i MTHFR A1298C ne pridonose povećanom riziku za MS. Međutim, pronađena je povezanost između prisustva T alela MTHFR C677T polimorfizma i povećanog progresijskog indeksa bolesti te potencijalan utjecaj C alela MTHFR A1298C polimorfizma na trajanje bolesti. Analiza međudjelovanja između polimorfizama ukazuje na povećan rizik od obolijevanja za osobe s kombinacijom genotipova CC/AC i moguć smanjen rizik za one s CC/CC kombinacijom. Zaključno, ispitivani polimorfizmi ne pridonose podložnosti za MS, ali mogu modificirati ekspresiju bolesti što se mora uzeti s rezervom obzirom na ograničen broj ispitanika s pojedinim kombinacijama polimorfizama.

Ključne riječi: MTHFR - metilentetrahidrofolat reduktaza; multipla skleroza; polimorfizam, genski.

## Summary

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease with neurodegenerative consequences, characterized by inflammatory areas, demyelination and axonal degeneration. The etiology of this disease is still not fully elucidated due to the complex relationship between environmental factors, genetic predisposition and viral infection, whereby these factors can play a role in the risk for the development of the disease to a greater or lesser extent and are not mutually exclusive. One of the genes associated with susceptibility to MS is the MTHFR gene. Polymorphic gene variants, MTHFR C677T and MTHFR A1298C, result in reduced activity of the enzyme encoded by the corresponding gene. This disrupts the balance of folate and methionine metabolism, which causes increased levels of neurotoxic homocysteine and free radicals, which damage myelin, and reduced levels of S-adenosylmethionine, necessary for remyelination. Previous studies in different populations have shown inconsistencies in the results in an attempt to link polymorphisms with a predisposition to MS. This research was conducted using the PCR-RFLP method on 200 MS patients and 200 control subjects in order to define the role of MTHFR polymorphisms in the predisposition to MS and the clinical expression of the disease. Processing the results revealed that the MTHFR C677T and MTHFR A1298C polymorphisms do not contribute to an increased risk for MS. However, an association was found between the presence of the T allele of the MTHFR C677T polymorphism and an increased disease progression index, and the potential influence of the C allele of the MTHFR A1298C polymorphism on the duration of the disease. Analysis of the interaction between polymorphisms indicates an increased risk of the disease for people with the combination of CC/AC genotypes and a possible reduced risk for those with the CC/CC combination. In conclusion, the studied polymorphisms do not contribute to susceptibility to MS, but they can modify the expression of the disease, which must be taken with

caution considering the limited number of subjects with certain combinations of polymorphisms.

Keywords: MTHFR - methylenetetrahydrofolate reductase; multiple sclerosis; polymorphism, genetic.



## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Multipla skleroza (MS) .....	2
1.1.2. Patofiziologija MS.....	2
1.1.3. Klinička slika bolesnika.....	8
1.1.4. Rizični faktori za MS .....	12
Okolišni čimbenici.....	12
Genetska predispozicija .....	14
1.2. MTHFR -5-10-metilentetrahidrofolat reduktaza.....	17
1.2.1. MTHFR gen.....	18
1.2.3. MTHFR i multipla skleroza .....	20
2. Cilj rada .....	21
3. Materijali i metode .....	22
3.1. Ispitanici.....	22
3.2. Metode rada.....	24
3.2.1. Izolacija DNA.....	24
3.2.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR).....	25
3.2.2.1. Analiza C677T polimorfizma MTHFR gena (1. dio).....	26
3.2.2.2. Analiza A1298C polimorfizma MTHFR gena (1. dio).....	27
3.2.3. Elektroforeza .....	28
3.2.4. Enzimaska restrikcija.....	30
3.2.5. Statistička analiza.....	34
4. Rezultati .....	35
4.1. Utjecaj MTHFR C677T polimorfizma na podložnost za MS.....	35
4.2. Utjecaj MTHFR C677T polimorfizma na kliničku ekspresiju MS .....	38
4.3. Utjecaj MTHFR A1298C polimorfizma na podložnost za MS .....	42
4.4. Utjecaj MTHFR A1298C polimorfizma na kliničku ekspresiju MS.....	45
4.5. Međudjelovanje polimorfizama C677T i A1298C MTHFR gena u podložnosti za MS.....	49
4.5. Međudjelovanje polimorfizama C677T i A1298C MTHFR gena na kliničku ekspresiju MS.....	51
5. Rasprava.....	54
5. Zaključak.....	62
Literatura .....	64
Životopis.....	67



## 1.Uvod

Multipla skleroza (lat. *Sclerosis multiplex*, MS) je kronična imunološka i neurodegenerativna inflamatorna bolest koja napada mijelinizirane aksone u središnjem živčanom sustavu (SŽS), oštećujući mijelin i aksone u različitim stupnjevima [1]. MS pogađa 2,8 milijuna ljudi diljem svijeta, s prosječnom prevalencijom od 142 slučaja na 100 000 stanovnika u Europi i više od 200 slučajeva na 100 000 stanovnika u nekim regijama sjeverne Europe i Sjeverne Amerike [2].

MS je 2–4 puta češća u žena nego u muškaraca [2]. Može se pojaviti u obiteljima, pri čemu 15% pacijenata prijavljuje oboljelog rođaka, a kod braće i sestara pacijenata postoji 7 puta veći rizik za bolest. Bolest rijetko pogađa tri ili četiri rođaka, a slučajevi obitelji s više od četiri pacijenta izuzetno su neuobičajeni. [3].

Patološka obilježja su upala, demijelinizacija i neurodegeneracija, čija se važnost mijenja s dobi i trajanjem bolesti. Dijagnoza se postavlja prema revidiranim McDonaldovim kriterijima [4] i temelji se na MRI dokazima o lezijama bijele tvari u mozgu i leđnoj moždini, oligoklonalnim trakama u likvoru i fizičkim simptomima bolesti. MS ima tipičan početak u osoba dobi od 20 do 40 godina, a uočen je i pedijatrijski početak prije 18. godine života [2]. Prognoza je nepouzdana pa se oboljeli od MS suočavaju s nepredvidivim tijekom bolesti koji može uključivati različite stupnjeve tjelesnog invaliditeta, te kognitivne simptome i umor. U većini slučajeva bolest ima relapsno-remitirajući (RR) tijek s kratkim napadima neurološkog poremećaja koji se u bolesti, u potpunosti ili gotovo u potpunosti, povlače [3].

## 1.1. Multipla skleroza (MS)

Unatoč tome što je MS prepoznata i proučavana više od 150 godina, njezin temeljni uzrok ostaje nedokučiv [5]. Patofiziologija MS-a može biti povezana s nasljednom predispozicijom i još neutvrđenim negenetskim okidačem koji rezultira dugotrajnom autoimunom bolešću što dovodi do ponavljajućih imunoloških procesa u SŽS. Brojna molekularno-genetička istraživanja posljednjih 50 godina govore u prilog genetičke podloge za MS. Zemljopisna varijacija u incidenciji MS-a ukazuje na uzroke iz okoliša [1]. Dakle, sve više dokaza ukazuje na to da više okolišnih i genetskih čimbenika doprinose bolesti. Ovi čimbenici, i okolišni i genetski, nisu međusobno isključivi, već sinergijski djeluju. Nijedan od njih ne objašnjava neovisno uzročnost, niti dosljedno korelira s rizikom MS-a u različitim populacijama [5].

### 1.1.2. Patofiziologija MS

MS je kompleksan, kroničan neurodegenerativan autoimuni poremećaj okarakteriziran upalnim procesom koji zahvaća SŽS. MS se manifestira unutar SŽS-a stvaranjem upalnih lezija u bijeloj tvari mozga i leđne moždine. Te su lezije rezultat ponovljenih autoimunih napada na prirodne antigene povezane s mijelinom (slika 1) [5].

Predloženi su mnogi mogući putovi autoimunih napada, ali jedan od glavnih mehanizama uključuje proupalne CD4+ T-stanice. Prema ovoj teoriji, neidentificirani antigen izbacuje i aktivira i T1 pomoćne stanice (Th1) i pomoćne stanice (Th17) i započinje proces prijanjanja tih stanica na endotel središnjeg živčanog sustava, prelazeći kroz krvno-moždanu barijeru i tako pokrećući imunološki napad kroz unakrsnu reaktivnost. Alternativna teorija, poznata kao „obrnuti“ mehanizam, sugerira da

kongenitalni defekt u SŽS-u sam proizvodi napad i na kraju dovodi do upale posredovane razaranjem tkiva [1].

Napadi su uzrokovani autoreaktivnim imunološkim stanicama koje probijaju krvno-moždanu barijeru nakon što zakažu mehanizmi periferne tolerancije. Oštećena funkcija regulatornih T-stanica i otpornost autoreaktivnih T-stanica na supresiju mehanizmi su kroz koje periferna tolerancija može zakazati. Pretpostavlja se da međudjelovanje genetskih i okolišnih čimbenika rizika utječe na aktivnost i aktivaciju autoreaktivnih stanica. Perivaskularni limfocitni infiltrat i makrofagi uništavaju mijelinske ovojnice koje patološki obavijaju neurone [1] što rezultira degeneracijom aksona i smrti oligodendrocita. Ovaj proces u konačnici dovodi do ometanja neuronskih mreža zbog demijeliniziranih plakova ili ožiljaka [5].

Dominantni mehanizam koji konačno dovodi do demijelinizacije i neurodegeneracije je kaskada oksidativnih ozljeda, oštećenja mitohondrija, "virtualne hipoksije" i njezinih nizvodnih molekularnih posljedica. Ovaj mehanizam je pojačan čimbenicima povezanim sa starenjem mozga i nakupljanjem lezija u SŽS-u [6].

Demijelinizacija i neurodegeneracija u mozgu oboljelih povezana je s reakcijom astroglije, formiranjem gustog glijalnog ožiljka u dugotrajnim lezijama. Neko se vrijeme pogled na patologiju MS-a usredotočio na žarišne demijelinizirane plakove u bijeloj tvari. No, s vremenom je postalo jasno da su lezije također prisutne u sivoj tvari, uključujući korteks, bazalne ganglije, moždano deblo i sivu tvar leđne moždine [6].

Nadalje, postoji neurodegeneracija koja utječe na mozak i leđnu moždinu u globalnom smislu, dovodeći do gubitka aksona u normalnoj bijeloj tvari, te difuzna neurodegeneracija u cijeloj sivoj tvari. Ove promjene konačno rezultiraju gubitkom moždanog tkiva i atrofijom. Analiza početnih stadija lezija bijele tvari pokazala je iznenađujuće malu upalu u usporedbi s onom koja se vidi u kasnijim, naprednijim stadijima lezije. Iz tih razloga, iako postoje neslaganja, predloženo je da MS može biti rezultat primarnog

neurodegenerativnog procesa, koji je modificiran ili pojačan upalnom reakcijom [6].

Plakovi su prisutni u svim oblicima MS-a, no njihova ekspresija varira tijekom vremena, pokazujući duboku heterogenost u imunopatološkim obrascima bolesti između relapsno-remitirajućeg tijeka i progresivnih oblika bolesti [7].

Primarne podskupine T-stanica uključene u MS uključuju CD8+ T-stanice, CD4+ Th1 stanice i Th17 stanice. Interferon-gama, IL-17 i faktori koji stimuliraju kolonije granulocita-makrofaga su citokini koje proizvode autoreaktivne T-stanice i mogu pridonijeti patofiziologiji MS [1].

Povećani imunoglobulin u cerebralnoj tekućini ukazuje na ulogu B-stanica u MS-u. Intratekalna proizvodnja oligoklonalnih imunoglobulina, također poznatih kao oligoklonalne trake (OCB), dijagnostička je značajka MS-a. U MS, većina B-stanica u cerebrospinalnoj tekućini (CSF) i parenhimu mozga su CD27+ memorijske B-stanice. Memorijske B-stanice su klonski namnožene u likvoru i parenhimu mozga te pokazuju somatsku hipermutaciju i transkripte imunoglobulina s promjenom klase. Nadalje, preklapanje imunoglobulinskih proteoma likvora i transkriptoma imunoglobulina B-stanica pruža dokaz da su stanice koje izlučuju antitijela, izvedene iz klonalno ekspanziranih B-stanica unutar SŽS-a, značajan izvor prekomjerne intratekalne proizvodnje klonskih imunoglobulina, kao što pokazuje prisutnost OCB u CSF [8].

Moždane ovojnice u pacijenata s MS-om uključuju upalne infiltrate B-stanica. B-stanice mogu poslužiti kao spremnici Epstein-Barr virusa (EBV) [7]. Nakon infekcije EBV-om, B-stanice se transformiraju u stanice koje obrađuju antigene, što rezultira preciznijom prezentacijom antigena. Pokazalo se da je rekombinantni humani mijelinski oligodendrocitni glikoprotein internaliziran i unakrsno predstavljen EBV-inficiranim B-stanicama, koje su učinkovito identificirane citotoksičnim CD8+ T-

stanicama. Nadalje, B-stanice dobivene od pacijenata s MS-om imale su više CD40 na svojoj površini, što ukazuje da B-stanice učinkovitije isporučuju antigene [9].

Povećana ekspresija markera aktivacije B-stanica u osoba s relapsno-remitirajućom multiplom sklerozom (RRMS) povezana je s visokim stupnjem neurodegeneracije, na što ukazuje porast broja T1 hiperintenzivnih lezija i smanjenje volumena mozga. Uz bolesti povezane s B-stanicama, gubitak normalnog funkcioniranja populacije efektorskih T-stanica može pridonijeti tijeku MS-a [9].

U zdravih ljudi, CD8+ citotoksične T-stanice koje eliminiraju limfoblastoidne stanične linije zaražene EBV-om drže EBV infekciju pod kontrolom. Budući da su određene citotoksične CD8+ stanice pripremljene za identifikaciju i ubijanje zaraženih stanica koje izražavaju EBV latentne proteine, nazivamo ih „T-stanice specifične za latenciju“. Tijekom egzacerbacije MS-a, EBV-specifična populacija T-stanica se širi, a aktivnost CD8+ T-stanica specifična za latenciju se povećava. Međutim, kako MS napreduje, CD8+ T-stanice specifične za latenciju pokazuju iscrpljeni fenotip i ne mogu inhibirati proliferaciju latentno zaraženih stanica. To rezultira situacijom u kojoj povećani broj zaraženih stanica inhibira autoregulacijski sustav i dodatno iscrpljuje T-stanice. Rekurentni recidivi mogu se povezati s lošim upravljanjem reaktivacijom EBV-a, što dovodi do povećane infekcije naivnih B-stanica i stvaranja virusa [9].

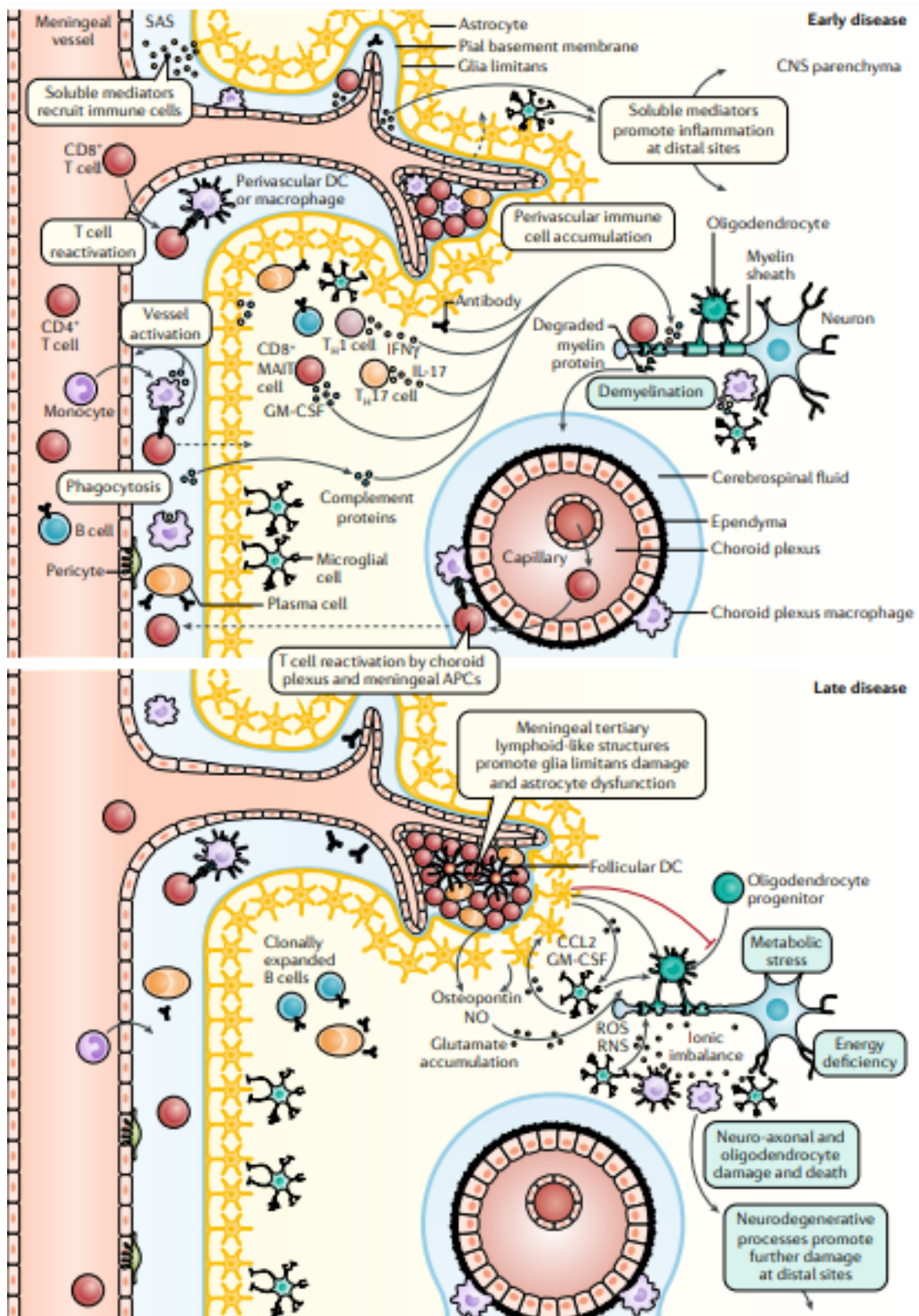
Dodatni patološki putovi koji uključuju B-stanice u MS-u uključuju prezentaciju antigena T-stanicama i otpuštanje potencijalno štetnih tvari koje mogu oštetiti oligodendrocite. Mikroglija i makrofagi igraju ulogu otpuštanjem različitih citokina, uključujući čimbenik tumorske nekroze (TNF)- $\alpha$  i interleukin (IL)-1 $\beta$ , koji mogu pridonijeti neurodegeneraciji putem stanične smrti izazvane citokinima. Oni također inhibiraju ponovnu pohranu glutamata od strane astrocita i induciraju disfunkciju u proteinima koji vežu ribonukleinsku kiselinu [1].

Nadalje, mikroglia i makrofagi mogu sami otpuštati glutamat, potencijalno pridonoseći ekscitotoksičnosti glutamata i neurodegeneraciji. Ove stanice također proizvode reaktivne vrste kisika/dušika, što može dovesti do oksidativnog stresa (OS) i oštećenja mitohondrija, potencijalno pridonoseći neurodegeneraciji (slika 1). S druge strane, mikroglia može izraziti protuupalne fenotipove, koji potiču proces remijelinizacije, ključni aspekt popravljanja oštećenja kod MS-a [1].

U kontekstu MS-a, oksidativna ozljeda je dokazana histopatologijom tijekom trajanja bolesti. Unutar lezija MS-a povećani su enzimi povezani s proizvodnjom slobodnih radikala. Slobodni radikali kisika (ROS) nastaju izravno upalom, osobito zbog spomenute mikroglie. Mitohondrijska disfunkcija i permeabilizacija mitohondrijske membrane prisutna je u MS-u i, uz uzrokovanje aksonske disfunkcije, proizvodi prekomjerni ROS što dovodi do smrti neurona (slika 1). Također, uočeno je da morfološka promjena mitohondrija sa smanjenom aktivnošću kompleksa I, III, IV korelira s oštećenjem aksona. [10].

Željezo se oslobađa iz područja aktivne demijelinizacije i pridonosi oksidativnom stresu [11]. Ono naglašava oslobađanje ROS-a pomoću NADPH oksidaze u mikrogliji. Prisutnost iona dvovalentnog željeza koje stvaraju oligodendrociti oštećeni MS-om tijekom demijelinizacije može pojačati stvaranje slobodnih radikala. Željezo se prvenstveno skladišti u oligodendrocitima, a visoka intracitoplazmatska akumulacija željeza u oligodendrocitima može objasniti preferencijalnu osjetljivost ovih stanica na degeneraciju kao odgovor na OS. Međutim, iako željezo igra ulogu u OS-u, mnoge regije nakupljaju željezo, a ne pokazuju prekomjerno stvaranje slobodnih radikala [10].





Slika 1. Disregulacija imunološkog sustava unutar središnjeg živčanog sustava u ranoj i kasnoj MS. Preuzeto iz [12].

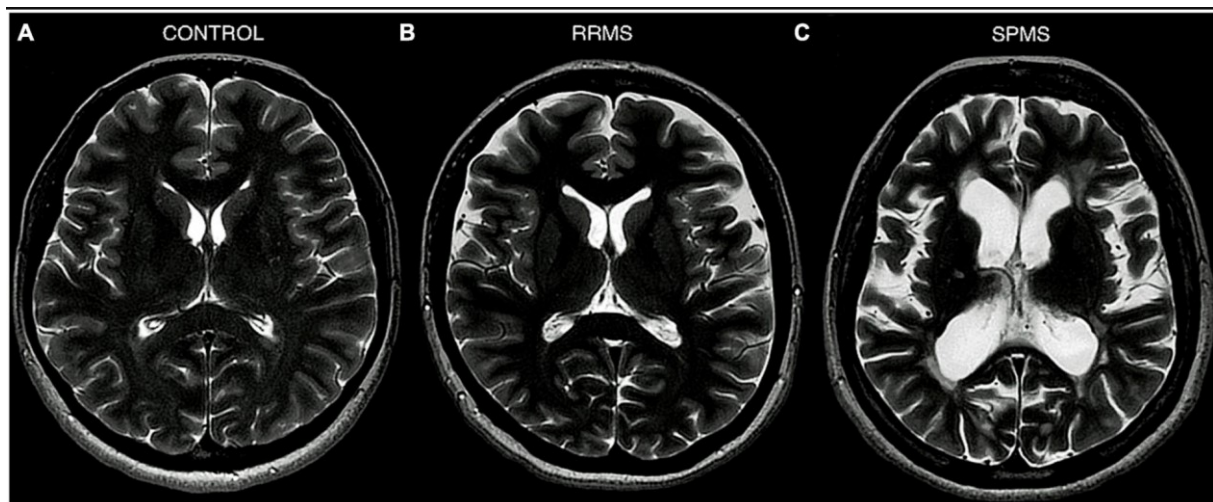
### 1.1.3. Klinička slika bolesnika

Manifestacije klinički izoliranog stanja variraju, a simptomi ovise o mjestu lezije, te su potencijalno jedno- ili multisimptomatski. Uobičajeno, MS se može prezentirati u sindromu moždanog debla, leđne moždine i optičkim neuritisom, iako postoje manje tipične prezentacije, poput kortikalnih - sindrom dominantnog parijetalnog režnja [13].

Tijek bolesti može biti RRMS, primarno progresivan (PPMS) i sekundarno progresivan (SPMS) MS [14]. Mali dio bolesnika s MS-om ima benigni tijek bolesti. Ovaj tijek definiran je nedostatkom tjelesnog invaliditeta, što se posebno odnosi na kretanje. Međutim, pacijenti mogu i dalje biti onesposobljeni nemotoričkim simptomima (umor, bol, depresija i kognitivna disfunkcija) [15]. RRMS tipično uključuje razdoblja kliničkih recidiva koji se podudaraju s pojavom upalnih lezija s varijabilnim oporavkom. SPMS opisuje pacijente koji su u početku imali remisije, ali su recidivi kasnije tijekom godina akumulirali invaliditet. I primarni i sekundarni tijek progresivne MS bolesti pokazuju sve veće kliničke poteškoće, ali i manje česte upale [14]. MS općenito obuhvaća tri stadija: 1. pretklinički stadij, u kojem kombinacija genetskih čimbenika i čimbenika okoliša izazivaju bolest; 2. RRMS klinički stadij karakterizira diskretne, samoograničene epizode neurološke disfunkcije, kao što je optički neuritis, senzorni poremećaji ili poremećaji motoričke i cerebelarne funkcije u 85% bolesnika (upalni stadij može započeti subklinički i biti vidljiv isključivo MRI slikom); i 3. progresivna klinička faza tijekom koje se neurološka disfunkcija progresivno pogoršava, utječući, posebice, na pacijentov hod. U nekih bolesnika (5-10%) MS može biti progresivna kada se simptomi bolesti pogoršavaju od samog početka, tada govorimo o PPMS [10].

Relapsi u MS-u obično se razvijaju subakutno tijekom nekoliko sati ili dana, zaostaju nekoliko tjedana, a zatim se postupno oporavljaju. Iako može doći do velikog kliničkog oporavka, većina recidiva s vremenom ostavlja zaostala oštećenja [1]. Na primjer, oštrina vida može se poboljšati nakon akutnog optičkog neuritisa, ali poremećaji vida u boji, kontrastne osjetljivosti i percepcije dubine mogu trajati. Kako se neuronska rezerva smanjuje, oporavak od relapsa postaje nedostatan, što dovodi do nakupljanja neuronskih nedostataka i trajnog oštećenja [16].

Putem MRI-a uočeno je približno 10 "asimptomatskih" lezija za svaki klinički napad. Manje lezije u značajnoj regiji mogu proizvesti simptome. Vidljive lezije na MRI (slika 2) predstavljaju samo dio ukupnog broja; mnogo više lezija postoji na mikroskopskoj razini, uključujući duboku i kortikalnu sivu tvar. Sekundarno progresivna MS obično se razvija 10-15 godina nakon početka RRMS, koju karakterizira pomak od izoliranih recidiva do postupnog napredovanja bolesti [16].



*Slika 2. MRI, aksijalni presjek. Usporedba stupnja atrofije mozga i volumena moždanih ventrikula između zdravih kontrola (A), pacijenata s RRMS (B) i pacijenata sa SPMS (C), preuzeto iz [17].*

Ne postoji jasna granica između ovih kategorija bolesti, s recidivima koji se javljaju u pozadini stalne progresije. Kognitivno oštećenje i povećana MRI atrofija u ranoj MS ukazuju na neurodegeneraciju od početka kliničkih simptoma. U 5 do 15% slučajeva PPMS manifestira se kao sporo, progresivno oštećenje koje zahvaća dominantni neuralni sustav. Progresivna spastična parapareza najčešća je prezentacija, iako su opisane i senzorna ataksija, cerebelarna ataksija, kognitivno oštećenje i uznapredovalo zatajenje vida [1].

Dijagnostički kriteriji za MS koji kombiniraju kliničke, slikovne i laboratorijske dokaze evoluirali su tijekom vremena. U svakom slučaju, dijagnoza MS-a zahtijeva potrebnu kliničku ekspertizu za dokazivanje dokaza diseminacije u vremenu (DIT) i prostoru (DIS) i isključivanje drugih neuroloških stanja pomoću MRI-a [18]. Sve veća inkorporacija parakliničkih procjena, posebno slikovnih tehnika poput MRI za dopunu kliničkih nalaza omogućila je raniju, osjetljiviju i specifičniju dijagnozu.

Nekoliko je ključnih načela u podlozi dijagnoze:

1. Sindrom "tipičan" za MS
2. Objektivni dokaz zahvaćenosti SŽS-a (gotovo uvijek MRI mozga i leđne moždine koja potvrđuje demijelinizirajuće lezije)
3. Diseminacija u prostoru – lezije koje zahvaćaju više područja SŽS-a
4. Diseminacija u vremenu – višestruki klinički događaji demijelinizacije ili magnetska rezonanca koja pokazuje lezije s pojačanim kontrastom (što ukazuje na akutnu demijelinizaciju) i lezije bez kontrasta (što ukazuje na kroničnost) [19].

Proširena ljestvica statusa invaliditeta (*engl. Expanded Disability Status Scale -EDSS*), razvijena od strane neurologa Johna Kurtzkea 1983. godine, služi kvantificiranju invaliditeta u pacijenata s MS-om i praćenja

promjena u razini invaliditeta tijekom vremena. EDSS ljestvica kreće se od 0 do 10 u pomacima od 0,5 jedinica što predstavlja više razine invaliditeta utemeljene pregledom neurologa.

EDSS koraci 1,0 do 4,5 odnose se na osobe s MS-om koje mogu hodati bez ikakve pomoći i temelji se na mjerama oštećenja u osam funkcionalnih sustava (FS): piramidalni – slabost mišića ili otežano kretanje, cerebelarni – ataksija, gubitak ravnoteže, koordinacije ili tremor, moždano deblo – problemi s govorom, gutanjem i nistagmusom, osjetilni – utrnulost ili gubitak osjeta, rad crijeva i mjehura, vizualna funkcija - problemi s vidom, cerebralne funkcije - problemi s mišljenjem i pamćenjem i drugo. Funkcionalni sustav predstavlja mrežu neurona u mozgu koji su odgovorni za određene zadatke. Svaki funkcionalni sustav se ocjenjuje na ljestvici od 0 (bez invaliditeta) do 5 ili 6 (teži invaliditet).

EDSS koraci 5,0 do 9,5 definirani su smetnjama hodanja od pomoći štapom do invalidskih kolica i prikovanosti za krevet. Iako ljestvica uzima u obzir invaliditet povezan s uznapredovalom MS, većina bolesnika nikada neće dosegnuti krajnje vrijednosti [20].

#### 1.1.4. Rizični faktori za MS

##### Okolišni čimbenici

Čimbenici povezani s načinom života/okolinom u razvoju MS-a uključuju EBV infekciju, izloženost duhanskom dimu i organskim otapalima, pretilost u adolescenciji, ograničeno izlaganje suncu i nedostatak vitamina D, rad u noćnoj smjeni, a sve je povezano s povećanim rizikom (slika 3). [21]. U prilog okolišnih čimbenika uglavnom ide i proučavanje migracija koje je pokazalo da migranti koji se presele iz zemlje visokog rizika u zemlju niskog rizika prije puberteta/adolescencije imaju smanjenu stopu bolesti, dok oni koji se presele u kasnijoj dobi zadržavaju visok rizik [11].

##### *EBV*

Brojni infektivni uzročnici predloženi su kao potencijalni uzročnici razvoja MS-a, pri čemu je jedan uzročnik istaknut kao najznačajniji EBV. Unatoč neslaganjima o njegovoj uzročnoj ulozi zbog poteškoća u uspostavljanju izravne uzročno-posljedične veze zbog toga što EBV nije izoliran u CSF-u, kumulativni posredni dokazi upućuju na povezanost [21].

Istraživanja upućuju na to da su osobe koje su imale klinički evidentnu infektivnu mononukleozu (IM) izložene više nego dvostruko većem riziku od razvoja MS-a [22]. Ključno je naglasiti da se čini da postoji određeni vremenski okvir tijekom kojeg je infekcija EBV-om povezana s povećanim rizikom od razvoja MS-a. Gotovo sve odrasle osobe s dijagnosticiranom MS pokazuju serološke znakove prošle infekcije EBV-om, međutim, EBV je ubikvitaran i u općoj populaciji. Oboljeli od MS obično imaju povišene razine protutijela usmjerenih na Epstein-Barr nuklearni antigen 1 (EBNA1) [23]. Infekcije koje se javljaju tijekom adolescencije ili kasnije povezane

su s povećanim rizikom od MS-a, dok to nije slučaj s infekcijama dobivenim tijekom djetinjstva [21].

#### *Deficijencija vitamina D*

Uloga vitamina D u stimulaciji limfocita i modulaciji rasta i imunološkog odgovora ukazuje na njegovu značajnu uključenost u razvoj MS. Vitamin D ima utjecaj na reakcije urođenog imunološkog sustava i adaptivnu imunološku aktivnost [1]. U to ubrajamo široke učinke na imunološki sustav, uključujući suzbijanje proliferacije B-stanica i T-stanica, skretanje T-stanica od upalnih odgovora prema regulatornim T-staničnim (Treg) odgovorima, sposobnost smanjenja proizvodnje proupalnih citokina posredovanih Th1 stanicama te promicanje tolerogenih fenotipa monocita i dendritičnih stanica [11]. Brojna ispitivanja pokazala su značajne promjene u razinama interleukina-10 (IL-10) i interleukina-17 (IL-17) nakon primjene vitamina D [24].

MS je raširenija među pojedincima koji žive na većim udaljenostima od ekvatora, s nižom topom prevalencije u populaciji koja živi blizu ekvatora, ali se povećava na 50 slučajeva na 1.000.000 pojedinaca koji žive 45 stupnjeva sjeverno ili južno. Nedostatak vitamina D među pacijentima s MS-om moguće pridonosi ovakvoj geografskoj distribuciji [1].

#### *Ostali okolišni čimbenici*

U novije vrijeme sve više pažnje u složenim bolestima privlači analiza mikrobioma sekvenciranjem. Početna istraživanja provedena u odrasloj i pedijatrijskoj populaciji pokazala su razlike u sastavu crijevne mikrobiote između oboljelih od MS i kontrolnih skupina. Potencijalna povezanost mogla bi biti rezultat proizvodnje neuromodulatornih i imunomodulacijskih tvari i metabolita od strane crijevnih mikroorganizama. Međutim, ostaje

nejasno igraju li promjene u crijevnoj mikrobioti uzročnu ulogu u razvoju MS ili MS dovodi do promjena u crijevnoj mikrobioti [11,23].



Slika 3. Rizični faktori za MS, preuzeto iz [25].

### Genetska predispozicija

Epidemiološka i istraživanja heritabilnosti pokazala su da rizik od MS-a ima nasljednu komponentu na koju utječe više genetskih čimbenika. Svaki genetski faktor rizika doprinosi samo malom dijelu ukupnog rizika, a njihov zajednički učinak određuje genetsku osjetljivost pojedinca na bolest. Ova poligenetska arhitektura rizika od MS-a naglašava njegovu složenost, kojom upravlja mreža genetskih čimbenika [3].

Genetska istraživanja imaju za cilj mapirati te varijante rizika i razumjeti njihove biokemijske i fiziološke učinke kako bi se otkrila temeljna biologija bolesti. Dok su studije obiteljske povezanosti uspješno identificirale uzroke monogenetskih bolesti s Mendelovim obrascima nasljeđivanja, ovaj je pristup bio manje plodonosan u slučaju MS-a zbog nedostatka višestruko



oboljelih obitelji i izazova u prikupljanju uzoraka kroz generacije, osobito za bolesti koje se javljaju u odrasloj dobi [3]. Ipak su, obiteljske, adoptivne i studije na blizancima uz druge genetičke studije ukazale da rizik raste od populacijskog 1/1000, preko 1/100 u braće i sestara do 1/10 u monozigotnih blizanaca.

Jedan od najznačajnijih lokusa genetske podložnosti za MS nalazi se u genskoj regiji glavnog sustava tkivne snošljivosti (*engl. major major histocompatibility complex* – MHC). Uočene su primarne povezanosti MS-a i ovog sustava u čovjeka s varijacijama u HLA-DR2 alelima humanog leukocitnog antigena (HLA), iako snaga ove povezanosti varira među različitim populacijama. Dodatne povezanosti MS rizika identificirane su također u HLA lokusima, uključujući HLA-DR3, -DR4, -DQ2, -DQ6 i -DQ8 varijante alela. Međutim, procjenjuje se da te povezanosti HLA haplotipa objašnjavaju samo 4% heritabilnosti MS-a, dok ostalih preko 200 *non*-HLA varijanti pridonosi još otprilike 20% heritabilnosti [26]. Ovo naglašava važnost etničkih, geoepidemioloških i okolišnih čimbenika koji doprinose riziku od MS-a. Unatoč ograničenim podacima o genetskim čimbenicima rizika za MS iz određenih populacija, pronađene su pozitivne povezanosti s polimorfizmima u genima povezanim s HLA klasom, genima sintaze dušikovog oksida (NOS), genom za receptor vitamina D , gen za leptin i drugima [5].

Nastavno, pokazana je povezanost otprilike 200 varijanti autosomne osjetljivosti izvan glavnog skupa gena sustava tkivne snošljivosti otkrivajući različite markere osjetljivosti i gene modifikatore s nekonzistentnim vezama među različitim MS populacijama. Dodatno, identificirana je i varijanta na kromosomu X te 32 neovisne varijante unutar proširene regije sustava tkivne snošljivosti. Većina ovih varijanti nalazi se u nekodirajućim regijama genoma, mnoge unutar intergenskih

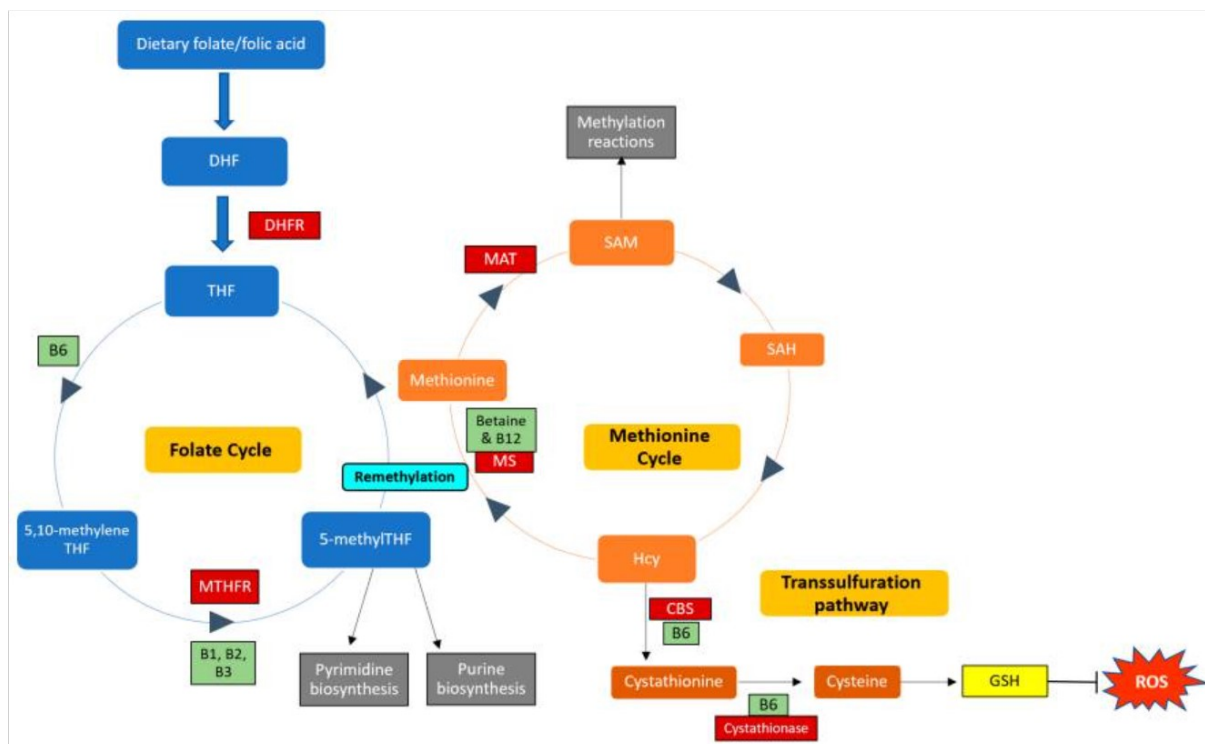
regija. Vjeruje se da te varijante utječu na regulatorne mehanizme i aktivnost gena. Značajno je da su mnoge od ovih genetskih varijanti povezanih s MS-om smještene u blizini gena koji upravljaju urođenim ili adaptivnim imunitetom, a dijele ih i nekoliko drugih autoimunih poremećaja [23].

## 1.2.MTHFR -5-10-metilentetrahidrofolat reduktaza

Enzim 5-10-metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR) ključan je za staničnu homeostazu zbog svojih funkcija u ciklusu metilnih skupina, što uključuje metabolizam metionina i folata te sintezu proteina, DNA i RNA (slika 1). Enzim je odgovoran za održavanje ravnoteže metionina i homocisteina (Hcy) kako bi se spriječila stanična disfunkcija [27].

Enzim MTHFR katalizira pretvorbu 5,10 metilentetrahidrofolata (5,10-MTHF) u 5- metiltetrahidrofolat (5-MTHF). U metabolizmu homocisteina, uz obavezni vitamin B12, 5-MTHF je neophodan za remetilaciju neurotoksičnog i vaskulotoksičnog intermedijera homocisteina u metionin. Metionin je polu-esencijalna aminokiselina koja se može aktivirati kao prekursor u S-adenozilmetionin (SAM) pomoću metionin-adenoziltransferaze (MAT). S adenzilmetionin služi kao sveprisutni donor metilne skupine i neophodan je za nekoliko komponenti mijelinskog sloja, kao što su osnovni protein mijelina ili fosfolipidi (nužno za mijelinizaciju SŽS-a) [28,29].

Transmetilacija S-adenozilmetionina rezultira S-adenozilhomocisteinom, koji se hidrolizira u reaktivni homocistein, koji se može metabolizirati na dva različita puta. U prvom cistationin beta-sintaza (CBS), koja ovisi o piridoksal fosfatu (vitamin B6), može pretvoriti homocistein u cistationin. Na drugom putu, metionin se može regenerirati iz homocisteina u SŽS-u putem ametiltetrahidrofolat-homocistein S-metiltransferaze (MTR), koja ovisi o kobalaminu (vitamin B12) i 5-metiltetrahidrofolatu. Transkobalamin 2 (Tc2) djeluje kao prijenosni protein kobalamina [29].



*Slika 1. Enzimi i kofaktori uključeni u ciklus s jednim ugljikom, uključujući metabolizam metionina i folata. Dijetetski folat (vitamin B9) pretvara se u dihidrofolat (DHF) pomoću enzima dihidrofolat reduktaze (DHFR) i zatim se reducira u tetrahidrofolat (THF). THF se pretvara u 5,10-metilenTHF, koji se pretvara u 5-metilTHF pomoću enzima MTHFR (koristeći vitamine B1, B2 i B3 kao kofaktore). 5-metilTHF se zatim koristi kao donor metila u sintezi pirimidina i purina i može donirati metilnu skupinu za regeneraciju metionina iz homocisteina (Hcy); ovu reakciju katalizira metionin sintaza (MS) s vitaminom B12 kao kofaktorom. To se naziva remetilacija. Dijetetski betain iz jetre također može poslužiti kao donor metila i sudjelovati u remetilaciji. Nakon toga, metionin adenziltransferaza (MAT) katalizira prijenos adenozina u metionin za stvaranje s-adenozilmetionina (SAM), koji djeluje u reakcijama metilacije. SAM se zatim demetilira i formira s-adenozilhomocistein (SAH), koji se hidrolizira u Hcy. Hcy sada može ući u put transulfuracije kako bi formirao cistationin (kataliziran cistationin beta-sintazom (CBS)) i cistein (kataliziran cistationazom). Cistein se zatim koristi za sintezu glutationa (GSH), čime se regeneriraju razine antioksidansa u borbi protiv oštećenja uzrokovanih reaktivnim kisikovim vrstama (ROS) preuzeto iz [27].*

### 1.2.1. MTHFR gen

MTHFR enzim kodiran je humanim MTHFR genom koji se nalazi na kromosomu 1p36.22 (ID gena:4524) i sadrži 11 egzona [30]. Promotorska regija gena MTHFR nema TATA, ali sadrži CpG otoke, višestruka potencijalna SP1-vezna mjesta i vezna mjesta za nekoliko drugih faktora transkripcije. Gen MTHFR je polimorfan i dvije uobičajene *missense* mutacije, varijante jednog nukleotida (*engl. single-nucleotide*

*polymorphism* – SNP) tranzicija C677T (A222V; rs1801133) i transverzija A1298C (E429A; rs1801131), povezane su s neadekvatnom, smanjenom aktivnošću enzima i povišenim razinama homocisteina u plazmi. Kao rezultat toga, pojedini MTHFR genotipovi mogu igrati ulogu u podložnosti za MS [30,31].

#### *MTHFR C677T*

MTHFR C677T je uobičajena polimorfna varijanta gena MTHFR s prijelazom C u T, smještena na nukleotidu 677 u egzonu 4. Frekvencija T alela u europskim populacijama kreće se oko 37%, dok za hrvatsku populaciju iznosi 32% [32]. Ova genska varijanta rezultira promjenom aminokiseline alanina u valin što dovodi do termolabilnog MTHFR i ujedno smanjene aktivnosti enzima (srednja aktivnost je 65% u Ala/Val heterozigota odnosno 30% u Val/Val homozigotnom stanju, u usporedbi sa srednjom aktivnošću u Ala/Ala homozigota). Kao rezultat toga, ovaj funkcionalni polimorfizam gena MTHFR može potencijalno imati ulogu u MS-u [28,33].

#### *MTHFR A1298C*

Polimorfizam A1298C u genu MTHFR povezan je s hiperhomocisteinemijom. SNP A1298C karakterizira promjena A u C na položaju 1298 gena MTHFR koja uzrokuje zamjenu glutamina alaninom u navedenom enzimu [34]. Frekvencija C alela u europskim populacijama iznosi 31%, dok je hrvatskoj populaciji 32% [32]. C-alel MTHFR 1298A>C povezan je sa smanjenom aktivnošću MTHFR enzima, u manjoj mjeri nego li što je to u slučaju C677T varijante, ali ipak rezultira većom dostupnošću 5,10-MTHF za sintezu nukleinskih kiselina, a time i za proliferaciju stanica zbog upalnog stanja. Osim toga, smanjena aktivnost MTHFR može

smanjiti sintezu metionina pomoću metionin sintaze ovisne o 5-MTHF što dovodi do smanjene dostupnosti aktivnog metionina, tj. SAM-a. Budući da SAM ima protuupalna svojstva i neophodan je za (re)mijelinizaciju SŽS-a, smanjena dostupnost SAM-a zbog smanjene aktivnosti MTHFR predstavlja jedno moguće patofiziološko objašnjenje za povezanost polimorfizma MTHFR A1298C s MS-om [35][36].

### 1.2.3.MTHFR i multipla skleroza

Rezultati populacijskih istraživanja polimorfizama MTHFR gena dosada su bili nekonzistentni [28–31,34–36]. Razlike između podataka različitih populacijskih istraživanja mogu biti uzrokovane različitim razlozima, a najuočljiviji su međuetničke i geografske genetske razlike. Ove razlike također mogu ovisiti o učestalosti alela, lokaciji gena na kromosomima, različitim LD obrascima (neravnoteža povezivanja) u populacijama, različitim evolucijskim povijestima gena koji utječu na složene bolesti i učinku brojnih čimbenika okoliša [30].

Osobe s nedostatkom MTHFR imaju povišenu razinu homocisteina u krvi i mokraći. Značajno je naglasiti da su visoke razine homocisteina uočene kod nekih, ali ne kod svih pacijenata s MS-om, a pacijenti s hipercistinurijom pokazuju gubitak neurona povezan s difuznom demijelinizacijom [29]. Primjerice, nedavno je istraživanje ustanovilo različite koncentracije metabolita metionina u mozgovima pacijenata s MS-om u usporedbi s mozgovima kontrolne skupine i sugeriralo učinak na mitohondrije i neurone [37]. Naime, povišena koncentracija homocisteina u krvi može potaknuti oksidaciju lipoproteina niske gustoće (LDL) koja se proteže do peroksidacije lipida i stadija ateroskleroze. Nadalje, povišena koncentracija homocisteina u krvi također može biti odgovorna za senzibilizaciju neurona na oksidativni stres, koji je obilježje MS-a [33].

## 2. Cilj rada

Multipla skleroza (MS) je kronična autoimuna neurodegenerativna bolest središnjeg živčanog sustava potaknuta okolišnim čimbenicima u genetički podložnih osoba, ali još uvijek nerazjašnjene etiopatogeneze. Polimorfizmi C677T i A1298C gena za metilentetrahidrofolat reduktazu (MTHFR) povezuju se s podložnošću za autoimune bolesti. Metilentetrahidrofolat reduktaza je enzim uključen u pretvorbu 5,10-metilenetetrahidrofolata u 5-metiltetrahidrofolat, a pokazalo se da navedene genske varijante uzrokuju smanjenu enzimsku funkciju MTHFR što se povezuje s poremećenim metabolizmom folata i blagim povećanjem razine homocisteina koji je prijavljen u bolesnika s MS-om. Literaturni podatci o utjecaju ovih polimorfizama u podložnosti za MS razlikuju se među populacijama, a njihov utjecaj na tijek bolesti slabije je istražen. Stoga je cilj našega istraživanja procijeniti učinak MTHFR C677T i A1298C polimorfizama u predispoziciji za MS i njejoj kliničkoj ekspresiji u MS bolesnika iz hrvatske populacije.

## 3. Materijali i metode

### 3.1. Ispitanici

Ispitivana grupa sastojala se od ukupno 200 osoba oboljelih od MS iz hrvatske populacije, od kojih su 151 bile žene, a muškaraca je bilo 49. Uzorci DNA bolesnika prikupljeni su u okviru znanstveno-istraživačkih projekta „Genetička analiza multiple skleroze“ i „Farmakogenetika imunomodulacijske terapije u multiploj sklerozi i utjecaj genskih polimorfizama pojedinih metaboličkih puteva“ koji su provedeni na Zavodu za biologiju i medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci te su pohranjeni u genske baze MS registra Zavoda. Svima je prethodno klinički i laboratorijski potvrđena MS prema McDonaldovim kriterijima [4]. Obrada ispitanika provodila se prema protokolu European Database for Multiple Sclerosis (EDMUS) [38]. Određivana je vrijednost u EDSS skali invaliditeta: 0-3 stupnja = blaga, 4-6 stupnjeva umjerena, 7-9 stupnjeva – teška, 10. stupanj = smrtni ishod. Također, utvrđena je dužina trajanja bolesti u godinama (od početnog nastupa bolesti do posljednjeg kliničkog pregleda) te indeks progresije (PI – izračunat kroz odnos EDSS / dužina trajanja bolesti). Bolesnici su podijeljeni u skupine prema tijeku bolesti kao PP, SP i RR MS. Navedeni klinički parametri MS bolesnika prikazani su u tablici 1, kao i broj bolesnika za koje je podatak dostupan.

Kontrolna skupina činilo je 200 zdravih pojedinaca, dobrovoljnih davatelja krvi, koji nisu u srodstvu međusobno niti s bolesnicima te nemaju u obitelji zabilježenu MS niti druge neurološke poremećaje. Spol i dob nisu se statistički značajno razlikovali između skupina MS bolesnika i kontrole.

Svi ispitanici potpisuju informirani pristanak prije davanja uzorka za istraživanje koje se provedi u skladu s Helsinškom deklaracijom.



Tablica 1. Kliničke karakteristike bolesnika s MS-om.

<b>Žene/Muškarci</b> (151 / 49)	3,08 : 1
<b>Dob</b>	
<b>Dob nastupa bolesti<sup>a</sup></b> (N=189)	30,0±8,2 (15 - 56)
<b>Tijek bolesti</b> (N=200):	
- <b>primarno-progresivni (PP)</b>	8 (4,0 %)
- <b>sekundarno-progresivni (SP)</b>	62 (31,0 %)
- <b>relapsno-remitirajući (RR)</b>	130 (65,0 %)
<b>Trajanje bolesti<sup>a</sup></b> (N=188)	11,6 ± 9,3 (1 - 46)
<b>EDSS<sup>b</sup></b> (N=187)	3,3±2,1 (0,5 - 9,0)
<b>PI<sup>c</sup></b> (N=150)	0,35 ± 0,25 (0,04 -1,67)

EDSS- skala invaliditeta

PI – indeks progresije

<sup>a</sup> srednja vrijednost (godine) ± SD (min - max)

<sup>b</sup> srednja vrijednost EDSS ± SD (min - max)

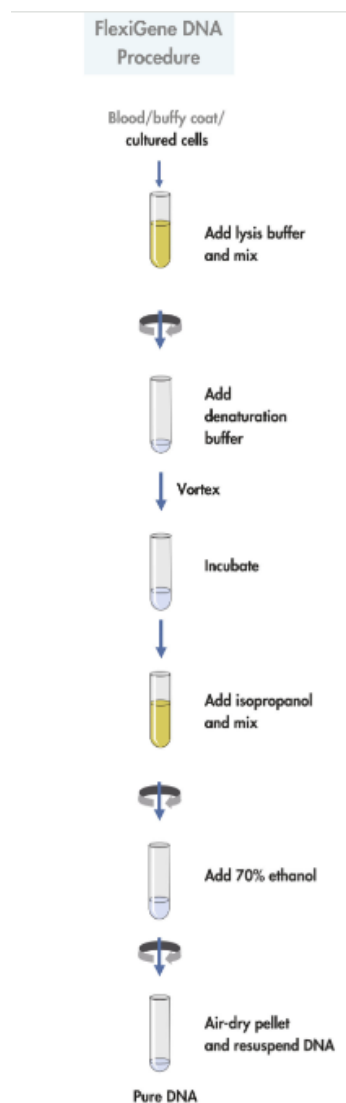
<sup>c</sup> srednja vrijednost PI ± SD (min - max)

## 3.2. Metode rada

Po 3 ml periferne venske krvi zamrznuto je do DNA izolacije u vakutejnerima s antikoagulansom EDTA na -20 °C.

### 3.2.1. Izolacija DNA

Iz 2 ml pune periferne krvi ispitanika izolirana je DNA pomoću kita za izolaciju (Qiagen flexigene DNA extraction kit, Netherlands) [39] prema protokolu proizvođača kako slijedi (slika 4).



Slika 4. Izolacija DNA, preuzeto iz [40].

U epruvetu od 15 ml dodano je 5 ml FG1 pufera te 2 ml odmrznute krvi. Sadržaj epruvete promiješan je okretanjem epruvete 5 puta. Slijedi centrifugiranje na 4000 G 10 min. Po završetku centrifugiranja supernatant je odstranjen, a epruveta položena na staničevinu 2 min. Potom je dodano 1 ml pufera FG2/proteinaza mix i pomiješano pomoću vortexa dok se talog ne homogenizira. Slijedi inkubacija 10 min u vodenoj kupelji prethodno zagrijanoj na 65°C. Nakon inkubacije u epruvetu je dodano 1 ml 100%-tnog isopropanola i epruvetu se okreće do pojave DNA. Potom slijedi centrifugiranje 5 min na 4000 G. Odstrani se supernatant i epruveta odloži na apsorbirajući papir. Zatim je dodano 1 ml 70%-tnog etanola i vorteksirano 5 sekundi. Slijedi centrifugiranje 5 min na 4000 G, otapanje DNA u puferu FG3 i pohrana na -20°C.

### 3.2.2.Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Uzorci DNA i reagensi (osim *Taq* polimeraze) izvađeni su na sobnu temperaturu. Količina reagensa za premiks određivana je ovisno o broju uzoraka DNA (22) plus 2 dodatne količine, od kojih će jedna poslužiti kao negativna kontrola za potvrdu odsutstva neželjenog DNA materijala (kontaminacije), a druga kao rezervna količina. Svi reagensi su vorteksirani nekoliko sekundi prije pipetiranja u epruvetu od 5 ml za premiks. Nastavci za mikropipetu promijenjeni su između svakog pipetiranja. Dodano je redom; PCR pufer, MgCl<sub>2</sub>, deoksinukleotid trifosfat (dNTP), *forward* i *reverse* početnice za svaki polimorfizam (tablica 2), bidestilirana voda, i na kraju, netom prije iz zamrzivača izvađena *Taq* polimeraza (tablica 3). Premiks je vorteksiran i pipetirano je po 14 µl premixa u svaku od 23 PCR tubice od 0,2 ml. U 22 PCR tubice dodano je po 0,5 µl uzorka DNA koji je prethodno odmrznut. PCR tubice su označene pripadnim oznakama DNA uzoraka te su uzorci zajedno s kontrolnom

tubicom stavljeni u PCR uređaj. Na PCR uređaja, *termocikleru* pokrenut je odgovarajući program za polimorfizme MTHFR gena (MTHFR C677T i MTHFR A1298C) (tablica 4).

### 3.2.2.1. Analiza C677T polimorfizma MTHFR gena (1. dio)

Prisustvo pojedinog C ili T alela MTHFR gena utvrđivali smo pomoću PCR-RFLP (engl. *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) metode. Uvjeti PCR reakcije uključujući slijed početnih oligonukleotida za reakciju, sadržaj reakcijske smjese i PCR program prikazani su u tablicama 2, 3 i 4.

Tablica 2. Sekvenca početnih oligonukleotida za analizu MTHFR C677T polimorfizma

Početnice	Sekvenca početnih oligonukleotida
C677T -F	5'TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA3'
C677T -R	5'AGGACGGTGCGGTGAGAGTG3'

Tablica 3. Reakcijska smjesa za PCR u konačnom volumenu 15 $\mu$ l.

Stok	Količina (za 1 uzorak)
10 x PCR pufer	1,5 $\mu$ l
25 mM MgCl	1,5 $\mu$ l
10 mM dNTP	0,3 $\mu$ l
10 x primer C677T -F	1,2 $\mu$ l
10x primer C677T -R	1,2 $\mu$ l
bidestilirana voda	8,65 $\mu$ l
Taq polimeraza	0,15 $\mu$ l
DNA	0,5 $\mu$ l

Tablica 4. Program: MTHFR C677T, PCR – temperaturni ciklusi.

<b>Korak</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Vrijeme</b>	<b>Broj ciklusa</b>
<b>1.</b>	94 °C	2 min	1
<b>2.</b>	94 °C	30 sec	40x
	62 °C	30 sec	
	72 °C	30 sec	
<b>3.</b>	72 °C	7 min	1

Po završetku amplifikacije PCR-om, očekivani produkt je veličine 198 parova baza (pb), a uspješnost reakcije i postojanje produkta provjerava se elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

### 3.2.2.2. Analiza A1298C polimorfizma MTHFR gena (1. dio)

Prisustvo pojedinog A ili C alela MTHFR gena utvrđivali smo pomoću PCR-RFLP metode. Uvjeti PCR reakcije uključujući slijed početnih oligonukleotida za reakciju, sadržaj reakcijske smjese i PCR program prikazani su u tablicama 5, 6 i 7.

Tablica 5. Sekvenca početnih oligonukleotida za analizu MTHFR A1298C polimorfizma

<b>Početnice</b>	<b>Sekvenca početnih oligonukleotida</b>
A1298C -F	5'CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTA3'
A1298C -R	5'CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG3'

Tablica 6. Reakcijska smjesa za PCR u konačnom volumenu 15 $\mu$ l.

Stok	Količina (za 1 uzorak)
10 x PCR pufer	1,5 $\mu$ l
25 mM MgCl	1,5 $\mu$ l
10 mM dNTP	0,3 $\mu$ l
10 x primer A1298C -F	1,2 $\mu$ l
10x primer A1298C -R	1,2 $\mu$ l
bidestilirana voda	8,65 $\mu$ l
Taq polimeraza	0,15 $\mu$ l
DNA	0,5 $\mu$ l

Tablica 7. Program: MTHFR A1298C, PCR – temperaturni ciklusi

Korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
<b>1.</b>	92 °C	2 min	1
<b>2.</b>	92 °C	1 min	38x
	60 °C	1 min	
	72 °C	30 sec	
<b>3.</b>	72 °C	7 min	1

Po završetku amplifikacije PCR-om, očekivani produkt je veličine 163 pb, a uspješnost reakcije i postojanje produkta provjerava se elektroforezom na 1% agaroznom gelu.

### 3.2.3. Elektroforeza

Gel elektroforeza je metoda za odvajanje i analizu makromolekula i njihovih fragmenata, na temelju njihove veličine, oblika i naboja. Za elektroforezu nukleinskih kiselina koristi se agarozni gel koji se smješta između dva rezervoara s puferom u kojima se nalaze elektrode pri čemu su jažice gela kraj negativne elektrode. Biološka molekula, u ovom slučaju

PCR produkt te kasnije smjesa restrikcijskih fragmenata DNA, unosi se u jažice te se uključuje izvor struje. Molekule nukleinske kiseline odvajaju se primjenom električnog polja za pomicanje negativno nabijenih molekula DNA kroz matricu agaroze prema pozitivnoj elektrodi. Zbog prisutnosti DNA različitih veličina, odvojiti će se fragmenti te će se kraće molekule kretati brže i migrirati dalje od duljih kroz pore gela.

Po završetku elektroforeze odvojenim fragmentima DNA određuje se veličina pomoću poznatog DNA standarda (markera). DNA standardi su točno određene veličine segmenata DNA koji se koriste za procjenu veličine dobivenih uzoraka i također se stavljaju u jažicu na gelu. DNA je moguće vizualizirati dodatkom etidij bromida (ili zamjenskih manje štetnih spojeva poput Gel RED boje) u agarozni gel pri čemu se spoj interkalira ili veže za DNA koja postaje vidljiva prilikom izlaganja UV svjetlu transiluminatora.

Za potrebe elektroforeze napravljen je 1%-tni i 3%-tni agarozni gel. 1%-tni gel služi provjeri uspješnosti PCR-a i potvrđivanju negativne kontrole. 3%-tni gel korišten je za određivanje produkta restrikcije te genotipizaciju ispitanika.

Za 1%-tni gel izvagano je 0,5 g agaroze i dodano 50 ml 1x TAE pufera u Erlenmeyerovu tikvicu koja je zagrijavana u mikrovalnoj pećnici dok se sva agarozna ne otopi (oko 2 min). Pripremljen je kalup za izlijevanje gela te umetnut češalj za formiranje jažica u gelu. U Erlenmeyerovu tikvicu potom je dodano 12  $\mu$ l Gel RED boje. Sadržaj Erlenmeyerove tikvice izliven je u kalup za gel i ostavljen da se gel ohladi i stvrdne (oko 10 min).

Za potrebe priprema 3%-tni agaroznog gela, izvagano je 1,5 g agaroze te se ponavljaju prethodno opisani koraci u nastavku.

Za potvrdu dobivanja željenog produkta PCR-om na parafilmu je mikropipetom resuspendirano 2  $\mu$ l BPB boje (brom fenol modri) i 4  $\mu$ l PCR produkta te ukrcano u jažicu na 1%-tnom gelu, koji je prethodno

uronjen u pufer uređaja za elektroforezu. Uključen je izvor struje na 80 V i nakon 25 min je provjerena prisutnost PCR produkta na transiluminatoru.

Nakon završetka restrikcije (opis u sljedećem odlomku) uslijedila je identifikacija polimorfizama. Za tu svrhu pomiješano je 8 µl produkta restrikcije (DNA fragmenata) i 2 µl brom phenol blue boje za određivanje MTHFR C677T i 2 µl Xylene cyanol (XC) boje za određivanje MTHFR A1298C. DNA standard (marker od 100 pb) ukrcan je u prvu ili posljednju jažicu dok je u ostale jažice ukrcana mješavina DNA

fragmenata i boje. Slijedi elektroforeza uključivanjem izvora struje na 80 V te nakon 60 min analiza rezultata, odnosno genotipizacija ispitanika pomoću transiluminatora i DNA standarda.

Tablica 8. Smjesa za pripremu 1%- i 3%-tnog agaroznog gela.

<b>1%-tni agarozni gel</b>	<b>3%-tni agarozni gel</b>
0,5 g agarozna	1,5 g agarozna
50 ml TAE 1x	50 ml TAE 1x
12 µl GEL RED	12 µl GEL RED

### 3.2.4. Enzimski restrikcija

Digestija DNA restrikcijskim enzimima je proces u kojem se DNA molekula reže na specifičnim mjestima pomoću restrikcijskih enzima. Restrikcijski enzimi, poznati i kao restrikcijske endonukleaze, prirodni su enzimi prisutni u bakterijama, a imaju ključnu ulogu u zaštiti bakterijskih stanica od stranih genetičkih materijala poput virusa ili tuđih DNA molekula. Također, osim kao obrambena strategija, mogu poslužiti i u molekularnoj biologiji i genetičkim istraživanjima, omogućavajući precizno manipuliranje DNA i analizu genetskih informacija. Restrikcijski enzimi prepoznaju karakteristične sekvence nukleotida u DNA i režu je na precizno



određenim točkama. Endonukleaze koje se koriste u molekularnoj biologiji obično prepoznaju kratke sekvence od oko 4 – 6 parova baza. Rezultat ovog procesa su fragmenti DNA različitih duljina.

Metoda u kojoj se koriste restriksijske endonukleaze s ciljem otkrivanja točkastih mutacija odnosno SNP-a zove se *Polimorfizam dužine restriksijskih fragmenata* (engl. *restriction fragment length polymorphism* – RFLP). Za ovu metodu potreban je ciljani fragment DNA prethodno dobiven pomoću PCR-a, i specifična restriksijska endonukleaza kojom se djeluje na produkt PCR-a. Moguće je identificirati mutacije ili polimorfizam ako promjena u jednom nukleotidu stvori novo ili poništi već postojeće restriksijsko mjesto te endonukleaze. Analiza restriksijskih fragmenata provodi se pomoću gel-elektroforeze. Detekcija točkaste mutacije ili SNP zasniva se na usporedbi veličine fragmenata DNA te se na temelju toga određuje genotip ispitanika. Budući da ova analiza uključuje kombinaciju dviju metoda, metoda se naziva PCR-RFLP.

Postupak digestije DNA restriksijskim enzimima podrazumijeva odabir odgovarajućeg enzima za ciljanu sekvencu DNA. Za potrebe eksperimenta prema protokolu je korišten *HinfI* za polimorfizam MTHFR C677T te *Mbo II* restriksijski enzim za polimorfizam MTHFR A1298C. DNA uzorak pomiješan je s restriksijskim enzimom i odgovarajućim reakcijskim puferom koji osigurava optimalne uvjete za enzimsku reakciju. Nakon vađenja iz leda, pufer je temperiran kako bi se odmrznuo, dok je restriksijski enzim pipetiran odmah. Smjesa PCR produkta, enzima pufera i vode je inkubirana na temperaturi od 37° C kroz 2h ili preko noći. Tijekom inkubacije, enzim prepoznaje ciljanu sekvencu u DNA i reže je na specifičnom mjestu. Nakon završetka reakcije, fragmenti DNA analiziraju se elektroforezom, kao što je prethodno opisano.

### 3.2.4.1. Analiza C677T polimorfizma MTHFR gena -restrikcija (2. dio)

U svrhu analize C677T polimorfizma MTHFR gena PCR produkt veličine 198 pb podvrgnut je restrikciji s *HinfI* restrikcijskim enzimom u trajanju od 2 h na temperaturi 37° C u vodenoj kupelji, a smjesa za reakciju prikazana je u tablici 9.

Tablica 9. Reakcijska smjesa za restrikciju: MTHFR C677T 2 h/37 °C.

<b>Stok</b>	<b>Količina</b>
Pufer REact2	2,0 µl
Enzim HinfI	0,2 µl
Bidestilirana voda	7,8 µl
Produkt PCR	10 µl

Po završetku restrikcije, dobiveni fragmenti razdvojeni su elektroforezom na 3% agaroznom gelu u trajanju od 45 min pri 80 V. Prilikom pripreme, u gel je dodano 12 µl Gel RED boje, a nakon što je gel formiran, u jažice na gelu krcano je po 8 µl restrikcijskog fragmenta i 2,0 µl BPB. Po završetku elektroforeze restrikcijski su fragmenti analizirani na transiluminatoru, a njihova veličina utvrđena je usporedbom s DNA standardom 100 bp. Ovisno o migraciji restrikcijskih fragmenata na gelu genotip je klasificiran kao homozigotni za C varijantu gena MTHFR C677T, heterozigotni i homozigotni za T varijantu gena MTHFR C677T. Veličine produkta i restrikcijskih fragmenata za polimorfizam MTHFR C677T:

1. homozigot CC → 198 pb

2. heterozigot CT → 198 pb

175 pb

23 pb

3. homozigot TT → 175 pb

23 pb

### 3.2.4.2. Analiza A1298C polimorfizma MTHFR gena -restrikcija (2. dio)

U svrhu analize A1298C polimorfizma MTHFR gena PCR produkt veličine 163 pb podvrgnut je restrikciji s *Mbo II* restrikcijskim enzimom u trajanju od 2 h na temperaturi 37° C u vodenoj kupelji, a smjesa za reakciju prikazana je u tablici 10.

Tablica 10. Reakcijska smjesa za restrikciju: MTHFR A1298C 2 h/37 °C

Stok	Količina
NePuffer2	2,0 µl
Enzim <i>Mbo II</i>	0,64 µl
Bidestilirana voda	7,36 µl
Produkt PCR	10 µl

Po završetku restrikcije, dobiveni fragmenti također su razdvojeni elektroforezom na 3% agaroznom gelu u trajanju od 45 min pri 80 V. Prilikom pripreme, u gel je dodano 12 µl Gel RED boje, a nakon što je gel formiran, u jažice na gelu krcano je po 8 µl restrikcijskog fragmenta i 2,0 µl XC. Po završetku elektroforeze restrikcijski su fragmenti analizirani na transiluminatoru, a njihova veličina utvrđena je usporedbom s DNA standardom 50 bp. Ovisno o migraciji restrikcijskih fragmenata na gelu genotip je klasificiran kao homozigotni za A varijantu gena MTHFR A1298C, heterozigotni i homozigotni za C varijantu gena MTHFR A1298C. Veličine produkta i restrikcijskih fragmenata za polimorfizam MTHFR A1298C:

1. homozigot AA → 56 pb

31/30 pb

28 pb

18 pb

2. heterozigot AC → 84 pb

56 pb

31/30 pb

18 pb

3. homozigot CC → 84 pb

31/30 pb

18 pb

### 3.2.5. Statistička analiza

Za potrebe statističkih analiza korišten je računalni program Statistica for Windows verzija 14.0.0.15 (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, SAD), za koje Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci posjeduje licencu i MedCalc's free statistical calculators.  $X^2$  i Fisherov egzaktni test korišteni su za provjeru razlika učestalosti alela i genotipova u skupini MS bolesnika s kontrolnom skupinom. Jednosmjerni ANOVA test upotrebljen je za ispitivanje kliničkih karakteristika kao što su trajanje bolesti, dob nastupa, EDSS i PI u skupini bolesnika s različitim genotipovima. Faktorijska ANOVA analiza korištena je za ispitivanje međudjelovanja genskih varijanti s obzirom na navedene kliničke karakteristike. Statistički značajne razlike izražene su na razini  $p < 0,05$ .

## 4.Rezultati

### 4.1. Utjecaj MTHFR C677T polimorfizma na podložnost za MS

Tablica 11. prikazuje učestalost MTHFR genotipova i alela za polimorfizam MTHFR C677T u uzorku od ukupno 400 ispitanika od kojih su 200 oboljeli od MS, a 200 čini kontrolnu skupinu. U uzorku oboljelih od MS genotip C/C imalo je ukupno 100 (50%) ispitanika, od kojih su 4 osobe (50%) imale P-P tijek bolesti, 28 (45,2%) S-P tijek bolesti, a R-R tijek bolesti imalo je 68 (52,3%) ispitanika. Genotip C/T identificiran je u 87 (43,5%) MS bolesnika. Od toga, 4 (50%) ispitanika imala su P-P tijek bolesti, 29 (46,8%) S-P tijek bolesti i 54 (41,5%) R-R tijek bolesti. Genotip T/T imalo je ukupno 13 (6,5%) MS bolesnika, od toga njih 5 sa S-P tijekom bolesti i 8 (6,2%) MS bolesnika s R-R tijekom bolesti.

Prije daljnje analize utvrdili smo da nije bilo statistički značajnog odstupanja ( $p > 0,05$ ) u frekvenciji MTHFR C677T alela od Hardy-Weinbergove ravnoteže niti u MS bolesnika niti u kontrolnoj skupini.

Usporedba rezultata MS bolesnika i kontrolne skupine (tablica 11) pokazala je da je  $p$  vrijednost veća od kriterija statističke značajnosti od 0,05 te da nema značajne razlike u distribuciji genotipova između ove dvije skupine. Statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ) nisu utvrđene niti u distribuciji genotipova između podskupina MS bolesnika prema tijeku bolesti.

Frekvenciju alela izračunali smo po 400 kromosoma u skupini MS bolesnika i 400 kromosoma kontrolnih ispitanika te nisu utvrđene statistički značajne razlike u frekvenciji alela između navedenih skupina (tablica 11).

Tablica 11. Učestalost MTHFR C677T genotipova i alela u MS bolesnika (N = 200) i kontrolnih ispitanika (N = 200).

Genotip n (%)	MS bolesnici (% , n)				Kontrola (% , n) (n=200)	OR (95% CI)	P
	P-P <sup>a</sup> (n=8)	S-P <sup>b</sup> (n=62)	R-R <sup>c</sup> (n=130)	Total (n=200)			
<b>C/C</b>	50,0 (4)	45,2 (28)	52,3 (68)	50,0 (100)	43,5 (87)	1,30 (0,88- 1,93)	0,193
<b>C/T</b>	50,0 (4)	46,8 (29)	41,5 (54)	43,5 (87)	46,0 (92)	0,90 (0,61- 1,34)	0,615
<b>T/T</b>	0,0 (0)	8,0 (5)	6,2 (8)	6,5 (13)	10,5 (21)	0,59 (0,29- 1,22)	0,155
<b>Alel (%)</b>							
<b>C</b>	75,0	68,5	73,1	71,8	66,5	1,28 (0,95- 1,73)	0,108
<b>T</b>	25,0	31,5	26,9	28,2	33,5	0,78 (0,58- 1,06)	

<sup>a</sup>PP – primarno progresivni tijek bolesti

<sup>b</sup>SP – sekundarno progresivni tijek bolesti

<sup>c</sup>RR – relapsno - remitirajući tijek bolesti

OR – engl.odds ratio – omjer izgleda

Omjer žena i muškaraca oboljelih od MS u našem uzorku iznosi 3,08:1. Tablica 12. prikazuje distribuciju MTHFR C677T genotipova prema spolu MS bolesnika. Od ukupno 49 muškaraca, 24 (49%) njih je imalo C/C genotip, 22 (44,9%) C/T genotip i 3 (6,1%) genotip. Nadalje, od ukupno 151 žene, 76 (50,3%) žena imalo je C/C genotip, 65 (43,1%) C/T genotip i 10 (6,6%) T/T genotip.

Obzirom da je p vrijednost za učestalost svakog genotipa po spolu veća od kriterija statističke značajnosti ( $p > 0,05$ ), nema statistički značajnih razlika prema spolu s obzirom na učestalost pojedinog genotipa.

Tablica 12. Distribucija MTHFR C677T genotipova u MS bolesnika prema spolu.

<b>Genotipovi</b>	<b>Muškarci</b>	<b>Žene</b>	<b>Ukupno</b>	<b>P</b>
	<b>% (N)</b>	<b>% (N)</b>	<b>% (N)</b>	
<b>C/C</b>	49,0 (24)	50,3 (76)	50 (100)	0,869
<b>C/T</b>	44,9 (22)	43,1 (65)	43,5 (87)	0,820
<b>T/T</b>	6,1 (3)	6,6 (10)	6,5 (13)	0,902
Ukupno	100,0 (49)	100,0 (151)	100 (200)	

Distribucija MTHFR C677T genotipova u obiteljskih i neobiteljskih slučajeva MS bolesnika prikazana je u tablici 13. Analizom je utvrđeno da je C/C genotip bio prisutan u 18 (54,5%) pacijenata s obiteljskim slučajem MS te u 80 (50%) pacijenata s neobiteljskim slučajem MS. Genotip C/T uočen je u 13 (39,4%) obiteljskih slučajeva MS, dok je neobiteljskih slučajeva s navedenim genotipom bilo 70 (43,8%). Genotip T/T identificiran je u 2 (6,1%) slučaja obiteljske MS i 10 (6,2%) slučajeva neobiteljske MS.

Nema statistički značajne razlike u distribuciji MTHFR C677T genotipova između skupina s obiteljskim i neobiteljskim slučajevima MS-a ( $p > 0,05$ ).

Tablica 13. Distribucija MTHFR C677T genotipova u obiteljskih i neobiteljskih slučajeva MS bolesnika.

<b>Genotipovi</b>	<b>Obiteljski MS</b>	<b>Neobiteljski MS</b>	<b>Ukupno</b>	<b>P</b>
	<b>% (N)</b>	<b>% (N)</b>	<b>% (N)</b>	
<b>C/C</b>	18 (54,5)	80 (50,0)	98 (50,8)	0,635
<b>C/T</b>	13 (39,4)	70 (43,8)	83 (43,0)	0,646
<b>T/T</b>	2 (6,1)	10 (6,2)	12 (6,2)	0,967
Ukupno	33 (100,0)	160 (100,0)	193 (100,0)	

#### 4.2. Utjecaj MTHFR C677T polimorfizma na kliničku ekspresiju MS

Klinički pokazatelji ekspresije bolesti u odnosu na različite genotipove MTHFR C677T prikazani su u tablici 14. Nema statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ) u dobi nastupa i trajanju bolesti, EDSS i PI ovisno o pojedinom MTHFR C677T genotipu. Srednja dob nastupa s obzirom na genotip kreće se u rasponu od godinu dana, od 29,5 do 30,5 godina. Trajanje bolesti duže je u MS bolesnika s C/C genotipom za 2,8 godina nego u onih s T/T genotipom, a stupanj EDSS-a viši za 0,6 te progresijski indeks za 0,12 u bolesnika s T/T genotipom nego onih s C/C genotipom, ali bez statistički značajnih razlika ( $p > 0,05$ ).



Tablica 14. Kliničke karakteristike bolesnika s MS-om u odnosu na MTHFR C677T genotipove.

<b>Genotip</b>	<b>Dob nastupa<sup>a</sup></b>	<b>Trajanje bolesti<sup>a</sup></b>	<b>EDSS<sup>b</sup></b>	<b>PI<sup>c</sup></b>
<b>C/C</b>	29,6±8,3	12,7±9,5	3,2±2,0	0,31±0,25
<b>C/T</b>	30,5±8,5	10,7±9,4	3,4±2,2	0,38±0,26
<b>T/T</b>	29,5±5,3	9,9±4,8	3,8±2,2	0,43±0,24

EDSS - stupanj invalidnosti

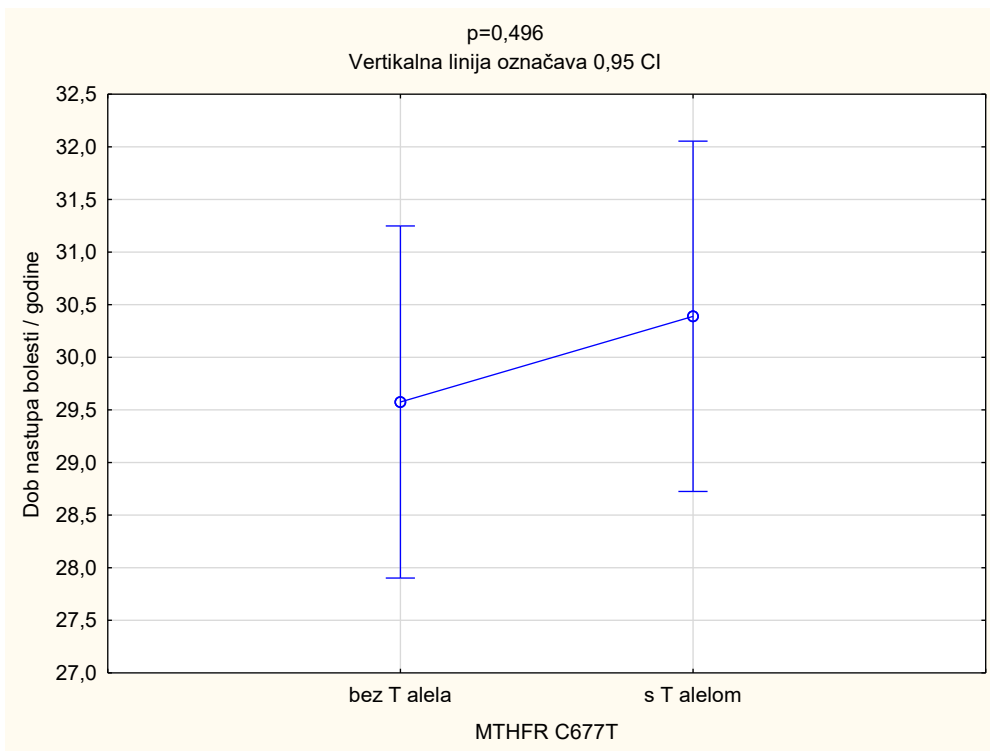
PI- indeks progresije

<sup>a</sup>srednja vrijednost (godine) ± SD

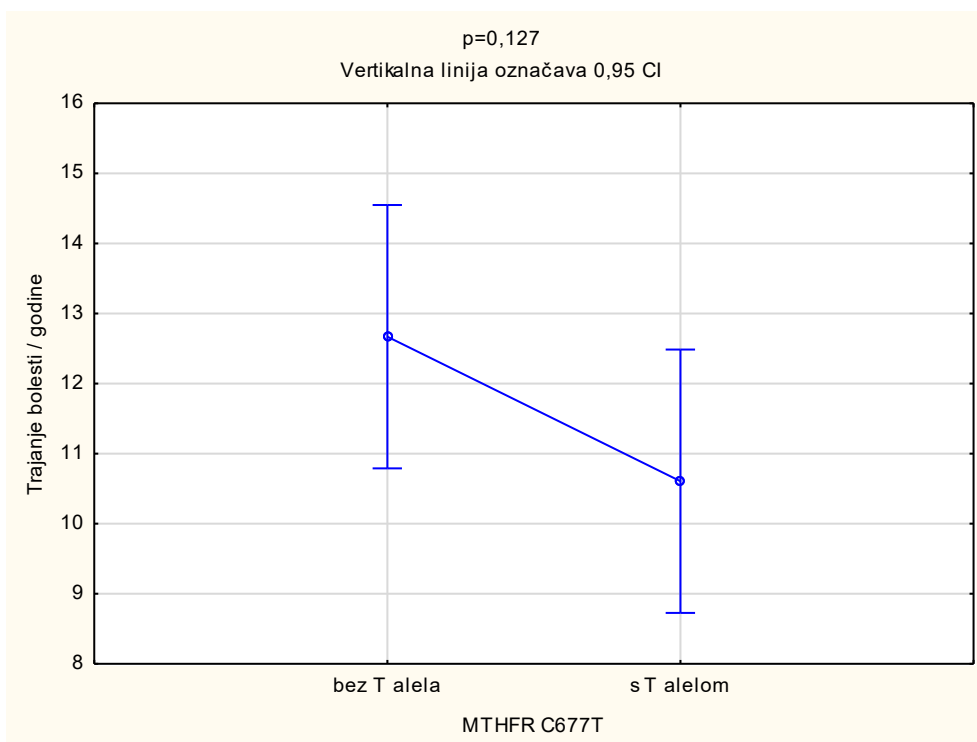
<sup>b</sup>srednja vrijednost EDSS ± SD

<sup>c</sup>srednja vrijednost PI ± SD

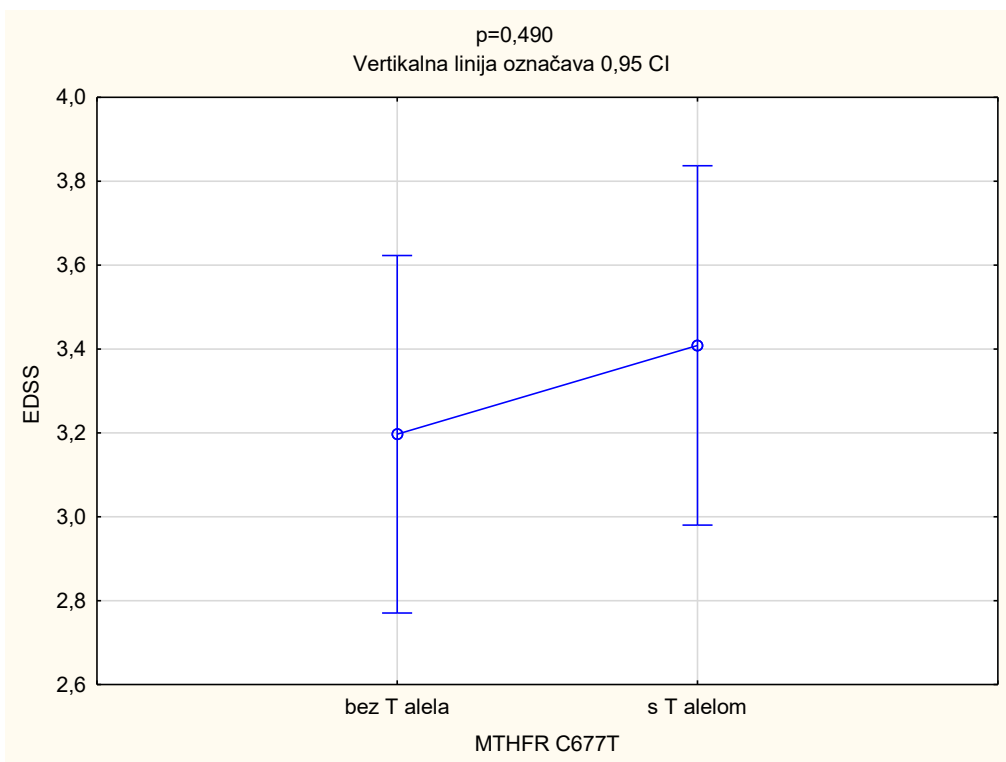
Rezultati analiza u MS bolesnika s obzirom na prisustvo T alela MTHFR C677T gena pokazali su da nema statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ) u dobi nastupa (Slika 5.), trajanju bolesti (Slika 6.) i EDSS-u (Slika 7.). Međutim, statistički značajna razlika ( $p = 0,047$ ) utvrđena je za indeks progresije ovisno o prisutnosti T alela (Slika 8.) u MS bolesnika, pri čemu nosioci T alela imaju bržu progresiju bolesti.



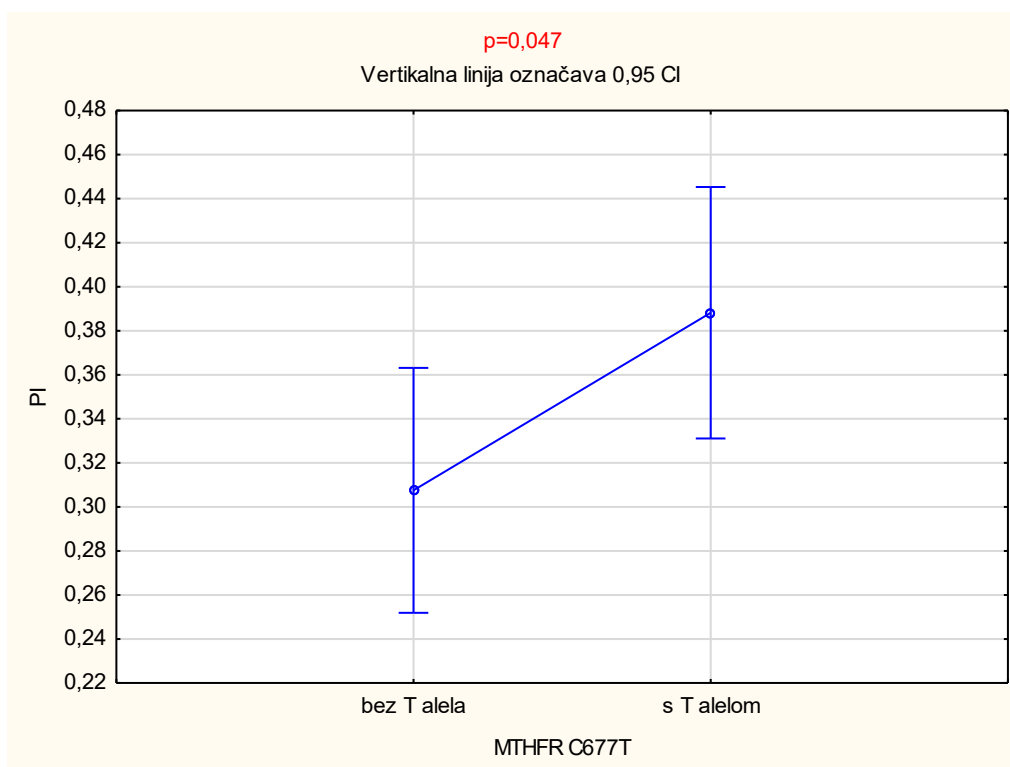
Slika 5. Srednja dob nastupa bolesti (godine) u MS bolesnika bez i s MTHFR C677T T alelom.



Slika 6. Trajanje bolesti (godine) u MS bolesnika bez i s MTHFR C677T T alelom



*Slika 7. Stupanj invalidnosti (EDSS) u MS bolesnika bez i s MTHFR C677T T alelom*



*Slika 8. Indeks progresije (PI) u MS bolesnika bez i s MTHFR C677T T alelom.*

### 4.3. Utjecaj MTHFR A1298C polimorfizma na podložnost za MS

Tablica 15 prikazuje učestalost MTHFR genotipova i alela za polimorfizam MTHFR A1298C u uzorku od ukupno 400 ispitanika od kojih su 200 oboljeli od MS, a 200 čini kontrolnu skupinu. U uzorku oboljelih od MS-a genotip A/A imalo je ukupno 86 (43,0%) ispitanika, od kojih su 3 osobe (3,5%) imale P-P tijek bolesti, 25 (29,1%) S-P tijek bolesti, a R-R tijek bolesti imalo je 58 (67,4%) bolesnika. Genotip A/C utvrđen je u 109 (54,5%) MS bolesnika, od čega je njih 5 (4,6%) imalo P-P tijek bolesti, njih 36 (32,1%) S-P tijek bolesti i 68 (62,3%) R-R tijek bolesti. Genotip C/C imalo je ukupno 5 (2,3%) MS bolesnika, od toga jedan (1,6%) sa S-P tijekom bolesti te 4 (3,1%) MS bolesnika s R-R tijekomom.

Prije daljnje analize utvrdili smo da nije bilo statistički značajnog odstupanja ( $p > 0,05$ ) u frekvenciji MTHFR A1298C alela od Hardy-Weinbergove ravnoteže niti u MS bolesnika niti u kontrolnoj skupini.

Usporedba rezultata MS bolesnika i kontrolne skupine (tablica 15) pokazala je da je  $p$  vrijednost manja od 0,05 ( $p < 0,05$ ) za učestalost genotipa C/C i utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipa C/C između ove dvije skupine. Usporedbe učestalosti ostalih genotipova nisu pokazale statistički značajnu razliku ( $p > 0,05$ ). Statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ) nisu utvrđene u distribuciji genotipova između podskupina MS bolesnika prema tijeku bolesti.

Frekvenciju alela izračunali smo na 400 kromosoma u skupini MS bolesnika i 400 kromosoma kontrolnih ispitanika te nisu utvrđene statistički značajne razlike u frekvenciji alela između navedenih skupina (tablica 15).

Tablica 15. Učestalost MTHFR A1298C genotipova i alela u bolesnika s MS-om (N=200) i kontrolnih ispitanika (N=200)

Genotip n (%)	MS bolesnici (% , n)				Kontrola (%) (n=200)	OR (95% CI)	P
	P-P <sup>a</sup> (n=8)	S-P <sup>b</sup> (n=62)	R-R <sup>c</sup> (n=130)	Total (n=200)			
<b>A/A</b>	37,5 (3)	40,3 (25)	44,6 (58)	43,0 (86)	44,5 (89)	0,94 (0,63- 1,40)	0,762
<b>A/C</b>	62,5 (5)	58,1 (36)	52,3 (68)	54,5 (109)	46,5 (93)	1,38 (0,93- 2,04)	0,110
<b>C/C</b>	0 (0)	1,6 (1)	3,1 (4)	2,5 (5)	9,0 (18)	0,26 (0,09- 0,72)	<b>0,009</b>
<b>Alel n (%)</b>							
<b>A</b>	68,8	69,4	70,8	70,2	67,7	1,12 (0,83- 1,52)	0,444
<b>C</b>	31,2	30,6	29,2	29,8	32,3	0,89 (0,66- 1,20)	

<sup>a</sup>PP – primarno progresivni tijek bolesti

<sup>b</sup>SP – sekundarno progresivni tijek bolesti

<sup>c</sup>RR – relapsno – remitirajući tijek bolesti

OR – engl.odds ratio – omjer izgleda

Tablica 16 prikazuje distribuciju MTHFR A1298C genotipova prema spolu MS bolesnika. Od ukupno 49 muškaraca, 24 (49%) ih je imalo A/A genotip, 23 (46,9%) A/C genotip i 2 (4,1%) genotip. Nadalje, od ukupno 151 žene, 62 (41,1%) žene imale su A/A genotip, 86 (57,0%) A/C genotip i 3 (2,0%) C/C genotip.

Tablica 16. Distribucija MTHFR A1298C genotipova u bolesnika s MS-om prema spolu

<b>Genotipovi</b>	<b>Muškarci % (N)</b>	<b>Žene % (N)</b>	<b>Ukupno % (N)</b>	<b>P</b>
<b>A/A</b>	49,0 (24)	41,1 (62)	43,0 (86)	0,332
<b>A/C</b>	46,9 (23)	57,0 (86)	54,5 (109)	0,223
<b>C/C</b>	4,1 (2)	2,0 (3)	2,5 (5)	0,424
<b>Ukupno</b>	100,0 (49)	100,0 (151)	100,0 (200)	

Distribucija MTHFR A1298C genotipova u obiteljskih i neobiteljskih slučajeva MS bolesnika prikazana je u tablici 17. Analizom je utvrđeno da je A/A genotip bio prisutan u 11 (33,3%) pacijenata s obiteljskom MS te u 72 (45,0%) pacijenta s neobiteljskom MS. Nastavno, genotip A/C utvrđen je u 22 (66,7%) obiteljska slučaja MS, dok je neobiteljskih slučajeva s navedenim genotipom bilo 83 (51,9%). Genotip C/C nije identificiran niti u jednom slučaju obiteljske MS dok je slučajeva neobiteljske MS s navedenim genotipom bilo 5 (3,1%).

Tablica 17. Distribucija MTHFR A1298C genotipova u obiteljskih i neobiteljskih slučajeva bolesnika s MS-om.

<b>Genotipovi</b>	<b>Obiteljski MS % (N)</b>	<b>Neobiteljski MS % (N)</b>	<b>Ukupno % (N)</b>	<b>P</b>
<b>A/A</b>	11 (33,3)	72 (45,0)	83 (43,0)	0,221
<b>A/C</b>	22 (66,7)	83 (51,9)	105 (54,4)	0,124
<b>C/C</b>	0 (0)	5 (3,1)	5 (2,6)	0,562
<b>Ukupno</b>	33 (100,0)	160 (100,0)	193 (100,0)	

#### 4.4. Utjecaj MTHFR A1298C polimorfizma na kliničku ekspresiju MS

Klinička ekspresija bolesti u odnosu na različite genotipove MTHFR A1298C prikazana je u tablici 18. Iako se bolest javlja prosječno 3,7 i 2,8 godina ranije u bolesnika s A/C i A/A genotipom nego u onih genotipa C/C, razlika u dobi nastupa bolesti nije se pokazala statistički značajna ( $p>0,05$ ). S druge strane utvrđena je statistički značajna razlika ( $p=0,005$ ) u trajanju bolesti s obzirom na pojedini MTHFR A1298C genotip. Srednje vrijednosti EDSS kreću se ovisno o MTHFR A1298C genotipu od 2,3 do 3,6, a srednje vrijednosti PI od 0,32 do 0,38 pri čemu razlike nisu bile statistički značajne ( $p>0,05$ )

Tablica 18. Kliničke karakteristike bolesnika s MS-om u odnosu na MTHFR A1298C genotipove

<b>Genotip</b>	<b>Dob nastupa<sup>a</sup></b>	<b>Trajanje bolesti<sup>a,d</sup></b>	<b>EDSS<sup>b</sup></b>	<b>PI<sup>c</sup></b>
<b>AA</b>	30,4±8,0	9,3±7,0	3,0±2,0	0,38±0,25
<b>AC</b>	29,5±8,4	13,6±10,4	3,6±2,2	0,32±0,25
<b>CC</b>	33,2±7,5	8,6±4,1	2,3±0,8	0,35±0,23

EDSS - stupanj invalidnosti

PI- indeks progresije

<sup>a</sup>srednja vrijednost (godine) ± SD

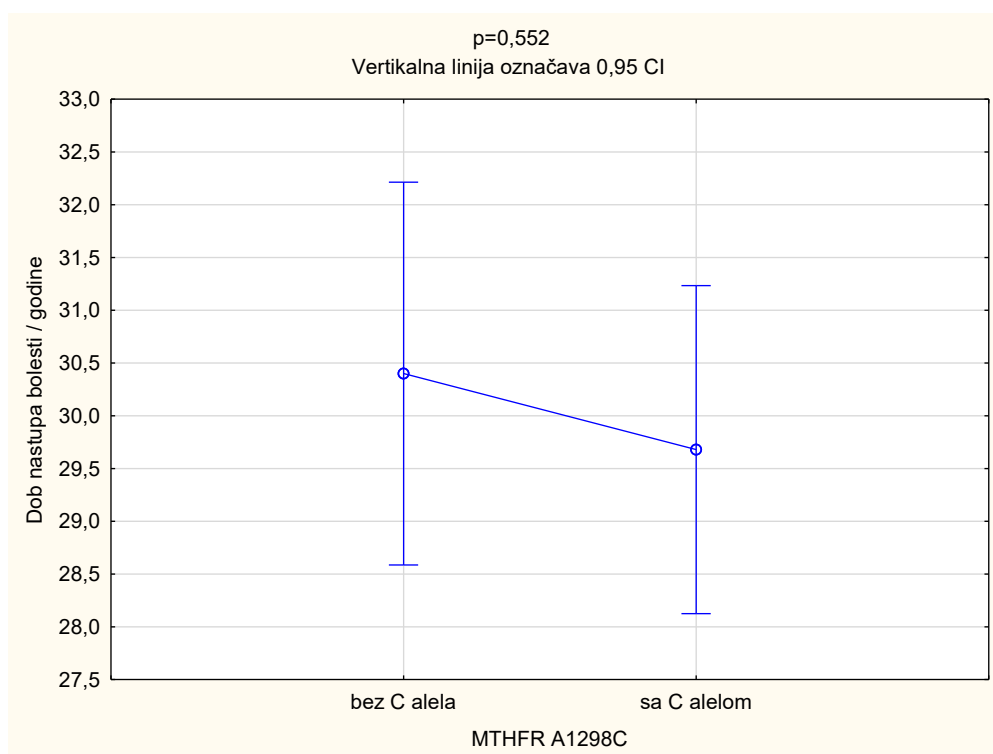
<sup>b</sup>srednja vrijednost EDSS ± SD

<sup>c</sup>srednja vrijednost PI ± SD

<sup>d</sup> $p=0,005$

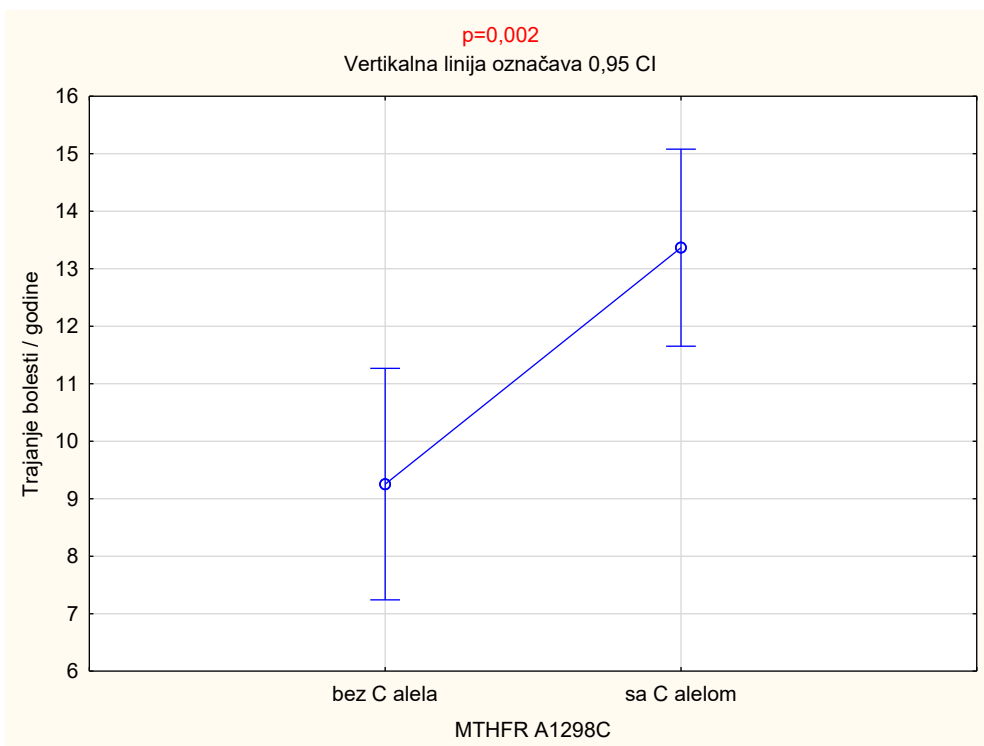
Rezultati analiza u MS bolesnika s obzirom na prisustvo C alela MTHFR A1298C gena pokazali su da nema statistički značajne razlike ( $p>0,05$ ) u dobi nastupa bolesti (slika 9), EDSS-u (slika 11) i PI (slika 12). Statistički

značajna razlika ( $p=0,002$ ) utvrđena je za trajanje bolesti (izračunato na 188 bolesnika) ovisno o prisutnosti C alela (Slika 10.) u MS bolesnika, pri čemu u bolesnika bez C alela prosječno trajanje bolesti iznosi 9,2 godine, a u onih sa C alelom prosječno trajanje bolesti iznosi 13,4 godina.

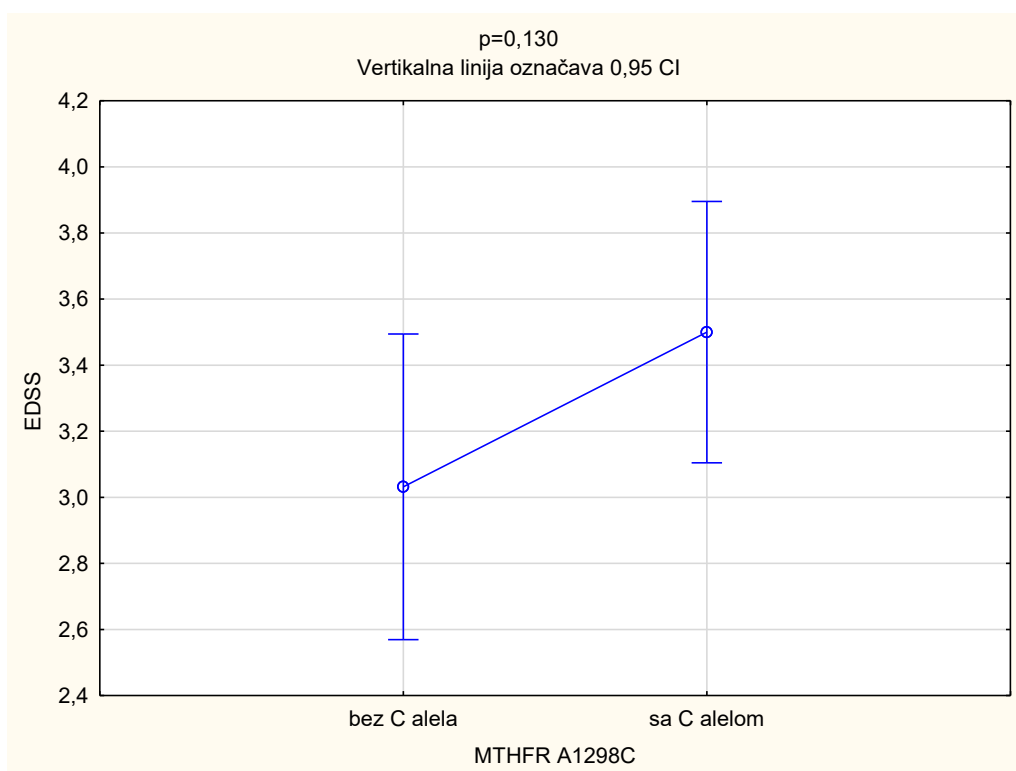


Slika 9. Srednja dob nastupa bolesti (godine) u MS bolesnika bez i sa MTHFR A1298C C alelom.

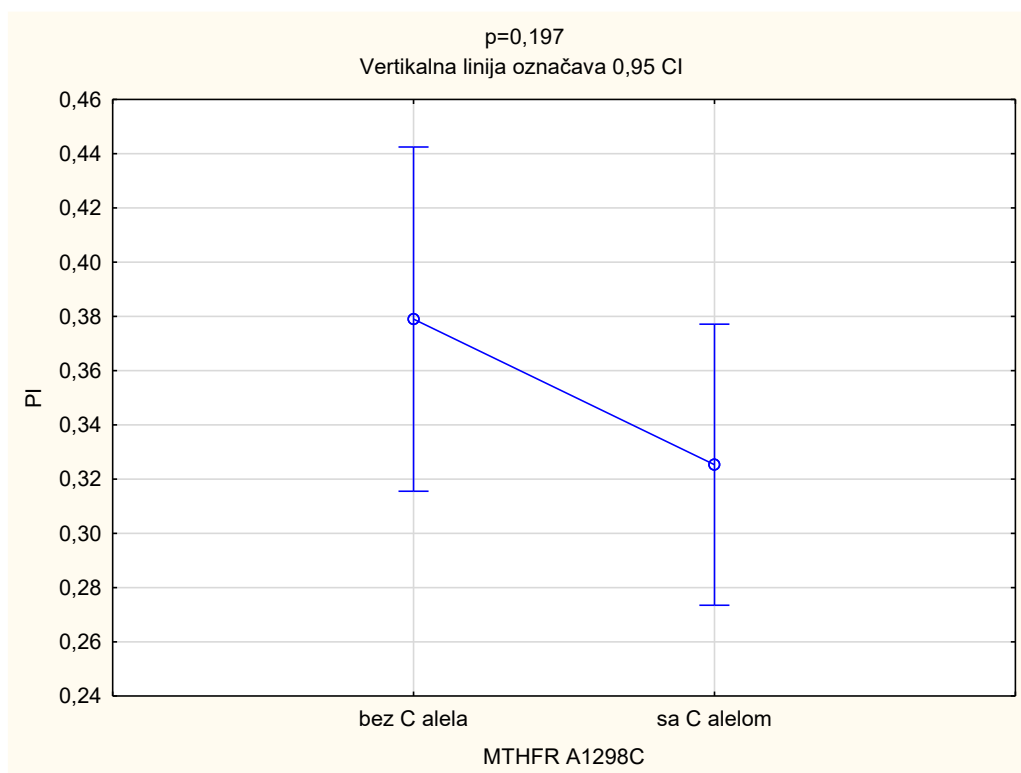




Slika 10. Trajanje bolesti (godine) u MS bolesnika bez i s MTHFR A1298C C alelom.



Slika 11. Stupanj invalidnosti (EDSS) u MS bolesnika bez i sa MTHFR A1298C C alelom.



Slika 12. Progresijski indeks (PI) u MS bolesnika bez i sa MTHFR A1298C C alelom.

#### 4.5. Međudjelovanje polimorfizama C677T i A1298C MTHFR gena u podložnosti za MS

Nakon što je utvrđen pojedinačni učinak polimorfizama C677T i A1298C MTHFR gena u podložnosti za MS, ispitana je njihova povezanost s MS-om za pojedine kombinacije MTHFR C677T i A1298C genotipova.

Distribucija kombinacija MTHFR C677T i A1298C genotipova u bolesnika s MS-om i u kontrolnih ispitanika prikazana je u Tablici 19. Od ukupno 200 oboljelih od MS, kombinaciju genotipova C/C za MTHFR C677T i A/A za MTHFR A1298C imalo je njih 25 (12,5%), a od 200 ispitanika kontrolne skupine, navedenu kombinaciju genotipova imalo je 23 (11,5%) ispitanika. Kombinaciju genotipova MTHFR C677T C/C i MTHFR A1298C A/C imao je 71 (35,5%) bolesnik s MS-om te 47 (23,5%) zdravih ispitanika. Kombinacija genotipova MTHFR C677T C/C i MTHFR A1298C C/C utvrđena je u 4 (2,0%) bolesnika s MS-om te u 17 (8,5%) ispitanika kontrolne skupine. Genotipovi MTHFR C677T C/T i MTHFR A1298C A/A u kombinaciji su pronađeni u 49 (24,5%) bolesnika s MS-om i 48 (24,0%) ispitanika kontrolne skupine. Nadalje, kombinaciju MTHFR C677T C/T i MTHFR A1298C A/C imalo je 37 (18,5%) oboljelih ispitanika i 43 (21,5%) zdrava ispitanika. Genotipovi MTHFR C677T C/T i MTHFR A1298C C/C zajedno su se pojavili u jednog bolesnika (0,5%) s MS-om kao i u jednog ispitanika kontrolne skupine (0,5%). Genotipovi MTHFR C677T T/T i MTHFR A1298C A/A u kombinaciji se pojavljuju u 12 (6,0%) bolesnika s MS-om te u 18 (9,0%) ispitanika kontrolne skupine. Kombinaciju genotipova MTHFR C677T T/T i MTHFR A1298C A/C imao je 1 (0,5%) bolesnik s MS-om i 3 (1,5%) ispitanika kontrolne skupine, dok kombinaciju genotipova MTHFR C677T T/T i MTHFR A1298C C/C nije imao niti jedan ispitanik.

Razlika između distribucije kombinacija genotipova dosegla je razinu statističke značajnosti u dva slučaja međudjelovanja polimorfizama C677T i A1298C MTHFR gena; prvi je kombinacija genotipova CC/AC ( $p = 0,009$ ),

a drugi je kombinacije genotipova CC/CC ( $p = 0,007$ ). Ostale kombinacije nisu bile statistički značajne ( $p > 0,05$ ).

Tablica 19. Distribucija kombinacija MTHFR C677T i A1298C genotipova u bolesnika s MS-om (N=200) i kontrolnih ispitanika (N=200).

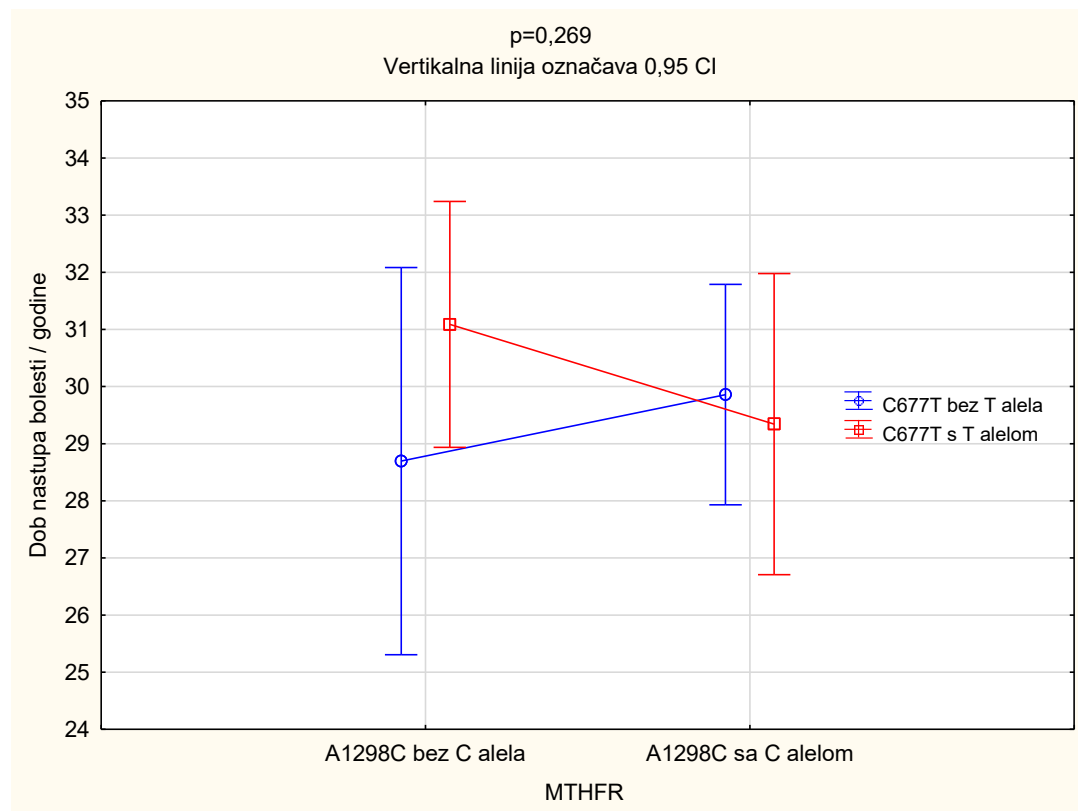
<b>Genotip MTHFR 677/1298</b>	<b>Bolesnici % (N=200)</b>	<b>Kontrola % (N=200)</b>	<b>P</b>	<b>OR (95% CI)</b>
<b>CC/AA</b>	12,5 (25)	11,5 (23)	0,758	1,10 0,60 do 2,01
<b>CC/AC</b>	35,5 (71)	23,5 (47)	<b>0,009</b>	1,79 1,16 - 2,77
<b>CC/CC</b>	2,0 (4)	8,5 (17)	<b>0,007</b>	0,22 0,07 - 0,67
<b>CT/AA</b>	24,5 (49)	24,0 (48)	0,907	1,03 0,65 - 1,62
<b>CT/AC</b>	18,5 (37)	21,5 (43)	0,454	0,82 0,51 - 1,35
<b>CT/CC</b>	0,5 (1)	0,5 (1)	1,000	1,00 0,06 - 16,10
<b>TT/AA</b>	6,0 (12)	9,0 (18)	0,258	0,65 0,30 - 1,38
<b>TT/AC</b>	0,5 (1)	1,5 (3)	0,339	0,33 0,03 - 3,20
<b>TT/CC</b>	0,0 (0)	0,0 (0)	1,000	1,00 0,02 do 50,65

OR – omjer izgleda

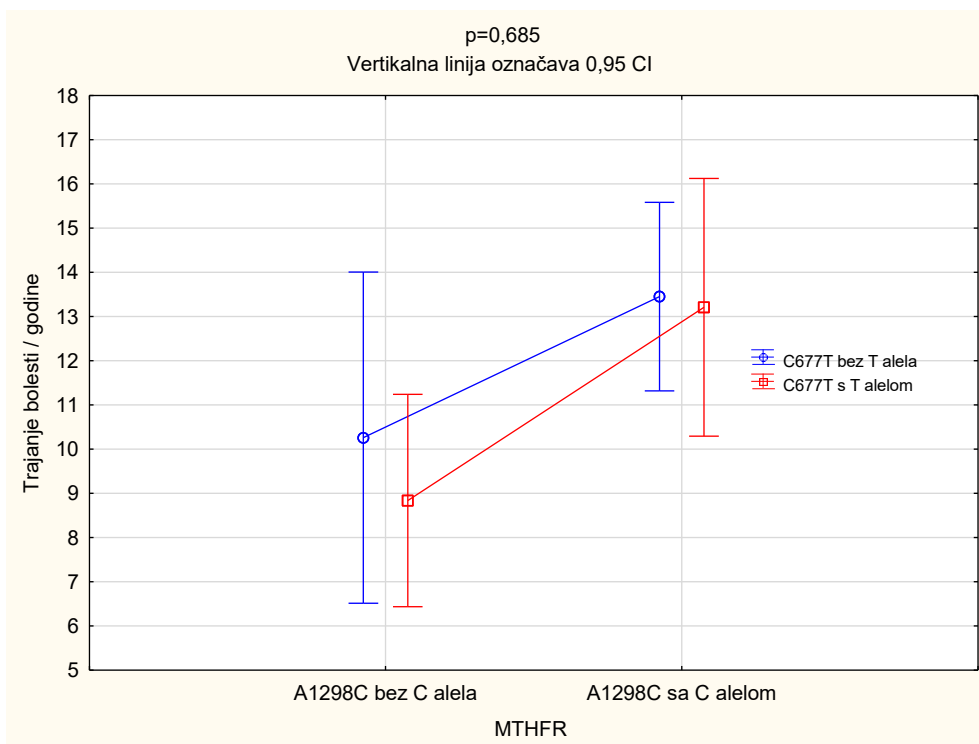
CI – raspon pouzdanosti

#### 4.5. Međudjelovanje polimorfizama C677T i A1298C MTHFR gena na kliničku ekspresiju MS

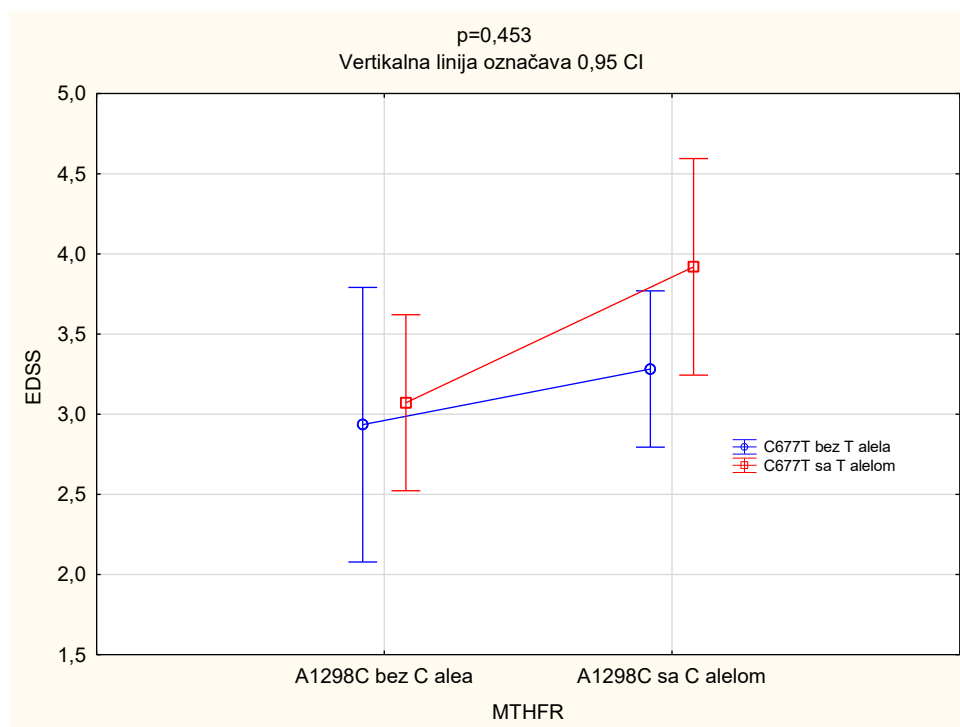
Rezultatima analize nije pokazan statistički značajan utjecaj ( $p > 0,05$ ) međudjelovanja polimorfizma C677T i A1298C MTHFR gena na promatrane parametre kliničke ekspresije MS-a kao što su dob nastupa bolesti (slika 13), trajanje bolesti (slika 14), EDSS (slika 15) i PI (slika 16).



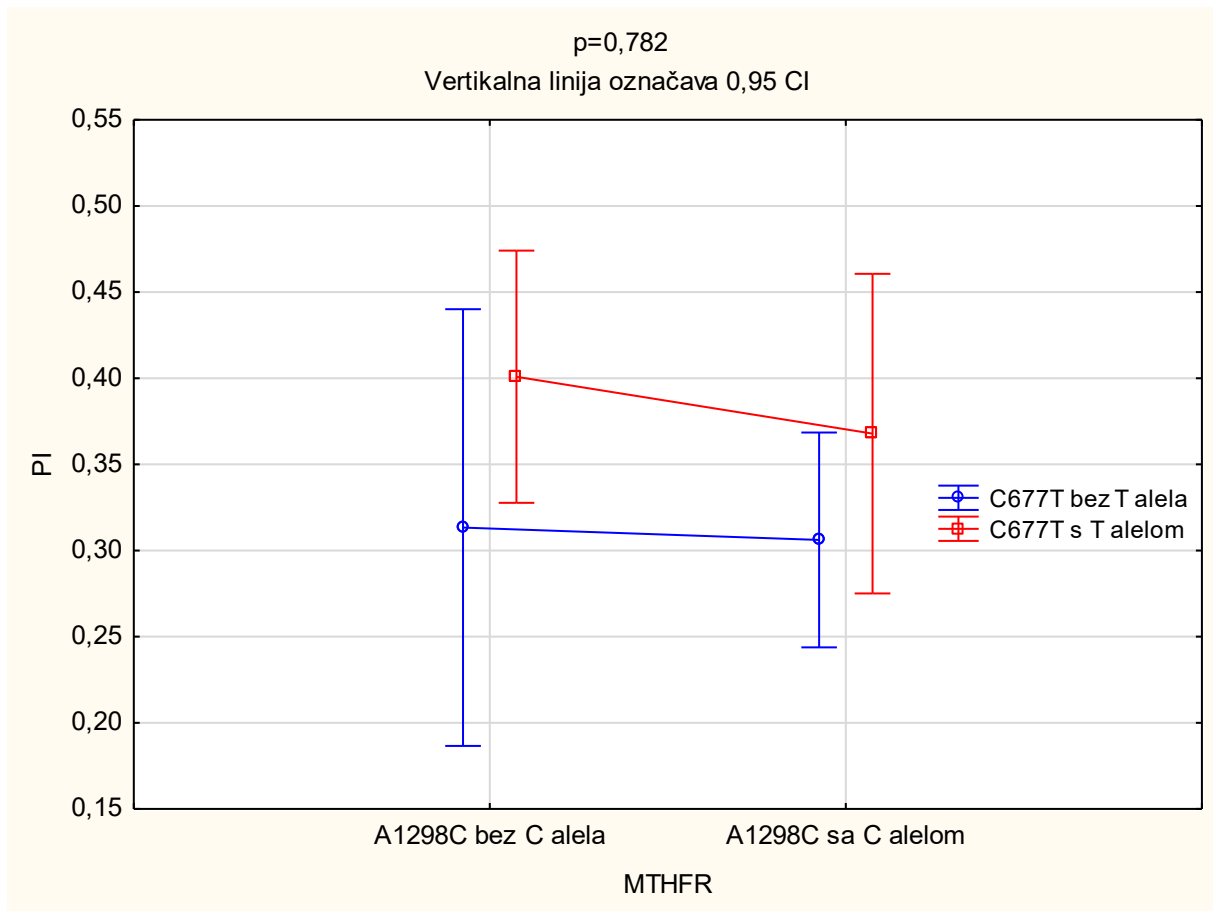
Slika 13. Utjecaj međudjelovanja MTHFR C677T i A1298C polimorfizma na dob nastupa bolesti (godine).



Slika 14. Utjecaj međudjelovanja MTHFR C677T i A1298C polimorfizma na trajanje bolesti (godine).



Slika 15. Utjecaj međudjelovanja MTHFR C677T i A1298C polimorfizma na stupanj invalidnosti (EDSS).



*Slika 16. Utjecaj međudjelovanja MTHFR C677T i A1298C polimorfizma na progresijski indeks (PI) bolesti.*

## 5.Rasprava

MS ostaje model složene autoimune i neurodegenerativne bolesti s varijabilnom kliničkom ekspresijom i nepredvidivim tijekom. Na podložnost za bolesti i fenotipsku ekspresiju i zastupljenost vjerojatno utječu varijacije u brojnim genima i složene interakcije tih gena s čimbenicima okoliša. Genetska struktura MS primarno je sugerirana obiteljskim združivanjem slučajeva i razlikama u riziku od MS među etničkim skupinama koje žive u istim zemljopisnim regijama. Naime, otkrivene su veće stope podudarnosti kod jednojajčanih blizanaca u usporedbi s dizigotnim blizancima, što ukazuje na snažnu, ali složenu genetsku strukturu. HLA regija najjači je lokus predispozicije za MS, ali genomske studije probira čitavog genoma (GWAS) identificirale su nove rizične gene, od kojih svaki doprinosi malim učinkom na ukupnu predispoziciju za bolest. Prethodna istraživanja također su pružila dokaze da je visoka prevalencija polimorfizama gena MTHFR često otkrivena u pacijenata s autoimunim bolestima, što ukazuje na genetsku povezanost s autoimunim poremećajima [28,30].

Smanjenje aktivnosti enzima kodiranog MTHFR genom, 5-10-metilentetrahidrofolat reduktazom, remeti ciklus metabolizma folne kiseline i sintezu nukleinskih kiselina, kao rezultat polimorfizma jednog nukleotida. MTHFR reducira 5-10-metilentetrahidrofolat u 5-metilentetrahidrofolat koji je ključni faktor remetilacije neurotoksičnog homocisteina u metionin. Inhibicija ovog procesa dovodi do hiperhomocisteinemije i uzrokuje stvaranje slobodnih radikala koji oštećuju mijelin. Metionin je prekursor S-adenozilmetionina, koji je neophodan za mijelinizaciju CNS-a. Dvije varijante gena MTHFR, C677T i A1298C dovode do smanjene aktivnosti enzimskog produkta kodiranog ovim genom [28,30].



Dosadašnja istraživanja po pitanju povezanosti polimorfizama MTHFR gena i MS dala su inkonzistentne rezultate, ovisno o populaciji [28–31,34–36]. Prema tome, svrha ovog istraživanja bila je ustanoviti postoji li moguća veza između pojedinačnog ili kombiniranog učinka dviju varijanti gena MTHFR (C677T i A1298C) u pacijenata s MS-om u odnosu na kontrolnu skupinu. To podrazumijeva odgovore na pitanja jesu li polimorfizmi MTHFR dio čimbenika odgovornih za predispoziciju na MS u hrvatskoj populaciji i imaju li utjecaj na tijek i progresiju bolesti na osnovi kliničke slike bolesnika.

Stoga je u istraživanje bilo uključeno 200 osoba oboljelih od MS (151 žena i 49 muškaraca) iz hrvatske populacije te 200 zdravih pojedinaca.

#### *Polimorfizam MTHFR C677T*

Iz prethodno opisanih rezultata proizlazi da nema statistički značajne razlike u frekvenciji MTHFR C677T genotipova i alela između oboljelih i kontrolne skupine, kao ni između različitih subtipova bolesti - PP, SP i RR MS (tablica 11). Prema tome, da se zaključiti da MTHFR C677T polimorfizam nema utjecaja na podložnost i tijek MS ovisno o subtipu bolesti u hrvatskoj populaciji. To je u skladu s istraživanjima u njemačkoj populaciji [35], poljskoj populaciji [30] i populaciji Tunisa [36].

Također, statistički značajne razlike su izostale i pri usporedbi distribucije genotipova u slučajevima obiteljske i neobiteljske MS (tablica 13), a možemo negirati i razliku učestalosti pojedinih genotipova prema spolu (tablica 12). Dakle, možemo isključiti ulogu MTHFR C677T kao jedne od pojedinačnih nasljednih komponenata rizika za MS ili čimbenika koji doprinosi češćoj prevalenciji MS u žena u odnosu na muškarce te razlikama s obzirom na obiteljsku pojavnost bolesti.

Što se tiče kliničke ekspresije, nema statistički značajne razlike u dobi nastupa i trajanju bolesti, EDSS i PI između pojedinih varijanti MTHFR

C677T genotipova (tablica 14), no valja naglasiti da rezultati analiza u MS bolesnika s obzirom na prisustvo T alela MTHFR C677T gena ukazuju na statistički značajnu razliku ( $p < 0,05$ ) utvrđenu za indeks progresije (slika 8). Ova činjenica podupire zaključak da prisutnost T alela negativno utječe na pacijenta, barem po pitanju PI, dok su za dob nastupa, trajanje bolesti i EDSS rezultati pokazali izostanak značajnog utjecaja prisutnosti T alela. Ipak s obzirom da je PI indirektan pokazatelj izračunat iz EDSS-a i trajanja bolesti ne iznenađuje njegova statistička značajnost s obzirom na veći EDSS od 0,2 i 2 godine kraće trajanje bolesti u nosioca T alela. Poznato je da prisutnost T alela umanjuje srednju enzimsku aktivnost MTHFR za 35-70% ovisno o prisustvu ili odsustvu C alela – time je umanjeno potencijal za remijelinaciju i povećan potencijal za oštećenja putem ROS-a, što se u MS bolesnika negativno odrazilo na PI. Ovakvi rezultati nisu zapaženi u istraženju literaturi.

#### *Polimorfizam MTHFR A1298C*

Analizom rezultata MS bolesnika i kontrolne skupine za genotipove MTHFR A1298C polimorfizma utvrđena je statistički značajna razlika u distribuciji genotipa C/C između ove dvije skupine dok usporedbe učestalosti ostalih genotipova nisu pokazale značajnu razliku (tablica 15). Konkretno, 5 pacijenata imalo je navedeni genotip naspram 18 zdravih kontrola te bi za donošenje zaključaka valjalo povećati skupine ispitanika i provesti funkcionalna istraživanja. Razlike nije bilo ni u distribuciji genotipova i frekvenciji alela između podskupina MS bolesnika prema tijeku bolesti. Ovakvi rezultati ostavljaju otvoreno pitanje utjecaja MTHFR A1298C polimorfizma u podložnosti za MS, dok utjecaja na tijek bolesti nema. Naizgled smanjen rizik za MS u recesivnih homozigota, ako je vjerovati relativno malom broju ispitanika s tim genotipom, može biti pripisan činjenici da je u daljnjoj analizi ustanovljeno da 17 od spomenutih 18 zdravih ispitanika ima divlji tip MTHFR C677T polimorfizma. U ovim

slučajevima, može se polemizirati da je genotip CC MTHFR C677T negirao negativan efekt C alela MTHFR A1298C polimorfizma u tih osoba budući da MTHFR C677T ima veći utjecaj na enzim od MTHFR A1298C. No, to je diskutabilno zbog kontradiktornog rezultata u osoba s kombinacijom genotipova CC/AC, gdje je značajno više oboljelih imalo ovu kombinaciju u odnosu na kontrolnu skupinu (tablica 19).

Zatim, statistički značajne razlike nije bilo pri usporedbi distribucije genotipova u slučajevima obiteljske i neobiteljske MS (tablica 17), kao ni u učestalosti pojedinih genotipova prema spolu (tablica 16). Prema tome, slijedi da MTHFR A1298C nije dio nasljedne komponente rizika za MS i ne pridonosi češćoj prevalenciji MS u žena u odnosu na muškarce.

Interpretacijom rezultata utjecaja MTHFR A1298C na parametre kliničke ekspresije, možemo zaključiti da pojedine varijante genotipa ne igraju ulogu u dobi nastupa, EDSS i PI. Međutim, pokazalo se da postoji značajna razlika u trajanju bolesti između pojedinih genotipova, pri čemu je trajanje bolesti za C/C genotip znatno kraće u odnosu na genotipove A/C i A/A (tablica 18). Nastavno na to, rezultati analiza u MS bolesnika s obzirom na prisustvo C alela MTHFR A1298C gena također ukazuju na statistički značajnu razliku utvrđenu za trajanje bolesti, gdje prisustvo C alela produžuje trajanje bolesti (slika 10), no s obzirom na ostatak rezultata, vidimo kako to nije zapravo slučaj u recesivnim homozigotima, već je rezultat kumulativnog utjecaja C alela A/C i C/C genotipa naspram A/A, koji je po trajanju bolesti ipak nešto bliži genotipu C/C dok A/C genotip ima najduže trajanje bolesti. Ostali rezultati MS bolesnika s obzirom na prisustvo C alela MTHFR A1298C gena pokazali su da nema statistički značajne razlike u dobi nastupa bolesti, EDSS-u i PI.

Kao što je već ranije nagoviješteno, osim ispitivanja pojedinačnog učinka polimorfizama C677T i A1298C MTHFR gena u podložnosti za MS, značajan doprinos ovog istraživanja je u ispitivanju interakcije polimorfizama i njihova povezanost s MS-om za kombinacije MTHFR C677T i A1298C genotipova. Razlika između distribucije kombinacija genotipova u oboljelih i kontrola dosegla je statističku značajnost u dva prethodno spomenuta slučaja međudjelovanja polimorfizama C677T i A1298C MTHFR gena; prvi je kombinacija genotipova CC/AC, gdje je više oboljelih (71 osoba) imalo ovu kombinaciju u odnosu na kontrolnu skupinu (47 osoba), a drugi je kombinacija genotipova CC/CC koja je bila zastupljenija u kontrolnoj skupini (17 osoba) no u oboljelih (4 osobe). Ostale kombinacije nisu se statistički značajno razlikovale između ispitivanih grupa (tablica 19). Slijedeći ovakve rezultate, postoji mogućnost da su genotipovi C/C za MTHFR C677T i A/C za MTHFR A1298C u kombinaciji rizični u podložnosti za MS bolesnika iz hrvatske populacije. Međutim, teško je teoretizirati o smanjenom riziku za razvoj MS ukoliko osoba posjeduje kombinaciju genotipova C/C za MTHFR C677T i C/C za MTHFR A1298C zbog opaske da je broj subjekata s ovim genotipom nedostatan za snažno utemeljene tvrdnje.

Nadalje, analiza međudjelovanja polimorfizama C677T i A1298C MTHFR gena na promatrane parametre ekspresije bolesti kao što su dob nastupa bolesti, trajanje bolesti, EDSS i PI nije dala statistički značajne razlike između ispitivanih skupina. Iz toga slijedi da kombinacije genotipova ovih polimorfizama nemaju utjecaj na spomenute parametre kliničke ekspresije MS-a u bolesnika iz hrvatske populacije.

Dosadašnji podatci istraživanja u različitim populacijama o povezanosti MTHFR polimorfizama bili su doista inkonzistentni te su kao takvi djelomično u

skladu s ovim istraživanjem. Primjerice, u australskoj populaciji nije pronađena veza između MTHFR A1298C s MS-om [34]. U populaciji Tunisa [36] zabilježen je nedostatak asocijacije u odnosu na varijantu MTHFR C677T, s druge strane je uočena povezanost polimorfizma MTHFR A1298C i MS. Naime, varijanta A1298C pojavila se značajno češće u bolesnika s MS-om kada se učestalost genotipova A/C, C/C ili alela C usporedila s učestalošću kontrolne skupine i C/C genotip je asociiran s 4 puta većim rizikom MS-a. Ovi nalazi populacije Tunisa nisu potpuno u skladu s istraživanjem u našoj populaciji, ali su sukladni s istraživanjem u njemačkoj populaciji, gdje su Klotz i sur. [35] prijavili značajnu povezanost između MTHFR A1298C i MS-a, ali ne i povezanost s MTHFR C677T. Prijavljeno je da su se učestalosti MTHFR C1298C genotipova značajno razlikovale između pacijenata i kontrola. Takvi rezultati sugeriraju da homozigotnost za A alel MTHFR A1298C može biti zaštitna u smislu incidencije MS-a. U istraživanju turskih bolesnika s MS-om, pokazalo se da ima statistički značajne razlike između skupina bolesnika i kontrole, a povezanosti su uočene za CC genotip u odnosu na CT + TT genotipove za varijantu MTHFR C677T [28]. Nadalje, prema modelu logističke regresije, u skupini iranskih MS bolesnika [31], polimorfizmi MTHFR C677T i A1298C bili su povezani s većim rizikom za MS. U usporedbi s kontrolom, genotip MTHFR C677T pokazao je veći rizik MS-a u recesivnim i kododominantnim modelima. Također je uočen veći rizik povezan s genotipovima MTHFR 1298 AC kada su pacijenti s MS-om uspoređeni s kontrolama i kada je korišten genotip divljeg tipa AA kao referentna kategorija. Međutim, prema recesivnom modelu nasljeđivanja, homozigotni CC genotip bio je blago povezan sa smanjenim rizikom za MS kao i u ovom istraživanju. Takav rezultat mogao bi biti posljedica niske statističke snage zbog ograničenog broja homozigotnih subjekata (5 od 180 slučajeva). Uz to je ispitan i zajednički učinak genotipova polimorfizama MTHFR C677T i A1298C u riziku za MS. Od pet najčešćih kombinacija genotipova (CC/AC, CT/AA, CT/AC, TT/AA i TT/AC) koji čine gotovo 80% cjelokupne genotipske raznolikosti u iranskoj ispitivanoj skupini, distribucija tri genotipa bila je

značajno drugačija između slučajeva i kontrola. Na temelju njihovih nalaza, 3 genotipa s promijenjenim varijantama (TT/AC, CT/AC i TT/AA) su genotipovi visokog rizika za razvoj MS, što nije podudarno s rezultatima našeg istraživanja provedenog na genetički različitoj populaciji [31]. U drugom istraživanju na turskoj populaciji uočeno je da je učestalost genotipa T/T za polimorfizam MTHFR C677T značajno viša u pacijenata nego u kontrolama. Za polimorfizam MTHFR A1298C, genotip A/A bio je značajno češći u kontrolama nego u pacijenata. Drugim riječima, moguća je veza između povećanog rizika za MS i polimorfizma MTHFR C677T i smanjenog rizika za MS i polimorfizma MTHFR A1298C [41]. S druge strane, istraživanje provedeno na poljskoj populaciji nije pronašlo povezanost MTHFR C677T i MTHFR A1298C polimorfizama s predispozicijom za MS ni s kliničkom ekspresijom bolesti [27].

Kontradiktorno nekim istraživanjima na homogenim populacijama, nedavno objavljeni rezultati meta-analize ukazuju na nepostojanje povezanosti između obiju polimorfničkih varijanti MTHFR gena s MS-om. Analizirana populacija sastojala se od približno 2500 bolesnika s MS-om i gotovo 3000 zdravih osoba [42].

MS je opsežno istraživana s obzirom na metabolizam homocisteina, s proturječnim rezultatima. Neka istraživanja pokazuju da se povećanje razine homocisteina može pojaviti u MS-i zbog nedostatka vitamina B12 i/ili folata. Buduća istraživanja morat će razmotriti ove parametre kako bi se u potpunosti razumjela uloga njihova nedostataka u vezi s polimorfizmima MTHFR.

Moguće je da su različiti nalazi navedenih istraživanja u pojedinim populacijama posljedica geografskih, rasnih, genetskih i prehrambenih čimbenika, uz razlike u dizajnu istraživanja i potencijalno limitiranom broju ispitanika. Osvrtom na istraživanja bilo bi poželjno ubuduće genotipizaciju komplementirati s određenim razinama homocisteina. S druge strane, ispitivanje međudjelovanja MTHFR C677T i MTHFR A1298C u svakom slučaju je korak naprijed naspram gledanja rezultata zasebno jer pomaže

proširiti kontekst te bi bilo dobro razmotriti potencijalni „*gene dose dependant*“ utjecaj polimorfizama. Opažene trendove značajnosti vezane uz kombinaciju genotipova u podložnosti za MS ili utjecaja pojedinog genotipa ili alelne varijante na neki od kliničkih parametara ekspresije bolesti valjalo bi testirati na većem broju bolesnika. Bez obzira što su neki od trenutnih rezultata inkonkluzivni, ovo istraživanje pružilo je uvid u genetsku podlogu MS-a u hrvatskoj populaciji vezano uz MTHFR gen, gdje se u mnogome čini da polimorfne varijante MTHFR gena, koje reduciraju aktivnost MTHFR enzima, ne igraju značajnu ulogu u predispoziciji za MS.

## 6. Zaključak

MS je autoimuni neurodegenerativni poremećaj koji pokazuje relativnu varijabilnost u kliničkoj ekspresiji i tijeku bolesti. Javlja u osoba s određenom genetskom podlogom, koja, po svemu sudeći, nije jedini odlučujući faktor u razvoju bolesti, već djeluje sinergijski s okolišnim čimbenicima koji se ponašaju kao okidač bolesti. Dosada je otkriveno oko 230 rizičnih genskih lokusa te potencijalni okolišni čimbenici koji čine etiopatogenezu izazovnom. Istraživanja asocijacija raznih faktora razlikuju se od populacije do populacije.

U ovom istraživanju, ispitan je učinak polimorfizama MTHFR C677T i MTHFR A1298C na predispoziciju za MS, tijek bolesti i kliničku ekspresiju u hrvatskoj populaciji bolesnika.

Rezultati upućuju na nedostatak pojedinačnog utjecaja oba polimorfizma na podložnost i tijek bolesti, što je u skladu s dijelom istraživanja provedenim u drugim populacijama.

Međutim, pokazalo se da prisustvo T alela MTHFR C677T polimorfizma negativno utječe na progresijski indeks bolesti te da je C alel MTHFR A1298C polimorfizma povezan s dužim trajanjem bolesti u ovih bolesnika. Povrh toga, analiza međudjelovanja između polimorfizama ukazuje na povećan rizik za osobe s kombinacijom genotipova CC/AC i smanjen rizik za one s CC/CC kombinacijom, pri čemu C alel MTHFR A1298C u manjoj mjeri reducira aktivnost enzima, što se čini problematičnim u heterozigota, ali ne i recesivnih homozigota. No, s obzirom na limitiran broj ispitanika s odgovarajućom kombinacijom genotipova upitna je pouzdanost u donošenju ovakvih zaključaka.

Relativno mali broj bolesnika ujedno je i nedostatak ovog istraživanja te bi buduća istraživanja koja bi inkorporirala više ispitivanih parametara te bi uz određivanje pojedinačnog učinka polimorfizma na predispoziciju za MS i ekspresiju bolesti i uz mjerenje razina homocisteina, također trebala



testirati međudjelovanje polimorfizama i utjecaj na kliničku ekspresiju na većem broju bolesnika kako bi se dobio što sveobuhvatniji uvid o utjecaju rizičnih alela i proširile spoznaje o etiopatogenezi bolesti.

## 7.Literatura

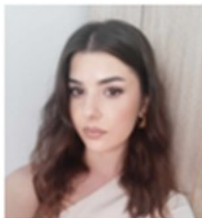
- 1 Dighriri IM, Aldalbahi AA, Albeladi F, Tahiri AA, Kinani EM, Almohsen RA *et al.* An Overview of the History, Pathophysiology, and Pharmacological Interventions of Multiple Sclerosis. *Cureus* 2023; **15**: e33242.
- 2 Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA *et al.* Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl* 2020; **26**: 1816–1821.
- 3 Goris A, Vandebergh M, McCauley JL, Saarela J, Cotsapas C. Genetics of multiple sclerosis: lessons from polygenicity. *Lancet Neurol* 2022; **21**: 830–842.
- 4 Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G *et al.* Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 2018; **17**: 162–173.
- 5 Dashti M, Ateyah K, Alroughani R, Al-Temaimi R. Replication analysis of variants associated with multiple sclerosis risk. *Sci Rep* 2020; **10**: 7327.
- 6 Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018; **8**: a028936.
- 7 Zéphir H. Progress in understanding the pathophysiology of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)* 2018; **174**: 358–363.
- 8 Ochi H. Role of B cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Exp Neuroimmunol* 2021; **12**: 220–227.
- 9 Guan Y, Jakimovski D, Ramanathan M, Weinstock-Guttman B, Zivadinov R. The role of Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: from molecular pathophysiology to: in vivo: imaging. *Neural Regen Res* 2019; **14**: 373.
- 10 Hollen C, Neilson LE, Barajas RF, Greenhouse I, Spain RI. Oxidative stress in multiple sclerosis—Emerging imaging techniques. *Front Neurol* 2023; **13**: 1025659.
- 11 Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* 2018; **97**: 742–768.
- 12 Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S *et al.* Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primer* 2018; **4**: 43.
- 13 Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ *et al.* Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology* 2014; **83**: 278–286.
- 14 Mey GM, Mahajan KR, DeSilva TM. Neurodegeneration in multiple sclerosis. *Wires Mech Dis* 2023; **15**: e1583.
- 15 Glad S, Nyland H, Myhr K-M. Benign multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl* 2006; **183**: 55–57.
- 16 Waldman A, Ness J, Pohl D, Simone IL, Anlar B, Amato MP *et al.* Pediatric multiple sclerosis: Clinical features and outcome. *Neurology* 2016; **87**: S74–S81.

- 17 Pogoda-Wesołowska A, Dziedzic A, Maciak K, Stępień A, Dziaduch M, Saluk J. Neurodegeneration and its potential markers in the diagnosing of secondary progressive multiple sclerosis. A review. *Front Mol Neurosci* 2023; **16**. doi:10.3389/fnmol.2023.1210091.
- 18 Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *Lancet Lond Engl* 2018; **391**: 1622–1636.
- 19 Multiple sclerosis diagnosis therapy and prognosis. *Aust. J. Gen. Pract.* <https://www1.racgp.org.au/ajgp/2022/april/multiple-sclerosis-diagnosis-therapy-and-prognosis> (accessed 13 Sep2023).
- 20 Trust MS. Expanded Disability Status Scale (EDSS) | MS Trust. <https://mstrust.org.uk/a-z/expanded-disability-status-scale-edss> (accessed 13 Aug2024).
- 21 Alfredsson L, Olsson T. Lifestyle and Environmental Factors in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2019; **9**: a028944.
- 22 Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV. An Updated Meta-Analysis of Risk of Multiple Sclerosis following Infectious Mononucleosis. *PLoS ONE* 2010; **5**: e12496.
- 23 Nourbakhsh B, Mowry EM. Multiple Sclerosis Risk Factors and Pathogenesis. *Contin Lifelong Learn Neurol* 2019; **25**: 596–610.
- 24 Toghianifar N, Ashtari F, Zarkesh-Esfahani SH, Mansourian M. Effect of high dose vitamin D intake on interleukin-17 levels in multiple sclerosis: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Neuroimmunol* 2015; **285**: 125–128.
- 25 Landry RL, Embers ME. The Probable Infectious Origin of Multiple Sclerosis. *NeuroSci* 2023; **4**: 211–234.
- 26 De Silvestri A, Capittini C, Mallucci G, Bergamaschi R, Rebuffi C, Pasi A *et al.* The Involvement of HLA Class II Alleles in Multiple Sclerosis: A Systematic Review with Meta-analysis. *Dis Markers* 2019; **2019**: 1409069.
- 27 Raghubeer S, Matsha TE. Methylenetetrahydrofolate (MTHFR), the One-Carbon Cycle, and Cardiovascular Risks. *Nutrients* 2021; **13**: 4562.
- 28 Cevik B, Yigit S, Karakus N, Aksoy D, Kurt S, Ates O. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism with multiple sclerosis in Turkish patients. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res* 2014; **62**: 980–984.
- 29 Ineichen BV, Keskitalo S, Farkas M, Bain N, Kallweit U, Weller M *et al.* Genetic variants of homocysteine metabolism and multiple sclerosis: a case-control study. *Neurosci Lett* 2014; **562**: 75–78.
- 30 Chorąży M, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Gościak J, Posmyk R, Czarnowska A, Więsik M *et al.* Association between polymorphisms of a folate - homocysteine - methionine - SAM metabolising enzyme gene and multiple sclerosis in a Polish population. *Neurol Neurochir Pol* 2019; **53**: 194–198.

- 31 Naghibalhossaini F, Ehyakonandeh H, Nikseresht A, Kamali E. Association Between MTHFR Genetic Variants and Multiple Sclerosis in a Southern Iranian Population. *Int J Mol Cell Med* 2015; **4**: 87–93.
- 32 Babić Božović I, Vraneković J, Starčević Čizmarević N, Mahulja-Stamenković V, Prpić I, Brajenović-Milić B. *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms as a risk factor for congenital heart defects in Down syndrome. *Pediatr Int* 2011; **53**: 546–550.
- 33 Tajouri L, Martin V, Gasparini C, Ovcarić M, Curtain R, Lea RA *et al*. Genetic investigation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and catechol-O-methyl transferase (COMT) in multiple sclerosis. *Brain Res Bull* 2006; **69**: 327–331.
- 34 Szvetko AL, Fowdar J, Nelson J, Colson N, Tajouri L, Csurhes PA *et al*. No association between MTHFR A1298C and MTRR A66G polymorphisms, and MS in an Australian cohort. *J Neurol Sci* 2007; **252**: 49–52.
- 35 Klotz L, Farkas M, Bain N, Keskitalo S, Semmler A, Ineichen B *et al*. The variant methylenetetrahydrofolate reductase c.1298A>C (p.E429A) is associated with multiple sclerosis in a German case-control study. *Neurosci Lett* 2010; **468**: 183–185.
- 36 Fekih Mrissa N, Mrad M, Klai S, Zaouali J, Sayeh A, Mazigh C *et al*. Association of methylenetetrahydrofolate reductase A1298C polymorphism but not of C677T with multiple sclerosis in Tunisian patients. *Clin Neurol Neurosurg* 2013; **115**: 1657–1660.
- 37 Olafsson S, Stridh P, Bos SD, Ingason A, Euesden J, Sulem P *et al*. Fourteen sequence variants that associate with multiple sclerosis discovered by meta-analysis informed by genetic correlations. *NPJ Genomic Med* 2017; **2**: 24.
- 38 EDMUS, your personal MS database :: Home. <https://www.edmus.org/> (accessed 16 Aug2023).
- 39 FlexiGene DNA Handbook - (EN) - QIAGEN. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=6b147421-7846-411e-9993-bb01563b807e&lang=en> (accessed 2 Sep2024).
- 40 FlexiGene DNA Kit. <https://www.qiagen.com/fr/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/flexigene-dna-kit> (accessed 2 Sep2024).
- 41 Cakina S, Ocak O, Ozkan A, Yucel S, Ozisik Karaman HI. Relationship between genetic polymorphisms MTHFR (C677T, A1298C), MTR (A2756G) and MTRR (A66G) genes and multiple sclerosis: a case-control study. *Folia Neuropathol* 2019; **57**: 36–40.
- 42 Lee YH, Seo YH, Kim J-H, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Meta-analysis of associations between MTHFR and GST polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol* 2015; **36**: 2089–2096.

## PERSONAL INFORMATION

### Monika Pavlović



Ulica Franje Kosine 8, Đakovo, 31400, Croatia  
Radmile Matejčić 5, Rijeka, 51000, Croatia

+385953594499

[pavlovicmonika5@gmail.com](mailto:pavlovicmonika5@gmail.com)

Sex Female | Date of birth 28/02/2000 | Nationality Croatian

## EDUCATION AND TRAINING

01/10/2021 - current

### Master program in Biotechnology in medicine

University of Rijeka - Department of biotechnology, Radmile Matejčić 2, Rijeka, Croatia

2019.

### Student representative congress, Rijeka 2019.

01/10/2018 – 22/09/2021

### Bachelor's degree in biotechnology and drug research, *magna cum laude*

University of Rijeka - Department of biotechnology, Radmile Matejčić 2, Rijeka, Croatia

Bachelor thesis: "Brain-gut axis in depressive and anxiety disorders" (Mentor: dr. sc. Zeljka Maglica)

-sufficient knowledge to analyse data in research, able to collect statistical information on which research is based, adequate knowledge of laboratory methods and techniques in biotechnology, being able to control and circulate research documentation and other information

2014 - 2018

### Gymnasium A. G. Matoš

Ul. Vijenac kardinala Alojzija Stepinca 11, 31400, Đakovo

Honours and awards: STEM scholarship (2019., 2020.), City of Đakovo scholarship for excellence (2021., 2022.)

## WORK EXPERIENCE

31.02.2024. – 31.07.2024

### ERASMUS practice internship at ICGEB (International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology) – Biotechnology development unit

CHO-Trastuzumab cells growth in the flask and 1L bioreactor's volume in a fed-batch mode, metabolite analysis, *in vitro* biological test set-up (*in vitro* parallel line assay), mammalian cell line manipulation, bioreactor's set-up, writing the Standard Operating Procedure (SOP), training in

GMP-like environment, part of the training personnel for Technology transfer

02.03.2023.–03.04.2023

**Lab practice and data analysis for master thesis at Institute of medical biology and genetics, University of Medicine, Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka**

Analysis of rs1801133 – C677T and rs1801131 – A1298C polymorphisms in MTHFR gene of Multiple sclerosis patients using polymerase chain reaction, endonuclease restriction as well as electrophoresis and statistical data analysis

05/07/2021 – 16/07/2021

**Student internship at Teaching Institute for Public Health of Osijek-Baranja Counties**

Detecting metal in food/water using mass spectrometry

#### PERSONAL SKILLS

**Mother tongue(s)** Croatian

**Other language(s)**

	UNDERSTANDING		SPEAKING		WRITING
	Listening	Reading	Spoken interaction	Spoken production	
English	C2	C2	B1	B2	C1

Levels: A1/2: Basic user - B1/2: Independent user - C1/2 Proficient user  
Common European Framework of Reference for Languages

**Communication skills** • good communication skills acquired through college presentations and student job

**Job-related skills** • used to working in teams (through college projects, lab practices and through being part of a group during internship practice)

**Computer skills** • good command of Microsoft Office™ tools, moderate knowledge of chemo- and bio-informatic softwares (UCSF Chimera, VMD, PyMOL,...), training in *in silico* high throughput drug screening and ligand docking-Spark, AutodockVina), average knowledge of Statistical tools; Statistica and MedCalc, eLabJournal application in day to day experiments

#### ADDITIONAL INFORMATION

**Student job** Media One agent for video identification of personal documents (verification and security check), E-sign authorization – Iknow app  
Assistant waiter at a restaurant (Blue Sun Hotels and Liburnia Hotels)