

# Vědecká příprava pro Zubní lékařství – cvičení

**Mgr. Tereza Deissová<sup>1,2</sup>**

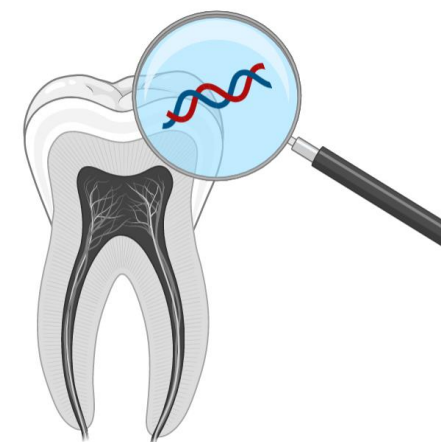
**doc. RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MBA<sup>1,2,3,4</sup>**

<sup>1</sup> Stomatologická klinika, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno

<sup>2</sup> Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno

<sup>3</sup> Ústav lékařské genetiky, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno

<sup>4</sup> Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie, Fakultní nemocnice Brno



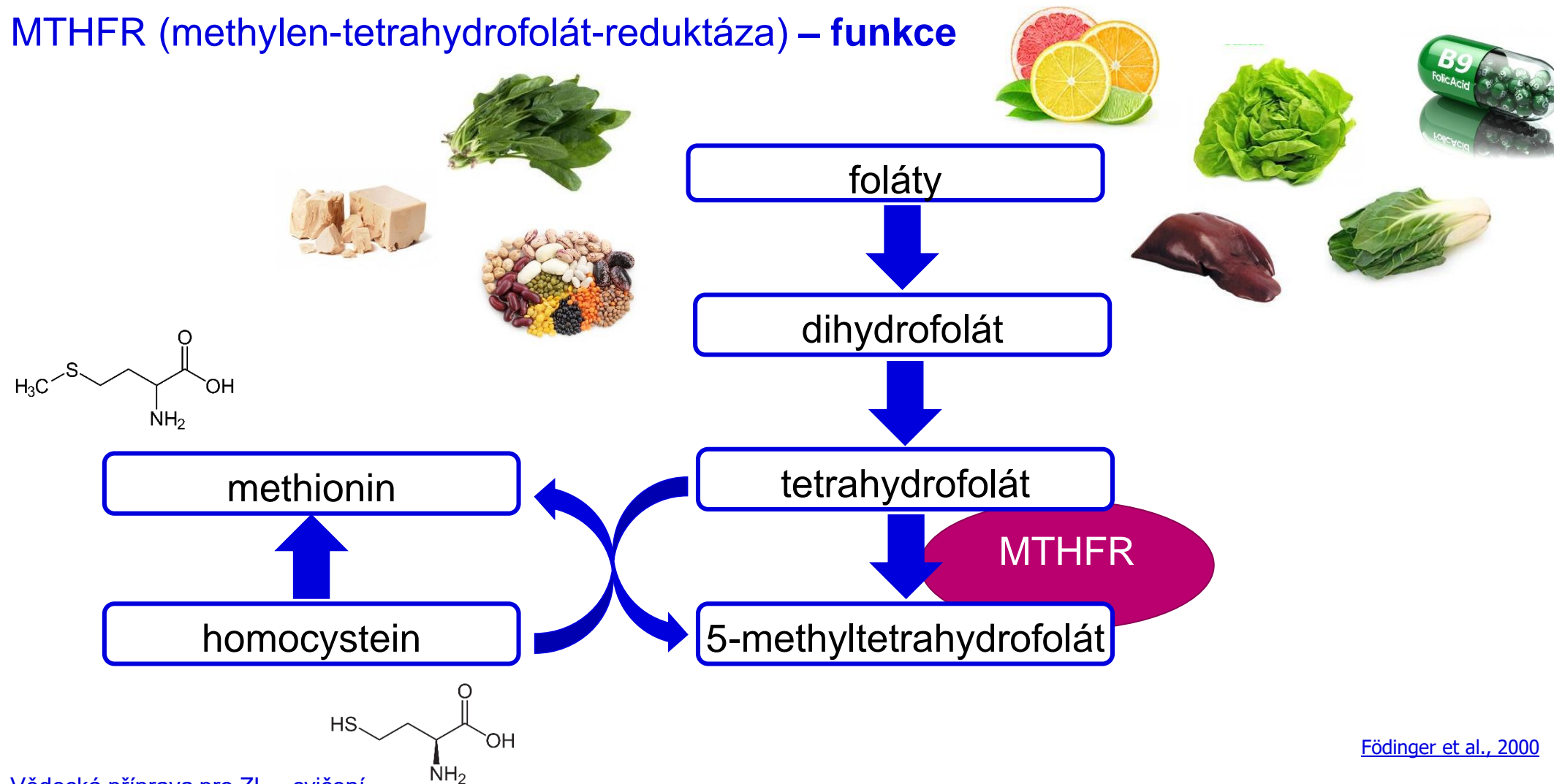
# Variabilita v genu *MTHFR* a onemocnění dutiny ústní

## Obsah cvičení

- Enzym methylenetetrahydrofolát reduktáza (MTHFR) – funkční význam a jeho polymorfizmy
- Onemocnění dutiny ústní asociované s variabilitou v genu pro MTHFR a výsledky našich studií
- Stanovení polymorfizmů v genu pro MTHFR (návod k laboratornímu cvičení)
- Vyhodnocení výsledků po laboratorní analýze

# Methylentetrahydrofolát reduktáza (MTHFR)

MTHFR (methylen-tetrahydrofolát-reduktáza) – funkce



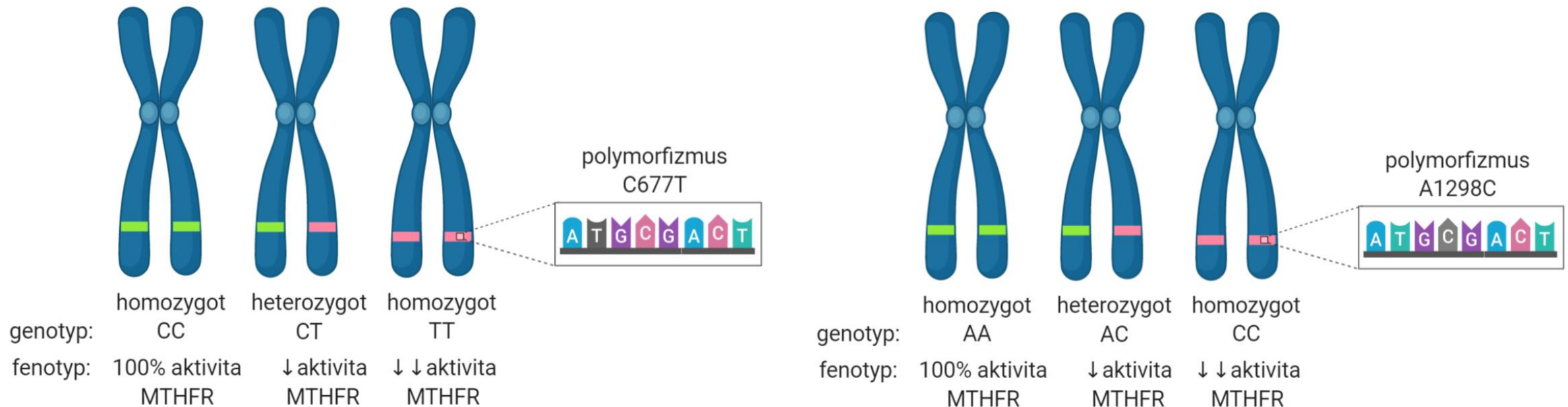
Födinger et al., 2000

MUNI  
MED

# Methylentetrahydrofolát reduktáza (MTHFR)

MTHFR (methylen-tetrahydrofolát-reduktáza) – genetická variabilita

— gen *MTHFR* a jednonukleotidový polymorfismus C677T a A1298C



[Weisberg et al., 1998](#)

MUNI  
MED

# Methylentetrahydrofolát reduktáza (MTHFR)

MTHFR (methylen-tetrahydrofolát-reduktáza) – **polymorfizmy C677T a A1298C význam**

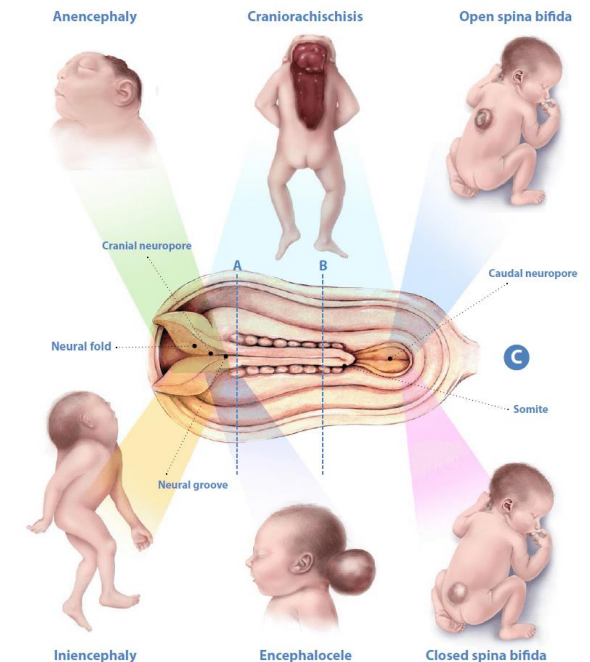
— geneticky podmíněná **snížená aktivita enzymu MTHFR**

→ **zpomalená metylace homocysteinu na methionin**

→ **akumulace homocysteinu v plazmě**

→ **riziko vrozených vývojových vad,  
kardiovaskulárních poruch**

- zvýšená prevalence tromboembolických poruch u nositelů
- u homozygotních nositelek variantních alel zvýšené riziko spontánních abortů
- zvýšená toxicita cytostatika CMF (cyklofosamid, MTX, 5-FU)



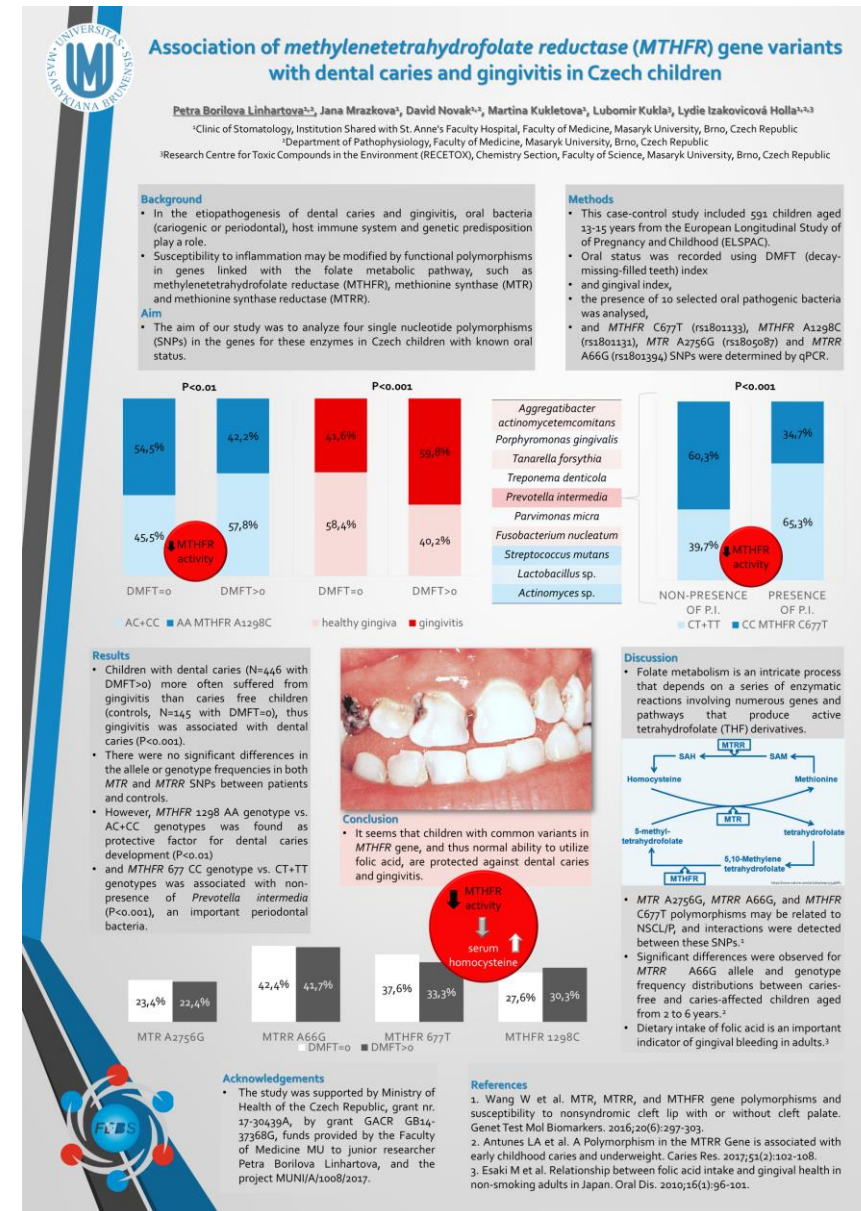
# Zubní kaz a gingivitida

## Etiopatogeneze

- ↑ homocystein ve slinách = oxidativní marker
  - zánět sliznice v dutině ústní
  - kariézní proces
- 2x denně 5 mg/ 5 ml folátu obsaženého v ústní vodě po dobu 14 dní = ↓rozvoj gingivitidy

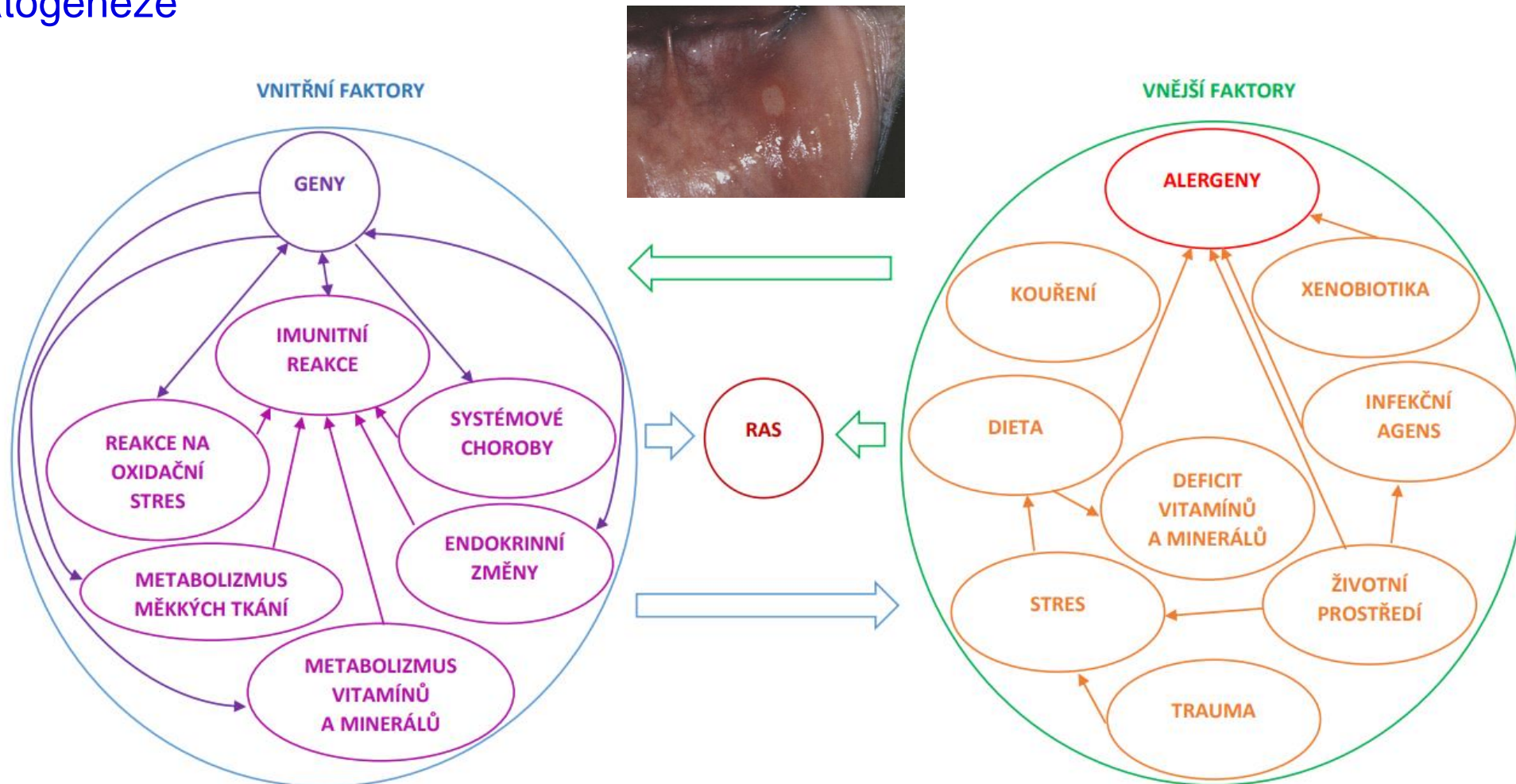


Pack 1984  
Cope et al., 2011  
Kumar et al., 2011  
Bořilová Linhartová et al., 2018



# Recidivující aftózní stomatitida

Etiopatogeneze



# Recidivující aftózní stomatitida

## Terapie

- symptomatická terapie, podpůrná terapie – **Škachova kúra**

### kyselina listová, pyridoxin

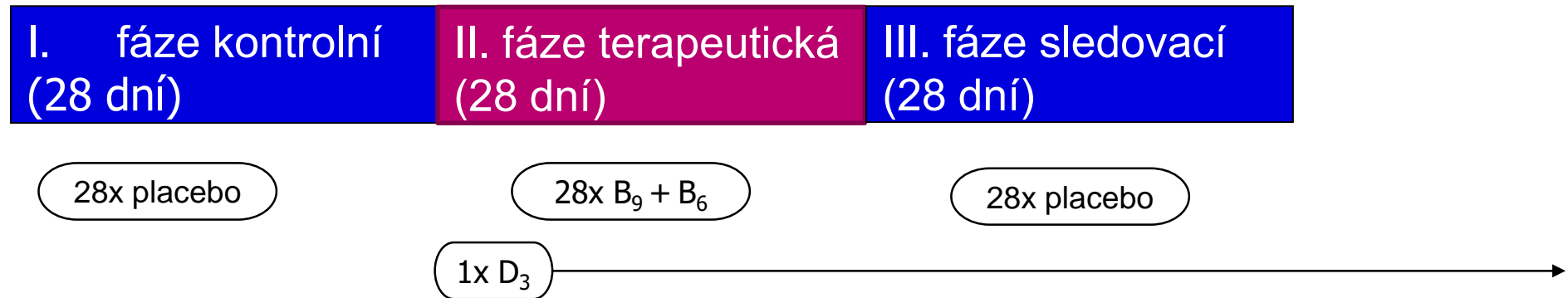
- kyselina listová je pouze prekurzorem biologicky aktivní látky – folátu označeného jako vitamin B<sub>9</sub>
- glukosaminová sůl 5-methylfolátu (4. generace) - oproti 3. generaci je dlouhodobě stabilní, má vysokou rozpustnost ve vodě, lepší biologickou dostupnost a bezpečnost



# Recidivující aftózní stomatitida

## Design pilotní klinické experimentální studie

- 10 pacientů – genotypizovaní na haplogenotypy v genu *MTHFR* (IM a PM)
- farmakoterapie v upraveném designu dvojitě zaslepené zkřížené studie (cross-over design) probíhala od jara 2018 v délce trvání 3 měsíců
- pacientům byl ve třífázovém schématu podáván aktivní folát (glukosaminová sůl 5-methylfolátu), vitamíny B<sub>6</sub> a D<sub>3</sub>



# Recidivující aftózní stomatitida

## Pilotní klinická experimentální studie

ČESKÁ STOMATOLOGIE A PRAKTICKÉ ZUBNÍ LÉKAŘSTVÍ 1/2019  
4 | PŮVODNÍ PRÁCE

FARMAKOTERAPIE RECIDIVUJÍCÍ AFTÓZNÍ  
STOMATITIDY U PACIENTŮ S GENETICKY PODMÍNĚNOU  
SNÍŽENOU SCHOPNOSTÍ METABOLIZOVAT KYSELINU  
LISTOVOU – PILOTNÍ STUDIE











Původní práce – experimentální klinická studie

PHARMACOTHERAPY OF RECURRENT APHTHOUS  
STOMATITIS IN PATIENTS WITH GENETICALLY  
IMPAIRED ABILITY TO METABOLIZE FOLIC ACID  
– PILOT STUDY

Original article – experimental clinical study

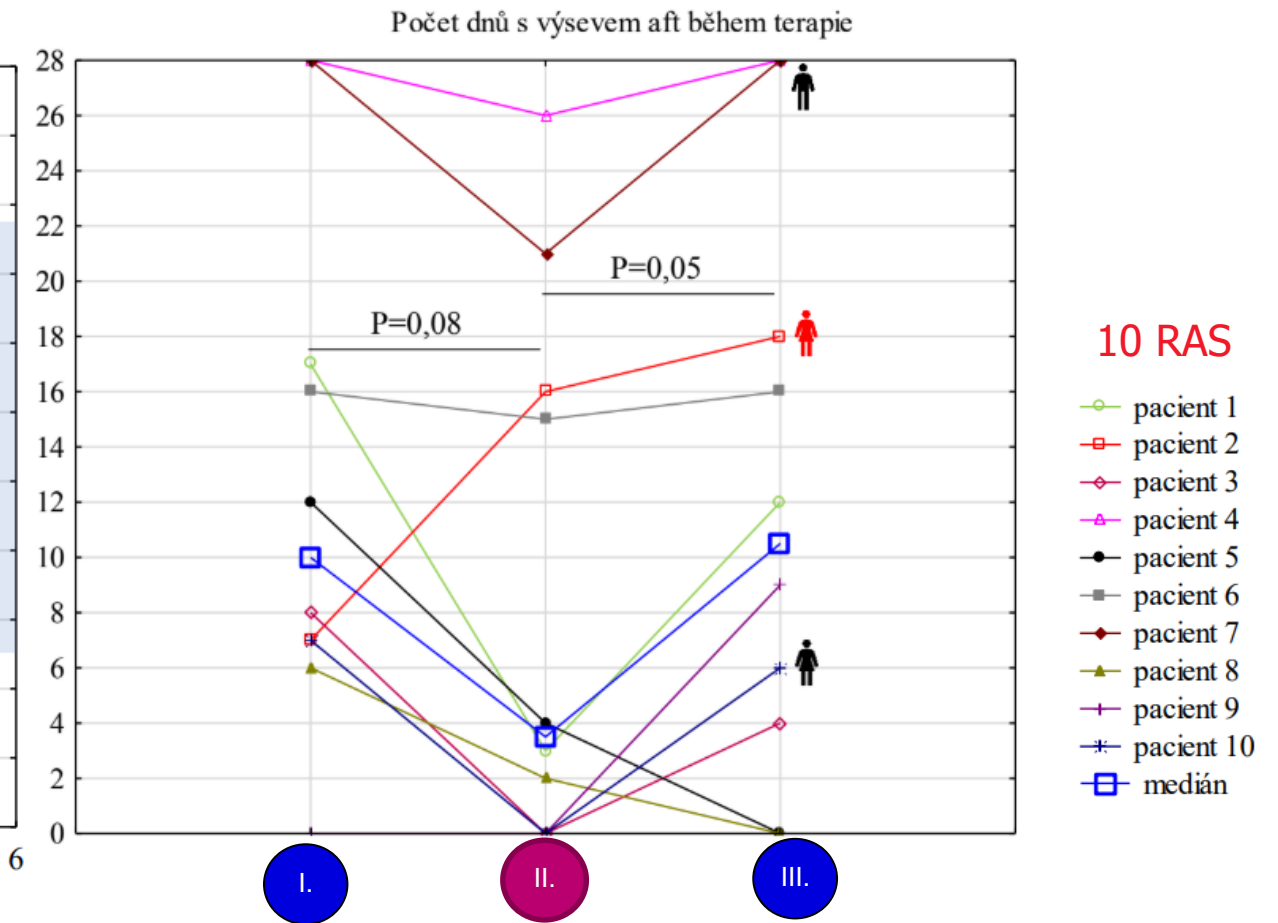
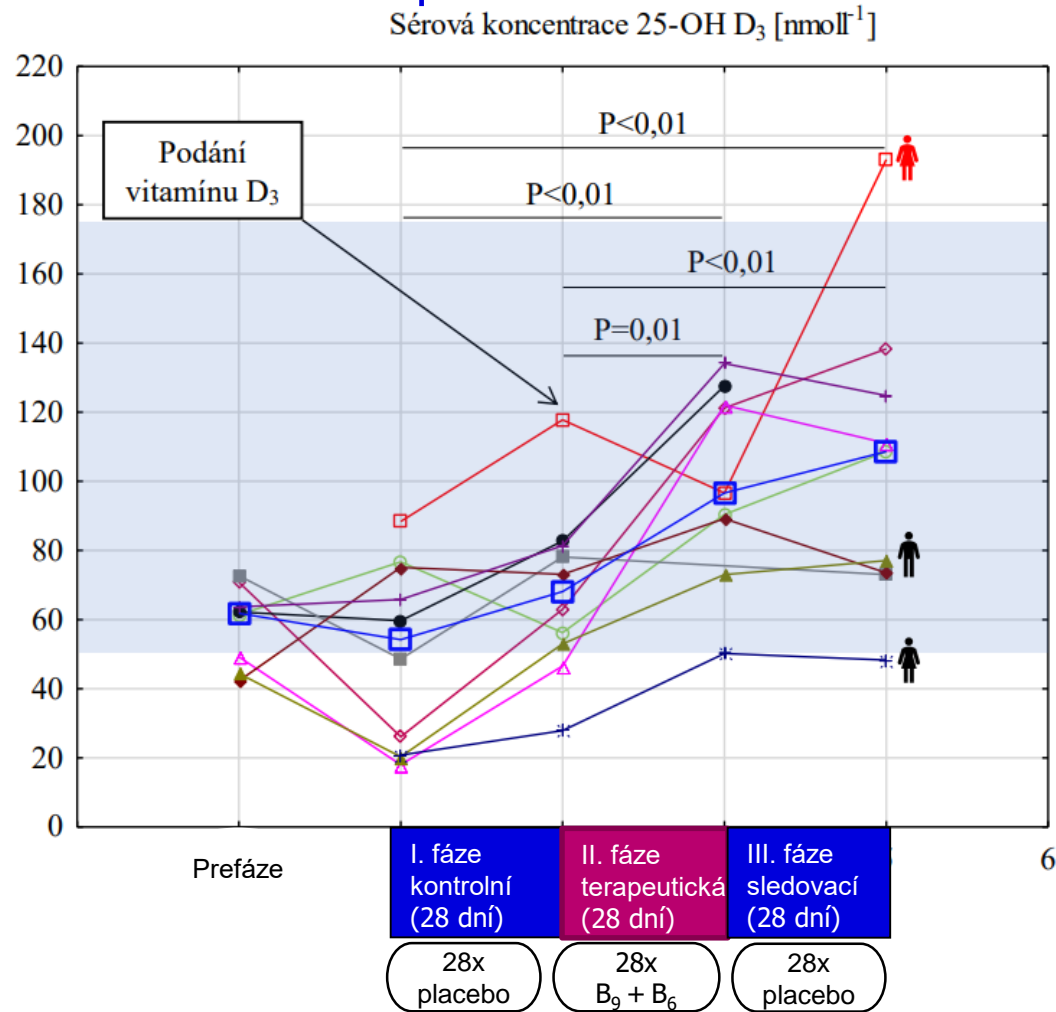
Bořilová Linhartová P.<sup>1, 2</sup>, Fassmann A.<sup>1</sup>, Linhartová J.<sup>1, 3</sup>,  
Izakovičová Holá L.<sup>1, 2</sup>

haplogenotyp  
funkce enzymu MTHFR  
předpokládaný fenotyp  
osoby s RAS v naší studii

SNP		A1298C <i>MTHFR</i> (rs1801131) MAF (C)=34 %		
	genotyp funkce enzymu MTHFR frekvence v EUR populaci	AA 100 % 43 %	AC 80-100 % 45 %	CC 60 % 12 %
C677T <i>MTHFR</i> (rs1801133) MAF (T)=31 %	CC 100 % 46 %	--/-- 100% EM	--/+ 80% EM	--/++ 60% IM  
	CT 65 % 44 %	+--/-- 65% IM  	+-/+- 50% IM   	+-/++ 30% PM
	TT 20 %-30 % 10 %	++/-- <30% PM  	++/+ <30% PM 	++/++ <10% PM

# Recidivující aftózní stomatitida

## Pilotní klinická experimentální studie



10 RAS

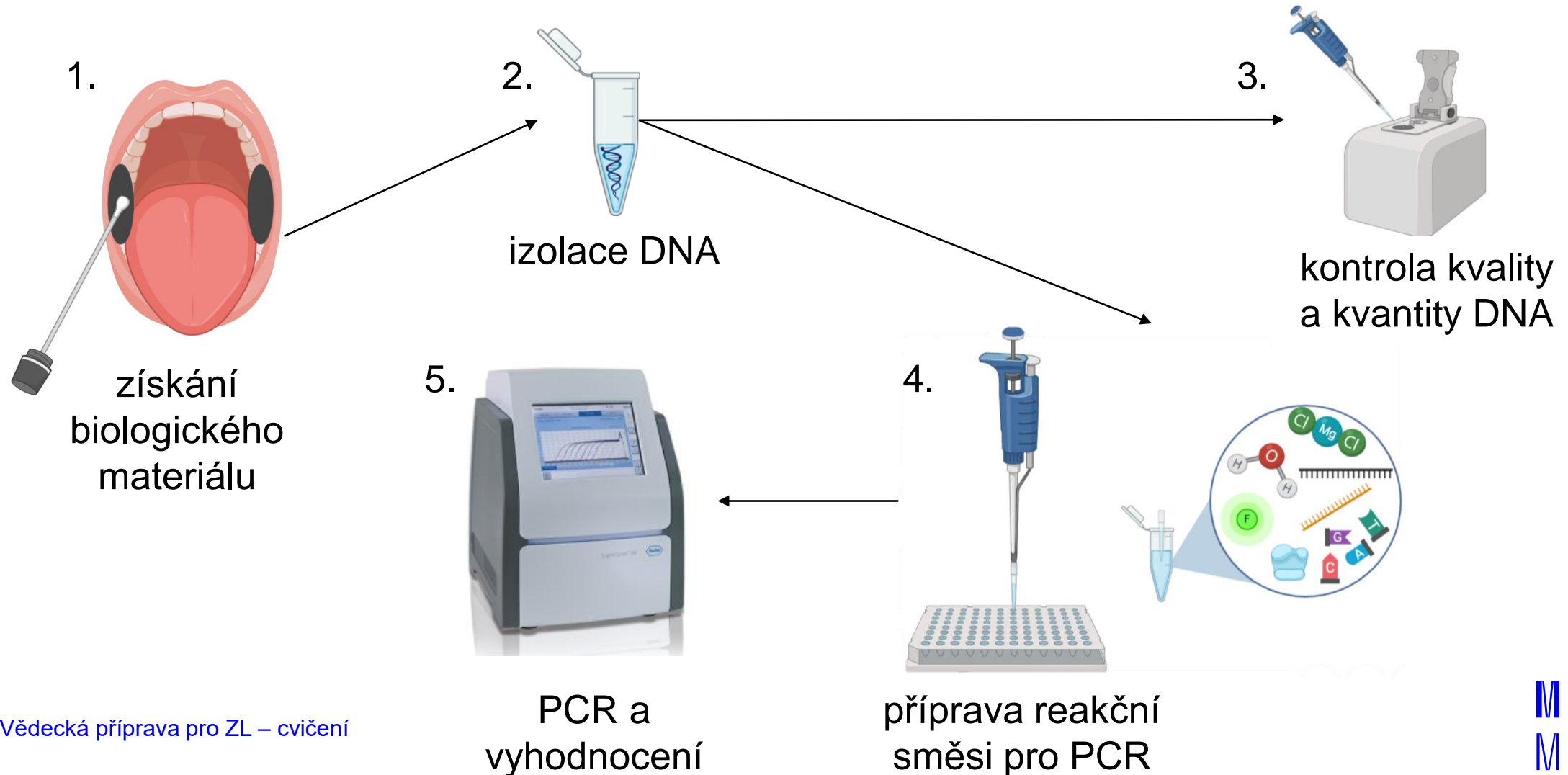
- pacient 1
- pacient 2
- ◇— pacient 3
- △— pacient 4
- pacient 5
- pacient 6
- ◆— pacient 7
- ▲— pacient 8
- +— pacient 9
- \*— pacient 10
- medián

Bořilová Linhartová et al., 2019

MUNI  
MED

# Stanovení polymorfizmů v MTHFR

Návod k laboratornímu cvičení



# Izolace DNA z bukálních stěrů

Návod k laboratornímu cvičení

**Odběr vzorku** z bukální sliznice → rotace kartáčkem 1-2 minuty → lyzační roztok



1



2



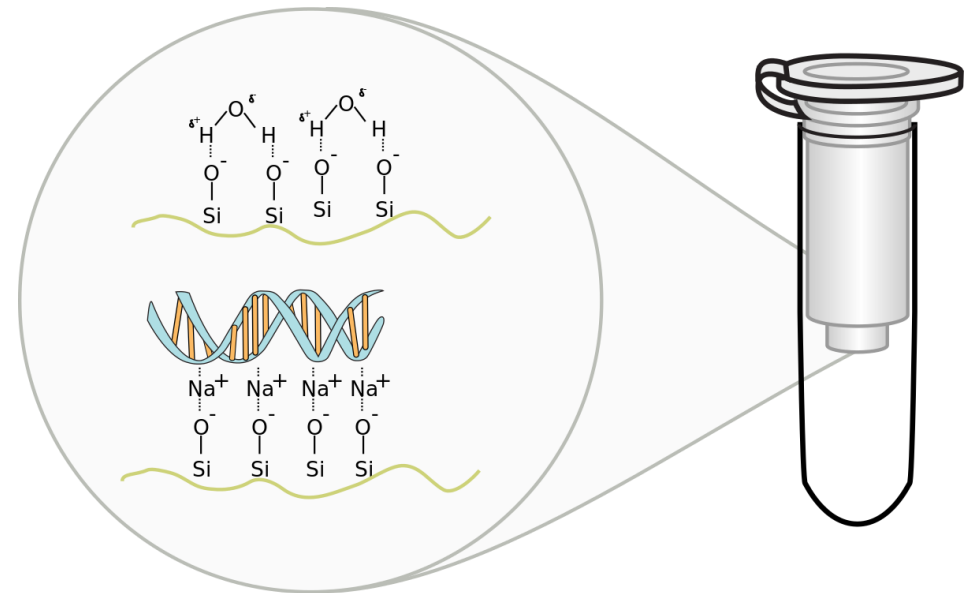
3

# Izolace DNA z bukalních stěrů

Návod k laboratornímu cvičení

## Izolace DNA pomocí silikátových kolonek

- 1) rozrušení plazmatických a jaderných membrán  
→ proteináza K, chaotropní činidlo, detergent
- 2) srážení DNA etanolem
- 3) vazba DNA na silikátovou kolonku
- 4) promytí
- 5) eluce čisté DNA z kolonky



# Izolace DNA z bukálních stěrů

Návod k laboratornímu cvičení

## Zhodnocení kvality izolované DNA pomocí spektrofotometrie (NanoDrop)

→ měření absorbance, nukleové kyseliny mají max. absorbance při 260 nm

a) Koncentrace v ng/ $\mu$ l

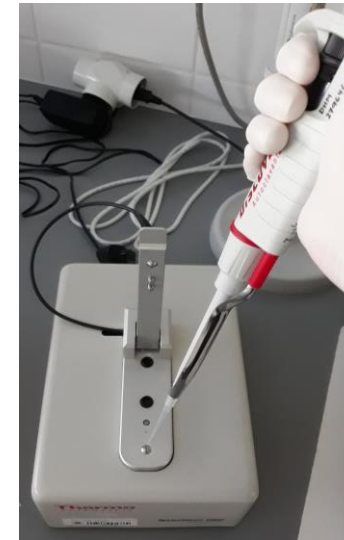
b) Čistota:

poměr absorbance 260/280

< 1,8 kontaminace bílkovinami (aromatické)

poměr absorbance 260/230

< 2 kontaminace organickými činidly



# PCR – příprava reakční směsi

Návod k laboratornímu cvičení

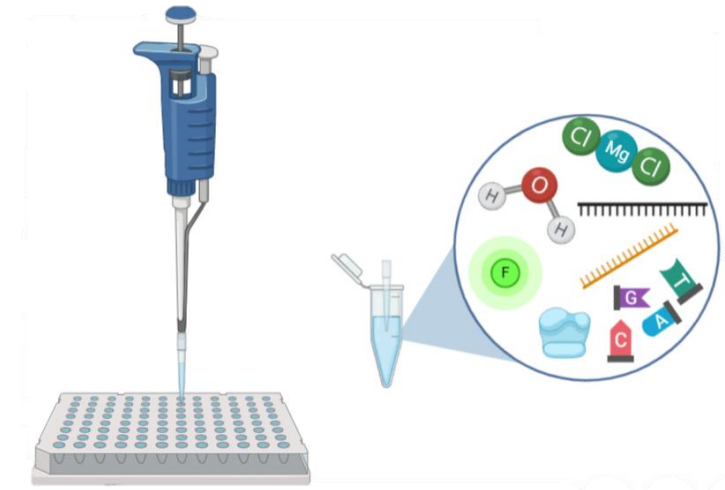
MasterMix obsahuje:

pufr

nukleotidy (adenin, thymin, guanin, cytosin)

chlorid hořečnatý/ síran hořečnatý

DNA-dependentní DNA polymerázu



TaqMan sonda obsahuje:

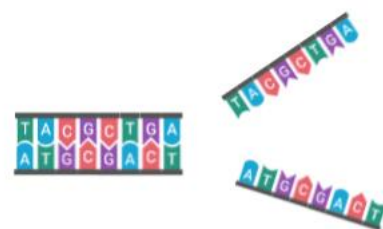
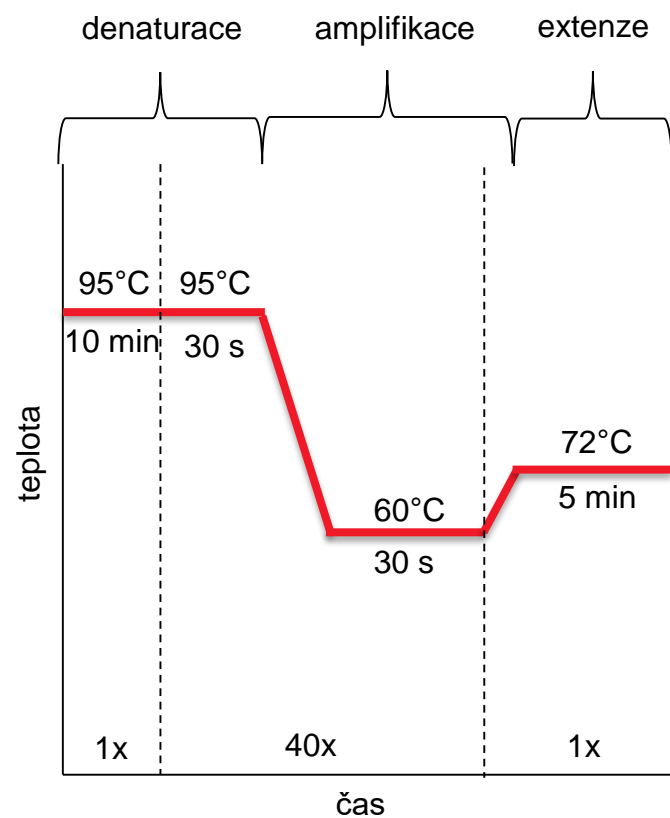
forward a reverse primer

oligonukleotid značený fluoroforem VIC a oligonukleotid značený fluoroforem FAM

reakční směs = MasterMix +  
TaqMan sonda + templátová DNA

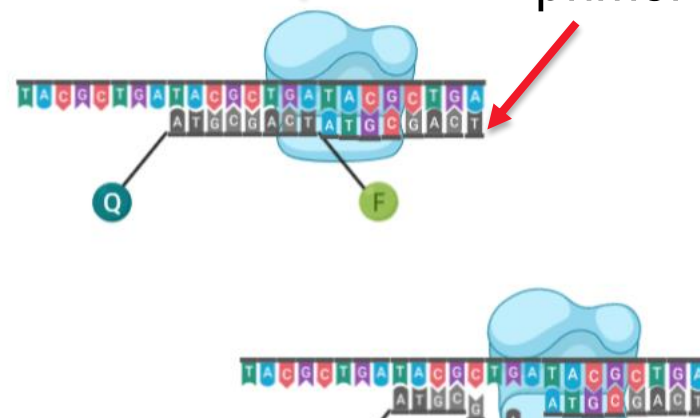
# qPCR

## Návod k laboratornímu cvičení



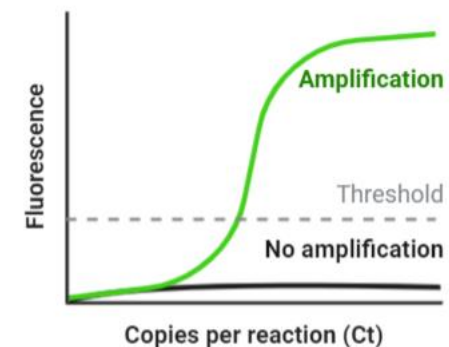
DNA polymeráza

primer



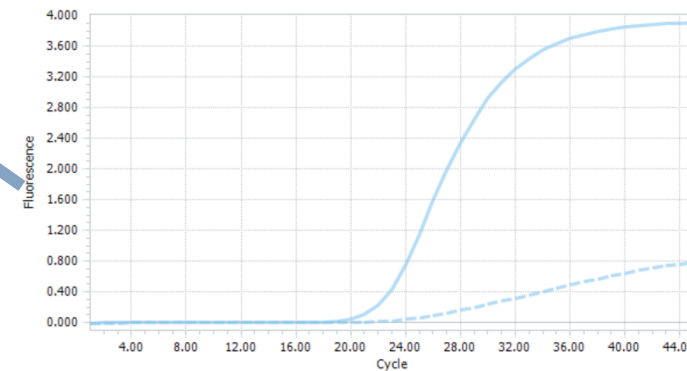
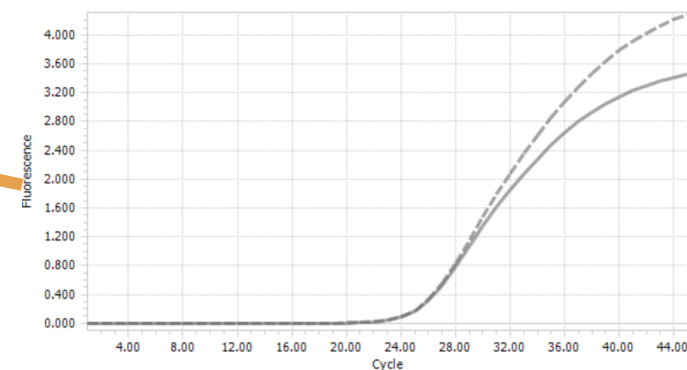
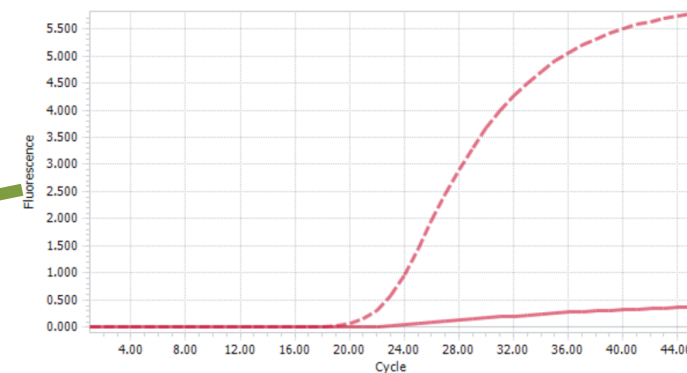
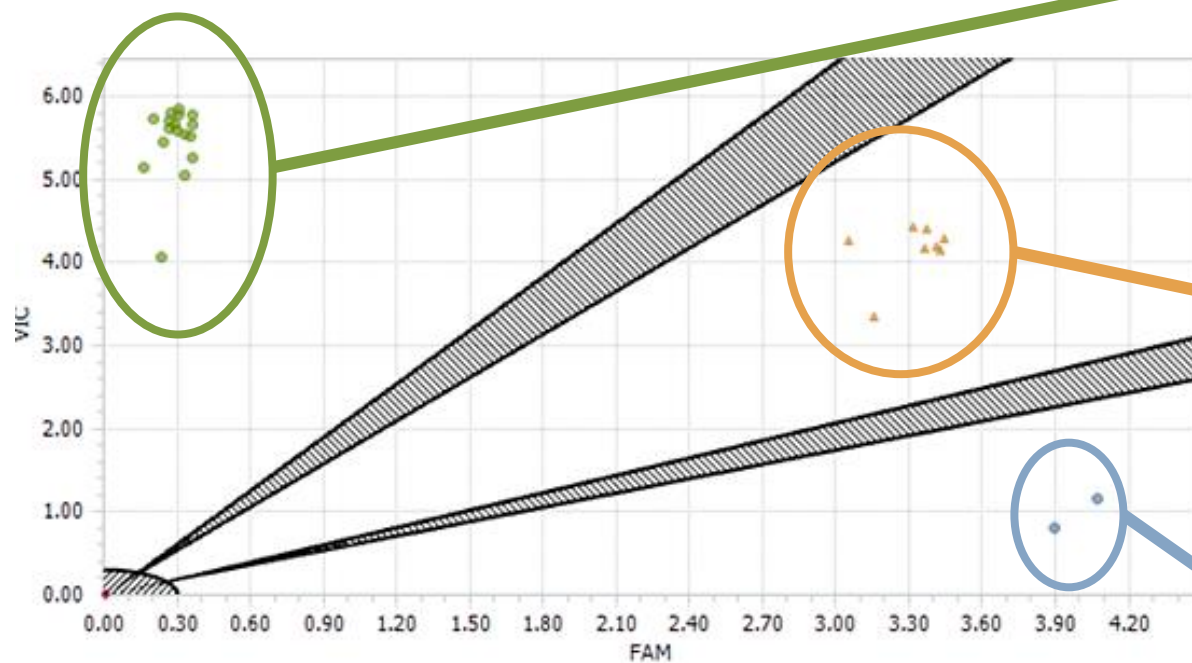
zhášec

fluorofor



# Vyhodnocení výsledků

Návod k laboratornímu cvičení



# Závěr – protokol

## Návod k laboratornímu cvičení

Vyšetření na přítomnost polymorfizmů C677T a A1289C genu <i>MTHFR</i>			
Metoda: TaqMan PCR			
Kód vzorku:			
Vstupní materiál:			
Koncentrace DNA:		Čistota DNA (260/280):	
		Čistota DNA (260/230):	
Genotyp:			
C677T:		A1289C:	
Haplogenotyp (C677T/A1289C):			
Fenotyp:			
Doporučení:			

Tabulka 1: Jednotlivé haplogenotypy vzniklé kombinací genotypů obou SNPs

SNP	A1298T genotyp AA	A1298T genotyp AC	A1298T genotyp CC
C677T genotyp CC	CCAA 100% aktivita MTHFR	CCAC 80%	CCCC 60%
C677T genotyp CT	CTAA 65%	CTAC 50%	CTCC 30%
C677T genotyp TT	TTAA <30%	TTAC <30%	TTCC <10% aktivita MTHFR

# Poděkování

- Podpořeno z projektu **MUNI/FR/1406/2019 Vědecká příprava pro Zubní lékařství.**
- Autorky děkují za konzultaci **prof. MUDr. Lydii Izakovičové Hollé, Ph.D.**  
ze Stomatologické kliniky, Lékařské fakulty, Masarykovy univerzity Brno.

# Recenzovali:

- **RNDr. Mária Hovořáková, Ph.D.**

Ústav histologie a embryologie. 1. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova Praha

- **doc. MUDr. Jakub Suchánek, Ph.D.**

Stomatologická klinika, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova

# Literatura

Bořilová Linhartová, P.; Fassmann, A.; Linhartová, J.; Izakovičová Hollá, L. Farmakoterapie Recidivující Aftózní Stomatitidy u Pacientů s Geneticky Podmíněnou Sníženou Schopností Metabolizovat Kyselinu Listovou - Pilotní Studie. *Pharmacother. Recurr. Aphthous Stomatitis Patients Genet. Impair. Abil. Metab. Folic Acid - Pilot Study* **2019**, 119 (1), 4–11.

Bořilová Linhartová, P.; Mrázková, J.; Novák, D.; Kukletová, M.; Kukla, L.; Izakovičová Hollá, L. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene variants with dental caries and gingivitis in Czech children. In The 43rd FEBS Congress, Prague **2018**. 2018. ISSN 2211-5463.

Borilova Linhartova, P.; Valová; Izakovicova Holla, L. Vrozená Náchylnost k Recidivující Aftózní Stomatitidě (Přehledový Článek) Genetic Predisposition to Recurrent Aphthous Stomatitis (Review). *Ceskoslovenská Stomatol.* **2017**, 117, 27–34.

Cope, G.; Cope, A. Gingivitis: Symptoms, Causes and Treatment. *Dent. Nurs.* **2011**, 7 (8), 436–439.

Doležálková, E.; Unzeitig, V. Kyselina listová a prevence rozštěpových vad centrálního nervového systému. *Čes Gynek* 2014 (2), 134–139.

Födinger, M.; Hörl, W. H.; Sunder-Plassmann, G. Molecular Biology of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase. *J. Nephrol.* **2000**, 13 (1), 20–33.

Kumar, D.; Pandey, R. K.; Agrawal, D.; Agrawal, D. An Estimation and Evaluation of Total Antioxidant Capacity of Saliva in Children with Severe Early Childhood Caries. *Int. J. Paediatr. Dent.* **2011**, 21 (6), 459–464.

Shere, M.; Bapat, P.; Nickel, C.; Kapur, B.; Koren, G. Association Between Use of Oral Contraceptives and Folate Status: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Obstet. Gynaecol. Can.* **2015**, 37 (5), 430–438.

Pack, A. R. C. Folate Mouthwash: Effects on Established Gingivitis in Periodontal Patients. *J. Clin. Periodontol.* **1984**, 11 (9), 619–628.

Wang, Y.; Jin, Y.; Wang, Y.; Li, L.; Liao, Y.; Zhang, Y.; Yu, D. The Effect of Folic Acid in Patients with Cardiovascular Disease. *Medicine (Baltimore)* **2019**, 98 (37).

Weisberg, I.; Tran, P.; Christensen, B.; Sibani, S.; Rozen, R. A Second Genetic Polymorphism in Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Associated with Decreased Enzyme Activity. *Mol. Genet. Metab.* **1998**, 64 (3), 169–172.

**M A S A R Y K O V A**  
**U N I V E R Z I T A**