

Elena Visternicean, V. Moșin, Alina Hotineanu A. Crețu
**POLIMORFISMELE GENETICE MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G ȘI MTR A2756G
LA FEMEILE CU AVORT SPONTAN RECURENT**

USMF „Nicolae Testemițanu”, Catedra Obstetrică și Ginecologie FECMF
(Șef catedră – prof.univ., dr. hab. med. Olga Cernetchi)
Centrul medical „Repromed”

SUMMARY

POLYMORPHISMS IN MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G AND MTR A2756G GENES
IN WOMEN WITH RECURRENT MISCARRIAGE

Keywords: recurrent miscarriage, MTHFR, MTR, MTRR, thrombophilia

Introduction. Spontaneous abortion is a significant clinical problem of different etiologies. Certain thrombophilia gene mutations have been associated with an increased risk of spontaneous abortion. Mutations in folate-related genes can lead to abnormal chromosomal segregation during meiosis which is the most common cause of spontaneous abortion. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is an important enzyme in the metabolism of folic acid and homocysteine and is crucial for reproductive function. MTHFR converts 5,10-methylenetetrahydrofolate into 5-methyltetrahydrofolate, providing a methyl group for conversion of homocysteine into methionine in a reaction catalyzed by methionine synthase (MTR). MTR requires vitamin B12 (cobalamin) as a coenzyme. Over time, the cobalamin (I) co-factor of MTR is oxidized to form cobalamin (II), leading to inactivation of MTR. Thus, methionine synthase reductase (MTRR) is required for reversion of oxidized cobalamin (II) to CH₃-cobalamin (III) to maintain the activity of MTR. Since all the enzymes are involved in one cascade, researchers discuss the possibility of intergenic interactions. **Objective:** Research objective was to detect the frequency of polymorphic alleles in folate and homocysteine metabolism genes: MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G in women with recurrent miscarriages.

Materials and methods. This study has a cross-sectional design and included 50 women who had experienced the loss of at least two consecutive pregnancies. The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was applied to detect the MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G genotypes.

Results. The frequency of mutated MTHFR genotypes: 677TT was 14,0% (95%CI 4,39 – 23,61) and 1298CC was 10% (95%CI 1,69 – 18,31). Compound heterozygosity 677CT/1298AC was detected in 28,0% (95%CI 15,56 – 40,44). No patients had the 677TT/1298CC genotype. The frequency of MTR 2756GG genotype was 6,0% (95%CI -0,58 – 12,58) and the MTRR 66GG genotype was present in 20,0% (95%CI 8,92 – 31,08).

Conclusions. Polymorphisms in genes MTHFR, MTR and MTRR were detected in 98,0% (95% IC 94,12 – 101,88).

РЕЗЮМЕ

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G,
MTR A2756G У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

Ключевые слова: невынашивание беременности, MTHFR, MTR, MTRR, тромбофилия

Введение. Самопроизвольный выкидыш является сложной клинической картиной различной этиологии. Наличие полиморфизмов генов тромбофилии связано с повышенным риском самопроизвольного выкидыша. Нарушение ферментов фолатного цикла препятствует нормальной сегрегации хромосом во время мейоза и является наиболее распространенной причиной невынашивания беременности и выкидыша. Фермент метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR), играющего ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты и гомоцистеина, имеет решающее значение для репродуктивной функции. MTHFR преобразовывает 5,10-метилентетрагидрофолат в 5-метилтетрагидрофолат, отдавая метильную группу для превращения гомоцистеина в метионин в реакции катализируемой метионинсинтазой (MTR). В качестве кофермента в этой реакции принимает участие витамин B₁₂ (кобаламин). В процессе этого преобразования происходит окисление кобаламин (I) в кобаламин (II) и фермент MTR переходит в неактивное состояние. Метионин-синтаза-редуктаза (MTRR) играет важную роль в восстановлении окисленного кобаламина (II) в CH₃ – кобаламин (III) для поддержания функциональной активности фермента MTR. Поскольку все ферменты являются ключевым звеном одного

цикла, ученые обсуждают возможности меж генов взаимодействий. Цель: Определить частоту встречаемости полиморфизмов генов MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G у женщин с привычным невынашиванием беременности.

Материалы и методы. Было проведено поперечное исследование и было обследовано 50 женщин с привычным невынашиванием беременности (2 и более потери беременности в анамнезе). Для генотипирования полиморфизмов MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G и MTRR A66G использовались полимеразная цепная реакция - анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (PCR-RFLP).

Результаты. При изучении полиморфизма MTHFR, выявлено, что гомозиготный генотип по мутантной аллели 677TT регистрировался в 14,0% случаев (95%CI 4,39 – 23,61) и гомозиготный генотип по мутантной аллели 1298CC найден в 10,0% случаев (95%CI 1,69 – 18,31). Компаунд-гетерозиготность по двум аллелям 677CT/1298AC обнаружено в 28,0% случаев (95%CI 15,56 – 40,44). Сочетание генотипов 677TT/1298CC не зарегистрировано. Генотип MTR 2756GG обнаружен в 6,0% случаев (95%CI -0,58 – 12,58) и генотип MTRR 66GG зарегистрирован в 20,0% случаев (95%CI 8,92 – 31,08).

Выводы. Полиморфизмы генов MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G и MTRR A66G были обнаружены в 98,0% случаев (95% IC 94,12 – 101,88).

Introducere. Pierderea spontană recurentă a sarcinii este definit drept pierderea a 2 sau mai multe sarcini consecutive [15,17]. El afectează aproximativ 1% dintre toate femeile, riscul de a pierde o altă sarcină după trei avorturi consecutive fiind de 55%. Au fost propuse mai multe etiologii pentru avortul spontan repetat dar, în ciuda acestui fapt, până la 60% dintre pierderile gestaționale recurente au o etiologie necunoscută [15,17].

Dintre cauzele genetice asociate avorturilor spontane, trombofilia ereditară reprezintă în prezent un domeniu mai nou de cercetare. Astfel, în ultimii 10 ani, interesul studiilor de asociere a trombofiliei cu pierderile de sarcină a crescut remarcabil, iar recent trombofilia a fost postulată ca o cauză a avortului spontan recurent [2].

S-a constatat că tulburările din metabolismul homocisteinei în relație cu polimorfismul metilentetrahidrofolat reductazei (MTHFR), ambele asociate bolilor cardiovasculare [1,4], sunt implicate în apariția complicațiilor sarcinii și că ele sunt legate de tulburarea microcirculației și hipercoagulare [20]. Există un număr relativ mare de complicații considerate astăzi ca fiind cauzate de creșterea nivelului plasmatic de homocisteină: anomalii cromozomiale, defecte de tub neural, gestoze tardive, decolarea prematură a placentei normal inserate, hipotrofia fetală și pierderea recurentă de sarcină [3,7,8,11,19,20].

Printre cele mai intens studiate variații care afectează gena MTHFR se numără schimbarea unei singure nucleotide (SNP): C677T și A1298C [18,16]. Haplotipul determinat de aceste două polimorfisme se consideră a fi implicat în patogeniza avortului spontan recurent, însă rezultatele studiilor de specialitate sunt contradictorii.

Polimorfismele genelor MTRR A66G și MTR A2756G sunt cauza unei activități scăzute a enzimelor și ele provoacă hiperhomocisteinemie [13]. Starea de heterozigoție asociată cu polimorfismul C667T reprezintă un factor de risc pentru viabilitatea fetală [5].

MTHFR, enzimă-cheie implicată în metabolismul folatului, catalizează conversia 5,10-metilentetrahidrofolatului (5,10-MTHF) în acid 5-metiltetrahidrofolic (5-MTHF). Gena este localizată la nivelul cromozomului 1p36.3. Este alcătuită din 20374 bp și constituită din 14 exoni. Ambele produc o schimbare de aminoacid cu caracteristici biochimice diferite [12].

Cel mai comun polimorfism și, totodată, cu cel mai important rol în patologia clinică este C677T, situat la nivelul exonului 4. Este o mutație cu sens greșit, în care citozina (C) este înlocuită cu timina (T) în poziția 677 a genei MTHFR. Consecutiv, acest locus va avea 2 alele: alela C sau alela nonmutantă și alela T sau alela mutantă (C677T). Codonul modificat (Ala222Val) va codifica în loc de alanină (Ala) valină (Val), rezultând o proteină termolabilă cu activitate enzimatică redusă [6,12,13,16,18]. Activitatea enzimatică în cazul genotipului heterozigot CT se reduce cu 35% și în cazul genotipului homozigot TT cu 70%, iar forma termolabilă este un marker genetic al hiperhomocisteinemiei moderate la subiecții cu genotipul 677TT [13,16]. Se raportează o incidență de 11% - 12% în populația caucaziană a statusului homozigot pentru această mutație, iar statusul heterozigot cu o frecvență de 51% [9].

Al doilea cel mai studiat polimorfism este A1298C situat la nivelul exonului 7: adenina (A) este înlocuită cu citozină (C), iar codonul rezultat va codifica în loc de alanină (Ala) glutamina (Gln), rezultând o proteină cu activitate enzimatică scăzută, fără termolabilitate [6,12,16]. Conform unor studii, se elucidează că această mutație nu se asociază cu hiperhomocisteinemie (indiferent de statusul heterozigot sau homozigot), însă statusul heterozigot combinat pentru cele două mutații MTHFR poate genera manifestări clinice similare cu cele induse de statusul homozigot pentru mutația C677T [13,16].

Alela 1298C este în dezechilibru de înlănțuire cu alela 677T. În total sunt posibile 9 combinații de genotipuri ale celor 2 alele: C677C/A1298A; C677C/A1298C; C677C/C1298C; C677T/A1298A; C677T/

A1298C; C677T/C1298C; T677T/A1298A; T677T/A1298C; T677T/C1298C. Combinațiile genotipurilor T677T/A1298C, C677T/C1298C și T677T/C1298C sunt foarte rar observate. Frecvența diferitelor haplotipuri variază în diferite regiuni ale lumii și diferite grupuri etnice [12].

Remetilarea homocisteinei în metionină este catalizată de enzima citoplasmatică metionin-sintaza (MTR). Gena este localizată pe brațul lung al cromozomului 1 în poziția 43. Singurul polimorfism comun raportat la ziua de azi în gena MTR este acel în care adenina (A) este înlocuită cu guanină (G) în nucleotida 2756, o poziție cu potențial funcțional al proteinei, iar codonul rezultat va codifica în loc de acid aspartic (D) glicina (G). Mutația homozigotă MTR 2756GG determină o creștere a funcției enzimatică care dezvoltă riscul de depleție a grupului metil 5-MTHF și epuizarea vitaminei B₁₂, folosind-o într-un ritm mai rapid [6].

Conform unor studii, combinația MTHFR C677T și MTR A2756G determină un nivel ridicat de homocisteină, cu excepția cazului în care se administrează vitamina B₁₂ și acidul folic [13].

Enzima metionin-sintetaza-reductaza (MTRR) are funcția de a reactiva enzima MTR prin metilarea reductivă a cobalaminei, folosind ca donor de metil SAM [16]. Gena este localizată pe brațul scurt al cromozomului 5 în poziția 15.31. Cel mai frecvent polimorfism în gena MTRR este acel în care adenina (A) este înlocuită cu guanina (G) în poziția 66, această mutație implică substituția aminoacidului izoleucinei cu metionina [6,13,16]. Defectul rezultat determină o scădere a funcției enzimatică, iar acest lucru se traduce prin scăderea capacității de a regenera metil-cobalamina care, este considerată ca un factor de risc genetic pentru hiperhomocisteinemie [10]. În plus, unele studii au sugerat un efect sinergic al polimorfismelor C677T MTHFR și MTRR A66G asupra nivelului de homocisteină în plasmă [14].

Scopul lucrării. Identificarea și asocierea polimorfismelor genice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G și MTR A2756G la femeile cu avort spontan recurent.

Material și metode. Specimen recoltat: sânge venos recoltat pe EDTA, în tuburi de unică folosință, prin puncție venoasă. ADN-ul genomic a fost extras după kituri specializate (GeneJet Whole Blood Genomic DNA purification Mini Kit, Fermentas) din leucocitele sângelui periferic. Pentru testarea genetică a polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G s-au realizat reacțiile PCR/RFLP (reacție de polimerizare în lanț și polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție). ADN-ul genomic a fost amplificat utilizând polimeraza Dream Taq („Fermentas” USA), la termociclul „Tprofessional Basic 96” (Biometra, Germania). Condițiile reacției sunt similare pentru

toate polimorfismele, cu excepția temperaturii de aliniere a primelor: 60.4°C pentru MTHFR C677T, 61°C pentru MTHFR A1298C, 58.4°C pentru MTR A2756G și 57.6°C pentru MTRR A66G, iar condițiile protocolului standard sunt: denaturarea inițială la 95°C – 3 minute, 33 cicluri: 94°C – 30 secunde, 57.6°C – 61°C – 30 secunde, 72°C – 30 secunde și elongația finală la 72°C – 5 minute. Ampliconii au fost supuși restricției timp de 3 ore la 37°C cu enzimele de restricție specifice pentru fiecare polimorfism: Hinf I pentru MTHFR C677T, Mbo II pentru MTHFR A1298C, Hae II pentru MTR A2756G și Nde I pentru MTRR A66G. Verificarea produșilor de restricție s-a efectuat prin electroforeză în gel de PAAG (poliacrilamidă) cu concentrația de 7,5% - sub condițiile: 200 V timp de 3 ore. Gelul a fost colorat cu soluție de etidiu. Iar rezultatele au fost vizualizate la sistemul UV SOLO (Germania).

Rezultate și discuții. Genotiparea polimorfismului MTHFR C677T relevă faptul că 19 paciente (38,0% \hat{I}_{95} : 24,55 – 51,45) au avut genotipul normal CC, 24 paciente (48,0% \hat{I}_{95} : 34,16 – 61,84) au fost heterozigote CT și 7 paciente (14,0% \hat{I}_{95} : 4,39 – 23,61) au fost homozigote pentru alela mutantă TT.

Evaluarea prezenței genotipului normal (CC) și a genotipului modificat (CT + TT) a evidențiat prezența mutației genei MTHFR în poziția 677 la 31 paciente (62,0% \hat{I}_{95} : 48,55 – 75,45).

Analiza polimorfismului MTHFR C677T a identificat o frecvență a alelei C de 62,0% (\hat{I}_{95} : 52,49 – 71,51) și o frecvență a alelei mutante T de 38,0% (\hat{I}_{95} : 28,49 – 47,51) (Tabelul 1).

Cercetarea prezenței mutației A>C în poziția 1298 a genei MTHFR arată că 20 paciente (40% \hat{I}_{95} : 26,43 – 53,57) aveau genotipul normal AA, 25 paciente (50% \hat{I}_{95} : 36,15 – 63,85) erau heterozigote AC și 5 paciente (10% \hat{I}_{95} : 1,69 – 18,31) homozigote pentru alela mutantă CC.

Am constatat că purtătoarele alelei A pentru polimorfismul MTHFR A1298C prezentau o frecvență de 65,0% (\hat{I}_{95} : 55,66 – 74,34), iar purtătoarele alelei mutante C au înregistrat o frecvență de 35,0% (\hat{I}_{95} : 25,66 – 44,34).

Pacientele din lotul de studiu au fost împărțite în două categorii, cu genotip normal și genotip modificat în poziția 1298 a genei MTHFR, stabilindu-se că 30 paciente (60,0% \hat{I}_{95} : 47,3 – 72,7) aveau genotipul modificat (AC+CC) (Tabelul 1).

Cercetarea polimorfismului MTR A2756G a arătat că 31 paciente (62,0% \hat{I}_{95} : 48,55 – 75,45) aveau genotipul normal AA, 16 paciente (32,0% \hat{I}_{95} : 19,07 – 44,93) erau heterozigote AG și 3 paciente (6,0% \hat{I}_{95} : -0,58 – 12,58) homozigote pentru alela mutantă GG.

Frecvența alelei A a polimorfismului MTR A2756G a fost de 78,0% (\hat{I}_{95} : 69,89 – 86,11), iar frecvența alelei mutante G a polimorfismului MTR A2756G a constituit 22,0% (\hat{I}_{95} : 13,89 – 30,11).

Evaluarea prezenței genotipului normal (AA) și genotipului modificat (AG + GG) a evidențiat prezența mutației genei MTR în poziția 2756 la 19 pacienți (38,0% \hat{I}_{95} : 24,55 – 51,45) (Tabelul 1).

Genotiparea polimorfismului MTRR A66G a arătat că 17 pacienți (34,0% \hat{I}_{95} : 20,87 – 47,13) aveau genotipul normal AA, 23 pacienți (46,0% \hat{I}_{95} : 32,19 – 59,81) erau heterozigote AG și 10 pacienți (20,0% \hat{I}_{95} : 8,92 – 31,08) homozigote pentru alela mutantă GG.

Frecvența alelei 66A a polimorfismului MTRR A66G s-a înregistrat în 57,0% (\hat{I}_{95} : 47,30 – 66,70) cazuri, iar frecvența alelei mutante 66G a polimorfismului MTRR A66G era prezentă în 43,0% (\hat{I}_{95} : 33,30 – 52,70) cazuri.

Separarea pacienților din lotul de studiu în două categorii, cu genotip normal și genotip modificat în poziția 66 a genei MTRR, a evidențiat că 33 pacienți (66,0% \hat{I}_{95} : 52,87 – 79,13) aveau genotipul modificat (AG+GG) (Tabelul 1).

Tabelul 1.

Frecvența genotipurilor polimorfismelor MTHFR, MTR și MTRR la pacienții din lotul de studiu

Genotipurile polimorfismelor testate	Abs.	%	\hat{I}_{95}
Genotip normal pentru toate polimorfismele testate	1	2,0	-1,88 – 5,88
MTHFR 677			
CC (homozigot normal)	19	38,0	24,55 – 51,45
CT (heterozigot mutant)	24	48,0	34,16 – 61,84
TT (homozigot mutant)	7	14,0	4,39 – 23,61
TOTAL alele mutante	38	38,0	28,49 – 47,51
MTHFR 1298			
AA (homozigot normal)	20	40,0	26,43 – 53,57
AC (heterozigot mutant)	25	50,0	36,15 – 63,85
CC (homozigot mutant)	5	10,0	1,69 – 18,31
TOTAL alele mutante	35	35,0	25,66 – 44,34
MTR 2756			
AA (homozigot normal)	31	62,0	48,55 – 75,45
AG (heterozigot mutant)	16	32,0	19,07 – 44,93
GG (homozigot mutant)	3	6,0	-0,58 – 12,58
TOTAL alele mutante	22	22,0	13,89 – 30,11
MTRR 66			
AA (homozigot normal)	17	34,0	20,87 – 47,13
AG (heterozigot mutant)	23	46,0	32,19 – 59,81
GG (homozigot mutant)	10	20,0	8,92 – 31,08
TOTAL alele mutante	43	43,0	33,30 – 52,70

Analiza genotipurilor polimorfismelor testate a permis identificarea mutațiilor în genele MTHFR, MTR și MTRR. În acest context, vom observa că s-a depistat doar o pacientă fără nici un polimorfism. Am identificat cel puțin una din mutațiile studiate la 49 din pacienții studiate (98,0% \hat{I}_{95} : 94,12 – 101,88). Acest

lucru este un indiciu că polimorfismele testate la pacienții din lotul de studiu pot fi implicate ca și factor cauzal în avortul spontan recurent. Se poate admite deci că absența mutațiilor ar putea avea un rol protector în producerea tulburărilor de circulație placentară.

În continuare, am analizat dacă există polimorfisme asociate ale mutațiilor MTHFR, MTR și MTRR la pacienții din lotul de studiu. Din cele 50 de cazuri studiate, 1 pacientă (2,0% \hat{I}_{95} : -1,88 – 5,88) nu a prezentat nici un polimorfism, 5 pacienți (10,0% \hat{I}_{95} : 1,69 – 18,31) au prezentat polimorfism unic, iar la 44 pacienți (88,0% \hat{I}_{95} : 79,0 – 97,0) s-au atestat asocieri de polimorfisme (Figura 1).

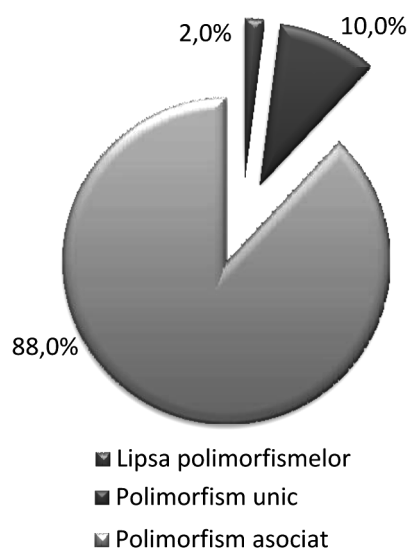


Fig. 1. Distribuția polimorfismelor asociate la pacienții din lotul de studiu (%).

Numărul polimorfismelor asociate MTHFR, MTR și MTRR la pacienții investigați este prezentat în tabelul 2.

Tabelul 2.

Numărul polimorfismelor asociate MTHFR, MTR și MTRR la pacienții din lotul de studiu

Numărul polimorfismelor asociate MTHFR, MTR și MTRR	Abs.	%	\hat{I}_{95}
Polimorfism unic	5	10,0%	1,69 – 18,31
2 asocieri	25	50,0%	36,15 – 63,85
3 asocieri	18	36,0%	22,7 – 49,3
4 asocieri	1	2,0%	-1,88 – 5,88

Astfel, am stabilit că 25 pacienți (50,0% \hat{I}_{95} : 36,15 – 63,85) aveau 2 combinații ale polimorfismelor genice analizate, 3 combinații s-au atestat la 18 pacienți (36,0% \hat{I}_{95} : 22,7 – 49,3) și doar 1 pacientă (2,0% \hat{I}_{95} : -1,88 – 5,88) a prezentat 4 combinații. În afecțiunile poligenice, cum este și avortul spontan recurent, o singură variație genică ar putea fi insuficientă pentru

a provoca întreruperea spontană a sarcinii, fiind dificil de demonstrat implicarea sa atunci când este studiată individual. Cu toate acestea, o combinație de anumiți factori de mediu și polimorfisme genice poate determina susceptibilitatea și chiar gravitatea riscului pentru avort spontan recurent. Studii publicate recent au arătat importanța genotipului compus și a analizei acestor asocieri în identificarea riscului pentru avortul spontan. Zetterberg și colab. au constatat că prezența uneia sau mai multor alele mutante în gena MTHFR poate afecta procesul de embriogeneză când concentrația folatului este scăzută [18].

Polimorfismele multiple de la nivelul aceleiași gene ar putea stimula expresia acesteia, expresia proteinei sau funcția proteinei, astfel încât am considerat că ar fi interesant să analizăm genotipul de cosegregare pentru MTHFR (C677T și A1298C) în grupul de studiu. Am analizat în continuare modul de

înlanțuire a alelelor genei MTHFR 1298 și MTHFR 677 care sunt în dezechilibru de înlanțuire. În total există 9 combinații de genotipuri: 677CC/1298AA; 677CC/1298AC; 677CC/1298CC; 677CT/1298AA; 677CT/1298AC; 677CT/1298CC; 677TT/1298AA; 677TT/1298AC; 677TT/1298CC. Genotipurile 677TT/1298AC, 677CT/1298CC și 677TT/1298CC sunt foarte rar observate [12].

În baza rezultatelor obținute a fost efectuată distribuția polimorfismelor și combinațiilor genotipice ale genei MTHFR (Tabelul 3).

Cele mai răspândite s-au dovedit a fi variantele C677T/A1298C (28,0% \hat{I}_{95} : 15,56 – 40,44), C677C/A1298C (22,0% \hat{I}_{95} : 10,52 – 33,48), C677T/A1298A (20,0% \hat{I}_{95} : 8,92 – 31,08). O incidență moderată se atestă la următoarele variante: T677T/A1298A (14,0% \hat{I}_{95} : 4,39 – 23,61), C677C/C1298C (10,0% \hat{I}_{95} : 1,69 – 18,31) și C677C/A1298A (6,0% \hat{I}_{95} : -0,58 – 12,58).

Tabelul 3.

Combi-națiile genotipice ale genei MTHFR (677/1298) în lotul de studiu

Combi-nații de genotipuri MTHFR		Cazuri		
677	1298	Abs.	%	\hat{I}_{95}
CC (homozigot normal)	AA (homozigot normal)	3	6,0%	-0,58 – 12,58
CC (homozigot normal)	AC (heterozigot mutant)	11	22,0%	10,52 – 33,48
CC (homozigot normal)	CC (homozigot mutant)	5	10,0%	1,69 – 18,31
CT (heterozigot mutant)	AA (homozigot normal)	10	20,0%	8,92 – 31,08
CT (heterozigot mutant)	AC (heterozigot mutant)	14	28,0%	15,56 – 40,44
CT (heterozigot mutant)	CC (homozigot mutant)	0	-	-
TT (homozigot mutant)	AA (homozigot normal)	7	14,0%	4,39 – 23,61
TT (homozigot mutant)	AC (heterozigot mutant)	0	-	-
TT (homozigot mutant)	CC (homozigot mutant)	0	-	-

Din cele expuse mai sus observăm că în cerceta-re-a noastră lipsesc următoarele combinații alelice: C677T/C1298C, T677T/A1298C și T677T/C1298C, ceea ce corespunde cu datele literaturii de specialitate, conform cărora combinațiile polimorfismelor MTH-

FR: C677T/C1298C, T677T/A1298C sunt rar întâl-nite, iar combinația homozigot pentru ambele mutații T677T/C1298C nu se atestă [12]

Datele distribuției alelelor genelor MTHFR 677 și MTRR 66 sunt prezentate în tabelul 4.

Tabelul 4.

Combi-națiile genotipice ale genelor MTHFR 677 și MTRR 66 în lotul de studiu

Combi-nații de genotipuri		Cazuri		
MTHFR 677	MTRR 66	Abs.	%	\hat{I}_{95}
CC (homozigot normal)	AA (homozigot normal)	3	6,0%	-0,58 – 12,58
CC (homozigot normal)	AG (heterozigot mutant)	11	22,0%	10,52 – 33,48
CC (homozigot normal)	GG (homozigot mutant)	5	10,0%	1,69 – 18,31
CT (heterozigot mutant)	AA (homozigot normal)	13	26,0%	13,85 – 38,15
CT (heterozigot mutant)	AG (heterozigot mutant)	9	18,0%	7,35 – 28,65
CT (heterozigot mutant)	GG (homozigot mutant)	2	4,0%	-1,43 – 9,43
TT (homozigot mutant)	AA (homozigot normal)	1	2,0%	-1,88 – 5,88
TT (homozigot mutant)	AG (heterozigot mutant)	5	10,0%	1,69 – 18,31
TT (homozigot mutant)	GG (homozigot mutant)	1	2,0%	-1,88 – 5,88

Cele mai frecvente combinații au fost: C677T/A66A (26,0% \hat{I}_{95} : 13,85 – 38,15), C677C/A66G (22,0% \hat{I}_{95} : 10,52 – 33,48) și C677T/A66G (18,0%

\hat{I}_{95} : 7,35 – 28,65). La 5 paciente (10,0% \hat{I}_{95} : 1,69 – 18,31) s-au depistat combinațiile C677C/G66G și T677T/A66G. Combi-nația celor două genotipuri nor-

male 677CC/66AA a fost prezentă doar la 3 paciente (6,0% \hat{I}_{95} : -0,58 – 12,58), iar combinația genotipurilor mutante 677TT/66GG s-a întâlnit doar la 1 pacientă (2,0% \hat{I}_{95} : -1,88 – 5,88).

Rezultatele evaluării distribuției alelelor genelor MTHFR 677 și MTR 2756 sunt prezentate în tabelul 5.

S-a observat că cel mai des atestată a fost combi-

nația: C677T/A2756A, ea fiind prezentă la 16 paciențe (32,0% \hat{I}_{95} : 19,07 – 44,93). Combinația celor două genotipuri sălbatice: C677C/A2756A s-a întâlnit la 12 paciențe (24,0% \hat{I}_{95} : 12,17 – 35,83), iar combinația genotipurilor mutante T677T/G2756G a fost prezentă doar la 1 pacientă (2,0% \hat{I}_{95} : -1,88 – 5,88).

Tabelul 5.

Combi-națiile genotipice ale genelor MTHFR 677 și MTR 2756 în lotul de studiu

Combi-nații de genotipuri		Cazuri		
MTHFR 677	MTR 2756	nr.	%	\hat{I}_{95}
CC (homozigot normal)	AA (homozigot normal)	12	24,0%	12,17 – 35,83
CC (homozigot normal)	AG (heterozigot mutant)	6	12,0%	3,0 – 21,0
CC (homozigot normal)	GG (homozigot mutant)	1	2,0%	-1,88 – 5,88
CT (heterozigot mutant)	AA (homozigot normal)	16	32,0%	19,07 – 44,93
CT (heterozigot mutant)	AG (heterozigot mutant)	7	14,0%	4,39 – 23,61
CT (heterozigot mutant)	GG (homozigot mutant)	1	2,0%	-1,88 – 5,88
TT (homozigot mutant)	AA (homozigot normal)	3	6,0%	-0,58 – 12,58
TT (homozigot mutant)	AG (heterozigot mutant)	3	6,0%	-0,58 – 12,58
TT (homozigot mutant)	GG (homozigot mutant)	1	2,0%	-1,88 – 5,88

Haplotipul heterozigot mutant pentru ambele mutații: C677T/A2756G s-a întâlnit la 7 paciențe (14,0% \hat{I}_{95} : 4,39 – 23,61). O incidență moderată se atestă la următoarele variante: C677C/A2756G (12,0% \hat{I}_{95} : 3,0 – 21,0), T677T/A2756A (6,0% \hat{I}_{95} : -0,58 – 12,58) și T677T/A2756G (6,0% \hat{I}_{95} : -0,58 – 12,58).

Concluzii

1. Identificarea genotipurilor polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G, cu evaluarea ponderii alelelor la paciențele cu avort spontan recurent din lotul de studiu a permis evidențierea: genotipului mutant 677CT și 677TT MTHFR în 62,0% cazuri (\hat{I}_{95} : 52,49 – 71,51), total alele mutante 38,0% (\hat{I}_{95} : 28,49 – 47,51); a genotipului mutant 1298AC și 1298CC MTHFR în 60,0% cazuri (\hat{I}_{95} : 47,30 – 72,70), total alele mutante 35,0% (\hat{I}_{95} : 25,66 – 44,34); a genotipului mutant 2756AG și 2756GG MTR în 38% cazuri (\hat{I}_{95} : 24,55 – 51,45), total alele mutante 22,0% (\hat{I}_{95} : 13,89 – 30,11) și a genotipului mutant 66AG și 66GG MTRR în 66,0% cazuri (\hat{I}_{95} : 52,87 – 79,13), total alele mutante 43,0% (\hat{I}_{95} : 33,30 – 52,70).

2. Genotiparea polimorfismelor MTHFR, MTR și MTRR a evidențiat prezența polimorfismelor la 49 paciențe (98,0% \hat{I}_{95} : 94,12 – 101,88).

3. Din cele 50 de cazuri studiate, 1 pacientă (2,0% \hat{I}_{95} : -1,88 – 5,88) nu a prezentat nici un polimorfism, 5 paciențe (10,0% \hat{I}_{95} : 1,69 – 18,31) au prezentat polimorfism unic, iar la 44 paciențe (88,0% \hat{I}_{95} : 79,0 – 97,0) s-au depistat asocieri de polimorfisme. Astfel, 25 paciențe (50,0% \hat{I}_{95} : 36,15 – 63,85) prezentau câte 2 combinații ale polimorfismelor genice analizate, 3 combinații s-au întâlnit la 18 paciențe (36,0% \hat{I}_{95} : 22,7 – 49,3) și doar la 1 pacientă (2,0% \hat{I}_{95} : -1,88 – 5,88) s-au depistat 4 combinații.

Bibliografie

1. Altomare I. et al. The 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and risk of fetal loss: a case series and review of the literature. În: Thrombosis Journal, 2007, vol. 5:17.

2. Boiciuc K. ș. a. Trombofilia ereditară ca una din principalele cauze ale problemelor reproductive la femeile din Republica Moldova. În: Buletin de Perinatologie, 2015, nr. 1, p. 61 – 68.

3. Creus M. et al. Plasma homocysteine and vitamin B₁₂ serum levels, red blood cell folate concentrations, C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation and risk of recurrent miscarriage: a case-control study in Spain. În: Clinical chemistry and laboratory medicine, 2013, vol. 51, nr. 3, p. 693 – 699.

4. Djuric D. et al. Homocysteine, Folic Acid and Coronary Artery Disease: Possible Impact on Prognosis and Therapy. În: The Indian Journal of Chest Diseases & Allied Sciences, 2008, vol. 50, p. 39 – 48.

5. Doolin M. et al. Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida. În: American Journal of Human Genetics, 2002, vol. 71, p. 1222 – 1226.

6. Finell R. et al. Gene-nutrient interactions: Importance of folic acid and vitamin B₁₂ during early embryogenesis. În: Food and Nutrition Bulletin, 2008, nr. 2 (supplement), p. S86 – S98.

7. Forges T. et al. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. În: Human Reproduction, 2007, vol. 13, nr. 3, p. 225 – 238.

8. Friso S. et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. În: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, nr. 8, p. 5606 – 5611.

9. Frosst P. et al. Identification of a candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. În: *Nature Genetics*, 1995, vol. 10, p. 111 – 113.
10. Gaughan D. et al. The methionine synthase reductase (MTRR) A66G polymorphism is a novel genetic determinant of plasma homocysteine concentrations. În: *Atherosclerosis*, 2001, vol. 157, p. 451 – 456.
11. Glijin C. Impactul hiperhomocisteinemieii în complicațiile obstetricale. În: *Anale Științifice ale Universității de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”*, 2010, vol. 5, p. 135 – 139.
12. Kozma K. Polimorfismul genei MTHFR (677 și 1298) la femeile cu avorturi spontane din județul Bihor. În: *Revista Medicală Română*, 2015, nr. 2, p. 195 – 199.
13. Li W. et al Homocysteine metabolism gene polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) jointly elevate the risk of folate deficiency. În: *Nutrients*, 2015, nr. 7, p. 6670 – 6687.
14. Matthews R. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthetase: biochemistry and molecular biology. În: *European journal of pediatrics*, 1998, supplement 2, p. S54 – S59
15. Moșin V. Ginecologie reproductivă. Chișinău, 2010, 618p.
16. Moșin V. ș. a. Hiperhomocisteinemia și patologia reproductivă. În: *Buletin de Perinatologie*, 2014, nr. 1, p. 40 – 46.
17. Ștefănescu C., Așchie M. Pierderea recurentă spontană a sarcinii – o analiză clinico-histologică. În: *Revista Medicală Română*, 2009, nr 3, p. 203 – 207.
18. Zetterberg H. et al. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. În: *European Journal of Human Genetics*, 2002, vol. 10, p. 113 – 118.
19. Плоцкий А.Р. Связь уровня гомоцистеина у беременных с наличием различных видов врожденных пороков развития у плода. În: *Журнал ГрГМУ*, 2007, n 2, p. 39 – 42.
20. Фетисова И. и соавт. Полиморфизм генов фолатного обмена и болезни человека. În: *Вестник Новых медицинских технологий*, 2007, vol. 10, n 1, p. 23 – 28.

© Marina Aramă, Ala Cojocaru, Adela Horodișteanu-Banuh, Dorina Savoschin, Natalia Chiper

Marina Aramă, Ala Cojocaru, Adela Horodișteanu-Banuh, Dorina Savoschin, Natalia Chiper
IMPACTUL IMPLEMENTĂRII CADRULUI NORMATIV OPTIMIZAT ASUPRA CALITĂȚII SERVICIILOR MEDICALE OFERITE COPILOR ȘI ASUPRA NIVELULUI ABILITĂȚILOR PARENTALE
IMSP Institutul Mamei și Copilului (Director – dr. șt. med., conf. univ. S. Gladun)

SUMMARY

THE IMPACT OF IMPLEMENTATION OF THE OPTIMIZED NORMAL FRAMEWORK ON THE QUALITY OF MEDICAL SERVICES OFFERED TO CHILDREN AND THE LEVEL OF PARENTAL ABILITY

Keywords: children, surveillance standards, parental ability, pneumonia

Background. Reducing infant and child mortality is a priority for Moldova. Significant reserves of its solutions lie in improving the effectiveness of primary health care services.

Aim. Evaluating the impact of implementation of the optimized normal framework on the quality of medical services offered to children and the level of parental ability

Materials and Methods: In 2011-2012. the Pediatric Scientific Department with the support of UNICEF Moldova and the Ministry of Health conducted an epidemiological study aimed at examining the effectiveness of the current “Standards for monitoring healthy children under 18 in outpatient settings” and the level of knowledge and parental skills. As a result, the effectual regulatory framework was updated and an innovative tool was created to improve parents’ skills - „Child Development Card (diary for the family)”. Since 01.01.2013 these developments have come into force. After 1.5 years, we conducted a similar study to assess the first results of implementing new standards, as well as compare the level of parental skills.

Results: After 1.5 years after the implementation of the new Standards, the quality of observation of healthy children by medical workers was statistically significantly improved ($p < 0.05$). As a result of the implementation of the