

to January 2012. Euro Surveill. 2012;17(6): pii=20081. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/>

3. Chen Z., Ji W., Wang Y. et al. Epidemiology and associations with climatic conditions of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae infections among Chinese children hospitalized with acute respiratory infections Italian Journal of Pediatrics 2013, 39:34

4. Defilippi A, Silvestri M, Tacchella A, Giacchino R, Melioli G, Di Marco E, et al. Epidemiology and clinical features of Mycoplasma pneumoniae infection in children. Respir Med. 2008;102(12):1762-81

5. Elkholy A, Elkaraksy H, Fattouh A. et al. Acute lower respiratory tract infection due to Chlamydia and Mycoplasma spp. in Egyptian children under 5 years of age. J Trop Pediatr. 2009 Jun;55(3):195-7. doi:10.1093/tropej/fmn102. Epub 2009 Feb 12.

6. Foy HM. Infections caused by Mycoplasma pneumoniae and possible carrier state in different populations of patients. Clin Infect Dis 1993;17:S37-S46.

7. Juvonen R., Bloigu A., Paladins M., Peitso A., Silvennoinen-Kassinen S., Harju T., M. Leinone, P. Saikku Acute Chlamydia pneumoniae infections in asthmatic and non-asthmatic military conscripts during a non-epidemic period Clinical Microbiology and Infection Volume 14, Issue 3, pages 207–212, March 2008.

8. Kern D., Neill M., Schachter J. A seroepidemiologic study of Chlamydia pneumoniae in Rhode Island: evidence of serologic cross-reactivity. Chest 1993;104:208–213.

9. Kishaba T. Community-Acquired Pneumonia Caused by Mycoplasma pneumoniae: How Physical and Radiological Examination Contribute to Successful Diagnosis. Front Med (Lausanne). 2016 Jun 13;3:28. doi: 10.3389/fmed.2016.00028. collection 2016.

10. Kraft M., Cassel G., Pak J, et al. Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae in asthma. Chest. 2002;121:1782–1788.

11. Nelson CT. Mycoplasma and Chlamydia pneumoniae in pediatrics. Seminars in Respiratory Infections 2002;17(1):10-4.

12. Principi N, Esposito S. Emerging role of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae in pediatric respiratory-tract infections. Lancet Infectious Diseases 2001; 1:334-44.

13. Rudolph C., Rudolph A., Hostetter M., et al. Rudolph's Pediatrics. 21st Edition. USA: McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2003.

© Elena Visternicean, V. Moșin, Alina Hotineanu A. Crețu

Elena Visternicean, V. Moșin, Alina Hotineanu A. Crețu
**IMPLICAȚIILE HOMOCISTEINEI, VITAMINELOR GRUPULUI B ȘI
POLIMORFISMUL MTHFR C677T ÎN AVORTUL SPONTAN RECURENT**
*USMF „Nicolae Testemițanu”, Catedra Obstetrică și Ginecologie FECMF
(Șef catedră – prof.univ., dr. hab. med. Olga Cernetchi)
Centrul medical „Repromed”*

SUMMARY

IMPLICATIONS OF THE MTHFR C677T POLYMORPHISM, HOMOCYSTEINE AND SERUM B VITAMINS IN THE RECURRENT MISCARRIAGES

Keywords: homocysteine, MTHFR, recurrent miscarriage, folate, vitamin B₁₂

Introduction. Elevated total serum homocysteine concentration is known to be related to many adverse pregnancy outcomes including birth defects, preeclampsia, placental abruption, spontaneous abortion, low birth weight and other maternal or fetal complications. Homocysteine is influenced by the status of B vitamins and nutritional adequacy of these vitamins is essential to maintain the plasma homocysteine levels within a normal homeostatic range. In addition, genetic polymorphism of the enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), which catalyzes the irreversible conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-MTHF) to 5-MTHF in the folate cycle, is known to influence homocysteine metabolism resulting in hyperhomocysteinemia. Objective: The purpose of this study was to investigate the effect of the interaction between the C677T mutation in the MTHFR genotypes and serum levels of vitamin B₁₂ and folic acid on serum homocysteine levels in women with recurrent miscarriages.

Materials and methods. This study has a cross-sectional design and included 50 women aged 18 – 42 years who had experienced recurrent miscarriage. The level of the total serum homocysteine, serum folate and vitamin B₁₂ concentrations were measured via the chemiluminescent method. The MTHFR gene mutation was investigated by the polymerase chain reaction of a genomic DNA fragment.

Results. We found that 25 patients (50,0%, 95%CI 36,15 – 63,85) had significantly high total serum homocysteine values, 7 patients were detected having low serum folate (14,0%, 95%CI 4,39 – 23,61) and 7 patients were also detected having low serum vitamin B₁₂ (14,0%, 95%CI 4,39 – 23,61). The frequency of the MTHFR C677T polymorphism among subjects with the CC, CT, and TT genotypes was 38,0% (95%CI 24,55 – 51,45), 48,0% (95%CI 34,16 – 61,84), and 14,0% (95%CI 4,39 – 23,61), respectively.

Conclusions. Serum homocysteine levels were significantly higher in women with the 677TT genotype (23,64±2,56 μmol/l) when the serum folate (6,89±0,49nmol/L) and vitamin B₁₂ (179,71±16,14) were lower than the median level (p <0.001).

РЕЗЮМЕ

РОЛЬ ГОМОЦИСТЕИНА, ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В И ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА MTHFR C677T ПРИ ПРИВЫЧНОМ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

Ключевые слова: гомоцистенн, MTHFR, невынашивание беременности, фолиевая кислота, витамин B₁₂

Введение. Увеличение концентрации гомоцистеина в сыворотке крови связано с повышенным риском различных осложнений беременности: репродуктивными потерями, преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты, выраженной задержкой роста плода, ранним началом преэклампсии тяжелой степени. Уровень гомоцистеина в плазме крови зависит от уровней в крови витаминов группы В и диетологическая адекватность данных витаминов имеет важное значение для поддержания уровней гомоцистеина в плазме в пределах нормального гомеостатического диапазона. Кроме того, генетический полиморфизм фермента метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), играющего ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты который катализирует необратимое изменение 5,10-метилентетрагидрофолята (5,10-MTHF) в 5-метилтетрагидрофолят (5-MTHF), одна из важных причин накопления гомоцистеина в крови. Цель: В этом исследовании, мы стремились обнаружить эффект влияния полиморфизма MTHFR C677T, сывороточных уровней витамина B₁₂ и фолиевой кислоты на концентрации гомоцистеина в плазме крови у женщин с привычным невынашиванием беременности.

Материалы и методы. Было проведено поперечное исследование и были включены 50 женщин в возрасте от 18 до 42 лет с привычным невынашиванием беременности. Концентрацию гомоцистеина, витамина B₁₂ и фолиевой кислоты измеряли в сыворотке крови с помощью метода хемилюминесценции. Исследование генетического полиморфизма MTHFR C677T проводилось с использованием фрагменты ДНК при полимеразной цепной реакции.

Результаты. Мы обнаружили, что 25 пациенток (50,0%, 95% IC 36,15 - 63,85) имели повышенную концентрацию гомоцистеина в плазме крови, 7 пациенток (14,0%, 95%CI 4,39 – 23,61) имели низкий уровень фолиевой кислоты в сыворотке крови и 7 пациенток (14,0%, 95%CI 4,39 – 23,61) имели также низкий уровень витамина B₁₂ в сыворотке крови. В исследуемой группе женщин генотип MTHFR 677TT (гомозигота по мутантной аллели) выявлен в 7 случаях (14,0%, 95%CI 4,39 – 23,61), носительницы гетерозиготного генотипа MTHFR 677CT были выявлены в 24 случаях (48,0%, 95%CI 34,16 – 61,84) и нормальные гомозиготы MTHFR 677CC – в 19 случаях (38,0%, 95%CI 24,55 – 51,45).

Выводы. Уровень гомоцистеина в плазме крови был значительно выше у женщин с генотипом 677TT MTHFR (23,64±2,56 мкмоль/л) когда уровни фолиевой кислоты (6,89±0,49 нмоль/л) и витамина B12 (179,71±16,14 пмоль/л) в сыворотке крови были ниже среднего уровня (p <0.001).

Introducere. Pierderea spontană recurentă a sarcinii este definită drept pierderea a două sau mai multe sarcini consecutive [3,4,20]. Studiile epidemiologice au arătat că această patologie a sarcinii afectează aproximativ 1% dintre toate femeile [3,16,17,20]. Datele empirice demonstrează că existența în anamneză a unui avort spontan crește riscul de recurență pentru sarcinile următoare de la 12% până la 24% după un avort spontan, la 32% după trei avorturi spontane și până la 53% după șase și mai multe avorturi spontane [16,20].

Cauzele cunoscute ale avortului spontan recurent sunt complexe și multiple (cauze infecțioase, endocrine, imunologice, anatomice, genetice etc.), totuși 60% din cazuri rămân inexplicabile [16,20,22,25]. În acest context, cercetarea medicală își îndreaptă atenția în ultimii ani spre diverse mecanisme care ar putea să conducă la elucidarea cauzelor avortului spontan [22]. Unele din aceste mecanisme vizează dezvoltarea și funcționarea placentei, vascularizația acesteia, sau alterarea altor procese fiziologice și moleculare care pot influența în sens negativ dezvoltarea produsului de concepție [2,12,28].

Studii recente demonstrează că o serie de patologii obstetricale, inclusiv pierderea recurentă de sarcină, sunt condiționate de mutații ereditare și polimorfisme cu potențial trombofilic, reprezentate prin hiperhomocisteinemie [26].

Hiperhomocisteinemia este implicată în dezvoltarea și apariția patologiilor obstetricale legate de insuficiența placentară, precum: preeclampsia, restricția de creștere intrauterină a fătului, avortul spontan, pierderea recurentă a sarcinii, decolarea de placenta normal inserată și nașterea prematură [8,10,11,27].

Nelen și colab. au raportat combinarea deficienței serice de folați cu hiperhomocisteinemia ca factor ce duce la deficiența de vascularizare a vililor corionici, posibil de remediat cu doze mari de acid folic [20].

Efectele folaților și vitaminei B₁₂ asupra sănătății erau cunoscute demult, deficitul lor manifestându-se prin anemie megaloblastică și neuropatie [14]. Asocierile dintre nivelul scăzut al acestor vitamine și impactul negativ asupra funcției reproductive la femei au fost descoperite recent [13,14].

În ultimii 20 de ani, a fost cuantificat rolul acidului folic asupra embriogenezei, în special în dezvoltarea tubului neural. Studiile randomizate au demonstrat că suplimentarea preconcepțională și prenatală cu acid folic reduce riscul de a avea un copil cu un defect de tub neural [19]. Mai mult decât atât, aceste cunoștințe au determinat revizuirea rolului folaților în timpul sarcinii, în ceea ce privește prevenirea complicațiilor fetale, cum ar fi malformațiile congenitale, și au permis reevaluarea nivelului inadecvat de acid folic pentru dezvoltarea unor complicații în sarcină, precum preeclampsia, decolarea prematură de placenta normal inserată, avortul spontan și pierderea recurentă de sarcină [7,14].

Sarcina poate conduce la deficiențe de folați, motiv pentru care trebuie să fie asociată cu un aport crescut de acid folic [15]. Necesarul crescut de folați de care are nevoie organismul în timpul sarcinii se datorează creșterii fătului [15,18]. Concentrația normală de acid folic este esențială în embriogeneză și creșterea embrionară [6,15]. S-a constatat că nivelul scăzut al acidului folic este legat de avorturile spontane și ar putea fi un factor embriotoxic în serul femeilor care au avortat [18]. George și colab. au raportat că femeile cu un nivel scăzut al folatului (< 4,9 nmol/L) în plasmă prezintă un risc mai mare de avort spontan decât femeile cu un nivel crescut al folatului, în special atunci când anomaliile cromozomiale fetale erau prezente [18].

Homocisteina, fiind un aminoacid neproteic, absent în dieta naturală, derivat din metabolismul metioninei, este condiționată nu doar de aportul extern de folați și vitamina B₁₂, dar se află și sub influența modului în care funcționează o serie de proteine și enzime implicate în metabolismul homocisteinei [7]. Acumularea homocisteinei în circulație este generată de polimorfismul genei MTHFR [8,10,17].

Schimbarea C în T la poziția 677 nucleotidică a genei MTHFR a fost amplu studiată, consecințele sale clinice fiind dependente de starea folatului [17]. Polimorfismele la nivelul genei MTHFR afectează metabolismul homocisteinei și acidului folic, și reprezintă factori de risc independenți pentru avort spontan [1]. Efectul lor asupra riscului de avort spontan este cumulativ [23].

Scopul lucrării este de a evalua interacțiunea dintre polimorfismul MTHFR C677T și nivelurile serice ale acidului folic și vitaminei B₁₂ asupra nivelului plasmatic al homocisteinei serice totale la femeile cu avort spontan recurent.

Material și metode. Grupul de paciente a constat din 50 de femei, de vârstă reproductivă, care au prezentat cel puțin 2 avorturi spontane consecutive în antecedente, în primul și al doilea trimestru de sarcină. Studiul de tip transversal s-a realizat în perioada 2014 – 2015.

Homocisteina serică totală, acidul folic și vitamina B₁₂ au fost determinate prin metoda chemiluminiscență. Specimen recoltat: sânge venos, recoltat dimineața, în condiții „a jeun”. Pentru determinările uzuale, recoltarea, manevrarea și efectuarea testelor s-a făcut în condițiile standard impuse de tipul de probă și de instrucțiunile de utilizare ale kiturilor și aparatelor folosite.

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 polimorfismului MTHFR C677T s-a realizat reacția 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 termocicluul „Tprofessional Basic 96” (Biometra, Germania).

Rezultatele obținute au fost prelucrate matematico-statistic prin intermediul aplicației Excel (din pachetul Microsoft Office 2010) și online, cu aplicația OpenEpi v.2.3.1. [20]. Semnificația statistică pentru valorile relative a fost stabilită prin intervalul de încredere (ÎI) pentru 95%. Semnificația statistică pentru comparația valorilor medii a fost apreciată prin calcularea testului de semnificație (t – Student) și pragului de semnificație (p).

Rezultate și discuții. În funcție de tipul de avort spontan recurent întâlnit, au fost identificate 33 paciente cu avort spontan primar primar (66,0% ÎI₉₅: 52,87 – 79,13) și 17 paciente cu avort spontan secundar (34,0% ÎI₉₅: 20,87-47,13).

Examinând distribuția după termenul la care s-a produs întreruperea spontană a sarcinii în lotul de studiu, am constatat că sarcinile s-au finalizat cu avort spontan precoce la 49 paciente (98,0% ÎI₉₅: 94,12 – 101,88) și cu avort spontan tardiv la 6 paciente (12,0% ÎI₉₅: 3,0 – 21,0).

Analizând numărul de avorturi spontane în antecedente am remarcat că 37 paciente cu avort spontan recurent au avut 2 avorturi spontane în antecedente (74,0% \hat{I}_{95} : 61,85 – 86,15), 3 avorturi spontane în antecedente s-au constatat la 11 paciente (22,0% \hat{I}_{95} : 10,52 – 33,48), 4 avorturi spontane în antecedente a suportat o singură pacientă (2,0% \hat{I}_{95} : -1,43 – 9,43) și 5 avorturi spontane în antecedente s-au înregistrat, de asemenea, la o singură pacientă (2,0% \hat{I}_{95} : -1,43 – 9,43).

Valoarea medie a nivelului seric de homocisteină totală a fost de $13,36 \pm 1,0$ $\mu\text{mol/L}$.

Analiza nivelului homocisteinei totale a arătat că la 25 paciente (50,0% \hat{I}_{95} : 36,15 – 63,85) valorile homocisteinei s-au încadrat în limitele normale. Valoarea serică a homocisteinei ce depășea 12 $\mu\text{mol/L}$ s-a depistat, de asemenea, la 25 paciente (50,0% \hat{I}_{95} : 36,15 – 63,85). Dintre acestea, 23 paciente (46,0% \hat{I}_{95} : 32,19 – 59,81) au avut concentrația homocisteinei totale cuprinsă între 12 – 30 mmol/L și la 2 paciente (4,0% \hat{I}_{95} : -1,43 – 9,43) valoarea acestui parametru era > 30 mmol/L . Nu a fost înregistrat nici un caz de hiperhomocisteinemie severă.

Concentrația serică a acidului folic încadrată în limitele valorilor de referință a fost înregistrată la 15 paciente (30,0% \hat{I}_{95} : 17,30 – 42,70). La 35 paciente (70,0% \hat{I}_{95} : 57,30 – 82,70) s-au găsit valori semnificativ mai mici decât domeniul de normalitate pentru acidul folic. Dintre acestea, 28 paciente (56,0% \hat{I}_{95} : 42,25 – 69,75) au avut concentrația acidului folic cuprinsă între 6,8 – 13,5 nmol/L , ceea ce se consideră deficiență posibilă, iar la 7 paciente (14,0% \hat{I}_{95} : 4,39 – 23,61) nivelul acidului folic era $< 6,8$ nmol/L , ceea ce semnifică deficit de folat. Valoarea medie a nivelului seric de acid folic a fost de $12,59 \pm 0,97$ nmol/L .

Concentrația serică a vitaminei B_{12} încadrată în limitele de referință ale acestui parametru a fost apreciată la 14 paciente (28,0% \hat{I}_{95} : 15,56 – 40,44). Valori mai mici de limitele de referință pentru vitamina B_{12} au fost înregistrate la 36 paciente (72,0% \hat{I}_{95} : 59,56 – 84,44). Astfel, 29 paciente (58,0% \hat{I}_{95} : 44,32 – 71,68) au avut concentrația vitaminei B_{12} cuprinsă între 150 – 258,9 pmol/L , ceea ce se consideră deficiență posibilă, și la 7 paciente (14,0% \hat{I}_{95} : 4,39 – 23,61) < 150 pmol/L , ceea ce semnifică deficit de vitamina B_{12} . Valoarea medie a concentrației serice a vitaminei B_{12} a fost de $240,34 \pm 17,71$ nmol/L .

Hiperhomocisteinemia este adesea asociată cu concentrații reduse de vitamine din grupul B, în special de acid folic, iar suplimentarea insuficientă cu acid folic este unul dintre motivele pentru creșterea nivelului plasmatic al homocisteinei [5]. Actualmente, în Republica Moldova, administrarea preconcepțională a acidului folic în doza de 0,4 μg este recomandată la toate femeile de vârstă reproductivă cu cel puțin 2-3 luni înainte de sarcină și în primele 3 luni ale sarcinii [21,24]. În conformitate cu noul ghid al Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) cu privire la îngrijirea

antenatală „WHO recommendations on antenatal care for a positive pregnancy experience” [29] administrarea acidului folic în doza de 0,4 μg este necesară pe toată durata sarcinii pentru prevenirea dezvoltării anemiei, sepsisului puerperal, greutății mici la naștere și nașterii premature [29].

În acest context, pacientele cu ASR din cadrul studiului au fost întrebate despre administrarea suplimentelor cu acid folic pe parcursul gravidităților anterioare.

Analiza informațiilor prelucrate arată că toate pacientele (100,0%) au folosit suplimente cu acid folic pe parcursul sarcinilor anterioare. Cât privește perioada administrării suplimentelor cu acid folic, am determinat că doar 18 paciente (36,0% \hat{I}_{95} : 22,7 – 49,3) au luat suplimente cu acid folic în perioada de preconcepție și în primul trimestru de sarcină, cu toate că majoritatea femeilor au menționat că și-au planificat sarcina. Restul de 33 paciente (66,0% \hat{I}_{95} : 52,87 – 79,13) au relatat că au folosit suplimente cu acid folic doar pe parcursul primelor 3 luni de graviditate. Totodată o pacientă a administrat suplimente cu acid folic pe parcursul doar al primelor 3 luni de graviditate la prima sarcină, iar la următoarea sarcină a folosit suplimente cu acid folic atât în perioada de preconcepție, cât și în primul trimestru de sarcină.

În cadrul studiului ne-am propus să analizăm perioada de administrare a suplimentelor cu acid folic din sarcinile precedente în raport cu nivelul educațional, mediul de trai și avortul spontan recurent (Tabelul 1). Din datele tabelului rezultă că utilizarea suplimentelor cu acid folic a avut loc doar în primele 3 luni de graviditate mai mult la femeile din mediul rural (36,0% \hat{I}_{95} : 22,70 – 49,30), preponderent cu studii medii (30,0% \hat{I}_{95} : 17,30 – 42,70) comparativ cu femeile care au luat suplimente cu acid folic atât în perioada preconcepțională, cât și în primul trimestru de sarcină, printre care predomină pacientele din mediul urban (26,0% \hat{I}_{95} : 13,49 – 38,51) cu studii superioare (26,0% \hat{I}_{95} : 13,49 – 38,51). Am stabilit că femeile din lotul de studiu utilizează suplimente cu acid folic, însă persoanele cu nivel general sau mediu de instruire nu dispun de informație privind modul și timpul administrării acidului folic, nu cunosc importanța acestuia pentru conceperea și menținerea sarcinii.

Datele cercetării arată că avortul spontan recurent secundar a survenit mai des la pacientele care au folosit suplimente cu acid folic doar în primele 3 luni de graviditate comparativ cu pacientele care au luat suplimente cu acid folic atât în perioada preconcepțională, cât și în primul trimestru de sarcină (32,0% \hat{I}_{95} : 19,07 – 44,93 versus 6,0% \hat{I}_{95} : -0,58 – 12,58). Totodată avortul spontan precoce a survenit mai des la pacientele din primul grup decât la pacientele din grupul care au administrat preparate cu acid folic atât în perioada preconcepțională, cât și în primul trimestru de sarcină (64,0% \hat{I}_{95} : 50,70 – 77,30 versus 36,0% \hat{I}_{95} : 22,70 – 49,30).

Tabelul 1.

Utilizarea suplimentelor cu acid folic în raport cu nivelul educațional, mediul de trai și avortul spontan recurent la pacientele din lotul de studiu

		Perioada de concepție + primul trimestru de sarcină			Primul trimestru de sarcină		
		Abs.	%	\hat{I}_{95}	Abs.	%	\hat{I}_{95}
Mediu de trai	Urban	13	26,0%	13,49 – 38,51	15	30,0%	17,30 – 42,70
	Rural	5	10,0%	1,69 – 18,31	18	36,0%	22,70 – 49,30
Nivelul educațional	Studii superioare	13	26,0%	13,49 – 38,51	12	24,0%	12,17 – 35,83
	Studii superioare incomplete	2	4,0%	-1,43 – 9,43	2	4,0%	-1,43 – 9,43
	Studii medii	3	6,0%	-0,58 – 12,58	15	30,0%	17,3 – 42,70
	Studii liceale	0	-	-	4	8,0%	0,49 – 15,51
Avort spontan	Primar	15	30,0%	17,30 – 42,70	16	32,0%	19,07 – 44,93
	Secundar	3	6,0%	-0,58 – 12,58	16	32,0%	19,07 – 44,93
Avort spontan	Precoce	18	36,0%	22,70 – 49,30	32	64,0%	50,70 – 77,30
	Tardiv	1	2,0%	-1,88 – 5,88	5	10,0%	1,69 – 18,31

Ținând cont de cele menționate, devine evidentă necesitatea administrării acidului folic în perioada de concepție și pe parcursul sarcinii, în condițiile în care foliații alimentari se absorb în proporție de aproximativ 50% [5].

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) homozigote pentru alela mutantă TT. Analiza polimorfismului MTHFR

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

Evaluarea prezenței genotipului normal (CC) și 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).

Concentrațiile serice ale acidului folic, vitaminei B₁₂ și homocisteinei serice totale au fost studiate în raport cu genotipurile polimorfismului MTHFR C677T (Tabelul 2).

Tabelul 2.

Concentrația homocisteinei serice, folatului seric și vitaminei B₁₂ în raport cu genotipurile polimorfismului MTHFR C677T

Genotipul polimorfismului MTHFR C677T						
	CC n = 19	CT n = 24	TT n = 7	CC/CT t, p	CC/TT t, p	CT/TT t, p
Acid folic (nmol/L)	13,64±1,40	13,39±1,60	6,89±0,49	0.1175 >0.05	4.5507 <0.001	3.8844 <0.001
Vitamina B ₁₂ (pmol/L)	232,52±24,46	264,20±30,54	179,71±16,14	9.2225 <0.001	1.8021 >0.05	2.4459 <0.05
Homocisteina (μmol/l)	11,81±1,43	11,58±1,10	23,64±2,56	0.1275 >0.05	4.0343 <0.001	4.3286 <0.001

Incidența hiperhomocisteinemiai (≥ 12 μmol/L) a fost cea mai mare la pacientele cu genotipul 677TT MTHFR (23,64±2,56 μmol/L) pe fond de concentrație joasă a folatului seric și vitaminei B₁₂, în comparație cu pacientele cu polimorfismul 677CC (11,81±1,43 μmol/l) (p <0.001). Această ipoteză a fost constată și demonstrată în referințe detaliate în literatura de specialitate. Mutațiile genei MTHFR sunt factorul de risc cel mai bine studiat pentru nivelul homocisteinei crescute [6,7,8].

Studiile recente indică legătura între un nivel scăzut de acid folic și prezența hiperhomocisteinemiai în prezența polimorfismului MTHFR 677TT [7,8].

Interacțiunea dintre nivelul seric al acidului folic și prezența polimorfismului MTHFR C677T ca determinant ai concentrației plasmatice de homocisteină este demonstrată în tabelul 3 care prezintă concentrațiile serice ale homocisteinei totale și acidului folic în raport cu genotipul polimorfismului MTHFR C677T în dependență de nivelul seric al acidului folic (folatul seric < 13,5 nmol/L și folatul seric > 13,5 nmol/L).

Influența genotipului TT al MTHFR asupra nivelului homocisteinei serice totale a fost observată cu certitudine atunci când folatul seric a fost < 13,5 nmol/L. Menționăm că nu s-a depistat nici o pacientă cu genotipul TT al MTHFR când folatul seric a fost > 13,5

Concentrațiile serice ale homocisteinei totale și acidului folic în raport cu genotipul polimorfismului MTHFR C677T în funcție de nivelul seric al acidului folic

Parametrii	Genotipul polimorfismului MTHFR C677T	Nivelul seric al acidului folic			
		< 13,5 nmol/L	> 13,5 nmol/L	t	p
Homocisteina, $\mu\text{mol/l}$	CC	13,64 \pm 1,99	8,68 \pm 1,42	2.0289	<0.05
	CT	13,04 \pm 1,44	9,17 \pm 1,53	1.8419	>0.05
	TT	23,68 \pm 2,55	0	9.2893	<0.001
Acidul folic, nmol/L	CC	10,21 \pm 0,87	19,52 \pm 2,06	4.1634	<0.001
	CT	9,15 \pm 0,88	20,45 \pm 2,78	3.8752	<0.001
	TT	6,98 \pm 0,49	0	20.3673	<0.001

nmol/L. Pacientele cu genotipul TT au avut un nivel semnificativ mai mare a homocisteinei serice, decât pacientele cu genotipul CC al polimorfismului MTHFR 677 (valoarea medie a homocisteinei: 23,68 \pm 6,27 versus 13,64 \pm 6,61 $\mu\text{mol/l}$, $p < 0.05$) când folatul seric era sub nivelul de 13,5 nmol/L, în timp ce această diferență a fost mult mai mică când folatul seric a depășit nivelul de 13,5 nmol/L la pacientele cu genotipurile CC și CT (valoarea medie a homocisteinei: 8,68 \pm 3,49 și 9,17 \pm 4,34 $\mu\text{mol/l}$, $p < 0.05$).

Creșterea nivelului plasmatic al homocisteinei la pacientele cu genotipul TT, din grupul cu folatul seric < 13,5 nmol/L, a fost însoțită de un nivel semnificativ mai scăzut de acid folic (6,98 \pm 1,20 nmol/L) comparativ cu genotipul CT (9,15 \pm 3,29 nmol/L) și genotipul CC (10,21 \pm 3,03 nmol/L) ($p > 0.05$). Această diferență nu se observă la pacientele cu genotipurile CC și CT atunci când folatul seric a fost mai mare de 13,5 nmol/L (19,52 \pm 5,05 și 20,45 \pm 7,87 nmol/L) ($p < 0.001$).

Acidul folic reprezintă o vitamină cu importanță vitală, necesară pentru evoluția normală a proceselor de creștere, dezvoltare și proliferare tisulară, în special pentru dezvoltarea sistemului hematopoietic, imun și evoluția normală a embriogenezei [9].

Stern și colab. și Frisco și colab. au demonstrat că deficitul de acid folic și activitatea redusă genetic determinată a enzimei MTHFR rezultă într-o capacitate diminuată a reacției de metilare a homocisteinei la metionină și o producție scăzută de SAM. Disponibilitatea insuficientă a SAM conduce apoi la reacții de metilare inadecvate, cu multiple consecințe, mai ales în ceea ce privește metilarea ADN-ului [23].

Având în vedere impactul major al metilării, Ueland și colab., la fel Reik și Walter au concluzionat că metilarea defectă poate duce la expresia aberantă a genelor care rezultă în abaterile de la dezvoltarea embrionară normală [7].

Concluzii

1. Hiperhomocisteinemia a fost înregistrată la 25 paciente (50,0% \hat{I}_{95} : 36,15 – 63,85), deficitul de acid folic s-a întâlnit la 7 paciente (14,0% \hat{I}_{95} : 4,39 – 23,61) și deficitul de vitamina B₁₂, de asemenea, la 7 paciente (14,0% \hat{I}_{95} : 4,39 – 23,61).

2. Evaluarea prezenței 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), în total alele mutante 38,0% (\hat{I}_{95} : 28,49 – 47,51).

3. Incidența hiperhomocisteinemiei ($\geq 12 \mu\text{mol/L}$) a fost cea mai mare la pacientele cu genotipul 677TT MTHFR (23,64 \pm 2,56 $\mu\text{mol/L}$) pe fond de concentrație joasă a folatului seric și vitaminei B₁₂, în comparație cu pacientele cu polimorfismul 677CC (11,81 \pm 1,43 $\mu\text{mol/l}$) ($p < 0.001$).

4. Pacientele cu genotipul TT au avut un nivel semnificativ mai mare al homocisteinei serice decât pacientele cu genotipul CC al polimorfismului MTHFR 677 (valoarea medie a homocisteinei: 23,68 \pm 6,27 versus 13,64 \pm 6,61 $\mu\text{mol/l}$, $p < 0.05$) când folatul seric a fost <13,5 nmol/L, în timp ce această diferență este mult mai mică când folatul seric a fost >13,5 nmol/L la pacientele cu genotipurile CC și CT (valoarea medie a homocisteinei: 8,68 \pm 3,49 și 9,17 \pm 4,34 $\mu\text{mol/l}$, $p < 0.05$).

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. Bergen N. et al. Homocysteine and folate concentrations in early pregnancy and the risk of adverse pregnancy outcomes: the Generation R Study. În: *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, 2012, vol. 119, nr. 6, p. 739 – 751.
3. 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.
4. Cao Y. et al. The association of idiopathic recurrent early pregnancy loss with polymorphisms in folic acid metabolism-related genes. În: *Genes & Nutrition*, 2014, vol. 9: 402, p. 1 – 8.
5. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. În: *Food and Nutrition Bulletin*, 2008, nr. 2 (supplement), p. S238 – S244.
6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. Friptu V. ș. a. Acidul folic: influența asupra sarcinii și lactației. În: *Buletin de Perinatologie*, 2008, nr. 1, p. 57 – 59.

10. Glijin C. Impactul hiperhomocisteinемiei în complicațiile obstetricale. În: *Anale Științifice ale Universității de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”*, 2010, vol. 5, p. 135 – 139.

11. Hague W. Homocysteine and pregnancy. În: *Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 2003, vol. 17, nr. 3, p. 459 – 469.

12. Kramer M. et al. Vasculopathic and thrombophilic risk factors for spontaneous preterm birth. În: *International Journal of Epidemiology*, 2009, vol. 38, p. 715 – 723.

13. McLean B. et al. Review of the magnitude of folate and vitamin B₁₂ deficiencies worldwide. În: *Food and Nutrition Bulletin*, 2008, nr. 2 (supplement), p. S38 – S51.

14. Metz J. A high prevalence of biochemical evidence of vitamin B₁₂ or folate deficiency does not translate into a comparable prevalence of anemia. În: *Food and Nutrition Bulletin*, 2008, nr. 2 (supplement), p. S74 – S85.

15. Molloy A. et al. Effects of folate and vitamin B₁₂ deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development. În: *Food and Nutrition Bulletin*, 2008, nr. 2 (supplement), p. S101 – S111.

16. Moșin V. *Ginecologie reproductivă*. Chișinău, 2010, 618 p.

17. Mtiraoui N. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. În: *Reproduction*, 2006, nr. 131, p. 395 – 401.

18. Neagoș D. ș. a. Polimorfismele C677T și A1298C ale genei metilentetrahidrofolat reductază la pacientele cu avorturi spontane în populația din România. În: *Re-*

vista Medicală Română, 2012, nr. 4, p. 315 – 320.

19. Opopol N., Obreja G., Ciobanu A. *Nutriția în sănătatea publică*. Chișinău: Casa editorial-poligrafică Bons Offices, 2006. 68 p.

20. Platon E. ș. a. Rolul factorilor genetici și negeneticici în avorturile spontane recurente. În: *Anale Științifice ale Universității de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”*, 2009, vol. 2, p. 221 – 227. *Anale Științifice ale Universității de Stat de Medicină și Farmacie “Nicolae Testemițanu”*, 2009, vol. 2, p. 221 – 227.

21. Sacară V. ș.a. Frecvența variantelor alelei C677T în gena 5,10-metilentetrahidrofolat reductaza ca factor genetic predispozant în apariția defectelor tubului neural și a malformațiilor congenitale dependente de acid folic în populația Republicii Moldova. În: *Buletin de Perinatologie*, 2009, nr. 3, p. 215 – 219.

22. Ștefănescu C., Așchie M. Pierderea recurentă spontană a sarcinii – o analiză clinico-histologică. În: *Revista Medicală Română*, 2009, nr. 3, p. 203 – 207.

23. Stover P. Discussion: Folate and vitamin B₁₂ metabolism: Overview and interaction with riboflavin, vitamin B₆, and polymorphisms. În: *Food and Nutrition Bulletin*, 2008, nr. 2 (supplement), p. S17 – S19.

24. Supliment la Ghidul C Național de Perinatologie (volumul 2) „Protocoale de îngrijire și tratament în obstetrică și neonatologie”. Chișinău, 2005. 14 p., 28 p.

25. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. În: *Fertility and Sterility* 2012, vol. 5, p. 1103 – 1111.

26. Миктадова А. и соавт. Полиморфизм генов фолатного цикла и предрасположенность к сердечно-сосудистым заболеваниям. În: *Главный Врач*, 2011, n 4, p. 16 – 18.

27. Плоцкий А. Роль гомоцистеина в генезе врожденных пороков развития плода. În: *Репродуктивное здоровье в Беларуси*, 2009, n 5, p. 58 – 65.

28. Трифонова Е. и соавт. Молекулярно-генетический анализ факторов наследственной тромбофилии при гестозе. În: *Сибирский медицинский журнал*, 2010, vol. 25, n 4, p. 34–36.

29. WHO. WHO recommendations on antenatal care for a positive pregnancy experience. Geneva, World Health Organization, 2016. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250796/1/9789241549912-eng.pdf?ua=1> (vizitat 20.12.2016)