Veaceslav Moşin, Elena Visternicean, Alina Hotineanu, Adrian Creţu

**POLIMORFISMELE GENETICE MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G ŞI MTR A2756G LA FEMEILE CU AVORT SPONTAN RECURENT**

*Universitatea de Stat de Medicină şi Farmacie „Nicolae Testemiţanu”*

*Catedra Obstetrică şi Ginecologie Nr. 2*

*(Şef catedră, profesor universitar, d. h. ş. m. – Cerneţchi Olga)*

*Centrul medical „Repromed”*

**Summury**

**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) cofactor 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 ingenesMTHFR*,* 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**. Самопроизвольныйвыкидыш являетсясложной клинической картиной различной этиологии. Наличие полиморфизмов генов тромбофилии связано с повышенным рискомсамопроизвольного выкидыша. Нарушение ферментов фолатного цикла препятствует нормальной сегрегации хромосом во время мейоза и являетсянаиболее 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 реакциикатализируемой метионинсинтазой (MTR). В качестве кофермента в этой реакции принимает участие витамин В12 (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 оксидированного кобаламина (II) в CH3 – кобаламин (III) для поддержания функциональной активности фермента MTR. Поскольку все ферменты являются ключевым звеном одного цикла, ученые обсуждают возможности меж генных 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 поперечноеисследование 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 677ТT/1298СC 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.** Avortul habitual (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 recurente gestaţionale au o etiologie necunoscută [15,17].

Dintre cauzele genetice asociate avorturilor spontane, trombofilia ereditară reprezintă în ultimii ani un domeniu mai nou de cercetare. Astefl, 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 (ASR) [2].

În ultimul deceniu a devenit evident că tulburările din metabolismul homocisteinei în relaţie cu polimorfismul metilentetrahidrofolat reductazei (MTHFR), ambele asociate bolilor cardiovasculare [1,4], sunt implicate în apariţiei complicaţiilor sarcinii, legate de tulburarea microcirculaţiei şi hipercuagulare [20]. Există un număr relativ mare de complicaţii considerate astăzi ca fiind cauzate de creşterea nivelui plasmatic de homocisteină: anomalii cromozomiale, defecte de tub neural, gestoze tardive, decolarea prematură a placentei normal inserată, hipotrofia fetală şi pierderea recurentă de sarcină [3,7,8,11,19,20].

Cele mai intens studiate variații care afectează gena MTHFR include schimbarea unei singure nucleotide (SNP): C677T şi A1298C [18,16]. Haplotipul determinat de aceste două polimorfisme au fost sugerate a fi implicate în patogeneza avortului spontan recurent, însă rezultatele studiilor de specialitate sunt încă contradictorii.

Polimorfismele genelor MTRR A66G şi MTR A2756G produc o activitate scăzută a enzimelor şi provoacă hiperhomocisteinemie [13]. Starea de heterozigoţie compusă cu polimorfismul C667T reprezintă un factor de risc pentru viabilitatea fetală [5].

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

Cel mai comun polimorfism şi, totodată, cu cel mai important rol în patologia clinică este C677T, situat la nivelul exonului 4. Este o mutaţie cu sens greşit, în care citozina (C) este înlocuită cu timina (T) în poziţia 677 a genei MTHFR. Consecutiv, acest locus va avea 2 alele: alela C sau alela non-mutantă şi 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 enzimatatică în cazul genotipului heterozigot CT se reduce cu 35% şi în cazul genotipului homozigot TT cu 70%, iar forma termolabilă este un marker genetic al hiperhomocisteinemiei moderate la subiecţii cu genotipul 677TT [13,16]. Se raportează o incidenţă de 11% - 12 % în populaţia caucaziană a statusului homozigot pentru aceasta mutaţie, 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 mutaţie nu se asociază cu hiperhomocisteinemie (indiferent de statusul heterozigot sau homozigot), însa statusul heterozigot combinat pentru cele două mutaţii MTHFR poate genera manifestări clinice similare cu cele induse de statusul homozigot pentru mutaţia C677T [13,16].

Alela 1298C este în dezechilibru de înlănţuire cu alela 677T. În total sunt posibile 9 combinaţii de genotipuri ale celor 2 alele: C677C/A1298A; C677C/A1298C; C677C/C1298C; C677T/A1298A; C677T/A1298C; C677T/C1298C; T677T/A1298A; T677T/A1298C; T677T/C1298C. Combinaţiile genotipurilor T677T/A1298C, C677T/C1298C şi T677T/C1298C sunt foarte rar observate. Frecvenţa diferitelor haplotipuri variază în diferite regiuni ale lumii şi diferite grupuri entice [12].

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

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

Enzimă metionin-sintetaza-reductaza (MTRR) are funţia de a reactiva enzima MTR prin metilarea reductivă a cobalaminei, folosind ca donor de metil SAM [16]. Gena este localizată pe braţul scurt al cromozomului 5 în poziţia 15.31. Cel mai frecvent polimorfism în gena MTRR este acel în care adenina (A) este înlocuită în guanină (G) în poziţia 66, această mutaţie implică substituţia aminoacidului izoleucinei cu metionina [6,13,16]. Defectul rezultat determină o scădere a funcţiei enzimatice, iar acest lucru se traduce prin scăderea capacitaţii de a regenera metil-cobalamină, și, prin urmare, este considerată ca un factor de risc genetic pentru hiperhomocisteinemie [10]. În plus, unele studii au sugerat un efect sinergic ale polimorfismelor C677T MTHFR și MTRR A66G asupra nivelului de homocisteină în plasmă [14].

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

**Material şi metode**. Specimen recoltat: sânge venos recoltat pe EDTA, în tuburi de unică folosinţă, prin puncţie 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 şi MTRR A66G s-au realizat reacţiile PCR/RFLP (reacţie de polimerizare în lanţ şi polimorfismul lungimii fragmentelor de resctricţie). ADN-ul genomic a fost amplificat utilizînd polimeraza Dream Taq („Fermentas” USA), la termociclul „Tprofessional Basic 96” (Biometra, Germania). Condiţiile reacţiei sunt similare pentru toate polimorfismele cu excepţia temperaturii de aliniere a primelor: 60.4°C pentru MTHFR C677T, 61°C pentru MTHFR A1298C, 58.4°C pentru MTR A2756G şi 57.6°C pentru MTRR A66G, iar condiţiile protocolului standard sunt: denaturarea iniţială la 95°C – 3 minute, 33 cicluri: 94°C – 30 secunde, 57.6°C - 61°C – 30 secunde, 72°C – 30 secunde şi elongaţia finală la 72°C – 5 minute. Ampliconii au fost supuşi restricţiei timp de 3 ore la 37°C cu enzimele de restricţie specifice pentru fiecare polimorfism: Hinf 1 pentru MTHFR C677T, Mbo II pentru MTHFR A1298C, Hae II pentru MTR A2756G şi Nde I pentru MTRR A66G. Verificarea produşilor de restricţie s-a efectuat prin electroforeză în gel de PAAG (poliacrilamidă) cu concentraţia de 7,5% - sub condiţiile: 200 V timp de 3 ore. Gelul a fost colorat cu soluţie de etidiu. Iar rezultatele au fost vizualizate la sistemul UV SOLO (Germania).

**Rezultate şi discuţii**. Genotiparea polimorfismului MTHFR C677T relevă faptul că 19 paciente (38,0% IÎ95: 24,55 – 51,45) au avut genotipul normal CC, 24 paciente (48,0% IÎ95: 34,16 – 61,84) au fost heterozigote CT şi 7 paciente (14,0% IÎ95: 4,39 – 23,61) au fost homozigote pentru alela mutantă TT.

Evaluarea prezenţei genotipului normal (CC) şi genotipului modificat (CT + TT) a evidenţiat prezenţa mutaţiei genei MTHFR în poziţia 677 la 31 paciente (62.0% IÎ95: 48,55 – 75,45).

Analiza polimorfismului MTHFR C677T a identificat o frecvenţă a alelei C de 62,0% (IÎ95: 52,49 – 71,51) şi o frecvenţă a alelei mutante T de 38,0% (IÎ95: 28,49 – 47,51) (Tabelul 1).

Cercetarea prezenței mutaţiei A>C în poziţia 1298 a genei MTHFR arată că 20 paciente (40% IÎ95: 26,43 – 53,57) au avut genotipul normal AA, 25 paciente (50% IÎ95: 36,15 – 63,85) au fost heterozigote AC şi 5 paciente (10% IÎ95: 1,69 – 18,31) sunt homozigote pentru alela mutantă CC.

Am constatat că purtătorii alelei A pentru polimorfismul MTHFR A1298C au prezentat o frecvenţă de 65,0% (IÎ95: 55,66 – 74,34), iar purtătorii alelei mutante C au înregistrat o frecvenţă de 35,0% (IÎ95: 25,66 – 44,34).

Când pacientele din lotul de studiu au fost împărţite în două categorii, cu genotip normal şi genotip modificat în poziția 1298 a genei MTHFR, s-a observat că 30 paciente (60,0% IÎ95: 47,3 – 72,7) au avut genotip modificat (AC+CC) (Tabelul 1).

Cercetarea polimorfismului MTR A2756G a arătat că 31 paciente (62,0% IÎ95: 48,55 – 75,45) au avut genotipul normal AA, 16 paciente (32,0% IÎ95: 19,07 – 44,93) au fost heterozigote AG şi 3 paciente (6,0% IÎ95: -0,58 – 12,58) au fost homozigote pentru alela mutantă GG.

Frecvenţa alelei A a polimorfismului MTR A2756G a fost de 78,0% (IÎ95: 69,89 – 86,11), iar frecvenţa alelei mutante G a polimorfismului MTR A2756G a fost de 22,0% (IÎ95: 13,89 – 30,11).

Evaluarea prezenţei genotipului normal (AA) şi genotipului modificat (AG + GG) a evidenţiat prezenţa mutaţiei genei MTR în poziţia 2756 la 19 paciente (38,0% IÎ95: 24,55 – 51,45) (Tabelul 1).

Genotiparea polimorfismului MTRR A66G arată că 17 paciente (34,0% IÎ95: 20,87 – 47,13) au avut genotipul normal AA, 23 paciente (46,0% IÎ95: 32,19 – 59,81) au fost heterozigote AG şi 10 paciente (20,0% IÎ95: 8,92 – 31,08) au fost homozigoţi pentru alela mutantă GG.

Frecvenţa alelei 66A a polimorfismului MTRR A66G a fost înregistrată în 57,0% (IÎ95: 47,30 – 66,70), iar frecvenţa alelei mutante 66G a polimorfismului MTRR A66G a fost înregistrată în 43,0% (IÎ95: 33,30 – 52,70).

Separarea pacientelor din lotul de studiu în două categorii, cu genotip normal şi genotip modificat în poziția 66 a genei MTRR, a detrminat că 33 paciente (66,0% IÎ95: 52,87 – 79,13) au avut genotip modificat (AG+GG) (Tabelul 1).

Analiza genotipurilor polimorfismelor testate a permis identificarea mutaţiilor în genele MTHFR, MTR şi MTRR. În acest context, putem observa că s-a găsit doar o pacientă fără nici un polimorfism. Am identificat cel puţin una din mutaţiile studiate la 49 din pacientele studiate (98,0% IÎ95: 94,12 – 101,88). Acest lucru este un indiciu că polimorfismele testate la pacientele din lotul de studiu pot fi implicate ca şi factor cauzal în avortul spontan recurent. Se poate admite deci că absența mutațiilor ar putea avea un rol protectiv în producerea tulburărilor de circulație placentară.

Tabelul 1. Frcevenţa genotipurilor polimorfismelor MTHFR, MTR şi MTRR

 la pacientele din lotul de studiu

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Genotipurile polimorfismelor testate** | **Abs.** | **%** | **IÎ95** |
| Genotip normal pentru toate polimorfismelor 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 |

În continuare, am analizat dacă există polimorfisme asociate ale mutaţiilor MTHFR, MTR şi MTRR la pacientele din lotul de studiu. Din cele 50 de cazuri studiate, 1 pacientă (2,0% IÎ95: -1,88 – 5,88) nu a prezentat nici un polimorfism, 5 paciente (10,0% IÎ95: 1,69 – 18,31) au prezentat polimorfism unic, iar 44 paciente (88,0% IÎ95: 79,0 – 97,0) au prezentat asocieri de polimorfisme (Figura 1).

Fig. 1. Distribuţia polimorfismelor asociate la pacientele din lotul de studiu (%).

Numărul polimorfismelor asociate MTHFR, MTR şi MTRR la pacientele din lotul de studiu este prezentat în tabelul 2.

Tabelul 2. Numărul polimorfismelor asociate MTHFR, MTR şi MTRR

la pacientele din lotul de studiu

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Numărul polimorfismelor asociateMTHFR, MTR şi MTRR | Abs. | % | IÎ95 |
| 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 |

Astefl, am apreciat că 25 paciente (50,0% IÎ95: 36,15 – 63,85) au câte 2 combinaţii ale polimorfismelor genice analizate, 3 combinaţii s-au întâlnit la 18 paciente (36,0% IÎ95: 22,7 – 49,3) şi doar 1 pacientă (2,0% IÎ95: -1,88 – 5,88) a prezentat 4 combinaţii. În afecţiunile poligenice, cum este şi avortul spontan recurent, o singură variaţie 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 pentru ASR. Studii publicate recent au arătat importanța genotipului compus și a analizei acestor asocieri în identificarea riscului pentru avortul spontan. Zetterberg şi col. au constatat că prezenţa uneia sau mai multor alele mutante în gena MTHFR poate afecta procesul de embriogeneză când concentraţia folatului este scăzută [18].

Polimorfismele multiple de la nivelul aceleiaşi 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 înlănțuire a alelelor genei MTHFR 1298 și MTHFR 677 care sunt în dezechilibru de înlănțuire. 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 obţinute a fost efectuată distribuţia polimorfismelor şi combinaţiile genotipice ale genei MTHFR (Tabelul 3).

Cele mai răspândite s-au dovedit a fi variantele C677T/A1298C (28,0% IÎ95: 15,56 – 40,44), C677C/A1298C (22,0% IÎ95: 10,52 – 33,48), C677T/A1298A (20,0% IÎ95: 8,92 – 31,08). Incidenţa moderată e la următoarele variante: T677Т/A1298A (14,0% IÎ95: 4,39 – 23,61), C677C/C1298С (10,0% IÎ95: 1,69 – 18,31) şi C677C/A1298A (6,0% IÎ95: -0,58 – 12,58).

Tabelul 3. Combinaţiile genotipice ale genei MTHFR (677/1298) în lotul de studiu

|  |  |
| --- | --- |
| Combinaţii de genotipuri MTHFR | Cazuri |
| 677 | 1298 | Abs. | % | IÎ95 |
| **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 se atestă că în cercetarea noastră lipsesc următoarele combinaţii alelice: C677Т/С1298С, Т677Т/A1298С şi Т677Т/С1298С, ceea ce corespunde cu datele literaturii, precum că combinaţiile polimorfismelor MTHFR: C677Т/С1298С, Т677Т/A1298С sunt rar întâlnite, iar combinația homozigot pentru ambele mutații Т677Т/С1298С nu poate fi întâlnită [12]

Evaluarea distribuţiei alelor genelor MTHFR 677 şi MTRR 66 sunt reprezentate în tabelul 4.

Tabelul 4. Combinaţiile genotipice ale genelor MTHFR 677 şi MTRR 66 în lotul de studiu

|  |  |
| --- | --- |
| Combinaţii de genotipuri  | Cazuri |
| MTHFR 677 | MTRR 66 | Abs. | % | IÎ95 |
| **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 combinaţii au fost: C677T/A66A (26,0% IÎ95: 13,85 – 38,15), C677C/A66G (22,0% IÎ95: 10,52 – 33,48) şi C677T/A66G (18,0% IÎ95: 7,35 – 28,65). La 5 paciente (10,0% IÎ95: 1,69 – 18,31) s-au întâlnit combinaţiile C677C/G66G şi T677T/A66G. Incidenţa combinaţiei celor două genotipuri normale 677CC/66AA a fost prezentă doar la 3 paciente (6,0% IÎ95: -0,58 – 12,58), iar combinaţia genotipurilor mutante 677TT/66GG s-a întâlnit doar la 1 pacientă (2,0% IÎ95: -1,88 – 5,88).

Rezultatele evaluării distribuţiei alelor genelor MTHFR 677 şi MTR 2756 sunt reprezentate în tabelul 5.

S-a observat că cel mai des a fost combinaţia: C677T/A2756A care s-a întâlnit la 16 paciente (32,0% IÎ95: 19,07 – 44,93). Incidenţa combinaţiei celor două genotipuri sălbatice: C677C/A2756A s-a întâlnit la 12 paciente (24,0% IÎ95: 12,17 – 35,83), iar frecvența combiinațiilor genotipurilor mutante T677T/G2756G a fost prezent doar la 1 pacientă (2,0% IÎ95: -1,88 – 5,88).

Tabelul 5. Combinaţiile genotipice ale genelor MTHFR 677 şi MTR 2756 în lotul de studiu

|  |  |
| --- | --- |
| Combinaţii de genotipuri  | Cazuri |
| MTHFR 677 | MTR 2756 | nr. | % | IÎ95 |
| **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 paciernte (14,0% IÎ95: 4,39 – 23,61). Incidenţa moderată se atestă la următoarele variante: C677C/A2756G (12,0% IÎ95: 3,0 – 21,0), T677Т/A2756A (6,0% IÎ95: -0,58 – 12,58) şi Т677Т/A2756G (6,0% IÎ95: -0,58 – 12,58).

**Concluzii**

1. Identificarea genotipurilor polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G şi MTRR A66G, cu evaluarea ponderii alelelor la pacientele cu avort spontan recurent din lotul de studiu, a permis evidenţierea: genotipului mutant 677CT şi 677TT MTHFR în 62,0% cazuri (IÎ95: 52,49 – 71,51), total alele mutante 38,0% (IÎ95: 28,49 – 47,51); genotipului mutant 1298AC şi 1298CC MTHFR în 60,0% cazuri (IÎ95: 47,30 – 72,70), total alele mutante 35,0% (IÎ95: 25,66 – 44,34); genotipului mutant 2756AG şi 2756GG MTR în 38% cazuri (IÎ95: 24,55 – 51,45), total alele mutante 22,0% (IÎ95: 13,89 – 30,11) şi genotipului mutant 66AG şi 66GG MTRR în 66,0% cazuri (IÎ95: 52,87 – 79,13), total alele mutante 43,0% (IÎ95: 33,30 – 52,70).
2. Genotiparea polimorfismelor MTHFR, MTR şi MTRR a atestat prezenţa polimorfismelor la 49 paciente (98,0% IÎ95: 94,12 – 101,88).
3. Din cele 50 de cazuri studiate, 1 pacientă (2,0% IÎ95: -1,88 – 5,88) nu a prezentat nici un polimorfism, 5 paciente (10,0% IÎ95: 1,69 – 18,31) au prezentat polimorfism unic, iar 44 paciente (88,0% IÎ95: 79,0 – 97,0) au prezentat asocieri de polimorfisme. Astefl, 25 paciente (50,0% IÎ95: 36,15 – 63,85) au câte 2 combinaţii ale polimorfismelor genice analizate, 3 combinaţii s-au întâlnit la 18 paciente (36,0% IÎ95: 22,7 – 49,3) şi doar 1 pacientă (2,0% IÎ95: -1,88 – 5,88) a prezentat 4 combinaţii.

**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. ş. a.Trombofilia ereditară ca una din principalelecauze ale problemelorreproductive 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 chemistrz and laboratorz 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-methylenetetra-hydrofolate 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 hiperhomocisteinemiei în complicaţiile obstetricale. În: Anale Ştiinţifice ale Universităţii de Stat de Medicină şi Farmacie “Nicolae Testemiţanu”, 2010, vol. 5, p. 135 – 139.
12. Kozma K. Polimorfismul genei MTHFR (677 şi 1298) la femeile cu avorturi spontane din judeţul 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. Metthews R. et al. Methylenetetrahzdrofolate reductase and methionine syntetase: biochemistry and molecular biology. În: În: European journal of pediatrics, 1998, supplement 2, p. S54 – S59
15. Moşin V. Ginecologie Reproductivă. Chişinău, 2010, 618p.
16. Moşin V. ş. a. Hiperhomocisteinemeia şi patologia reproductivă. În: Buletin de Perinatologie, 2014, nr. 1, p. 40 – 46.
17. Ştefănescu C., Aşchie 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.