Veaceslav Moşin, Elena Visternicean, Alina Hotineanu, Adrian Creţu

**IMPLICAŢIILE HOMOCISTEINEI, VITAMINELOR GRUPULUI B ŞI POLIMORFISMUL MTHFR C677T ÎN AVORTUL 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”*

**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 measuredvia thechemiluminescent 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, ВИТАМИОВ ГРУППЫ В И ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНАMTHFR C677T ПРИ ПРИВЫЧНОМ НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ**

**Ключевые слова**: гомоцистеин, MTHFR, невынашивание беременности, фолиевая кислота, витамин B12

**Введение**. Увеличение концентрации гомоцистеина в сыворотке крови связанно 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 зависитот 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 необоатимое 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 С677Т, сывороточных уровней витамина В12 и фолиевой кислоты на концентрации гомоцистеина в плазме крови у женщин с привычным невынашиванием беременности.

**Материалы и методы**. Было проведено поперечноеисследование и были включены 50 женщин в возрасте от 18 до 42 летс привычным невынашиванием беременности. Концентрацию гомоцистеина, витамина В12 и фолиевой кислоты измеряли в сыворотке крови с помощью метода хемилюминесценции. Исследование генетического полиморфизма MTHFR C677Tпроводилось 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 В12 в сывороткекрови. В исследуемой группе женщин генотип MTHFR 677ТТ (гомозигота по мутантной аллели) выявлен в 7 случаях (14,0%, 95%CI 4,39 – 23,61), носительницы гетерозиготного генотипа MTHFR 677СT были выявленны в 24 случаях (48,0%, 95%CI 34,16 – 61,84) и нормальные гомозиготы MTHFR 677СС – 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 В12 (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 existenţa în anamneză a unui avort spontan (AS) creşte riscul de recurenţă pentru sarcinile următoare de la 12% până la 24% după un AS, 32% după trei AS şi până la 53% după şase şi mai multe AS [16,20].

Cauzele cunoscute ale avortului spontan recurent (ASR) sunt complexe şi multiple (cauze infecţioase, endocrine, imunologice, anatomice, genetice etc.), totuşi 60% din cazuri rămân inexplicabile [16,20,22,25]. În acest context, cercetarea medicală îşi îndreaptă atenţia în ultimii ani spre diverse mecanisme care ar putea să conducă la elucidarea cauzelor avortului spontan [22]. Unele din aceste mecanisme vizează dezvoltarea şi funcţionarea placentei, vascularizaţia acesteia, sau alterarea altor procese fiziologice şi moleculare care pot influenţa în sens negativ dezvoltarea produsului de concepţie [2,12,28].

Studii mai recente au evidenţiat că o serie de patologii obstetricale, inclusiv pierderea recurentă de sarcină sunt condiţionate de mutaţii ereditare şi polimorfisme cu potenţial trombofilic, reprezentate prin hiperhomocisteinemie [26].

Hiperhomocisteinemia este implicată în dezvoltarea şi apariţia patologiilor obstetricale, legate de insuficienţa placentară, precum: preeclampsia, restricţia de creştere intrauterine a fătului, avortul spontan, pierderea recurentă a sarcinii, decolarea de placenta normal înserată şi naşterea premature [8,10,11,27].

Nelen şi colab. au raportat combinarea deficienţei serice de folaţi şi hiperhomocisteinemie ca factor ce duce la deficienţa de vascularizare a vililor corionici, posibil de remediat cu doze mari de acid folic [20].

Folaţii şi vitamina B12 au fost mult timp cunoscute de a avea efecte adverse asupra sănătății, deficitul lor manifestîndu-se prin anemie megaloblastică și neuropatie [14]. Asocierile între nivelul scăzut al acestor vitamine şi impactul negativ asupra funcţiei 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 preconcepţională şi prenatală cu acid folic reduce riscul de a avea copil cu un defect de tub neural [19]. Mai mult decât atât, aceste cunoștințe au determinat revizuirea rolului folaţilor în timpul sarcinii, atât în ceea ce privește prevenirea complicaţiilor fetale, cum ar fi malformațiile congenitale, precum şi reevaluare nivelului inadecvat de acid folic pentru dezvoltarea unor complicaţii în sarcină, precum preeclampsia, decolarea prematură de placentă normal inserată, avortul spontan şi pierderea recurentă de sarcină [7,14].

Sarcina poate conduce la deficienţe de folaţi, motiv pentru care trebuie să fie asociată cu un aport crescut de acid folic [15]. Necesarul crescut de folaţi de care are nevoie organismul în timpul sarcinii se datorează creşterii fătului [15,18]. Concentraţia normală de acid folic este esenţială în embriogeneză şi creşterea embrionară [6,15]. Acest lucru a fost susţinut de câţiva autori, care au constatat că nivelul scăzut al acidului folic este legat de avorturile spontane şi ar putea fi un factor embriotoxic în serul femeilor care au avortat [18]. George şi col. au raportat că femeile cu un nivel scăzut al folatului (< 4,9 nmol/L) în plasmă au avut un risc mai mare de avort spontan decât femeile cu un nivel crescut al folatului, în special atunci când anomaliile cromozomale fetale au fost prezente [18].

Homocisteina, fiind un aminoacid neproteic, absent în dieta naturală, derivat din metabolismul metioninei, este condiţionată nu doar de aportul extern de folaţi şi vitamina B12, dar se află şi sub influenţa modului în care funcţionează o serie de proteine şi enzime implicate în metabolismul homocisteinei [7]. Acumularea homocisteinei în circulaţie este generată de polimorfismul genei MTHFR [8,10,17].

Schimbarea C în T la pozitia 677 nucleotidicã a genei MTHFR a fost intensiv studiatã, consecintele sale clinice fiind dependente de starea folatului [17]. Polimorfismele la nivelul genei MTHFR afectează metabolismul homocisteinei şi acidului folic, şi reprezintă factori de risc independenți pentru avort spontan [1]. Efectul lor asupra riscului de avort spontan este cumulativ [23].

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

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

Homocisteina serică totală, acidul folic şi vitamina B12 au fost determinate prin metoda chemiluminiscenţă. Specimen recoltat: sânge venos, recoltat dimineaţa, în condiţii „a jeun” – pe nemâncate. Pentru determinările uzuale, recoltarea, manevrarea şi efectuarea testelor s-a făcut în condiţiile standard impuse de tipul de probă şi de instrucţiunile de utilizare ale kiturilor şi aparatelor folosite.

ADN-ul genomic a fost extras după kituri specializate (GeneJet Whole Blood Genomic DNA purification Mini Kit, *Fermentas*) din leucocitele sîngelui periferic. Pentru testarea genetică a polimorfismelor MTHFR C677T s-a realizat reacţiile PCR/RFLP (reacţie de polimerizare în lanţ şi polimorfismul lungimii fragmentelor de resctricţie). ADN-ul genomic a fost amplificat utilizând polimeraza Dream Taq („Fermentas” USA), la termociclul „Tprofessional Basic 96” (Biometra, Germania).

Rezultatele obţinute au fost prelucrate matematico-statistic prin intermediul aplicaţiei Excel (din pachetul Microsoft Office 2010) şi online, cu aplicaţia OpenEpi v.2.3.1. [20]. Semnificaţia statistică pentru valorile relative a fost stabilită prin intervalul de încredere (IÎ) pentru 95%. Semnificaţia statistică pentru comparaţia valorilor medii a fost apreciată prin calcularea testului de semnificaţie (t – Student) şi pragul de semnificaţie (p).

**Rezultate şi discuţii**. În funcţie de tipul de ASR întâlnit, au fost identificate 33 paciente cu ASR primar (66,0% IÎ95: 52,87 – 79,13) şi 17 paciente cu ASR secundar (34,0% IÎ95: 20,87-47,13).

Examinând distribuţia 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% IÎ95: 94,12 – 101,88) şi cu avort spontan tardiv la 6 paciente (12,0% IÎ95: 3,0 – 21,0).

Analizând numărul de avorturi spontane în antecedente am remarcat că 37 paciente cu ASR au avut 2avorturi spontane în antecedente (74,0% IÎ95: 61,85 – 86,15), 3 avorturi spontane în antecedente a fost constată la 11 paciente (22,0% IÎ95: 10,52 – 33,48), 4 avorturi spontane în antecedente a suportat o singură pacientă (2,0% IÎ95: -1,43 – 9,43) şi 5 avorturi spontane în antecedente a fost înregistrat, de asemenea, doar la o singură pacientă (2,0% IÎ95: -1,43 – 9,43).

Valoarea medie a nivelului seric de homocisteină totală a fost de 13,36±1,0 μmol/L.

Analiza nivelului homocisteinei totale a arătat că la 25 paciente (50,0% IÎ95: 36,15 – 63,85) valorile homocisteinei se încadrează în limitele normale. Valoarea serică a homocisteinei ce depăşea 12 μmol/l s-a întilnit, de asemenea, la 25 paciente (50,0% IÎ95: 36,15 – 63,85). Dintre acestea, 23 paciente (46,0% IÎ95: 32,19 – 59,81) au avut concentraţia homocisteinei totale cuprinsă între 12 – 30 μmol/l şi 2 paciente (4,0% IÎ95: -1,43 – 9,43) au avut concentraţia homocisteinei totale mai mare de > 30μmol/l. Nu a fost înregistrat nici un caz de hieprhomocisteinemie severă.

Concentraţia serică a acidului folic încadrată în limetele valorilor de referinţă a fost înregistrată la 15 paciente (30,0% IÎ95: 17,30 – 42,70). La 35 paciente (70,0% IÎ95: 57,30 – 82,70) s-au găsit valori semnificativ mai mici decât domeniul de normalitate pentru acidul folic. Dintre acestea, 28 paciente (56,0% IÎ95: 42,25 – 69,75) au avut concetraţia acidului folic cuprinsă între 6,8 – 13,5 nmol/L, ceea ce se consideră deficienţă posibilă, iar 7 paciente (14,0% IÎ95: 4,39 – 23,61) au avut concentraţia de acid folic < 6,8 nmol/L, ceea ce semnifică deficit de folat. Valoarea medie a nivelului seric de acid folic a fost de 12,59±0,97 nmol/L.

Concentraţia serică a vitaminei B12 încadrată în limitele de referinţă ale acestui parametru a fost apreciată la 14 paciente (28,0% IÎ95: 15,56 – 40,44). Valori mai mici de limitele de referinţă pentru vitamina B12 au fost înregistrate 36 paciente (72,0% IÎ95: 59,56 – 84,44). Astfel, 29 paciente (58,0% IÎ95: 44,32 – 71,68) au avut concetraţia vitaminei B12 cuprinsă între 150 – 258,9 pmol/L, ceea ce se consideră deficienţă posibilă, şi 7 paciente (14,0% IÎ95: 4,39 – 23,61) au avut concentraţia vitaminei B12 < 150 pmol/L, ceea ce semnifică deficit de vitamina B12. Valoarea medie a concentraţiei serice a vitaminei B12 a fost de 240,34±17,71 nmol/L.

Hiperhomocistinemia este adesea asociată cu concentraţii reduse de vitamine din grupul B, în special de acid folic, iar suplimentarea insuficientă cu acid folic este unul dintre motivele pentru creşterea nivelui plasmatic al homocisteinei [5]. Actualmente, în Republica Moldova, administrarea preconcepţională a acidului folic în doza de 0,4 μg (0,4 mg) este recomandată la toate femeile de vârstă reproductivă cu cel puţin 2-3 luni înainte de sarcină şi în primele 3 luni ale sarcinii [21,24], ceea ce necesită actualizarea în conformitate cu noul ghid al Organizaţiei Mondiale a Sănătăţii (OMS) cu privire la îngrijirea antenatală „[WHO recommendations on antenatal care for a positive pregnancy experience](http://www.who.int/entity/nutrition/publications/guidelines/antenatalcare-pregnancy-positive-experience/en/index.html)” [29]. Ghidul are în vedere administrarea acidului folic în doza de 0,4 μg (0,4 mg) pe toată durata sarcinii pentru prevenirea dezvoltării anemiei, sepsisului puerperal, greutatea mică la naştere şi naşetrii prematrure [29].

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

Analizând informaţiile prelucrate, putem menţiona că toate pacientele (100,0%) au administrat suplimente cu acid folic pe parcursul sarcinilor anterioare. Din analiza datelor privind prerioada administrării suplimentelor cu acid folic, am determinat că doar 18 paciente (36,0% IÎ95: 22,7 – 49,3) au administrat suplimente cu acid folic în perioada de preconcepţie şi în primul trimestru de sarcină, cu toate că majoritatea femeilor au menţionat că şi-au planificat sarcina. Restul, 33 paciente (66,0% IÎ95: 52,87 – 79,13) au relatat că au primit suplimente cu acid folic doar pe parcursul primelor 3 luni de graviditate. Totodată, s-a constat că 1 pacienta (2,0% IÎ95: -1,43 – 9,43) a administrat, iniţial suplimente cu acid folic doar pe parcursul primelor 3 luni de graviditate, ulterior, la următoarea sarcină a administrat suplimente cu acid folic atât în perioada de preconcepţie, cât şi în primul trimestru de sarcină.

Ne-am propus să analizăm perioada de administrare a suplimentelor cu acid folic din sarcinile precedente în raport cu nivelul educaţional şi mediul de trai (Tabelul 1.1). Conform tabelului, se atestă utilizarea suplimentelor cu acid folic doar în primele 3 luni de graviditate mai mult la femeile din mediul rural (36,0% IÎ95: 22,70 – 49,30), preponderent cu studii medii (30,0% IÎ95: 17,30 – 42,70) comparativ cu femeile care au administrat suplimente cu acid folic atât în perioada preconcepţională, cât şi în primul trimestru de sarcină, unde se observă că predomină doamne din mediul urban (26,0% IÎ95: 13,49 – 38,51) cu studii superioare (26,0% IÎ95: 13,49 – 38,51). Am stabilit că femeile din lotul de studiu utilizează suplimente cu acid folic, însă doamnele cu nivel general sau mediu de instruire nu dispun de informaţie cum şi când să administreze acidul folic şi cât de eficiente sunt acestea pentru conceperea şi menţinerea sarcinii.

În cadrul cercetării, se atestă (Tabelul 1) că ASR secundar a survenit mai des la pacientele care au administrat suplimentele cu acid folic doar în primele 3 luni de graviditate decât la pacinetele care au administrat suplimentele cu acid folic atât în perioada preconcepţională, cât şi în primul trimestru de sarcină (32,0% IÎ95: 19,07 – 44,93 versus 6,0% IÎ95: -0,58 – 12,58) şi ASR precoce a survenit, de asemenea, mai des la pacientele care au administrat suplimentele cu acid folic doar în primele 3 luni de graviditate decât la pacinetele care au administrat suplimentele cu acid folic atât în perioada preconcepţională, cât şi în primul trimestru de sarcină (64,0% IÎ95: 50,70 – 77,30 versus 36,0% IÎ95: 22,70 – 49,30).

Tabelul 1. Utilizarea suplimentelor cu acid folic în raport cu nivelul educaţional şi mediul de trai la pacientele cu ASR din lotul de studiu

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Perioada de preconcepţie + primul trimestru de sarcină | Primul trimestru de sarcină |
| Abs. | % | IÎ95 | Abs. | % | IÎ95 |
| 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 educaţional | 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 |
| ASR | 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 |
| ASR | 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 preconcepţie şi pe parcursul sarcinii, în condițiile în care folaţii alimentari se absorb în procent de aproximativ 50% [5].

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. 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).

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).

Concentraţiile serice ale acidului folic, vitaminei B12 şi homocisteina serică totală au fost studiate în raport cu genotipurile polimorfismului MTHFR C677T (Tabelul 2).

Tabelul 2. Homocisteina serică, folatul seric şi vitamina B12 în raport cu genotipurile polimorfismului MTHFR C677T

|  |
| --- |
| **Genotipul polimorfismului MTHFR C677T** |
|  | CCn = 19 | CTn = 24 | TTn = 7 | CC/CTt, p | CC/TTt, p | CT/TTt, 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 B12 (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 hiperhomocisteinemiei (≥12 µmol/L) a fost cea mai mare la pacientele cu genotipul 677TT MTHFR (23,64±2,56 µmol/L) pe fon de concentraţie joasă ale folatului seric şi vitaminei B12 în comparaţie cu pacientele cu polimorfismul 677CC (11,81±1,43 µmol/l) (p <0.001). Această ipoteză a fost constatată şi demonstrată în referinţe detailate în literatura de specialitate. Mutațiile genei MTHFR sunt factorul de risc cel mai cunoscut și studiat pentru nivelul homocisteinei crescute [6,7,8].

Studiile recente indică legatura între un nivel scăzut de acid folic şi prezenţa hiperhpmocisteinemiei în prezenţa polimorfismului MTHFR 677TT [7,8]. Interacțiunea dintre nivelul seric al acidului folic și prezenţa polimorfismului MTHFR C677T ca determinanți ai concentraţiei plasmatice de homocisteină este în continuare demonstrată în tabelul 3. Tabelul 3 prezintă concentraţiile serice ale homocisteinei totale şi acidului folic în raport cu genotipul polimorfismului MTHFR C677T în dependenţa de statutul seric al acidului folic (folatul seric < 13,5 nmol/L şi folatul seric > 13,5 nmol/L).

Tabelul 3. Concentraţiile serice ale homocisteinei totale şi acidului folic în raport cu genotipul polimorfismului MTHFR C677T în dependenţa de statutul seric al acidului folic

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

Influenţa genotipului TT al MTHFR asupra nivelul homocisteinei serice totale a fost observat, cu certitudine, atunci când folatul seric a fost mai mic de 13,5 nmol/L. Menţionăm că nu s-a depistat nici o pacientă cu genotipul TT al MTHFR când folatul seric a fost mai mare de 13,5 nmol/L. De remarcat că, 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±6,27 versus 13,64±6,61 μmol/l, p >0.05) când folatul seric a fost mai mic de 13,5 nmol/L, în timp ce această diferenţă este mult mai mică când folatul seric este mai mare de 13,5 nmol/L la pacientele cu genotipurile CC şi CT (valoarea medie a homocisteinei: 8,68±3,49 şi 9,17±4,34 μmol/l, p>0.05).

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

Acidul folic reprezintă o „vitamină” cu importanţă vitală, necesară pentru evoluţia normală a proceselor de creştere, dezvoltare şi proliferare tisulară, în special pentru dezvoltarea sistemului hematopoietic, imun şi evoluţia normală a embriogenezei [9].

Stern şi colab. şi Frisco şi colab. au demonstrat că deficitul de acid folic şi activitatea redusă genetic determinată a enzimei MTHFR rezultă într-o capacitate diminuată a reacţiei de metilare a homocisteinei la metionină şi o producţie 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 şi colab. şi Reik și Walter au constatat 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% IÎ95: 36,15 – 63,85), deficitul de acid folic s-a întâlnit la 7 paciente (14,0% IÎ95: 4,39 – 23,61) şi deficitul de vitamina B12, de asemenea, s-a întâlnit la 7 paciente (14,0% IÎ95: 4,39 – 23,61).
2. Evaluarea prezenţei genotipului modificat (CT + TT) a evidenţiat prezenţa mutaţiei genei MTHFR în poziţia 677 la 31 paciente (62.0% IÎ95: 48,55 – 75,45), total alele mutante 38,0% (IÎ95: 28,49 – 47,51).
3. Incidența hiperhomocisteinemiei (≥12 µmol/L) a fost cea mai mare la pacientele cu genotipul 677TT MTHFR (23,64±2,56 µmol/L) pe fon de concentraţie joasă ale folatului seric şi vitaminei B12 în comparaţie cu pacientele cu polimorfismul 677CC (11,81±1,43 µmol/l) (p <0.001).
4. 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±6,27 versus 13,64±6,61 μmol/l, p >0.05) când folatul seric a fost mai mic de 13,5 nmol/L, în timp ce această diferenţă este mult mai mică când folatul seric este mai mare de 13,5 nmol/L la pacientele cu genotipurile CC şi CT (valoarea medie a homocisteinei: 8,68±3,49 şi 9,17±4,34 μmol/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. 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.
4. Cao Y. et al. The association of idiopathic recurrent early pregnancy loss with polymorphisms in folic acid metabolism-related genes. În: [Genes & Nutrition](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjM4fq59K_QAhWDFiwKHW0uDk8QFgg5MAM&url=http%3A%2F%2Fwww.springer.com%2Fbiomed%2Fhuman%2Bgenetics%2Fjournal%2F12263&usg=AFQjCNEILe1gooCrU-0tPzd_RIy4LAbiRg&bvm=bv.139138859,d.bGg), 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 chemistrz and laboratorz 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. ş. a. Acidul folic: influenţa asupra sarcinii şi lactaţiei. În: Buletin de Perinatologie, 2008, nr. 1, p. 57 – 59.
10. 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.
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. Moşin V. Ginecologie Reproductivă. Chişinău, 2010, 618p
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. Neagoş D. ş. a. Polimorfismele C677T şi A1298C ale genei metilentetrahidrofolat reductază la pacientele cu avorturi spontane în populaţia din România. În: Revista Medicală Română, 2012, nr. 4, p. 315 – 320.
19. Opopol N., Obreja G., Ciobanu A. Nutriţia în sănătatea publică. Chişinău: Casa editorial-poligrafică Bons Offices, 2006. 68p.
20. Platon E. ş. a. Rolul factorilor genetici şi negenetici în avorturile spontane recurente. În: Anale Ştiinţifice ale Universităţii de Stat de Medicină şi Farmacie “Nicolae Testemiţanu”, 2009, vol. 2, p. 221 – 227. Anale Ştiinţifice ale Universităţii de Stat de Medicină şi Farmacie “Nicolae Testemiţanu”, 2009, vol. 2, p. 221 – 227.
21. Sacară V. ş. a. Frecvenţa variantelor alelei C677T în gena 5,10-metilentetrahidrofolatreductaza ca factor genetic predispozant în apariţia defectelor tubului neural şi a malformaţiilor congenitale dependente de acid folic în populaţia Republicii Moldova. În: Buletin de Perinatologie, 2009, nr. 3, p. 215 – 219.
22. Ştefănescu C., Aşchie 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 Naţional de Perinatologie (volumul 2) „Protocoale de îngrijire şi tratament în obstetrică şi neonatologie”. Chişinău, 2005. 14p., 28p.
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](http://www.who.int/entity/nutrition/publications/guidelines/antenatalcare-pregnancy-positive-experience/en/index.html). Geneva, World Health Organization, 2016. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250796/1/9789241549912-eng.pdf?ua=1> (vizitat 20.12.2016)