

HOMOCISTEINA ȘI POLIMORFISMELE GENEI MTHFR LA FEMEILE CU AVORT SPONTAN RECURENT

HOMOCYSTEINE AND MTHFR POLYMORPHISM IN WOMEN WITH RECURRENT MISCARRIAGES

Veaceslav Moșin, d.h.ș.m., profesor universitar^{1,2}, **Alina Hotineanu**, dr. med.², **Elena Visternicean**, doctorand¹, **Adrian Crețu**²

¹ *Catedra Obstetrică și Ginecologie Nr. 2, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”*

² *Centrul medical „Repromed”*

Rezumat

Homocisteina este un aminoacid care conține sulf și este un produs intermediar derivat din metabolismul metioninei. Metilentetrahidrofolat reductaza (MTHFR) este o enzimă cheie implicată în metabolismul folatului și catalizează conversia 5,10-metilentetrahidrofolat în 5-metiltetrahidrofolat, transferând grupul metil pentru remetilarea homocisteinei în metionină. Homocisteina și polimorfismul MTHFR C677T sunt implicate în dezvoltarea și apariția patologiilor obstetricale, legate de insuficiența placentară, precum: preeclampsia, pierderea recurentă a sarcinii, nașterea prematură, restricția de creștere intrauterină a fătului și decolarea de placenta normal înserată. Scopul acestui studiu a fost de a evalua concentrația serică totală de homocisteină și polimorfismele genei MTHFR la femeile cu avort spontan recurent. Cercetarea reprezintă un studiu descriptiv transversal și inclus 50 de femei care au prezentat cel puțin 2 avorturi spontane consecutive în antecedente. Homocisteina serică totală a fost determinată prin metoda chemiluminiscență și polimorfismele genetice MTHFR C677T și MTHFR A1298C au fost evaluate. Pentru detectarea genotipurilor MTHFR C677T și MTHFR A1298C s-au realizat reacțiile PCR/RFLP (reacție de polimerizare în lanț și polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție). La 25 paciente (50,0%, $I\ddot{I}_{95}$: 36,15 – 63,85) s-au determinat valori semnificativ crescute ale homocisteinei serice totale. Genotiparea polimorfismelor MTHFR C677T și MTHFR A1298C relevă faptul că 24 paciente (48,0% $I\ddot{I}_{95}$: 34,16 – 61,84) sunt heterozigote 677CT și 7 paciente (14,0% $I\ddot{I}_{95}$: 4,39 – 23,61) sunt homozigote 677TT, 25 paciente (50,0% $I\ddot{I}_{95}$: 36,15 – 63,85) sunt heterozigote 1298AC și 5 paciente (10,0% $I\ddot{I}_{95}$: 1,69 – 18,31) sunt homozigote 1298CC. Incidența hiperhomocisteiniei a fost cea mai mare la pacientele cu genotipul 677TT MTHFR ($23,64 \pm 2,56 \mu\text{mol/l}$) în comparație cu pacientele cu polimorfismul 677CC ($11,81 \pm 1,43 \mu\text{mol/l}$) ($p < 0.001$).

Summary

Homocysteine is a sulfur-containing intermediate product in the normal metabolism of methionine. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) is an important enzyme in the metabolism of folic acid and converts 5,10-methylene tetrahydrofolate into 5-methyl tetrahydrofolate, providing a methyl group for conversion of homocysteine into methionine. Homocysteine and polymorphism MTHFR C677T are associated with an increased risk of a placental vasculopathy, which in turn is related to preeclampsia, recurrent early pregnancy loss, premature delivery, low birth weight, and placental abruption or infarction. The purpose of the study was to evaluate maternal homocysteine concentration and MTHFR polymorphisms in women with recurrent miscarriages. This study has a cross-sectional design and included 50 women who had experienced the loss of at least two consecutive pregnancies. The level of the total serum homocysteine was measured via the chemiluminescent method and C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene were evaluated. The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was applied to detect the MTHFR C677T and MTHFR A1298C genotypes. We found that 25 patients (50,0%, 95%CI 36,15 – 63,85) had significantly high total serum homocysteine values. The genotype and allele frequencies of the C677T and A1298C polymorphisms of MTHFR gene were analyzed: 24 patients were heterozygous for 677CT (48,0%, 95%CI 34,16 – 61,84) and 7 patients were homozygous for 677TT (14,0%, 95%CI 4,39 – 23,61), 25 patients were heterozygous for 1298 AC (50,0%, 95%CI 36,15 – 63,85) and 5 patients 11 were homozygous for 1298CC (10,0%, 95%CI 1,69 – 18,31). Women homozygous for the 677T allele had significantly increased fasting total serum homocysteine ($23,64 \pm 2,56 \mu\text{mol/l}$), compared with women homozygous for the wild-type allele 677C ($11,81 \pm 1,43 \mu\text{mol/l}$) ($p < 0.001$).

Introducere

Pierderea sarcinii reprezintă o afecțiune multifactorială, cauzată de diferiți factori, printre care mutații genice, anomalii structurale ale uterului, vârsta mamei, infecțiile genitale, etc [12]. În ultimii ani, detecția mutațiilor trombofilice a câștigat unul dintre locurile fruntașe printre factorii de risc răspunzători de pierderile recurente de sarcină. În literatura de specialitate există lucrări care sugerează o strânsă interrelație între trombofilii ereditare și pierderile recurente de sarcină [4].

Studii mai recente au evidențiat că o serie de patologii obstetricale, inclusiv pierderea recurentă de sarcină, sunt condiționate de mutații ereditare și polimorfisme cu potențial trombofilic, reprezentate prin hiperhomocisteinemie [23]. Implicația homocisteinei în patologia vasculară a fost dovedită în numeroase studii [6,8,16]. Există dovezi circumstanțiale

relevante care sugerează că concentrațiile sporite de homocisteină conduc la disfuncția endotelială, mediată prin stresul oxidativ, și lezarea endoteliului, urmată de activare plachetară și formare de trombus [10,17]. În timpul sarcinii dereglările de microcirculație afectează funcția placentară [17,24].

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 înserată și nașterea prematură [1,3,7,9,18,24]. Acumularea homocisteinei în circulație este generată de polimorfismul genei metilentetrahidrofolat reductazei MTHFR [3,7,8].

Schimbarea C în T la poziția 677 nucleotidică a genei MTHFR a fost intensiv studiată, consecințele sale clinice fiind dependente

de starea folatului, pe când al doilea polimorfism – schimbarea A în C în poziția 1298 nucleotidică este mai puțin clar conturată [19]. Este relevant faptul că starea de heterozigot compus pentru C677T și A1298C se asociază cu activitate enzimatică redusă, nivel ridicat de homocisteină și concentrații plasmatice scăzute de foliați [18]. Statutul heterozigot combinat 677CT / 1298AC are un impact clinic similar ca statutul homozigot compus C677T, fapt confirmat în cercetările efectuate de către Chango și colab. și Chen și colab. [19].

Polimorfismele la nivelul genei MTHFR afectează metabolismul homocisteinei și reprezintă factori de risc independenți pentru avort spontan [4].

Studiile efectuate de Lissak și colab. și Durnwald și colab. raportează asocierea polimorfismului homozigot mutant C677T MTHFR și nivelul scăzut al folatului seric, hiperhomocisteinemie și avort precoce [21]. Mtiraoui și colab. au demonstrat că statul homozigot pentru polimorfismele C677T și A1298C ale genei MTHFR reprezintă factori de risc pentru pierderea recurentă a sarcinii, indiferent de concentrația serică a homocisteinei [19].

Scopul lucrării

Evaluarea nivelului seric al homocisteinei și polimorfismelor la nivelul genei MTHFR la femeile cu avort spontan recurent.

Materiale și metode

Studiul actual a fost realizat ca un studiu descriptiv, de tip transversal, la care au participat 50 de femei cu pierderi spontane de sarcină. Au fost recrutate doar paciente care prezentau cel puțin 2 avorturi spontane consecutive în antecedente. Programul de examinare a inclus: anchetarea, determinarea serică a homocisteinei și efectuarea testelor molecular genetice cu identificarea polimorfismelor MTHFR C677T și MTHFR A1298C.

Homocisteina serică totală a fost determinată prin metoda chemiluminiscență. Specimen recoltat: sânge venos, recoltat dimineața, în condiții „a jeun” – pe nemâncate.

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 s-au realizat reacțiile PCR/RFLP (reacție de polimerizare în lanț și polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție). ADN-ul genomic a fost amplificat utilizând polimeraza Dream Taq („Fermentas” USA), la termociclul „Tprofessional Basic 96” (Biometra, Germania). Condițiile reacției sunt similare pentru toate polimorfismele cu excepția temperaturii de aliniere a primelor: 60.4°C pentru MTHFR C677T, 61°C pentru MTHFR A1298C. Ampliconii au fost supuși restricției timp de 3 ore la 37°C cu enzimele de restricție specifice pentru fiecare polimorfism: Hinf I pentru MTHFR C677T, Mbo II pentru MTHFR A1298C. Verificarea produșilor de restricție s-a efectuat prin electroforeză în gel de PAAG (poliacrilamidă) cu concentrația de 7,5% - sub condițiile: 200 V timp de 3 ore. Gelul a fost colorat cu soluție de etidiu. Iar rezultatele au fost vizualizate la sistemul UV SOLO (Germania).

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 (II) pentru 95%. Semnificația statistică pentru comparația valorilor medii a fost apreciată prin calcularea

testului de semnificație (t – Student) și pragul de semnificație (p).

Rezultatele și discuții

Valorile individuale ale homocisteinei înregistrate în lotul de studiu s-au încadrat în limitele 2,19 – 34,7 μmol/l. 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% II₉₅: 36,15 – 63,85) valorile homocisteinei se încadrează în limitele normale. Valoarea serică a homocisteinei ce depășea 12 μmol/l s-a întâlnit, de asemenea, la 25 paciente (50,0% II₉₅: 36,15 – 63,85). Dintre acestea, 23 paciente (46,0% II₉₅: 32,19 – 59,81) au avut concentrația homocisteinei totale cuprinsă între 12-30 μmol/l și 2 paciente (4,0% II₉₅: -1,43 – 9,43) au avut concentrația homocisteinei totale > 30 μmol/l. Nu a fost înregistrat nici un caz de hiperhomocisteinemie severă.

Rezultatele noastre susțin sursele de literatură, precum că hiperhomocisteinemia ușoară și moderată este frecvent asociată defectelor vitaminice și genetice, implicând mutații la nivelul genei MTHFR, iar forma severă este asociată homocistinuriei sau bolilor congenitale severe [13]. Vollset și colab. sugerează că nivelul plasmatic al homocisteinei >10 μmol/l este responsabil de apariția complicațiilor în sarcină. Iar perfuzia placentară alterată din cauza hiperhomocisteinemiei produce efecte negative asupra sarcinii [22].

Genotiparea polimorfismului MTHFR C677T relevă faptul că 19 paciente (38,0% II₉₅: 24,55 – 51,45) au avut genotipul normal CC, 24 paciente (48,0% II₉₅: 34,16 – 61,84) au fost heterozigote CT și 7 paciente (14,0% II₉₅: 4,39 – 23,61) au fost homozigote pentru alela mutantă TT (Tabelul 1). Analiza polimorfismului MTHFR C677T a identificat o frecvență a alelei C de 62,0% (II₉₅: 52,49 – 71,51) și o frecvență a alelei mutante T de 38,0% (II₉₅: 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% II₉₅: 48,55 – 75,45).

Cercetarea prezenței mutației A>C în poziția 1298 a genei MTHFR arată că 20 paciente (40% II₉₅: 26,43 – 53,57) au genotipul normal AA, 25 paciente (50,0% II₉₅: 36,15 – 63,85) au fost heterozigote AC și 5 paciente (10,0% II₉₅: 1,69 – 18,31) sunt homozigote pentru alela mutantă CC (Tabelul 1). Am constatat că purtătoarele alelei A pentru polimorfismul MTHFR A1298C au prezentat o frecvență de 65,0% (II₉₅: 55,66 – 74,34), iar purtătoarele alelei mutante C au înregistrat o frecvență de 35,0% (II₉₅: 25,66 – 44,34).

Când pacientele din lotul de studiu au fost împărțite în două categorii, cu genotip normal și genotip modificat în poziția 1298 a genei MTHFR, s-a observat că 30 paciente (60,0% II₉₅: 47,3 – 72,7) au genotip modificat (AC+CC).

Tabelul 1

Frecvența genotipurilor polimorfismelor MTHFR C677T și A1298C la pacientele din lotul de studiu cu ASR

Genotipurile polimorfismelor testate	Abs.	%	II ₉₅
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

Polimorfismele multiple de la nivelul aceleiași gene ar putea stimula expresia acesteia, expresia proteinei sau funcția proteinei, astfel încât am considerat că ar fi interesant să analizăm genotipul de cosegregare pentru MTHFR (C677T și A1298C) în grupul de studiu. Am analizat în continuare modul de 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 [11,15].

În baza rezultatelor obținute a fost efectuată distribuția polimorfismelor și combinațiile genotipice ale genei MTHFR (Tabelul 2).

Tabelul 2

Combinațiile genotipice ale genei MTHFR (677/1298) în lotul de studiu

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

Cele mai răspândite s-au dovedit a fi variantele C677T/A1298C (28,0% I₉₅: 15,56 – 40,44), C677C/A1298C (22,0% I₉₅: 10,52 – 33,48), C677T/A1298A (20,0% I₉₅: 8,92 – 31,08). Incidența moderată e la următoarele variante: T677T/A1298A (14,0% I₉₅: 4,39 – 23,61), C677C/C1298C (10,0% I₉₅: 1,69 – 18,31) și C677C/A1298A (6,0% I₉₅: -0,58 – 12,58).

Din cele expuse se atestă că în cercetarea noastră lipsesc următoarele combinații alelice: C677T/C1298C, T677T/A1298C și T677T/C1298C, ceea ce corespunde cu datele literaturii, precum că combinațiile polimorfismelor MTHFR: C677T/C1298C, T677T/A1298C sunt rar întâlnite, iar combinația homozigot pentru ambele mutații T677T/C1298C nu poate fi întâlnită [11,15].

În prezența mutațiilor genice, este posibil ca valoarea serică de homocisteină să nu poată fi reglementată în mod corespunzător. În acest context, scopul a fost determinarea și compararea modificărilor concentrației de homocisteină în raport cu genotipurile MTHFR C677T și MTHFR A1298C. Ținem să menționăm că rezultatele cercetării au evidențiat diferențe între nivelul homocisteinei serice în raport cu genotipurile studiate (Tabelul 3).

Tabelul 3

Homocisteina serică în raport cu genotipurile polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C la pacientele cu avort recurent

Nivelul homocisteinei serice totale, (μmol/l)	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
	11,81±1,43	11,58±1,10	23,64±2,56	0.1275 >0.05	4.0343 <0.001	4.3286 <0.001
Nivelul homocisteinei serice totale, (μmol/l)	Genotipul polimorfismului MTHFR A1298C					
	AA n = 20	AC n = 25	CC n = 5	AA/AC t, p	AA/CC t, p	AC/CC t, p
	14,11±1,89	13,11±1,33	11,65±2,02	0.4327 >0.05	0.8863 >0.05	0.6037 >0.05

Prezența alelelor mutante au avut o influență asupra nivelului seric al homocisteinei, cu excepția polimorfismului MTHFR A1298C. Pacientele care au fost homozigote pentru alela mutantă pentru polimorfismul MTHFR C677T au prezentat valorile homocisteinei semnificativ mai mari decât cele înregistrate comparativ cu genotipul sălbatic al acestui polimorfism. Incidența hiperhomocisteinemiei (≥12 μmol/l) a fost cea mai mare la pacientele cu genotipul 677TT MTHFR (23,64±2,56 μmol/l) în comparație cu pacientele cu polimorfismul 677CC (11,81±1,43 μmol/l) (p <0.001). Luând în considerație divergența valorilor medii a homocisteinei în dependență de genotipurile polimorfismelor MTHFR C677T și MTHFR A1298C, am analizat în continuare concentrația serică a homocisteinei după modul de înlănțuire a alelelor genelor MTHFR 1298 și MTHFR 677 (Tabelul 4), care sunt în dezechilibru de înlănțuire.

Tabelul 4

Concentrația serică a homocisteinei în raport cu combinațiile genotipice ale genei MTHFR (677/1298) în lotul de studiu

Combinații de genotipuri MTHFR		Valoarea serică a homocisteinei (μmol/l)
677	1298	
CC	AA	10,5±0,07
CC	AC	12,24±2,4
CC	CC	11,65±2,02
CT	AA	8,49±0,88
CT	AC	13,80±1,57
CT	CC	0
TT	AA	23,68±2,55
TT	AC	0
TT	CC	0

Rezultatele testărilor concentrației serice a homocisteinei în ceea ce privește polimorfismele genei MTHFR 677 și 1298 au evidențiat prezența hiperhomocisteinemiei în prezența haplotipurilor 677CT/1298AC (starea de heterozigoție compusă) și 677TT/1298AA. Se pare că mutația din poziția 1298 în forma homozigotă sau heterozigotă duce la creșterea homocisteinemiei numai dacă se asociază cu o mutație în poziția 677, homozigotă sau heterozigotă. Această ipoteză a fost constatată și demonstrată în referințe detaliate în literatura de specialitate. Mutațiile genei MTHFR sunt factorul de risc cel mai cunoscut și studiat pentru nivelul homocisteinei crescute. Comparând rezultatele noastre cu studii similare

am constatat atât unele similitudini cât și diferențe în ceea ce privește polimorfismul MTHFR C677T și A1298C. Analizând nivelul homocisteinei în raport cu genotipurile polimorfismului MTHFR A1298C la pacientele incluse în studiu, am constatat că genotipul mutant 1298CC MTHFR nu este asociat cu hiperhomocisteinemie ($11,65 \pm 2,02 \mu\text{mol/l}$).

Studiile lui van der Pune și colab. demonstrează că cel de-al doilea polimorfism al genei MTHFR: A1298C nu pare a fi asociat cu hiperhomocisteinemie [8]. Comparativ cu aceste studii, cercetarea noastră corespunde concluziilor autorilor care susțin că nu există o asociere între polimorfismul MTHFR A1298C și hiperhomocisteinemie.

Purtătorii genotipului mutant 677TT MTHFR în studiile lui Jacques și colab. prezintă hiperhomocisteinemie [14]. Mai mult, prezența mutației genei MTHFR în sine a fost, de asemenea, legată cu avortul spontan recurent [2,5].

Concluzii

1. Evaluarea prezenței genotipului modificat (CT+TT) a

evidențiat prezența mutației genei MTHFR în poziția 677 la 31 paciente (62,0% $\text{I}_{95}^{\text{sup}}$: 48,55 – 75,45), total alele mutante 38,0% ($\text{I}_{95}^{\text{sup}}$: 28,49 – 47,51). Genotip modificat (AC+CC) în poziția 1298 a genei MTHFR s-a observat la 30 paciente (60,0% $\text{I}_{95}^{\text{sup}}$: 47,3 – 72,7), total alele mutante 35,0% ($\text{I}_{95}^{\text{sup}}$: 25,66 – 44,34).

2. Pacientele care au fost homozigote pentru alela mutantă pentru polimorfismul MTHFR C677T au prezentat valorile homocisteinei semnificativ mai mari decât cele înregistrate comparativ cu genotipul sălbatic al acestui polimorfism. Incidența hiperhomocisteinemiei ($\geq 12 \mu\text{mol/L}$) a fost cea mai mare la pacientele cu genotipul 677TT MTHFR ($23,64 \pm 2,56 \mu\text{mol/L}$) în comparație cu pacientele cu polimorfismul 677CC ($11,81 \pm 1,43$) ($p < 0,001$).

3. Valoarea homocisteinei serice totale a fost mai mare în prezența haplotipurilor 677CT/1298AC (starea de heterozigoție compusă) și 677TT/1298AA. Se pare că mutația din poziția 1298 în forma homozigotă sau heterozigotă duce la creșterea homocisteinemiei numai dacă se asociază cu o mutație în poziția 677, homozigotă sau heterozigotă.

Bibliografie

1. Alan L. et al. Homocysteine metabolism: nutritional modulation and impact on health and disease. În: *Alternative Medicine Review*, 1997, nr. 4, p. 234 – 254.
2. 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.
3. 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
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Finkelstein J. The metabolism of homocysteine: pathways and regulations. În: *European journal of pediatrics*, 1998, nr. 157 (supplement 2), p. S40 – S44.
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. Glijin C. Impactul hiperhomocisteinemiei în complicațiile obstetricale. În: *Anale Științifice ale Universității de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu"*, 2010, vol. 5, p. 135 – 139.
10. Herrmann W., Obeid R. Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases. În: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2011, vol. 49, nr. 3, p. 435 – 441.
11. Hickey S. et al. ACMG Practice Guideline: lack of evidence for MTHFR polymorphism testing. În: *Genetics in medicine*, 2013, vol. 15, nr. 2, p. 153 – 156.
12. Hlistun V. ș. a. Genele de faza a II – a (GSTM1, GSTT1, GSTP1) a detoxificării xenobioticelor la femeile cu pierderi reproductive din Republica Moldova. În: *Buletin de perinatologie*, 2014, nr. 1, p. 47 – 52.
13. Hoțoleanu C. ș. a. Noi factori de risc în trombozele venoase profunde. În: *Clujul Medical*, 2007, nr. 3, p. 578 – 582.
14. Jacques P. et al. Relation Between Folate Status, a Common Mutation in Methylenetetrahydrofolate Reductase, and Plasma Homocysteine Concentrations. În: *Circulation*, 1996, vol. 93, nr. 1, p. 7 – 9.
15. Kozma K. Polimorfismul genei MTHFR (677 și 1298) la femeile cu avorturi spontane din județul Bihor. În: *Revista Medicală Română*, 2015, nr. 2, p. 195 – 199.
16. Malinowska J. et al. Comparison of the effect of homocysteine in the reduced form, its thiolactone and protein homocysteinylaton on hemostatic properties of plasma. În: *Thrombosis Research*, 2011, vol. 127, p. 214 – 219.
17. 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.
18. Moșin V. ș. a. Hiperhomocisteinemia și patologia reproductivă. În: *Buletin de Perinatologie*, 2014, nr. 1, p. 40 – 46.
19. 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.
20. OpenEpi 2.3.1 – Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, <http://www.openepi.com> (vizitat 16.11.2016)
21. Platon E. ș. a. Rolul factorilor genetici și negenetici în avorturile spontane recurente. În: *Anale Științifice ale Universității de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu"*, 2009, vol. 2, p. 221 – 227
22. Vollset S. et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. În: *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, vol. 71, p. 962 – 968.
23. Миктадова А. и соавт. Полиморфизм генов фолатного цикла и предрасположенность к сердечно-сосудистым заболеваниям. În: *Главный Врач*, 2011, n 4, p. 16 – 18.
24. Фетисова И. и соавт. Полиморфизм генов фолатного обмена и болезни человека. În: *Вестник Новых Медицинских Технологий*, 2007, vol. 10, n 1, p. 23 – 28.