

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE
AL REPUBLICII MOLDOVA
IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU”**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U.:618.39-021.3-008.9+577.112.386

VISTERNICEAN ELENA

**ROLUL DEREGLĂRILOR METABOLISMULUI METIONINEI LA FEMEILE CU
AVORT SPONTAN RECURENT: DIAGNOSTIC ȘI CORIJARE**

321.15 – OBSTETRICĂ ȘI GINECOLOGIE

Teză de doctor în științe medicale

Conducător științific

Veaceslav Moșin,
doctor habilitat în științe medicale,
profesor universitar
(321.15 – obstetrică și ginecologie)

Autor

Elena Visternicean

CHIȘINĂU, 2018

© Visternicean Elena, 2018

CUPRINS

ADNOTARE (în română, rusă și engleză)	5
LISTA ABREVIERILOR	8
INTRODUCERE	9
1. DEREGLĂRILE METABOLISMULUI METIONINEI, VITAMINELE GRUPULUI B ȘI ROLUL LOR ÎN AVORTUL SPONTAN	18
1.1. Metabolismul metioninei și homocisteinei. Impactul clinic al hiperhomocisteinемiei .18	
1.2. Vitaminele din grupul B și rolul lor în dezvoltarea hiperhomocisteinемiei.....	33
1.3. Implicațiile homocisteinei și vitaminelor grupului B în pierderea fetală	36
1.4. Concluzii la capitolul 1	42
2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE	44
2.1. Caracteristica generală a cercetării: grupul de cercetare, etapele și designul studiului ..	44
2.2. Metodele clinico-paraclinice de examinare și cercetare	48
2.3. Metodele de evaluare statistică pentru analizarea rezultatelor	54
2.4. Concluzii la capitolul 2	55
3. PARTICULARITĂȚILE ANAMNESTICE OBSTETRICAL-GINECOLOGICE ȘI ANALIZELE DE LABORATOR LA PACIENTELE CU AVORT SPONTAN RECURENT	57
3.1. Caracteristicile socio-demografice și particularitățile anamnezei obstetrical-ginecologice ale pacientelor incluse în studiu	57
3.2. Evaluarea nivelului seric al homocisteinei, folatului seric, vitaminei B ₁₂ și corelarea lor la pacientele incluse în cercetare.....	72
3.3. Concluzii la capitolul 3	80
4. FRECVENȚA POLIMORFISMELOR GENELOR MTHFR, MTR, MTRR ȘI IMPLICAȚIILE LOR ÎN AVORTUL SPONTAN RECURENT	83
4.1. Identificarea și asocierea polimorfismelor genetice MTHFR, MTR și MTRR la pacientele incluse în studiu	83
4.2. Aprecierea corelațiilor genetice și fenotipice ai parametrilor studiați și implicațiile lor la pacientele cu avort spontan recurent.....	93
4.3. Stratificarea riscului obstetrical și managementul clinic al pacientelor cu avort spontan recurent	107
4.4. Concluzii la capitolul 4	114
SINTEZA REZULTATELOR OBȚINUTE	117
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	127
BIBLIOGRAFIE	129

ANEXE	146
Anexa 1. Formular de anchetă	146
Anexa 2. Factorii care influențează nivelul plasmatic al homocisteinei.....	155
Anexa 3. Hiperhomocisteinemia și patologia vasculară	157
Anexa 4 Echilibrul Hardy-Weinberg pentru polimorfismele MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G la pacientele din studiu.....	159
Anexa 5. Frecvența genotipurilor polimorfismelor MTHFR, MTR și MTRR la pacientele din studiu.....	160
Anexa 6. Relația dintre genotipurile polimorfismelor testate cu termenul la care s-a produs avortul spontan recurent la pacientele din lotul de bază	161
Anexa 7. Relația dintre genotipurile polimorfismelor testate cu frecvența avorturilor spontane în antecedente la pacientele cu avort spontan recurent.....	162
Anexa 8. Algoritm diagnostic și terapeutic în trombofilia ereditară	163
Anexa 9. Acte de implementare și certificat de drept de autor	164
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	169
CURRICULUM VITAE	170

ADNOTARE

Visternicean Elena

„Rolul dereglărilor metabolismului metioninei la femeile cu avort spontan recurent: diagnostic și corijare”, teză de doctor în științe medicale, Chișinău, 2018.

Teza este constituită din introducere, 4 capitole, concluzii și recomandări, bibliografie cu 200 de surse, 9 anexe, 128 pagini de bază, 35 tabele și 25 figuri. Rezultatele obținute sunt publicate în 10 lucrări științifice, inclusiv 4 articole fără coautor, 3 teze în materialele comunicărilor științifice internaționale, 1 îndrumare metodică.

Cuvinte-cheie: avort spontan recurent, homocisteină, polimorfism, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G, trombofilie

Domeniul de studiu: Obstetrică și ginecologie.

Scopul cercetării: Diagnosticul dereglărilor metabolismului metioninei la femeile cu avort spontan recurent pentru optimizarea managementului terapeutic.

Obiectivele cercetării: (1) evaluarea particularităților medico-sociale a femeilor cu avort spontan recurent; (2) aprecierea nivelului seric al homocisteinei, vitaminei B₁₂, acidului folic, frecvenței polimorfismelor genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G, și impactul lor asupra avortului spontan recurent; (3) identificarea relațiilor dintre nivelul seric al homocisteinei, vitaminei B₁₂, acidului folic și polimorfismele genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G la femeile cu avort spontan recurent; (4) evaluarea eficacității terapeutice, monitorizarea parametrilor hemostazei și homocisteinei la gravidele cu dereglările metabolismului metioninei; (5) elaborarea recomandărilor privind managementul clinic al pacientelor cu dereglări ale metabolismului metioninei.

Noutatea și originalitatea științifică. Lucrarea oferă date cu privire la identificarea și interpretarea prevalenței, precum și stabilirea corelațiilor dintre parametrii biochimici (homocisteina, acidul folic, vitamina B₁₂) și polimorfismele genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G cu avortul spontan recurent și determinarea eficienței terapiei de corecție a metabolismului homocisteinei și tromboprofilaxiei la pacientele cu avort spontan recurent și dereglări ale metabolismului metioninei și homocisteinei.

Problema științifică soluționată în teză constă în aprecierea rolului factorilor genetici și biochimici în dezvoltarea avortului spontan recurent, identificarea căroră contribuie la evaluarea riscului pentru apariția complicațiilor obstetricale și optimizarea managementului terapeutic, printr-o abordare individualizată, la pacientele cu mutații genetice a enzimelor implicate în metabolismul homocisteinei și metioninei.

Semnificația teoretică a lucrării rezidă în faptul că rezultatele cercetării oferă perspective în cunoașterea rolului parametrilor biochimici (homocisteina, acidul folic, vitamina B₁₂) și polimorfismelor genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G în fiziopatologia avortului spontan recurent.

Valoarea aplicativă a lucrării constă în evaluarea dereglărilor metabolismului metioninei și homocisteinei, determinarea căroră este necesară pentru stratificarea riscului obstetrical și individualizarea conduitei obstetricale ulterioare la pacientele cu avort recurent. În baza cercetării efectuate a fost argumentat potențialul terapeutic al tromboprofilaxiei și terapiei de corecție a metabolismului homocisteinei prin survenirea și evoluția sarcinii, și depășirea termenului de 22 săptămâni de gestație.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele studiului au fost implementate în activitatea curativă a Centrului medical „Repromed” și IMSP Institutul Mamei și Copilului, or. Chișinău, Republica Moldova.

АННОТАЦИЯ

Вистерничан Елена

«Роль нарушений метаболизма метионина у женщин с привычным невынашиванием беременности: диагностика и коррекция», на соискание научной степени кандидата медицинских наук, Кишинев, 2018.

Диссертация состоит из введения, 4-ех глав, общих выводов и практических рекомендаций, библиографии включающей 200 источников, 9 приложений, 128-ух страниц основного текста, 35-и рисунков и 25-и таблиц. На основе диссертации было опубликовано 10 научных работ.

Ключевые слова: привычное невынашивание беременности, гомоцистеин, полиморфизм, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G, тромбофилия

Область исследования: Акушерство и гинекология.

Цель исследования: диагноз нарушений метаболизма метионина у женщин с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) для оптимизации терапевтического лечения.

Задачи исследования: (1) Оценка медико-социальных характеристик женщин с ПНБ; (2) Оценка уровня гомоцистеина в сыворотке крови, витамина B₁₂, фолиевой кислоты и определение генетических полиморфизмов MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G и MTRR A66G у женщин с ПНБ; (3) Определение корреляции между уровнем гомоцистеина в сыворотке крови, витамина B₁₂, фолиевой кислоты и генетических полиморфизмов MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G и их влияние у пациенток с ПНБ; (4) Оценка терапевтической эффективности, мониторинг состояния системы гемостаза и гомоцистеина у беременных с нарушений метаболизма метионина; (5) Разработки рекомендаций и менеджмента женщин с ПНБ и нарушений метаболизма метионина.

Научная новизна и оригинальность исследования. Работа содержит информацию о идентификации и интерпретации, а также, о корреляций между биохимическими параметрами (гомоцистеин, фолиевая кислота, витамин B₁₂) и генетическими полиморфизмами MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G с ПНБ. Эти результаты дают ценную информацию с практическими последствиями, которая может быть использована клиницистами в связи с ПНБ, для определения причин и создания соответствующих терапевтических стратегий.

Решенная научная проблема свидетельствует о роли генетических и биохимических факторов в патогенезе ПНБ. Это поможет оптимизировать и установить оценку степени риска акушерских осложнений у пациентов с генетическими мутациями ферментов, участвующих в метаболизме гомоцистеина и метионина, и определить терапевтические подходы во время последующей беременности.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что результаты исследований дают представление о роли знания биохимических параметров (гомоцистеин, витамин B₁₂, фолиевая кислота) и генетических полиморфизмов MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G и MTRR A66G в патофизиологии ПНБ.

Практическая значимость работы заключается в оценке метаболических нарушений метионина и гомоцистеина, определение которых необходимо для оценки степени риска осложнений беременности и проведения лечебных мероприятий у пациентов с ПНБ. Основываясь на результатах исследования, анализ эффективности применения комплексной профилактики коагулопатий и лечение гипергомоцистеинемии коррелировал с развитием и достижением 22-недельного срока беременности.

Внедрение результатов исследования. Результаты данного исследования были внедрены в практическую деятельность медицинского центра «Репромед» и Научно-Исследовательского Института Охраны Здоровья Матери и Ребенка, Кишинев, Республика Молдова.

SUMMARY

Visternicean Elena

“Role of methionine metabolism disorders in women with recurrent spontaneous abortion: diagnostic and correction”,

PhD thesis in Medical Sciences, Chisinau, 2018.

The thesis consists of introduction, 4 chapters, conclusions and recommendations, 200 bibliographical sources, 9 annexes, 128 basic pages, 35 tables and 25 figures. Obtained results were published in 10 scientific publications, including 4 articles without co-authors, 3 article in international scientific publications, 1 method guidance.

Keywords: recurrent pregnancy loss, homocysteine, polymorphism, MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G, thrombophilia

The research area: Obstetrics and gynecology.

Study aim: diagnosis of methionine metabolism disorders in women with idiopathic recurrent pregnancy loss for optimizing therapeutic management.

Study objectives: (1) evaluation of medico-social particularities of women with recurrent pregnancy loss; (2) assessment of serum homocysteine levels, vitamin B₁₂, folic acid and the frequency of the MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss; (3) identification of relations between serum homocysteine levels, vitamin B₁₂, folic acid and MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G polymorphisms and their implications in women with recurrent pregnancy loss; (4) evaluation of therapeutic efficacy, monitoring of hemostasis parameters and homocysteine in pregnant women with methionine metabolic disorders; (5) developing recommendations for clinical management of these patients.

The novelty and the scientific originality. The study provides information on prevalence and incidence, as well as correlations between biochemical parameters (homocysteine, vitamin B₁₂, folic acid) and MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G polymorphisms with recurrent pregnancy loss. These findings provide valuable information with practical implications for health care providers, that can be linked to recurrent pregnancy loss in order to identify the etiology and to establish a proper therapeutic strategy.

The scientific solved problem evidence the role of genetic and biochemical factors in the pathogenesis of recurrent pregnancy loss. This will help to optimize and identify the risk of obstetric complications in patients with genetic mutations of enzymes involved in homocysteine and methionine metabolism and will determine therapeutic approaches during the next pregnancy.

The theoretical significance of the study is that the research results provide insights into the role of knowledge of biochemical parameters (homocysteine, vitamin B₁₂ and folic acid) and MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G genetic polymorphisms in the pathophysiology of recurrent pregnancy loss.

The applicable value of the study is to evaluate the metabolic disturbances of methionine and homocysteine metabolism, the determination of which is necessary for the risk stratification and individualized approach to prophylaxis and therapy in patients with recurrent pregnancy loss. Based on the research, the efficacy of thromboprophylaxis and correction of hyperhomocysteinemia was argued by the evolution of pregnancy and exceeding 22 weeks gestation.

Implementation of scientific results. The study results were implemented in clinical work of Medical center “Repromed” and Scientific Research Institute of Mother and Child Health Care, Chisinau, Republic of Moldova.

LISTA ABREVIERILOR

5,10-MTHF – 5,10-metilentetrahidrofolat	MAT – Metionin adenzil-transferaza
5-MTHF – 5-metilterahidrofolat	MTHFR – Metilentetrahidrofolat reductaza
A – adenina	MTR – Metionin-sintetaza
ADMA – Dimetil arginina asimetrică	MTRR – Metionin-sintetaza-reductaza
ADN – Acid dezoxiribonucleic	NO – Oxid nitric
ARN – Acid ribonucleic	O₂ – Oxigen molecular
Ala – Alanină	OMS – Organizația Mondială a Sănătății
APTT – Timpul de tromboplastină parțial activată	OR – raportul șanselor
BHMT – Betain-homocistein-metil-transferaza	PAI-1 – Inhibitor al activatorului de plasminogen
Cbl – Cobalamină	PCR/RFLP – Reacțiile de polimerizare în lanț și polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție
CBS – Cistationin β-sintetază	PCR – Reacția de polimerizare în lanț
C – citozina	PEMT – Fosfatidiletanolamin-N-metiltransferaza
CGL – Cistationin- γ-liaza	PLAT – Activator tisular al plasminogenului
COC – Contraceptive orale combinate	RR – riscul relativ
DFE – Echivalent dietetic de folat	SAH – S-adenozil-homocisteină
DIU – Dispozitiv intrauterin	SAHH – Adenzil-homocisteinaza
EDTA – Acid etilendiaminotetraacetic	SAM – S-adenozil metionină
FIV – Fertilizare in vitro	SHMT – Serin-hidroximetil-transferaza
GAMT – Guanidinoacetate metiltransferaza	SNP – Schimbarea unei singure nucleotide
Gln – Glutamină	THF – Tetrahidrofolat
G – guanina	T – timina
GNMT – Glicin N-metil-transferaza	TORCH – Complexul TORCH: Toxoplasmoza, Alte infecții (sifilis, Varicella zoster, parvovirus R18), Rubella, Cytomegalovirus, Herpes
Î – Interval de încredere	Val – Valină
IMC – Indicele de masă corporală	
IMSP – Instituție Medico-Sanitară Publică	
ITGA2 – Integrin alpha 2	
ITGB3 – Integrin beta 3	

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța temei abordate

Avortul spontan reprezintă o problemă medicală frecventă [2; 15; 22]. Pierderea spontană a sarcinii rămâne, până în prezent, una dintre cele mai complexe și actuale probleme ale medicinei moderne [29].

Rata pierderilor reproductive este dificil de estimat, dar se consideră că mai mult de 50% din numărul total de sarcini care survin, se întrerup în termene timpurii, adeseori nefiind suspectate și înregistrate de femei. Aproximativ 10-20% din sarcinile înregistrate se termină cu pierderea spontană a sarcinii până la 20 săptămâni de gestație. Din ele, 80% se întrerup în primul trimestru de sarcină [15].

Pierderea spontană recurentă a sarcinii este definită drept pierderea a două sau mai multe sarcini consecutive [2; 22; 78; 117; 164; 174, p. 11]. Studiile epidemiologice au arătat că această patologie a sarcinii afectează aproximativ 1% dintre toate femeile [2; 15; 22; 29; 139; 167]. Datele empirice demonstrează că prezența în anamneză a unui avort spontan crește riscul de recurență pentru sarcinile ulterioare de la 14% până la 21% după un avort spontan, după două avorturi spontane riscul de recurență este de 29%, 43% după trei avorturi spontane și până la 53% după șase și mai multe avorturi spontane [15; 22; 35, p. 3; 174, p. 12]. Dacă factorii nefavorabili pregravidari persistă, riscul avortului spontan este mult mai mare [15].

Cauzele cunoscute ale avortului spontan recurent sunt multiple și complexe (cauze infecțioase, endocrine, imunologice, anatomice, genetice etc.) [35, p. 3; 42; 164; 165; 167]. În pofida eforturilor cercetătorilor de a soluționa această problemă, incidența patologiei date rămâne crescută până în prezent, astfel că în 60% din cazuri etiologia pierderii spontane a sarcinii nu poate fi precizată [2; 22; 23, p. 3; 29; 42; 149; 174, p. 11; 189].

În acest context, cercetarea medicală își focusează atenția în ultimii ani spre diverse mecanisme care ar putea să conducă la elucidarea cauzelor avortului spontan [29]. 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 [12; 23, p. 4; 63; 75].

Sistemul hemostatic joacă un rol important în sarcină, respectiv în procesul de embrio – implantare și dezvoltarea placentei [5; 12, p. 6].

Dintre cauzele genetice asociate avorturilor spontane, trombofilia reprezintă în ultimii ani un domeniu mai nou de cercetare atât la nivel mondial [12, p. 6; 59], cât și în Republica Moldova. Trombofiliile reprezintă afecțiuni hematologice ereditare sau dobândite, care

predispun la fenomene trombo-ocluzive sau boala tromboembolică, având drept substrat anomalii moleculare ale procesului de hemostază. Pe parcursul sarcinii, potențialul trombogenic este mai mare decât în afara perioadei de sarcină, fiind amplificat de modificările specifice ai factorilor de coagulare, la care se poate adăuga statusul trombofilic congenital sau dobândit [90].

Astfel, în ultimii 10 ani, interesul studiilor care relatează despre asocierea trombofiliei cu pierderile recurente de sarcină a sporit remarcabil, iar recent trombofilia ereditară a fost postulată ca o cauză a avortului spontan recurent [2; 44; 46, p. 18; 62, p. 19; 115; 117; 125; 149; 192].

În ultimii ani studiile genetice s-au concentrat pe identificarea genelor și a variantelor alelice care ar putea conferi susceptibilitate pentru avortul spontan recurent, precum și asocierea lor cu factorii de risc, ce pot avea un efect potențator în fenotipul acestei patologii [42; 115]. Trombofiliile ereditare, implicând diferiți factori ai coagulării, pot fi cauză de avort spontan prin afectarea circulației placentare și fetale [36; 37, p.3]. În timpul sarcinii, potențialul tromboembolic al acestor tulburări este amplificat de modificările factorilor de coagulare asociate stării de gestație [14]. Polimorfismele cele mai studiate în cadrul trombofiliilor ereditare sunt la nivelul genelor factorului V Leiden (G1619A), inhibitorului activatorului plasminogenului (PAI – 1 5G/4G), factorului II (G21020A) și enzimei metilentetrahidrofolat reductazei (MTHFR) [10; 20; 37, p. 4; 39; 44; 48; 51; 125; 192].

În ultimul deceniu a devenit evident că tulburările din metabolismul homocisteinei și metioninei, în relație cu polimorfismul MTHFR, ambele asociate bolilor cardiovasculare [3; 45; 87; 96; 99; 131; 136; 162; 185; 192], sunt implicate în apariția complicațiilor sarcinii, legate de tulburarea microcirculației și hipercoagulare [55; 59; 64]. Există un număr relativ mare de complicații considerate astăzi ca fiind cauzate de creșterea nivelului plasmatic de homocisteină: anomalii cromozomiale, defecte de tub neural, hipertensiunea arterială indusă de sarcină, decolarea prematură a placentei normal inserată, restricția de creștere intrauterină a fătului, moartea intrauterină a fătului și pierderea recurentă de sarcină [7; 39; 47, p. 35; 54; 57; 58, p. 188; 65; 66; 93; 113; 118; 125; 129; 139; 153; 169].

Ultimii ani au înregistrat o creștere dramatică în cercetarea și înțelegerea notorietății aminoacidului homocisteina, deși dovezile sunt incomplete și multe întrebări rămân încă fără răspuns [32]. Homocisteina, fiind un aminoacid neproteic, absent în dieta naturală, derivat din metabolismul metioninei, este condiționată nu doar de aportul extern de acid folic și vitamina B₁₂, dar se află și sub influența modului în care funcționează o serie de enzime implicate în metabolismul homocisteinei [55; 83; 119; 139; 150, p. 4].

Hiperhomocistinemia este considerată, în prezent, un factor de risc protrombotic, însă relativ slab [171]. Studiile demonstrează rolul protrombogen al homocisteinei prin mai multe

mecanisme, cum ar fi expresia crescută a factorului tisular, atenuarea proceselor anticoagulante, favorizarea agregării plachetare, generarea crescută de trombină, activitatea factorului V Leiden, potențial fibrinolitic deficitar și dezvoltarea leziunilor endoteliale, inclusiv disfuncția endotelială [128; 183; 184]. Homocisteina și expresia genelor metionin–sintetaza (MTR), metilen-tetrahidrofolat–reductaza (MTHFR) și metionin–sintetaza–reductaza (MTRR) ce codifică proteinele implicate în metabolismul homocisteinei și metioninei sunt subiecte importante de studiu.

Cele mai intens studiate variații care afectează gena MTHFR includ schimbarea unei singure nucleotide (SNP): C677T și A1298C [95]. Genotipul 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 și MTR A2756G produc o activitate scăzută a enzimelor și provoacă hiperhomocisteinemie [88]. Aceste mutații, cu impact asupra metabolismului homocisteinei și metioninei, sunt rare și semnificația lor clinică este practic neexplorată.

În ultimii 20 de ani, literatura de specialitate a evaluat rolul acidului folic și vitaminei B₁₂ asupra embriogenezei [91]. Au apărut studii despre deficitul acidului folic la femeile însărcinate, care condiționează acumularea homocisteinei și reducerea metioninei, iar la etapele timpurii de dezvoltare a embrionului dereglează viteza de dividere și migrație celulară, sporind riscul apariției celor mai necorijabile și grave malformații congenitale – defecte ale tubului neural la făt [7; 25].

Conform unor studii recente, au fost raportate date despre asocierea polimorfismului homozigot mutant MTHFR T677T, nivelul scăzut al folatului seric, hiperhomocisteinemie și avort spontan precoce [22; 139]. Starea de heterozigoție compusă ale polimorfismelor genelor MTRR A66G și MTR A2756G cu polimorfismul MTHFR C677T reprezintă un factor de risc pentru viabilitatea fetală [109].

Există motive biologice plauzibile că nivelul crescut al homocisteinei serice totale, deficitul de acid folic și genotipul MTHFR 677TT sunt factori de risc pentru afecțiunile mediate de insuficiența placentară [75; 86; 97; 152; 154]. Cu toate acestea, sunt necesare investigații suplimentare pentru a confirma aceste constatări și a ghida măsurile preventive și terapeutice.

Studiul efectuat în Republica Moldova de către Centrul Național de Sănătate a Reproducerii și Genetică Medicală (2009) a evaluat particularitățile populațional – genetice ale frecvenței alelei C677T și variantele polimorfismului genei MTHFR, stabilind că frecvența genotipurilor polimorfismului MTHFR C677T în populația Republicii Moldova este de 44,0% pentru genotipul heterozigot C677T și 15,0% pentru genotipul homozigot mutant T677T [25].

În condițiile social – demografice contemporane, problema avorturilor spontane ocupă un loc special în domeniul sănătății reproducerii. Incidența întreruperilor spontane de sarcină în Republica Moldova pentru anul 2014 a constituit 21,66% [190], iar pentru anul 2015 - 20,44% [191]. Analiza comparativă a incidenței avorturilor spontane în ultimii ani s-a redus, dar nesemnificativ.

În acest context, identificarea genotipului heterozigot C677T a genei MTHFR în valoare de 44,0%, frecvența relativ înaltă a genotipului homozigot mutant T677T – 15,0% și incidența avorturilor spontane în jur de 20,0% în populația Republicii Moldova, reprezintă temeuri pentru evaluarea gradului de implicare a polimorfismelor genelor implicate în metabolismul metioninei și homocisteinei în patogeneza avortului spontan recurent.

Asocierea mai multor polimorfisme ale unor gene diferite, sau chiar ale aceleiași gene, pot influența patogeneza unei afecțiuni cu etiologie genetică [59]. Polimorfismele genelor MTHFR, MTR și MTRR au un impact în embriogeza timpurie, cu toate acestea, interacțiunea dintre aceste polimorfisme, nivelul homocisteinei, folatului seric și vitaminei B₁₂ nu au fost investigate în etiologia avortului spontan recurent în Republica Moldova. În populația din Republica Moldova aceste variante genetice au fost puțin studiate, efectuate sporadic, iar studii care să reflecte interconexiunea cu avortul spontan recurent sunt aproape absente. Prin cercetarea de față s-a încercat extinderea sferei de cunoaștere a particularităților patogenetice a avortului spontan recurent. Astfel, rezultatele studiului oferă informații legate atât de distribuția celor 4 polimorfisme investigate și valoarea serică a homocisteinei, precum și despre asocierea acestora cu avortul spontan recurent pentru populația din Republica Moldova.

Teza de față vine ca răspuns la problemele existente astăzi în patologia avortului spontan recurent: informații insuficiente legate de identificarea unor parametri biochimici, posibil implicați în etiologia avortului spontan recurent; informații în ceea ce privește explicarea mecanismelor care stau la baza declanșării avortului spontan recurent și identificarea răspunsului terapeutic practic în această direcție, și nu în ultimul rând, perspectiva utilizării datelor în practica clinică, ceea ce ar putea să îmbunătățească prognosticul acestei afecțiuni.

Stabilirea diagnosticului etiologic reprezintă o necesitate în vederea instituirii unei terapii adecvate. Studiul reprezintă, astfel, o intervenție diagnostică, ce ar putea duce la profilaxia și diagnosticul prenatal, prin stabilirea corelației factorilor etiologici analizați cu apariția avortului spontan recurent.

Studiul prezent va evalua pacientele cu avort spontan recurent, care includ combinații de istoric al pacientelor cu markerii biochimici serici și caracteristici de profil genetic, în vederea evidențierii rolului factorilor clinici și genetici în etiopatogenia avortului spontan recurent.

Astfel, este evidentă necesitatea unei abordări comprehensive (clinică, biochimică, genetică, nutrițională) a particularităților metabolismului metioninei prin evaluarea homocisteinei, statutului folatului seric și vitaminei B₁₂, polimorfismelor genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G în relație cu avortul spontan pentru identificarea cauzei implicate și stabilirea unei strategii terapeutice adecvate.

Scopul cercetării constă în diagnosticul dereglărilor metabolismului metioninei la femeile cu avort spontan recurent pentru optimizarea managementului terapeutic.

Obiectivele cercetării

1. Evaluarea particularităților medico-sociale a femeilor cu avort spontan recurent.
2. Aprecierea nivelului seric al homocisteinei, vitaminei B₁₂, acidului folic, frecvenței polimorfismelor genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G și MTR A2756G și impactul lor asupra avortului spontan recurent.
3. Identificarea relațiilor dintre nivelul seric al homocisteinei, vitaminei B₁₂, acidului folic și polimorfismele genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G la femeile cu avort spontan recurent.
4. Evaluarea eficacității terapeutice, monitorizarea parametrilor hemostazei și biochimici la gravidele cu dereglări ale metabolismului metioninei.
5. Elaborarea recomandărilor privind managementul clinic al pacientelor cu avort spontan recurent și dereglări ale metabolismului metioninei.

Noutatea științifică a rezultatelor obținute

A fost realizat un studiu de cohortă, care a permis identificarea și interpretarea prevalenței, precum și stabilirea corelațiilor dintre parametrii biochimici (homocisteina, acidul folic, vitamina B₁₂) și polimorfismele genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G la pacientele cu avort spontan recurent. Prin rezultatele obținute a fost elucidat rolul lor în veriga etiopatogenetică a declanșării avortului spontan și a fost argumentată importanța terapiei de corecție a metabolismului homocisteinei și tromboprofilaxiei prin diminuarea riscului de recurență a bolii, iar răspunsul terapeutic fiind cuantificat prin survenirea și evoluția normală a sarcinii cu depășirea termenului de 22 săptămâni de gestație la pacientele cu avort spontan recurent și dereglări ale metabolismului metioninei și homocisteinei. Aceste rezultate aduc informații cu implicații practice, care pot fi folosite de către clinicieni în relație cu avortul spontan recurent pentru identificarea cauzei și stabilirea unei strategii terapeutice adecvate.

Problema științifică soluționată în teză constă în aprecierea rolului factorilor genetici și biochimici în dezvoltarea avortului spontan recurent, identificarea cărora contribuie la evaluarea

riscului pentru apariția complicațiilor obstetricale și optimizarea managementului terapeutic, printr-o abordare individualizată, la pacientele cu mutații genetice a enzimelor implicate în metabolismul homocisteinei și metioninei.

Importanța teoretică și valoarea aplicativă a lucrării

Semnificația teoretică a lucrării rezidă în faptul că rezultatele cercetării oferă perspective în cunoașterea rolului parametrilor biochimici (homocisteina, acidul folic, vitamina B₁₂) și polimorfismelor genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G în fiziopatogenia avortului spontan recurent. Datele obținute completează viziunea patogenetică asupra avortului spontan recurent. De asemenea, rezultatele pot servi în calitate de material educațional – didactic pentru instruirea universitară, inclusiv pentru perfecționarea programelor de studii postuniversitare destinate rezidenților, doctoranzilor, medicilor obstetricieni – ginecologi la Catedrele Obstetrică și ginecologie nr. 1 și nr. 2, USMF „Nicolae Testemițanu”.

Valoarea aplicativă a lucrării constă în evaluarea dereglărilor metabolismului metioninei și homocisteinei, determinarea cărora este necesară pentru stratificarea riscului obstetrical și individualizarea conduitei obstetricale ulterioare la pacientele cu avort recurent. În baza cercetării efectuate a fost argumentat potențialul terapeutic al tromboprofilaxiei și terapiei de corecție a metabolismului homocisteinei prin survenirea și evoluția sarcinii, și depășirea termenului de 22 săptămâni de gestație. În acest context, evaluarea acestor parametri este necesară pentru predicția și prevenirea riscului de avort spontan, instituirea strategiei terapeutice optime și îmbunătățirea prognosticului.

Totodată, studiul actual argumentează necesitatea evaluării a altor factori tromboembolici cu implicație posibilă în avorturile spontane și asocieri dintre factorii menționați, precum sunt: factorul de coagulare V, proteina C, factorul de coagulare II, antitrombina, proteina S, receptorul endotelial de proteină C, trombomodulina, cofactorul II al heparinei, inhibitorul activatorului de plasminogen tip - 1, glicoproteina IIb/IIIa, activatorul tisular al plasminogenului, factorul de coagulare XIII, fibrinogenul.

Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere.

1. Studiul actual demonstrează că genotipurile mutante: heterozigot și homozigot mutant pentru polimorfismele MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G, precum și frecvența asocierii dintre polimorfisme, este semnificativ statistic mai mare în lotul pacientelor cu avort spontan recurent decât în lotul martor.
2. La pacientele cu avort spontan recurent și prezența polimorfismelor genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G, concentrația homocisteinei serice totale este semnificativ statistic mai mare comparativ cu lotul martor.

3. Rezultatele cercetării confirmă importanța stratificării riscului obstetrical la pacientele cu hiperhomocisteinemie și mutații genetice a enzimelor implicate în metabolismul homocisteinei și metioninei pentru individualizarea conduitei obstetricale ulterioare.
4. A fost apreciată eficacitatea administrării terapiei de corecție a metabolismului homocisteinei și terapiei anticoagulante cu viză profilactică la pacientele cu avort spontan recurent și dereglări ale metabolismului metioninei în perioada de preconcepție și pe parcursul sarcinii, prin evoluția sarcinii și depășirea termenului de 22 săptămâni de gestație în 75,43±5,70% cazuri.

Aprobarea rezultatelor

Rezultatele preliminare și finale, precum și concluziile teoretice și practice formulate în cercetare au fost comunicate și discutate în cadrul:

- Ședințele Catedrei Obstetrică și ginecologie nr. 2 a USMF „Nicolae Testemițanu” (Chișinău, 2014-2017);
- Conferința Științifică a Tinerilor Cercetători și Studenți (cu participare internațională) „Modern Solutions of Current Scientific Issues in Medicine”, ediția a III-a, 15-16 martie 2017, Niznij Novgorod, Rusia.
- Conferința Științifică a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători” (cu participare internațională), ediția a VI-a, 15 iunie 2017, Chișinău, Republica Moldova.
- Conferința științifică anuală a USMF „Nicolae Testemițanu”, 19 octombrie 2017.

Teza a fost discutată și recomandată spre susținere la Ședința Catedrei de obstetrică și ginecologie nr. 2 a USMF „Nicolae Testemițanu” (Proces-verbal nr. 2 din 2 octombrie 2017) și la Ședința Seminarului Științific de Profil Obstetrică și ginecologie din cadrul USMF „Nicolae Testemițanu” (Proces-verbal nr. 6 din 21 noiembrie 2017).

În baza materialelor tezei au fost publicate 10 lucrări științifice, inclusiv 4 articole fără co-autor și 3 articole în materialele comunicărilor științifice internaționale, 1 îndrumare metodică.

Sumarul compartimentelor tezei

Teza este constituită din introducere, 4 capitole, concluzii și recomandări, bibliografie cu 200 de surse, 9 anexe.

Compartimentul *Introducere* descrie actualitatea și importanța problemei abordate, scopul și obiectivele tezei, noutatea științifică a rezultatelor obținute, importanța teoretică și valoarea aplicativă a lucrării, aprobarea rezultatelor și sumarul compartimentelor tezei.

Capitolul 1 este structurat în 4 subcapitole și conține analiza materialelor științifice la tema tezei, cuprinzând date din literatura autohtonă și străină autentică, care reflectă ultimele cercetări în domeniul obstetricii și ginecologiei asupra problemei studiate. Am abordat date generale privind metabolismul și rolul metioninei, homocisteinei, acidului folic și vitaminei B₁₂, precum și variantele alelice ale genelor MTHFR, MTR și MTRR ce codifică compuși implicați în metabolismul folaților și homocisteinei. Am evidențiat mecanismele prin care homocisteina generează disfuncția endotelială și exercită acțiuni protrombogene, detaliind acele mecanisme care sunt cel mai bine evaluate și susținute experimental, până în acest moment. Ulterior, sunt descrise diverse studii ce au analizat asocierea polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G, homocisteinei, acidului folic și vitaminei B₁₂, și impactul clinic al acestora asupra embriogenezei.

În capitolul 2 este prezentată caracteristica generală a metodologiei de cercetare, precum și descrierea detaliată a loturilor de studiu în baza criteriilor de includere și excludere. În acest capitol este prezentat designul cercetării și sunt redate etapele de desfășurare ale cercetării, precum și metodele de cercetare, care au inclus: anchetarea, examinarea clinică și biochimică (homocisteina, acidul folic, vitamina B₁₂, numărul de trombocite, concentrația fibrinogenului plasmatic, timpul de protrombină și timpul parțial de tromboplastină activată). De asemenea, sunt descrise metodele molecular – genetice utilizate pentru aprecierea polimorfismelor genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G, precum și prezentarea instrumentelor de procesare statistică a rezultatelor obținute.

Capitolul 3, structurat în 3 subcapitole, reflectă analiza loturilor de studiu din punct de vedere demografic, clinic și rezultatele investigațiilor biochimice, unde se elucidează nivelul seric al homocisteinei, acidului folic și vitaminei B₁₂. Tot în acest capitol, se încearcă realizarea unor corelații statistice între o serie de parametri de explorare biochimică și clinică legate de metabolismul homocisteinei, precum și de a preciza implicațiile și importanța lor ca factori de risc pentru producerea avortului spontan recurent.

Capitolul 4, structurat în 4 subcapitole, prezintă variantele mutaționale observate la nivelul polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G, frecvența și analiza asocierii polimorfismelor genetice investigate în loturile de cercetare, precum și corelații privind frecvența genotipurilor polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G identificate și concentrația serică a homocisteinei cu avortul spontan la pacientele cu avort spontan recurent. De asemenea, în cadrul acestui capitol s-a efectuat stratificarea riscului obstetrical în prezența hiperhomocisteinемiei și mutațiilor genetice implicate în metabolismul homocisteinei și metioninei, și stabilirea strategiei terapeutice

adecvate, cu evaluarea în dinamică a parametrilor clinici și biochimici: homocisteina serică totală, parametrii hemostazei (numărul de trombocite, concentrația fibrinogenului plasmatic, timpul de protrombină și timpul parțial de tromboplastină activată) în scopul prelungirii sarcinii peste termenul de 22 săptămâni de gestație.

Analiza rezultatelor obținute în cadrul tezei sunt expuse în 6 concluzii generale și 4 recomandări practice. Compartimentul final al tezei include bibliografia cu 200 referințe, 9 anexe, declarația privind asumarea răspunderii și CV-ul autorului.

1. DEREGLĂRILE METABOLISMULUI METIONINEI, VITAMINELE GRUPULUI B ȘI ROLUL LOR ÎN AVORTUL SPONTAN

1.1. Metabolismul metioninei și homocisteinei. Impactul clinic al hiperhomocisteinемiei

Homocisteina (acid 2-amino 4-mercapto butiric) este un aminoacid neproteinogen cu grupare tiolică, absent în dieta naturală, derivat din metabolismul metioninei [16; 54; 76; 81; 89; 92; 101; 135; 158; 175, p. 17; 184].

Metionina este un aminoacid esențial ce conține sulf, care este activat de enzima metionin adenozil – transferaza (MAT) și adenzin trifosfat (ATP) pentru a forma S-adenozil metionină (SAM), un donator puternic de grup metil [55; 65; 92; 107; 108; 155, p. 23; 158; 162; 174, p. 40].

SAM este principalul donator de grup metil în multe reacții biologice de metilare, precum metilarea ADN-ului și ARN-ului, proteinelor, lipidelor și neurotransmițătorilor, excepție fiind reacția de remetilare a homocisteinei [65; 90; 92; 107; 157; 158; 162; 193].

La transmetilare, ca rezultat al transferului de grup metil către alte grupări R-CH₃ (în catecolamine, ADN, ARN etc.), sub influența enzimei glicin-metiltransferaza, SAM este convertit în S-adenozil-homocisteină (SAH), care este scindat în continuare de către enzima adenozil-homocisteinaza (SAHH) pentru a produce homocisteina și adenozina (Figura 1.1) [89; 90; 92; 93; 103; 162].

Homocisteina este un intermediar metabolic și poate fi remetilată la metionină prin reacția de remetilare sau degradată ireversibil în cisteină prin reacția de transsulfurare (Figura 1.1) [8; 9; 76; 81; 84; 90; 91; 93; 175, p. 18]. În esență, acest metabolit intermediar – homocisteina este situat într-un punct metabolic critic și, de aceea, direct sau indirect influențează metabolismul compușilor metabolici metilici și cu sulf [9; 65].

Reacția de transsulfurare constă în condensarea homocisteinei cu serină pentru a forma cistationina. Această reacție este catalizată de enzima cistationin β-sintetază (CBS), dependentă de piridoxal fosfat (vitamina B₆), în calitate de cofactor [55]. Cistationina este metabolizată, în continuare, sub influența enzimei cistationin-γ-liaza (CGL), în cisteină și α-cetobutirat [16; 54; 89; 92; 158; 162; 175, p. 18]. Cisteina, reprezintă un precursor al glutationului, un antioxidant celular utilizat în detoxifierea multor xenobiotice [16; 162]. Reacția de transsulfurare este prezentă doar în câteva țesuturi: ficat, rinichi, intestinul subțire și pancreas [92].

Reacția de remetilare este formată din două căi biochimice, care se intersectează și constau din transferul unui grup metil (CH₃) către homocisteină de la 5-metiltetrahidrofolat (5-MTHF) sau betaina [64; 89; 90-93; 158; 177].

Reacția de remetilare a homocisteinei, care primește grupul metil din 5-MTHF, leagă ciclul folatului de metabolismul homocisteinei (Figura 1.1) [174, p. 40]. Grupul metil de la 5-MTHF este transferat la homocisteină din care rezultă metionina și tetrahidrofolat (THF) [155, p. 24]. Reacția este catalizată de enzima MTR și necesită în calitate de cofactor vitamina B₁₂ [89; 92; 93; 175, p. 18]. THF este apoi reciclat la 5,10-metilentetrahidrofolat (5,10-MTHF), în prezența serinei și vitaminei B₆ de către enzima serin-hidroxitil-transferaza (SHMT) [91; 93; 155, p. 23]. Restabilirea donatorului de grup metil, necesar pentru remetilarea homocisteinei îi revine enzimei MTHFR care reduce 5,10-MTHF în 5-MTHF, cofactor fiind vitamina B₂ [90; 91; 94; 175, p. 18].

Pentru activitatea enzimei MTR este necesară prezența cofactorului cobalamină (Cbl), care formează împreună complexul Cbl(I)MTR. Complexul Cbl(I)MTR întrebunțează grupa metil din 5-MTHF pentru reacția de remetilare a homocisteinei în metionină, formând complexul Cbl(III)MTR. În această reacție cofactorul Cbl(I) poate fi ușor oxidat la Cbl(II), inactivând complexul Cbl(II)MTR. Enzima MTRR are funcția de a restabili activitatea enzimei MTR prin metilarea reductivă a Cbl(II) folosind ca donator de metil SAM [16; 65; 124; 140].

Calea de remetilare a homocisteinei folat – dependentă este prezentă în aproape toate celulele, cu excepția eritrocitelor [16; 155, p. 24; 162].

În ficat și în rinichi, betaina (cunoscută ca și trimetilglicină) acționează ca un donator de grup metil în reacția de remetilare a homocisteinei la metionină, într-o reacție catalizată de enzima betain-homocistein-metil-transferaza (BHMT) și este folat – independentă (Figura 1.1) [65; 89; 175, p. 18; 196].

Reacția cu 5-MTHF apare în toate țesuturile și este dependentă de vitamina B₁₂, în timp ce reacția cu betaină este limitată în special la ficat și este vitamina B₁₂ independentă [90; 196].

SAM reprezintă un factor determinant în reglarea metabolismului homocisteinei [89; 155, p. 24]. Acesta este un inhibitor alosteric al enzimei MTHFR și un activator al enzimei CBS [91; 177]. Când nivelul tisular SAM este suficient pentru a menține reacția de transmetilare, SAM reduce rata reacției de remetilare a homocisteinei în metionină prin 5-MTHF, inhibând activitatea enzimei MTHFR [89]. SAM reglementează, de asemenea, și reacția de remetilare hepatică a homocisteinei prin inhibarea activității enzimei BHMT [155, p. 25]. La un nivel crescut de metionină, se constată exces de SAM și pentru a evita acumularea de homocisteină, SAM este un efector pozitiv asupra sintezei cistationinei, stimulând producția de cisteină și α -cetobutirat. Totuși, în cazul în care metionina este în cantitate insuficientă, SAM se va forma numai în cantități mici, limitând astfel activitatea enzimei CBS [155, p. 25]. În aceste condiții,

homocisteina acumulată este remetilată la metionină, folosind grupul metil din 5-MTHF [55; 89; 162].

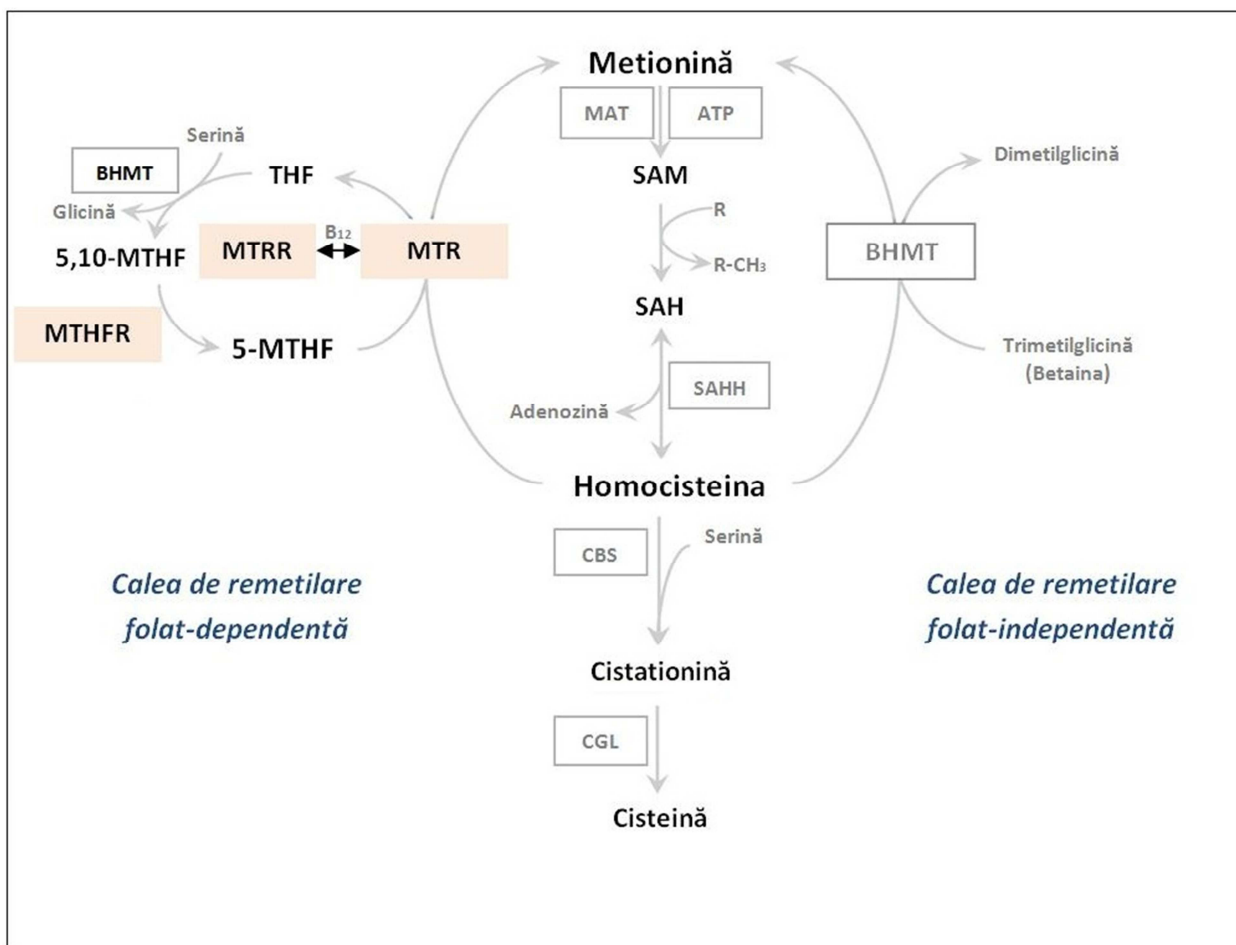


Fig. 1.1. Schema metabolismului metioninei și homocisteinei [155].

Ficatul și rinichii sunt organele majore în menținerea nivelului seric optim al homocisteinei. În ficat, în special ca răspuns la un conținut ridicat de proteine și aportul alimentar de metionină, concentrația SAM este supusă reglementării. După cum s-a menționat deja, SAM este produs din metionină sub acțiunea enzimelor MAT și ATP. În țesuturile mamiferelor, trei izoforme ale enzimei MAT au fost identificate: MAT I, II și III. În țesuturile extra – hepatice, predomină izoforma MAT II, care prezintă o afinitate relativ scăzută pentru metionină și este inhibată de SAM. Izoformele: MAT I și MAT III, specifice pentru ficat, răspund la nivelul crescut de metionină, generând SAM hepatic [92; 155, p. 25].

În ficat, la transmetilare, rata de conversie SAM în SAH este determinată de activitatea a trei metil-transferaze SAM dependente: (1) guanidinoacetate metiltransferaza (GAMT) - responsabilă pentru metilarea guanidinoacetatului, formându-se creatinina; (2)

fosfatidiletanolamin-N-metiltransferaza (PEMT) – responsabilă pentru metilarea fosfatidiletanolaminei în fosfatidilcolină; și (3) Glicin N-metil-transferaza (GNMT), sub acțiunea căreia glicina se transformă în sarcozină. Enzimele GMAT și PEMT consumă cantități mari de SAM și astfel, contribuie în mod semnificativ la menținerea concentrației plasmatice de homocisteină. Enzima GNMT asigură conservarea grupurilor metil atunci când disponibilitatea lor este compromisă sau de eliminare a acestora în cazul în care oferta este excesivă. În comparație cu celelalte metiltransferaze, GNMT este mai puțin sensibilă la inhibarea SAH și este inhibată alosteric de 5-MTHF. În timpul aportului crescut de metionină, nivelurile crescute de SAM limitează sinteza 5-MTHF, activând astfel GNMT și, ulterior producția de sarcozină. Pe de altă parte, lipsa grupurilor metil determină activarea enzimei MTHFR și 5-MTHF, care inhibă activitatea enzimei GNMT, păstrând astfel grupurile metil pentru alte reacții de metilare. Prin urmare, enzima GNMT a fost propusă ca o enzimă cheie responsabilă de stabilitatea și menținerea profilului de metilare la nivel celular prin optimizarea raportului SAM/SAH [53; 81; 155, p. 26; 162].

Folatul intracelular, de asemenea, este implicat în reglarea metabolismului homocisteinei prin furnizarea de 5-MTHF [155, p. 26]. 5-MTHF menține nivelele tisulare optime de SAM atunci când există o aprovizionare deficitară cu grupe metil din metionină și colină. Mai mult decât atât, în condițiile aportului crescut de acid folic, 5-MTHF reduce alternativ calea de transmetilare prin inhibarea activității enzimei GNMT. Creșterea nivelului SAM tisular limitează folatul intracelular în reacția de remetilare a homocisteinei. Invers, o scădere a biodisponibilității 5-MTHF generează o reducere a reacției de remetilare a homocisteinei și o accelerare a reacției de transmetilare. Scăderea concentrațiilor tisulare SAM determinată de scăderea sau epuizarea rezervelor de acid folic, induc inhibarea reacției de transsulfurare [89; 131; 155, p. 26].

Cercetările au demonstrat faptul că acumularea unor cantități ridicate de homocisteină la nivel celular fac ca toate reacțiile de metilare să fie inhibate [9].

Homocisteina totală. Valorile normale. Hiperhomocisteinemia

Homocisteina, în plasma sanguină, se găsește în diferite forme: forma redusă și forma oxidată [112; 151; 152; 161; 162]. Termenul de homocisteină serică totală se folosește pentru a defini suma tuturor formelor de homocisteină din plasmă [1; 112; 151; 161].

Homocisteina în forma redusă, se găsește în proporție extrem de mică, aproximativ 1% și se prezintă cu gruparea sulfhidril în forma homocisteină-SH.

Homocisteina în forma oxidată cuprinde homocisteina legată de alți compuși prin intermediul legăturilor disulfidice, prezentă în aproximativ 98-99%:

(1) legată de proteine, în proporție de 80-90%, cel mai des albumina;

(2) legată de alți tioli, inclusiv cisteină, în proporție de 5-10%;

(3) dimer de homocisteină – două molecule de homocisteină unite cu o punte disulfidică [92; 112; 151; 152; 161; 162].

Nivelul homocisteinei prezintă o anumită variabilitate dată de sex, vârstă și mai ales de tipul de alimentație și aportul de vitamine [162]. Concentrația de homocisteină plasmatică crește cu vârsta, datorită declinului metabolic al homocisteinei în rinichi. Femeile de vârstă reproductivă au un nivel plasmatic al homocisteinei mai scăzut decât bărbații, parțial din cauza influenței hormonilor sexuali feminini (estrogeni), care crește după menopauză [15; 151; 152; 161; 162].

Valorile de referință pentru homocisteina serică totală sunt cuprinse între 5 și 12 $\mu\text{mol/l}$ [152; 161; 162]. În normă homocisteina serică este în concentrații foarte mici ($< 10 \mu\text{mol/l}$) (Tabelul 1.1) [112; 161; 177].

Utilizarea mai multor metode de determinare a homocisteiniei și, implicit, necesitatea interpretării unitare a semnificației și încadrarea valorilor homocisteiniei, a dus la elaborarea în 2003 a unui Consens Paper European cu ghiduri și recomandări legate de hiperhomocisteinemie (D.A.C.H. – Liga Homocystein, German, Austrian and Swiss Society) [161]. Hiperhomocisteinemia a fost clasificată în [42; 51; 125; 152; 161; 162; 184]:

- Moderată – valorile homocisteinei serice sunt cuprinse între $>12-30 \mu\text{mol/l}$, prevalența în populația generală ~ 5-10%.
- Intermediară – valorile homocisteinei serice sunt cuprinse între $>30-100 \mu\text{mol/l}$, prevalența în populația generală ~ 1%.
- Severă – valorile homocisteinei serice mai mari de $100 \mu\text{mol/l}$, prevalența în populația generală 0,02%.

Tabelul 1.1. Homocisteina serică totală: valori de referință

Domeniu de normalitate	5-12 $\mu\text{mol/l}$
Admisibil	$< 10 \mu\text{mol/l}$
Hiperhomocisteinemia	$>12 \mu\text{mol/l}$
Moderată	$>12-30 \mu\text{mol/l}$
Intermediară	$>30-100 \mu\text{mol/l}$
Severă	$>100 \mu\text{mol/l}$

Datorită influenței semnificative pe care o are vârsta și sarcina trebuie stabilite limite normale pentru diferite categorii: femei de vârstă reproductivă, femei de vârstă a treia (> 60 ani), femei însărcinate (Tabelul 1.2) [154].

Tabelul 1.2. Valori limită de referință pentru homocisteină pentru diferite de categorii

Categoria	Nivelul homocisteinei
Vârsta < 30 ani	4,6 – 8,1 $\mu\text{mol/l}$
Vârsta 30 – 59 ani	6,3 – 11,2 $\mu\text{mol/l}$
Vârsta > 60 ani	5,9 – 15,3 $\mu\text{mol/l}$
Sarcina 8 – 16 săptămâni	3,9 – 7,3 $\mu\text{mol/l}$
Sarcina 20 – 28 săptămâni	3,5 – 5,3 $\mu\text{mol/l}$
Sarcina 36 – 42 săptămâni	3,3 – 7,5 $\mu\text{mol/l}$

În timpul sarcinii, atât concentrațiile medii, cât și limita superioară de referință pentru homocisteina serică totală sunt semnificativ mai mici (< 8 $\mu\text{mol/l}$) [152]. Scăderea homocisteinei nu pare a fi influențată de nivelul estrogenilor sau progesteronului. Hemodiluția, albumina serică redusă în timpul gestației, cât și rata sporită a reacției de remetilare a homocisteinei, datorită cererilor crescute de metionină de către făt, ar putea contribui la valorile reduse ale homocisteinei în timpul sarcinii [68; 152].

La femeile de vârstă reproductivă, homocisteina serică totală este influențată de statutul seric al acidului folic și vitaminei B₁₂ [152]. Suplimentarea cu acid folic poate reduce și mai mult concentrația totală de homocisteină serică în perioada preconcepțională și pe parcursul sarcinii [137]. Studiul Framingham (1989 - 1990) subliniază importanța alimentației cu cereale și derivate de acid folic care produc scăderea concentrației plasmatice a homocisteinei cu 48% față de pacienții cu consum deficitar al vitaminelor din grupul B. Deficiențe ale vitaminelor B₆, B₁₂ și acid folic ca urmare a unei alimentații deficitare conduc la o creștere a valorilor homocisteinemiciei [82; 152; 157; 198].

Limita superioară de referință pentru homocisteină este cu 20-25% mai mică în cazul administrării suplimentelor cu acid folic sau consumul produselor alimentare fortificate cu acid folic (Tabelul 1.3) [152]. Dieta și suplimentarea cu acid folic pot determina temporar nivele plasmatice fiziologice de homocisteină. Metabolismul acidului folic și homocisteinei sunt interdependente, deoarece folatul este un cofactor necesar pentru enzima MTR care mediază conversia homocisteinei la metionină [18; 86;].

Tabelul 1.3. Valoarea limită de referință pentru homocisteină în raport cu suplimentele cu acid folic

Categorია	Homocisteina serică totală „a jeun”	
	Suplimentarea cu acid folic (+)	Suplimentarea cu acid folic (-)
Sarcină	8 $\mu\text{mol/l}$	10 $\mu\text{mol/l}$
Femei de vârstă reproductivă	12 $\mu\text{mol/l}$	15 $\mu\text{mol/l}$
Vârsta > 60 ani	16 $\mu\text{mol/l}$	20 $\mu\text{mol/l}$
Testul de încărcare cu metionină	Creșterea concentrației homocisteinei serice totale după 2 ore cu 40 $\mu\text{mol/l}$ sau de 5 ori peste nivelul homocisteinei serice totale „a jeun”	

Prevalența în populația generală a hiperhomocisteinемiei este de 5-10% [161] și cu o incidență de 20-40% la persoanele cu patologie cardiovasculară [152; 161].

Nivelul plasmatic al homocisteinei este reglementat de o multitudine de factori: genetici, stilul de viață, dieta deficitară și alte condiții clinice, rezumate în Anexa 2 [55; 65; 75; 89; 90; 101; 103; 148, p. 17; 153; 184].

Schimbări ale unui factor sau combinații de factori pot determina creșterea nivelului de homocisteină serică totală [11]. Studiile efectuate de Steed și colab. (2011) justifică dezvoltarea hiperhomocisteinемiei prin intermediul a câtorva stări: 1) dieta bogată în metionină; 2) anomalii genetice în genele MTHFR, MTR, MTRR, CBS; 3) deficiența de vitamine (B_{12} , B_6 și acid folic); 4) disfuncții renale [16; 162].

Dieta bogată în metionină. Carnea, peștele și produsele lactate constituie surse alimentare de metionină. Aportul alimentar excesiv de metionină favorizează creșterea concentrației intracelulare SAM. SAM va reduce nivelul homocisteinei prin stimularea activității enzimei CBS și, prin urmare, crește catabolismul homocisteinei prin calea de transsulfurare. În acest moment, remetilarea homocisteinei în metionină este inhibată datorită abundenței de metionină disponibilă și donorului de grup metil SAM [16; 162].

Concentrația serică a homocisteinei se poate măsura suplimentar prin testul de încărcare cu metionină, probele de sânge recoltându-se înainte și după administrarea de metionină. Prin testul de încărcare cu metionină se pot identifica o perturbare a căii de transsulfurare prin compararea concentrațiilor de homocisteină înainte și după administrarea de metionină [89; 106; 175, p. 23; 184].

Contrar celor expuse anterior, Finkelstein și colab. (1998) menționează că, având în vedere capacitatea reacțiilor de transmetilare și transsulfurare a organismului pentru a se adapta la excesul de metionină, nici ingestia excesivă de metionină, și nici producția excesivă de homocisteină, ca rezultat al unui aport alimentar excesiv de metionină, sunt puțin probabil de a fi cauza hiperhomocisteinемiei [92].

Studiile efectuate pe animale sugerează că dieta bogată în metionină și deficitul de acid folic, pot crește riscul aterosclerozei și patologiilor coronare vasculare prin majorarea nivelului de colesterol și homocisteină din sânge, în timp ce dieta bogată în produse vegetale și fructe limitează cantitatea de metionină și homocisteină [16].

Anomalii genetice în genele MTHFR, MTR, MTRR, CBS. Anomalii genetice în genele metabolismului homocisteinei și metioninei pot determina creșterea concentrației nivelului de homocisteină totală, iar severitatea modificărilor depinde de sediul mutației genetice [41].

MTHFR – enzima cheie implicată în metabolismul folatului și homocisteinei, catalizează conversia 5,10-MTHF în acid 5-MTHF [91; 130; 192]. Simbolul genei care codifică enzima metilentetrahidrofolat reductaza este MTHFR [10]. Gena este localizată la nivelul cromozomului 1, brațul scurt, în poziția 36.3 – 1p36.3. Este alcătuită din 20374 bp și constituită din 11 exoni [10; 11; 91; 117]. Cele mai bine studiate sunt SNPs-urile C677T și A1298C [55; 77; 116]. Ambele produc o schimbare de aminoacid cu caracteristici biochimice diferite [10; 11; 91].

Cel mai comun polimorfism și, totodată, cu cel mai important rol în patologia clinică este C677T, situat la nivelul exonului 4. Este o mutație cu sens greșit, în care citozina este înlocuită cu timina în poziția 677 a genei MTHFR. Consecutiv, acest locus va avea 2 alele: alela C sau alela normală și alela T sau alela mutantă (C677T) [38; 76; 84; 93; 110; 149]. Codonul modificat (Ala222Val) va codifica în loc de alanină (Ala) valină (Val), rezultând o proteină termolabilă cu activitate enzimatică redusă [10; 11; 16; 25; 84; 89; 93; 108; 124; 158; 174, p. 41; 192]. Activitatea enzimatică în cazul genotipului heterozigot 677CT se reduce cu 35% și în cazul genotipului homozigot 677TT cu 70%, iar forma termolabilă este un marker genetic al hiperhomocisteinемiei moderate la subiecții cu genotipul 677TT [16; 47, p. 37; 91; 93; 149]. Se raportează o incidență de 5-25% în populația caucaziană a statusului homozigot pentru această mutație, iar statusul heterozigot cu o frecvență de 50% [59; 96; 130; 158] și practic nu se determină la rasa negroidă [157].

Al doilea cel mai studiat polimorfism al genei MTHFR este A1298C, situat la nivelul exonului 7. Este o mutație în care adenina este înlocuită cu citozina în poziția 1298 a genei MTHFR, iar codonul rezultat va codifica în loc de alanină (Ala) glutamina (Gln), rezultând o proteină cu activitate enzimatică scăzută, fără termolabilitate [10; 11; 16; 47, p. 37; 76; 108; 117;

124; 192]. Conform unor studii, se elucidează că această mutație nu se asociază cu hiperhomocisteinemie (indiferent de statusul heterozigot sau homozigot) [76; 192], însă statusul heterozigot combinat pentru cele două mutații MTHFR poate genera manifestări clinice similare cu cele induse de statusul homozigot pentru mutația C677T [10; 16; 59; 60, p. 34; 63; 76; 77; 117; 118; 158].

Alela 1298C se află în dezechilibru de înlănțuire cu alela 677C [10; 34, p. 289; 108]. În total sunt posibile nouă combinații de genotipuri ale celor 2 alele: C677C/A1298A; C677C/A1298C; C677C/C1298C; C677T/A1298A; C677T/A1298C; C677T/C1298C; T677T/A1298A; T677T/A1298C; T677T/C1298C. Combinațiile genotipurilor T677T/A1298C, C677T/C1298C și T677T/C1298C sunt foarte rar observate [10; 108]. Frecvența diferitor genotipuri variază în diferite zone ale lumii și în diferite grupuri etnice [10].

Remetilarea homocisteinei în metionină este catalizată de enzima citoplasmatică MTR [89; 91; 92]. Simbolul genei care codifică enzima metionin-sintetaza este MTR. Gena este localizată pe brațul lung al cromozomului 1 în poziția 43 – 1q43 [92]. Singurul polimorfism comun raportat în gena MTR este acel în care adenina este înlocuită în guanină în nucleotida 2756, o poziție cu potențial funcțional al proteinei, iar codonul rezultat va codifica în loc de acid aspartic glicina [133]. Mutația homozigot mutantă MTR 2756GG determină o creștere a funcției enzimatică care dezvoltă riscul de depleție a grupului metil 5-MTHF și epuizarea vitaminei B₁₂, folosind-o într-un ritm mai rapid și rezultând în creșterea nivelului de homocisteină [45, p. 38; 76; 91]. Se raportează o incidență mai mică de 5% pentru statusul homozigot mutant al polimorfismului MTR A2756G [90; 173].

Unele studii au demonstrat că combinația MTHFR C677T și MTR A2756G determină un nivel ridicat de homocisteină, cu excepția cazului în care se administrează atât vitamina B₁₂, cât și acid folic [124; 133].

Simbolul genei care codifică enzima metionin-sintetaza-reductaza este MTRR [60, p. 23]. Enzima MTRR are funcția de a reactiva enzima MTR prin metilarea reductivă a cobalaminei, folosind ca donator de metil SAM [16; 73; 91]. Gena este localizată pe brațul scurt al cromozomului 5 în poziția 15.12-15.13 – 5p15.12-15.13 [61, p. 23; 91]. Cel mai frecvent polimorfism în gena MTRR este acel în care adenina este înlocuită în guanină în poziția 66, această mutație implică substituția aminoacidului izoleucinei cu metionina [16; 91; 133]. Defectul rezultat determină o scădere a funcției enzimatică de patru ori [26], iar acest lucru se traduce prin scăderea capacității de a regenera metilcobalamina, și, prin urmare, este considerată ca un factor de risc genetic pentru hiperhomocisteinemie [98]. În plus, unele studii au sugerat un efect sinergic ale polimorfismelor MTHFR C677T și MTRR A66G asupra nivelului de

homocisteină în plasmă [133; 173]. Frecvența haplotipului heterozigot MTRR 66AG este de 45-50%, iar haplotipul homozigot mutant MTRR 66GG este de 25-30% [47, p. 37; 90; 173].

Deficitul de enzima CBS este cea mai frecventă cauză genetică a hiperhomocisteinемiei ereditare și este considerată o boală autozomal recesivă. La inhibare activității enzimatice a CBS, homocisteina este redirecționată spre calea de remetilare pentru a genera metionină, ceea ce duce la o creștere intracelulară SAM, care va inhiba prin calea feedback-ului enzima MTHFR, inhibând astfel reacția de remetilare. În consecință, ambele căi sunt inhibate, fapt asociat cu un nivel înalt de homocisteină. Indivizii homozigoți prezintă o frecvență de 1:200.000 de nașteri și manifestă din copilăria timpurie afecțiuni trombotice fatale [89; 161].

Deficiența de vitamine B₁₂, B₆ și folați. Valorile plasmaticе ale homocisteinei se găsesc într-un raport invers proporțional cu valorile plasmaticе ale acidului folic și vitaminei B₁₂ întrucât aceste vitamine intervin direct, în calitate de cofactori, în metabolismul homocisteinei [76; 82; 103; 161]. Mai multe studii demonstrează că indivizii cu hiperhomocisteinемie prezintă concentrații inadecvate ale unor sau mai multor cofactori enzimatici [101; 108; 153; 157; 161; 175, p. 22].

Disfuncții renale. Rinichii constituie sediul major al metabolismului homocisteinei, posedând trei enzime – MTR, CBS și CGL [16; 161]. Disfuncțiile renale sunt însoțite de creșterea nivelului homocisteinei plasmaticе [161]. Studiile efectuate de Arnadottir și colab. au determinat un raport invers proporțional dintre rata de filtrare glomerulară și nivelul homocisteinei totale [16]. Studiile lui Guttormsen și colab. au demonstrat că eliminarea metabolică hepatică a homocisteinei este mult mai afectată în insuficiența renală, stadiu terminal, datorită alterării căii de transsulfurare [161; 175, p. 22].

Mecanismele patologice vasculare induse de homocisteină

Endoteliul vascular normal, reprezintă un organ autocrin, paracrin și endocrin, care reglează homeostazia vasculară prin eliberarea substanțelor cu rol vasodilatator, așa ca: oxidul nitric (NO), prostaciclina, factorul hiperpolarizant din endoteliu și a altora substanțe cu rol vasoconstrictor, precum ar fi: angiotensina II, endotelina 1, anionii superoxid și noradrenalina [13; 24].

Cel mai important rol aparține NO [24; 148, p. 12]. NO prezintă proprietăți antiateroge prin intermediul mai multor mecanisme: inhibarea proliferării celulelor musculare netede, permeabilității vasculare și proceselor inflamatorii, și scade agregarea și adeziunea plachetară [24].

Disfuncția endotelială reprezintă o tulburare complexă care implică scăderea producției sau disponibilității de NO și/sau un dezechilibru între forțele vasoconstrictorii/vasodilatatorii,

constituind o reacție de apărare a organismului prin “activarea endotelială”, iar endoteliul dobândește un status proinflamator și procoagulant [13; 24].

Primele evidențe despre posibilele efecte negative ale homocisteinei asupra peretelui vascular au fost relatate de către McCully în anul 1969 [131]. Studiile sugerează că homocisteina atacă inițial endoteliul vascular și inițiază o cascadă de complicații vasculare [16; 131]. Observațiile clinice și studiile pe animale au stabilit posibilele ținte ale homocisteinei: celule endoteliale, celule musculare, țesuturi conective, factori de coagulare, trombocite, lipide, molecule de transducere a semnalelor prin NO [16; 81; 89; 105; 163; 183].

Există numeroase mecanisme biomoleculare care au fost intens studiate și propuse pentru a explica modificările patologice asociate cu niveluri crescute de homocisteină. S-a sugerat că homocisteina atacă inițial endoteliul vascular și începe cascada negativă a complicațiilor vasculare, inclusiv întârzierea creșterii endoteliului [175, p. 25]. Este, prin urmare, important să se examineze fiecare mecanism molecular și celular propus, și rolul lor potențial în disfuncția vasculară mediată de homocisteină. Efectele la nivel molecular și celular ale hiperhomocisteinemiei sunt reflectate în tabelul 1.4 [16; 161].

Tabelul 1.4. Mecanismele biomoleculare ale hiperhomocisteinemiei

Efecte moleculare	Efecte celulare
Reducerea producției de NO	Disfuncția endotelială
Reducerea cantității de NO disponibil	Afectarea vasorelaxării celulelor endoteliale
Stresul oxidativ	Lezarea mitocondriilor
Peroxidarea lipidelor	Proliferarea celulelor musculare netede
Inflamația	Degradarea matrixului extracelular
Coagularea	Lezarea ADN-ului și ARN-ului
Formarea trombilor	Apoptoza

Mecanismul pentru leziunile produse de homocisteină asupra endoteliului vascular sunt legate de creșterea stresului oxidativ [64; 87; 132]. Homocisteina are capacitatea de a genera specii reactive de oxigen contribuând la patologia vasculară prin scăderea biodisponibilității NO [89; 93; 114; 134].

Homocisteina în serul sangvin se supune oxidării cu formarea de radicali liberi, datorită grupului său sulfhidril foarte reactiv. Gruparea tiolică a homocisteinei interacționează cu NO în prezența oxigenului molecular formând S-nitrozo homocisteina, compus ce produce vasodilatație

și generează peroxid de hidrogen [54; 182] Scăderea clearance-ului homocisteinei și acumularea ei continuă, crește în continuare producerea de radicali liberi, toxici pentru endoteliul vascular, influențând proprietățile endoteliului într-un mod negativ [45; 57; 64; 105; 114; 115; 158; 183].

Explicația constă în faptul că homocisteina, alături de alți tioli, prezintă activitate prooxidativă, iar în prezența oxigenului molecular (O_2), homocisteina prezintă capacitate autooxidativă. La nivel intracelular țintele sunt: aparatul Golgi, reticulul endoplasmatic și NO [9]. Homocisteina prin intermediul grupării sulfhidril (-SH), ca și alți tioli (R-SH), suferă oxidare cu formare de legături disulfidice (R-S-S-R) la un pH fiziologic în prezența O_2 [9; 148, p. 19; 153; 183].



Reacția este catalizată de metale de tranziție (cupru și cobalt) și sunt produse o varietate de specii reactive de oxigen, precum: peroxid de hidrogen, anionul superoxid și în anumite condiții – anionul hidroxil. Astfel, efectul nociv al homocisteinei se datorează generării de peroxid de hidrogen via autooxidarea catalizată de metale [9; 89].

Disfuncția endotelială în prezența homocisteinei crescute, poate fi mediată și prin stresul oxidativ ca urmare a diminuării activității și expresiei enzimei glutatión peroxidazei [9; 53; 156; 182]. Acest efect scade capacitatea celulelor endoteliale de a elimina radicalii hidroxil, permițând în continuare leziuni oxidative [9; 47, p. 34; 114].

Homocisteina scade, de asemenea, statusul redox tiolic în celulele endoteliale vasculare, evaluat prin raportul glutatión intracelular redus/disulfid glutatión prin oxidarea glutatiónului intracelular redus, dezvoltând un deficit relativ de cosubstrat pentru glutatión peroxidază. Astfel, scade potențarea inactivării radicalilor peroxil mediați de NO și scad mecanismele oxidative endoteliale de apărare, rezultatul fiind disfuncția endotelială [9].

S-a demonstrat că homocisteina inhibă enzima superoxid-dismutaza și poate stimula peroxidarea lipidelor și oxidarea lipoproteinelor de densitate joasă [9; 54; 55; 89; 183]. Peroxidarea lipoproteinelor de densitate joasă determină activarea plachetară și formarea de trombus [9; 183].

Homocisteina scade vasodilatația dependentă de endoteliu prin majorarea nivelului dimetil arginina asimetrică (ADMA), care reprezintă un inhibitor al NO-sintazei, și scăderea producției de endotelin 1 (Figura 1.2) [9; 54; 175, p. 26].

Cercetările demonstrează rolul protrombogen al homocisteinei, aceasta stimulând activitatea factorului V și XII, cu creșterea expresiei factorului tisular endotelial la nivelul endoteliului, dereglând mecanismul antitrombotic și fibrinolitic [3; 9; 64]. Studiile recente demonstrează că homocisteina activează agregarea trombocitelor, inhibă funcția antitrombinei III

și proteinei C, dereglează funcția activatorului tisular al plasminogenului, stimulează factorii V, X și XII de coagulare (Figura 1.2) [3; 42; 53; 57; 89; 90; 99; 117; 136; 193; 148, p. 21].

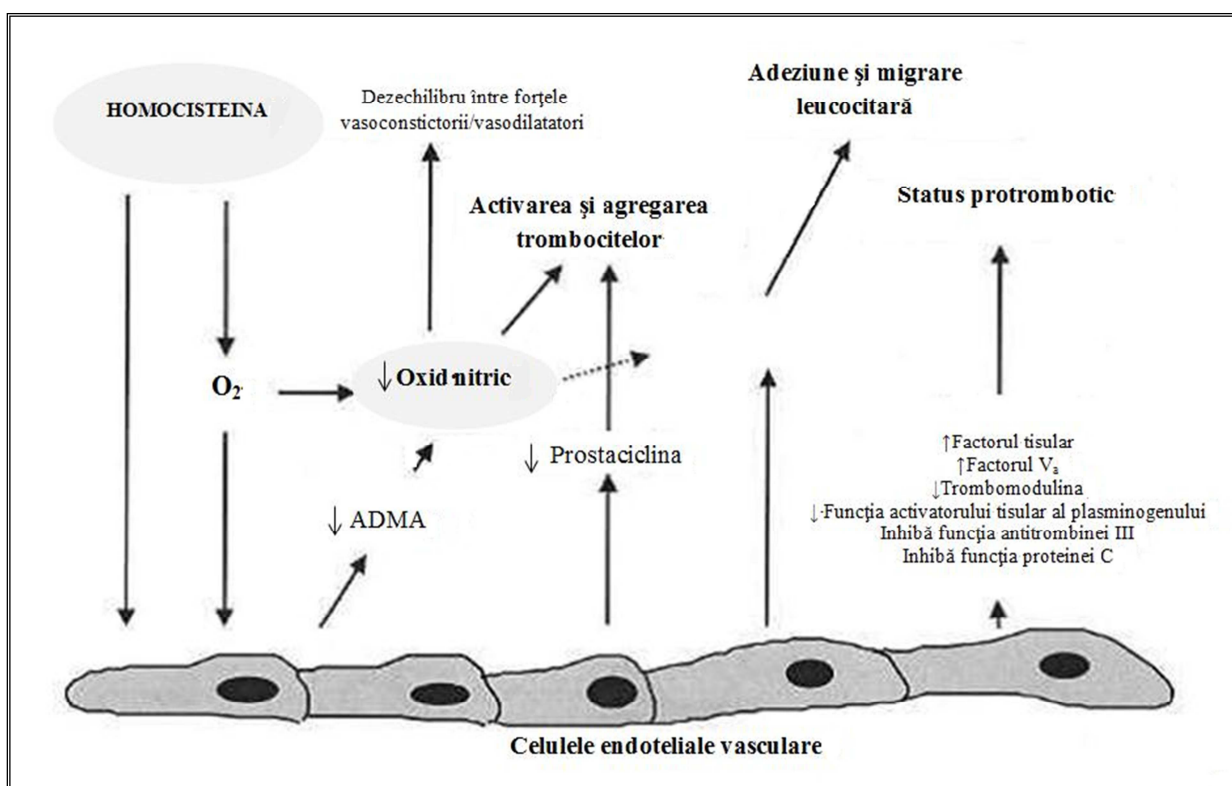


Fig.1.2. Mecanismele patogenice de acțiune a homocisteinei asupra peretelui vascular [148].

Homocisteina poate, de asemenea, influența disfuncția endotelială prin scăderea factorului de necroză tumorală. Acesta este capabil să inducă, la nivel endotelial, molecule de adeziune intracelulară cum ar fi ICAM 1, VCAM 1 și E-selectinele, incitând infiltrarea țesutului afectat și inițierea inflamației [9].

Creșterea endotelială poate fi alterată de nivele crescute ale homocisteinei plasmatică. Studiile in vitro au demonstrat că homocisteina inhibă sinteza proteică, cum ar fi ciclina A cu rol în ciclul celular de creștere. Acest lucru are impact asupra refacerii endotelului deteriorat [9].

Steed și colab. (2011) descriu trei mecanisme patologice care stau la baza complicațiilor vasculare induse de homocisteină: stresul oxidativ, disfuncția endotelială și remodelarea vasculară – incluse în „Triada toxică” [161].

Astfel, mecanismele patogenice de acțiune a homocisteinei asupra peretelui vascular sunt: dereglarea vasodilatării legate de endoteliu, oxidarea lipidelor și proteinelor, stresul oxidativ, care contribuie la apariția unui climat favorabil trombogenezei și a coagulabilității sângelui [3; 39; 51; 58, p. 188; 64; 78; 81; 89; 134].

Hiperhomocisteinemia în patologie

Homocisteina a fost prezentată pentru prima dată de Butz și de Vigneaud în anul 1932 ca un aminoacid cu sulf, în legătură apropiată cu metionina și cisteina. În anul 1962 Carson și Neil au sugerat o asociație între nivelul crescut de homocisteină și patologie. Ei au determinat concentrații crescute de homocisteină în urina unor copii diagnosticați cu retard mintal. Cauza acestor observații era prezența unui defect enzimatic sever care inhiba metabolismul homocisteinei [9]. Teoria vasculară a homocisteinei apare ca urmare a unei observații realizată de McCully în anul 1969 [131].

Creșterea concentrației homocisteinei serice este corelată cu creștea semnificativă a riscului dezvoltării și apariției bolii arteriale coronariene [65; 66; 69; 89; 99; 108; 116; 193], bolii vasculare periferice [65; 66; 81; 90; 99; 101; 108; 116; 144; 175, p. 23], bolii ocluzive cerebrale și retiniene [65; 66; 89; 90; 99; 107; 116] și infarctului miocardic [42; 65; 66; 70; 89; 193; 99; 109; 116; 121; 157; 162]. Evidențe experimentale atestă faptul că înclinația aterogenică atribuită hiperhomocisteiniei rezultă din lezarea endoteliului și disfuncția endotelială, urmată de activare plachetară cu formare de trombus [1; 9]. Hiperhomocisteinemia reprezintă un factor de risc independent pentru ateroscleroză și aterotromboză [40; 60, p. 33; 70; 80; 81; 128]. Cercetările din ultimii ani demonstrează tot mai convingător rolul homocisteinei în afecțiunile vasculare [1; 69; 80; 175, p. 25]. În acest sens au fost realizate diverse studii, iar rezultatele lor sugerează faptul că, creșteri plasmatice ale homocisteinei ar putea avea efect protrombotic, predispunând la hipercoagulabilitate. O serie de studii care demonstrează corelația între hiperhomocisteinemie și patologia vasculară sunt expuse în Anexa 3 [85; 90; 116; 136]. De dată mai recentă este corelația hiperhomocisteiniei și cu tromboza venoasă, nu doar cu cea arterială [85; 105]. Studii mari de tip caz-control au evidențiat hiperhomocisteinemia ca factor de risc pentru tromboza venoasă profundă [8]. O recentă meta-analiză a identificat 24 studii retrospective și 3 studii prospective în literatura electronică, publicate înainte de 2003. Rezultatele ei au evidențiat că o creștere a homocisteiniei peste 5 $\mu\text{mol/l}$ față de nivelul considerat normal s-a asociat cu 27% risc crescut de tromboză venoasă profundă în studiile prospective și cu 60% în studiile retrospective [85]. Studiul prospectiv LITE, pe o durată de 11 ani, a arătat că hiperhomocisteinemia se asociază unui risc relativ de 1.55 de recurențe trombotice venoase [150].

Managementul hiperhomocisteiniei

Managementul hiperhomocisteiniei se referă la un sistem de măsuri de îngrijire, pornind de la măsuri de prevenire a formării excesului de homocisteină, inclusiv și, în perioada preconcepțională, și continuând cu menținerea valorilor serice adecvate pe tot parcursul sarcinii.

1. Terapia nutrițională. Adoptarea unui regim alimentar ce are la bază principiile unei alimentații sănătoase, cu scopul de a obține un echilibru nutrițional. Aportul nutritiv trebuie să presupună aportul de macronutrienți și micronutrienți în cantități și proporții optime, consum alimentar porționat, moderat, din toate grupele alimentare, bogat în legume și fructe, fără consum de alcool, consum moderat de sare (2-3 g/zi), cofeină în cantități moderate sau deloc [193].
2. Activitatea fizică. Exercițiul fizic este desemnat ca formă de terapie adjuvantă în managementul hiperhomocisteinемiei, utilizând diferite tipuri de exerciții fizice cu variații ale frecvenței, intensității și duratei [64; 85].
3. Tratamentul medicamentos al hiperhomocisteinемiei. Există două strategii utilizate în prezent în vederea reducerii concentrației crescute de homocisteină: prevenirea formării excesului de homocisteină sau creșterea ratei de metabolizare [9]. Managementul hiperhomocisteinемiei începe cu acid folic, vitamina B₁₂ și vitamina B₆. Acidul folic și vitamina B₁₂ participă în reacția de remetilare a homocisteinei, stimulând-o, iar vitamina B₆ este necesară pentru conversia homocisteinei în produși finali ai reacției de transulfurare (Figura 1.3) [161; 163; 176].

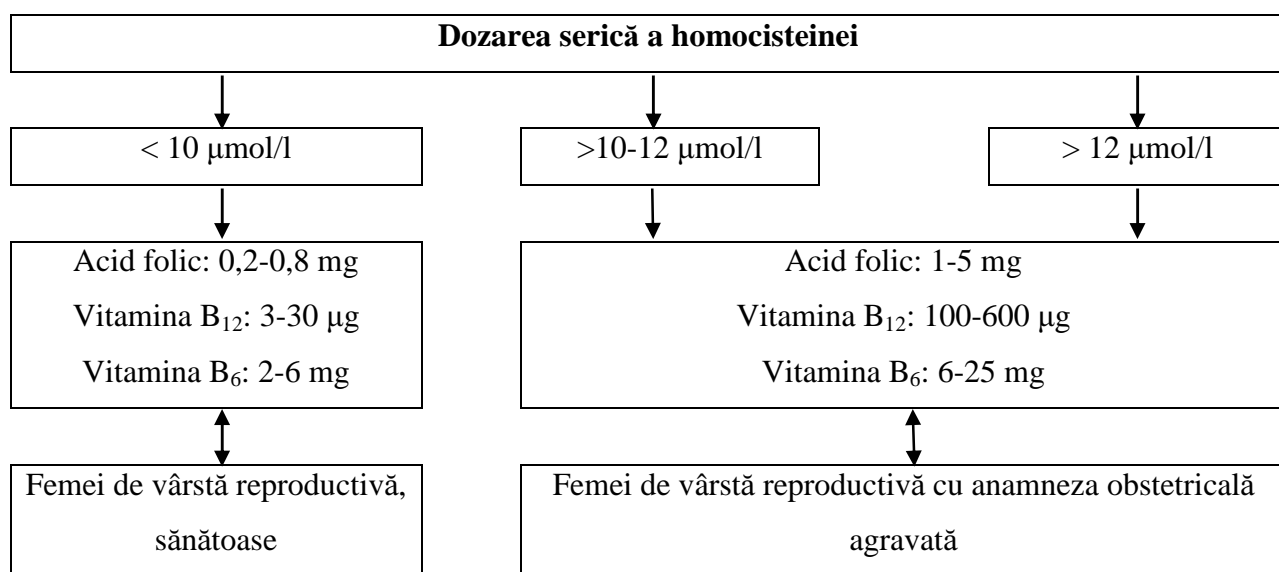


Fig. 1.3. Profilaxia și tratamentul medicamentos al hiperhomocisteinемiei [18].

O analiză a unor trialuri care aveau drept scop reducerea concentrației de homocisteină, a demonstrat că acidul folic a fost agentul cel mai eficient în comparație cu vitaminele B₁₂ și B₆. Acidul folic reduce concentrația plasmatică a homocisteinei cu o medie de 25%, cu efecte

similare în intervalul 0,5-5 mg. Terapia suplimentară cu vitamina B₁₂ la acid folic prezintă un efect semnificativ mai vizibil de scădere a concentrației homocisteinei, în schimb asocierea vitaminei B₆ la acidul folic nu a influențat mai mult nivelul homocisteinemic în sensul scăderii acesteia [9].

1.2. Vitaminele din grupul B și rolul lor în dezvoltarea hiperhomocisteinemiciei

Acidul folic și rolul lui coenzimatic

Termenul „acid folic” reunește o familie de compuși cu proprietăți fiziologice asemănătoare, al cărei reprezentant de bază este acidul pteroilglutamic. Acidul folic participă sub forma de coenzimă în numeroase procese metabolice: (1) este indispensabil în transferul grupelor monocarboxilice (metil, metilen, metoxi, formil) în cadrul biosintezei bazelor purinice și pirimidinice; (2) este implicat în sinteza ADN [21, p. 68; 65; 91; 158; 165].

Acidul folic are o structură complexă, având molecula compusă din trei fragmente: (1) un inel pteridinic, pe care se găsește grefată o grupare amino în poziția 2 și o grupare hidroxil în poziția 4 (2-amino-4-hidroxipteridina); (2) un radical al acidului para-amino-benzoic și (3) un rest peptidic rezultat din una sau mai multe molecule de acid glutamic [67; 160; 175, p. 27].

Folații reprezintă o mare familie de molecule naturale formate prin modificări a moleculei de acid folic, structura de bază a grupului. Derivații naturali ai acidului folic diferă între ei prin: (1) starea de oxidare a ciclului pteridinic; (2) natura substituenților de la carbonul din pozițiile N₅ și N₁₀ și (3) numărul resturilor de acid glutamic din moleculă [47, p. 33; 158].

Folatul alimentar este poliglutamat și necesită conversie în monoglutamat pentru a fi absorbit. Această hidroliză are loc la nivelul jejunului proximal, după aceea monoglutamații rezultați sunt absorbiți în circulație, unde se leagă nespecific și cu afinitate mică de albumină; 1/3 circulă în formă liberă și numai o fracțiune foarte mică se leagă specific de proteina de legare a folatului, derivată din membrana celulară [158; 193].

Folații plasmatici se află sub formă de monoglutamat (N₅-metil-tetrahidrofolat) și sunt transportați în celule printr-un “transportator” care este specific pentru formele reduse (FH₄). Odată ajuns în celulă, folatul trece în forma poliglutamată după pierderea grupării N₅-CH₃ într-o reacție de transfer a grupului metil. Forma poliglutamată pare a fi forma în care celulele rețin și depozitează folații. Formele poliglutamice sunt cele care predomină intracelular și sunt mai eficiente în reacțiile enzimatiche. Formele metabolic active sunt: 5-MTHF (forma majoră din organism), 10-formiltetrahidrofolatul și THF [64; 158; 175, p. 27; 193].

Folatul este esențial pentru sinteza de novo a purinelor, deoxitimidilat monofosfat și metionină, având rol de transportor intermediar al radicalilor monocarbonici folosiți în biosinteza acestor compuși [38; 46, p. 33]. Metabolismul folaților și homocisteinei sunt strâns legate între

ele (Figura 1.1). În sinteza metioninei, radicalul metil de la 5-MTHF este transferat la homocisteină din care rezultă metionina și THF. Reacția este catalizată de enzima MTR și necesită în calitate de cofactor vitamina B₁₂ [47, p. 33; 65; 157; 158; 168, p. 17; 193].

Anumite alimente reprezintă o sursă naturală de folați. Alimentele cele mai bogate în folați sunt legumele cu frunze verzi, în special de culoare închisă (salate, spanac, varză verde), precum și în ficat, mușchi de mamifere, brânzeturi fermentate, cereale și produse de cereale. De asemenea, folații sunt sintetizați de către bacteriile intestinale [21, p. 68; 67; 72; 193; 198].

Biodisponibilitatea folaților alimentari este mai mică decât biodisponibilitatea acidului folic sintetic găsit în suplimentele și alimentele fortificate. Astfel, folații alimentari se absorb în procent de aproximativ 50%, în timp ce acidul folic care este folosit la fortificarea alimentelor se absoarbe în procent de aproximativ 85% [67; 71; 158; 175, p. 27; 193; 198]. Acidul folic din suplimente și alimente fortificate este redus la tetrahidrofolat activ și este chimic identic cu folații alimentari [193]. Acest lucru a dus la introducerea conceptului de "echivalent dietetic de folat" (DFE), ca o modalitate de a exprima aportul mixt de folați naturali și acid folic. Astfel [67; 72; 175, p. 27; 193]:

- 1 μg de folat care se găsește în natură = 1 μg DFE;
- 1 μg de acid folic folosit la fortificarea alimentelor = 1,7 μg DFE.

Necesarul zilnic de acid folic constituie 400 μg pe zi pentru adolescenți și adulți [67; 121, p. 68; 155; 193].

Vitamina B₁₂ și rolul ei coenzimatic

Vitamina B₁₂ este o vitamină care se distinge printr-o mare complexitate, caracterizată prin prezența unui atom de cobalt (Co³⁺) în structură [196]. Molecula vitaminei B₁₂ este constituită din: (1) patru nuclee pirolice (nucleul tetrapirolic) reduse, din care trei sunt legate coordinativ de cobalt, iar al patrulea printr-o legătură covalentă; (2) gruparea nucleotidică (5,6-dimetilbenzimidazol) legat de nucleul tetrapirolic prin ribozo-fosfat și aminopropanol; (3) atomul de cobalt este legat de un radical cian (-C≡N), precum și de un atom de azot de la 5,6-dimetilbenzimidazol [123; 158; 160]. Gruparea cian din molecula vitaminei B₁₂ poate fi substituită cu alți radicali (OH, SO₃, Br etc.), formând derivații cobalaminelor, mulți dintre care posedă activitate biologică. Formele active ale vitaminei B₁₂ sunt: (1) metilcobalamina, care predomină în plasmă și în citoplasmă; (2) adenzilcobalamina, care predomină intramitocondrial și (3) ciancobalamina, care este un preparat farmacologic stabil, care trebuie convertit în alte forme pentru a fi activ metabolic [65; 160].

Vitamina B₁₂ din alimente este absorbită la nivelul intestinului subțire, în prezența unei glicoproteine care se găsește în sucul gastric și se numește "factorul intrinsec". Aceasta

facilitează legarea vitaminei B₁₂ de mucoasa intestinală și trecerea ei prin peretele intestinal. Vitamina B₁₂ este necesară pentru creștere și este esențială pentru funcția metabolică normală a tuturor celulelor, în special a celulelor aparatului digestiv, măduvii osoase și ale țesutului nervos [21, p. 68]. Vitamina B₁₂ participă la două grupe de reacții biochimice: reacțiile de transformare, care constau în transportul hidrogenului și formarea unei noi legături carbon-hidrogen și reacțiile de transmetilare. Probabil, una din cele mai importante funcții a vitaminei B₁₂ este relația pe care aceasta o stabilește în raport cu folații, în reglarea nivelului homocisteinei din sânge [91; 123; 157].

Forma coenzimatică a vitaminei B₁₂ – metilcobalamina este necesară pentru sinteza metioninei din homocisteină [91]. Enzima MTR împreună cu Cbl formează împreună complexul Cbl(I)MTR. Complexul Cbl(I)MTR întrebuințează grupa metil din 5-MTHF pentru reacția de remetilare a homocisteinei în metionină, formând complexul Cbl(III)MTR. În această reacție cofactorul Cbl(I) poate fi ușor oxidat la Cbl(II), inactivând complexul Cbl(II)MTR. Enzima MTRR are funcția de a restabili activitatea enzimei MTR prin metilarea reductivă a Cbl(II) folosind ca donor de metil SAM [161].

Sursa alimentară de vitamina B₁₂ este reprezentată de produsele animale (ouă, lactate, brânzeturi, ficat, pește, carne). Necesitatea diurnă de vitamina B₁₂ este de 2,4 μg pentru adulți [21, p. 68; 67; 160].

Statusul seric al acidului folic și vitaminei B₁₂

Determinarea concentrației de folat se realizează prin evaluarea nivelului folatului seric și folatului eritrocitar. Organizația Mondială a Sănătății (OMS) propune următoarele valori de departajare pentru evaluarea concentrației de acid folic (Tabelul 1.5) [198].

Tabelul 1.5. Folatul seric și eritrocitar pentru determinarea nivelului de acid folic

Nivelul folatului seric ng/mL (nmol/L) *	Nivelul folatului eritrocitar ng/mL (nmol/L)	Interpretare
> 20 (> 45.3)		Crescut
6 - 20 (13.5 - 45.3)		Valoare de referință
3 - 5.9 (6.8 - 13.4)		Deficiență posibilă
< 3 (< 6.8)	< 100 (< 226.5)	Deficiență

*Factor de conversie: 1 ng/mL = 2.265 nmol/L

Aceste valori de departajare au fost revizuite pe baza unor indicatori metabolici. În 2005, the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) evaluează relația dintre homocisteina serică și folatul seric sau eritrocitar, și nivelul seric al acidului metilmalonic,

și al vitaminei B₁₂, și a identificat valori de departajare pentru deficitul de acid folic și vitamina B₁₂ sub care concentrația de homocisteină începe să crească [82; 84; 198]. Nivelul ridicat de homocisteină este considerat un indicator funcțional de deficit de acid folic și vitamina B₁₂, care rezultă din incapacitatea folaților de a dona gruparea metil necesară pentru a converti homocisteina la metionină (Tabelul 1.6) [79; 137; 198]. Aceste valori se aplică tuturor categoriilor de vârstă [67; 79; 101; 157].

Tabelul 1.6. Valori de departajare pentru determinarea deficitului de acid folic și vitamina B₁₂ raportat la concentrația serică de homocisteină

Indicator	Valori de departajare
Folat seric	<4 (<10) ng/mL (nmol /L)
Folat eritrocitar	<151 (<340) ng/mL (nmol /L)
Nivelul seric al vitaminei B ₁₂	< 150 pmol/L (203 pg/mL)*

*Factor de conversie: 1 pg/mL = 0.737 pmol/L

Nivelul homocisteinei în sânge este invers proporțional cu nivelul plasmatic al folaților, vitaminei B₁₂ și implicat cu aportul exogen al acestora [82; 91; 101; 157].

1.3. Implicațiile homocisteinei și vitaminelor grupului B în pierderea fetală

În ultimii ani, mutațiile trombofilice au dobândit unul dintre locurile fruntașe printre factorii de risc răspunzători de pierderile recurente de sarcină [20; 37; 62, p. 19]. În literatura de specialitate există lucrări care sugerează o strânsă interrelație între trombofiliile ereditare și pierderile recurente de sarcină. Cu toate acestea, există și cercetători care nu susțin o cauzalitate între ele [20].

În timpul sarcinii, potențialul trombogenic este cu 0,5-3% mai mare decât în afara sarcinii, fiind favorizat de schimbările specifice ale factorilor de coagulare, reducerea activității anticoagulanților endogeni, precum și o suprimare a fibrinolizei, la care se poate adăuga prezența trombofiliei congenitale sau dobândite [5, p. 2; 62, p. 19]. Toate aceste condiții se asociază cu leziuni trombotice la nivelul patului placentar [5, p. 3].

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, manifestate prin hiperhomocisteinemie [18; 53].

Hiperhomocisteinemia este implicată în apariția și dezvoltarea patologiilor obstetricale, legate de insuficiența placentară, precum: preeclampsia, avortul spontan, restricția de creștere intrauterină a fătului, decolarea de placentă normal inserată, pierderea recurentă a sarcinii și

nașterea prematură [7; 39; 47, p. 35; 54; 57; 58, p. 188; 65; 66; 93; 113; 118; 125; 129; 139; 153; 169].

Femeile însărcinate prezintă valori a homocisteinei serice totale mai mici decât în afara perioadei de sarcină [68; 152]. Concentrația medie a homocisteinei serice totale la femeile gravide este de 5-6 $\mu\text{mol/l}$, iar concentrațiile $> 10 \mu\text{mol/l}$ sunt rareori observate [152]. Mecanismele care contribuie la scăderea homocisteinei serice totale în timpul sarcinii includ cerința sporită de metionină pentru creșterea și dezvoltarea fetală, fenomenul de hemodiluție, secundar creșterii volumului plasmatic, modificări endocrine, creșterea clearance-ului renal al homocisteinei, și scăderea albuminei serice, la care este legată homocisteina [166].

Cercetările au demonstrat că homocisteina serică maternă în plasma sangvină este cu puțin mai mare decât cea din cordonul ombilical, dar o depășește cu mult pe cea din lichidul amniotic. Malinow și colab. (1998) au descoperit diferențe mari între nivelul seric al homocisteinei din vena și arterele ombilicale, astfel argumentând absorbția și metabolizarea homocisteinei la nivel fetal. Aceste constatări sunt în concordanță cu sinteza intrauterină sporită de metionină. Nu a fost detectată calea de transsulfurare în ficatul fetal, iar activitatea enzimei CBS înregistrează doar 20% din activitatea enzimei la un adult, ceea ce sugerează desfășurarea reacției de remetilare într-un ritm mai intens decât reacția de transsulfurare [166]. În acest context, devine evident impactul hiperhomocisteinемiei materne asupra dezvoltării și creșterii fetale.

Implicația homocisteinei în patologia vasculară a fost dovedită în numeroase studii [18; 87; 93; 128]. 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 [18; 107; 137]. În timpul sarcinii dereglările de microcirculație afectează funcția placentară [39; 40; 45; 47, p. 35; 52, p. 39; 137; 194]. Acumularea homocisteinei serice determină tromboza vaselor placentare, care se dezvoltă pe fundal de necroza fibrinoidă, vasculită, tromboza intraluminală ale arterelor spiralate placentare, reducând fluxul sangvin către placentă [32; 51; 163].

Di Simone și colab. (2004) au demonstrat că placenta umană reprezintă o țintă pentru homocisteină. Atunci când celulele trofoblastice au fost expuse la homocisteină, a fost observată o cascadă de evenimente precum: eliberarea citocromului c din spațiul intermitochondrial în citosol, clivajul internucleosomal al ADN-ului în fragmente caracteristice de 180-200 pb, celula fiind antrenată în procesul apoptotic, și scăderea secreției de gonadotropină corionică. Administrarea acidului folic a demonstrat inhibarea efectelor homocisteinei asupra trofoblastului uman [86].

Nelen și colab. (2000) au raportat combinarea deficienței serice de folați și hiperhomocisteinemia ca factori ce duc la deficiența de vascularizare a vililor corionici, posibil de remediat cu doze mari de acid folic [22; 143]. Gris și colab. (2003) au raportat, de asemenea, o asociere între concentrația crescută de homocisteină și avortul spontan precoce [102].

În sarcină, homocisteina ușor traversează bariera placentară și poate avea efect fetotoxic și teratogen [49; 50, p. 39; 54; 55; 186]. Efectul embriotoxic direct al homocisteinei a fost evaluat în numeroase studii, dintre care unele au fost testate experimental [64]. Rosenquist și colab. au estimat apariția malformațiilor cardiace și defectului de tub neural la embrionii de pui expuși la homocisteină. Greene și colab. și Vanaerts și colab. au determinat întârzierea creșterii la embrionii de șoareci și șobolani expuși la homocisteină [130].

Folații și vitamina B₁₂ au fost mult timp cunoscute de a avea efecte adverse asupra sănătății, deficitul lor manifestându-se prin anemie megaloblastică și neuropatie [132; 134]. Asocierile între nivelul scăzut al acestor vitamine și impactul negativ asupra funcției reproductive la femei au fost descoperite recent [61, p. 19; 124; 132; 134; 137; 156; 168, p. 19; 170; 182].

În ultimii 20 de ani, a fost cuantificat rolul acidului folic asupra embriogenezei, în special în dezvoltarea tubului neural [21, p. 84; 91; 137]. Studiile randomizate au demonstrat că suplimentarea preconcepțională și prenatală cu acid folic reduce riscul de a naște un copil cu defect de tub neural. Extinderea rolului acidului folic în protecția sănătății și prevenirea bolilor a avut o implicare majoră în ultimii ani, cu o evidență a efectului protectiv al utilizării suplimentelor de acid folic anterior gravidității asupra defectelor tubului neural [21, p. 84]. Mai mult, aceste evidențe au determinat la revizuirea rolului acidului folic în timpul sarcinii, atât în ceea ce privește prevenirea complicațiilor fetale, cum ar fi malformațiile congenitale, precum și reevaluarea nivelului inadecvat de acid folic pentru dezvoltarea unor complicații în sarcină, precum preeclampsia, decolarea prematură de placentă normal inserată, avortul spontan și pierderea recurentă de sarcină [52, p. 39; 61, p. 19; 91; 137; 138; 158].

Sarcina poate conduce la deficiența de folat, motiv pentru care trebuie să fie asociată cu un aport crescut de acid folic [137]. Necesarul crescut de folați de care are nevoie organismul în timpul sarcinii se datorează creșterii fătului [19; 137]. Concentrația adecvată de acid folic este esențială în embriogeneză și creșterea fetală [84; 137]. Acest lucru a fost susținut de câțiva cercetători, care au determinat că nivelul scăzut al acidului folic este legat de avorturile spontane și ar putea reprezenta un factor de risc pentru femeile care au pierdut sarcina [19].

George și col. au raportat că femeile cu un nivel seric scăzut al folatului (< 4,9 nmol/L) au prezentat un risc mai mare de avort spontan decât femeile cu un nivel crescut al folatului, în special, când anomaliile cromozomiale fetale au fost depistate [19; 84; 93; 166].

Există tot mai multe dovezi că concentrația serică joasă a vitaminei B₁₂ ar putea fi asociat cu complicații ale sarcinii [111; 137; 149]. O serie de studii din ultimii 50 de ani au demonstrat legătura dintre nivelul seric scăzut al vitaminei B₁₂ cu pierderea precoce a sarcinii. Astfel, Bennett și colab. (2001) au observat o incidență crescută a pierderii recurente de sarcină și infertilitate la pacientele cu deficit sever de vitamin B₁₂ [74]. Rezinkoff Efievant și colab. estimează că deficitul de vitamina B₁₂ poate fi implicat în geneza avortului spontan recurent precoce și trebuie efectuată dozarea serică a vitaminei B₁₂ preconcepțional la această categorie de paciente [136]. Deficitul de vitamina B₁₂ în timpul sarcinii determină concentrația ridicată de homocisteină la nivelul embrionului și crește incidența defectului de tub neural [200].

Acumularea homocisteinei în circulație este generată de polimorfismele genelor MTHFR, MTR și MTRR [41; 47, p. 36; 64; 67; 124; 149; 165]. Deoarece procesele celulare vitale, cum ar fi proliferarea și diferențierea sunt dependente de metabolismul folaților și vitamina B₁₂ – indispensabil în transferul grupelor monocarboxilice necesare pentru sinteza ADN și ARN, aceste efecte pot fi deosebit de pronunțate în embriogeneza timpurie atunci când celulele sunt supuse diferențierii celulare și proliferării rapide [130]. Efectul toxic al homocisteinei se datorează acumulării în exces al S-adenosil homocisteina, care ar putea inhiba critic reacțiile de metilare și duc la sinteza defectuasă de ADN, reacții fundamentale pentru embrionul în curs de dezvoltare [200].

Un număr mare de cercetători au furnizat date privind relația dintre polimorfismele genelor sus menționate și diferite tulburări de reproducere, inclusiv avortul spontan [50; 165; 192].

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 [139]. Este relevant faptul că starea de heterozigoție compusă pentru C677T și A1298C se asociază cu activitate enzimatică redusă, nivel ridicat de homocisteină și concentrații serice scăzute de folat [17; 83; 139]. Statusul heterozigot combinat 677CT/1298AC are un impact clinic similar ca statusul homozigot mutant 677TT, fapt confirmat în cercetările efectuate de către Chango și colab. și Chen și colab. [17].

Polimorfismele la nivelul genei MTHFR afectează metabolismul homocisteinei și acidului folic, și reprezintă factori de risc independenți pentru avort spontan [76; 110; 158; 192]. Efectul lor asupra riscului de avort spontan este cumulativ [165].

Nelen și colab. (2000) au raportat o prevalență înaltă a genotipului homozigot mutant MTHFR T677T (20%) în rândul femeilor olandeze cu 2 avorturi spontane consecutive [142]. O prevalență similară a polimorfismului homozigot mutant C677T MTHFR a fost constatat și în rândul pacientelor franceze cu avort spontan recurent în studiul retrospectiv de tip caz-control efectuat de Quéré și colab. [149].

Rezultate asemănătoare au fost raportate și în studiile efectuate de Lissak și colab. și Durnwald și colab. despre asocierea polimorfismului homozigot mutant C677T MTHFR și nivelul scăzut al folatului seric, hiperhomocisteinemie și avort precoce [22].

Rezultatele unei analize sistematice efectuată de Ray și colab. indică faptul există un consens general bazat pe numeroase studii că deficitul de acid folic, hiperhomocisteinemia și statusul homozigot pentru mutația C677T de la nivelul genei MTHFR sunt factori de risc pentru preeclampsie, decolarea de placentă normal inserată și avortul spontan [45].

Un studiu recent efectuat de Goodman și colab. (2006), a analizat 10 gene implicate în trombofilie, cu posibil impact asupra avorturilor spontane și a evidențiat genotipul 677TT MTHFR având semnificație statistică ($p < 0.04$) în asociere cu avorturile spontane [100], fapt confirmat și de Coulam și colab (2006) [83].

De asemenea, unele studii au arătat ca statusul homozigot mutant pentru mutația C677T conferă un risc de 2-3 ori mai mare pentru defecte de tub neural, cum ar fi spina bifida și anencefalie în comparație cu persoanele care nu prezintă această mutație, iar statusul heterozigot combinat pentru C677T și A1298C constituie de asemenea un factor de risc pentru defectele de tub neural [91].

Studiul efectuat de Klai și colab. (2011) a arătat că polimorfismul MTHFR A1298C, dar nu polimorfismul C677T MTHFR a fost asociat cu nivel crescut de homocisteină și vasculopatie placentară [119].

Mtiraoui și colab. (2006) au demonstrat că statusul homozigot mutant pentru polimorfismele C677T și A1298C ale genei MTHFR reprezintă factori de risc pentru pierderea recurentă a sarcinii, indiferent de concentrația serică a homocisteinei [139].

Макацария А. Д. și colab. (2005) au studiat mutația MTHFR și au constatat că polimorfismul matern MTHFR și hiperhomocisteinemia au fost detectate în 45% cazuri la pacientele cu avort spontan habitual în anamneză [42; 49].

Cercetările genetice au demonstrat că nu doar polimorfismul matern MTHFR, dar și cel fetal joacă un rol important în apariția pierderii recurente spontane a sarcinii. Zetterberg și col. (2002) au examinat distribuția polimorfismelor C677T și A1298C în 80 de probe din țesut fetal, provenite din avorturile spontane care s-au produs între săptămânile 6 și 20 de sarcină [189]. Aceste probe au fost comparate cu 125 de probe recoltate de la grupul de control. Doar unul din 80 de embrioni avortați a prezentat combinația genotipurilor sălbatice 677CC/1298AA în comparație cu 19 din 125 din grupul de control. Combinațiile genotipurilor cu trei sau patru alele mutante nu au fost detectate în nici una din grupurile studiate, sugerând un dezechilibru de înlănțuire între cele două polimorfisme. Zetterberg și col. au raportat, de asemenea, un risc crescut de avorturi spontane pentru genotipurile mutante fetale 677TT și 677TC ale genei MTHFR [188;200]. Concluzia a fost că prezența uneia sau mai multor alele mutante în gena MTHFR afectează procesul de embriogeneză, atunci când concentrația folatului este joasă, fapt confirmat și în alte studii [19; 77; 95; 200].

Cercetătorii Ogino și Wilson au apreciat frecvența polimorfismelor C677T și A1298C într-o populație generală, utilizând date din 16 articole și au constatat că alela 677T este asociată mai frecvent cu alela 1298A, iar alela 1298C este mai frecvent asociată cu alela 677C [19; 77].

Rezultate asemănătoare au fost obținute și de Reyes-Engel și colab., care au presupus că lipsa dezechilibrului de înlănțuire în cazul acestor două polimorfisme poate avea un rol important în fertilitatea umană [103]. Isotalo și colab. au căpătat un procent ridicat de genotipuri cu trei și patru alele mutante în probele fetale avortate și au constatat că genotipurile fetale 677CT/1298CC sau 677TT/1298CC ale genei MTHFR cresc riscul de avort spontan. Volcik și colab. au oferit date care susțin concluzia lui Isotalo și colab. cu privire la viabilitate scăzută în rândul feteșilor cu genotipul 677TT/1298CC [77; 138].

Callejon și colab. (2007) au sesizat lipsa dezechilibrului de înlănțuire între cele două polimorfisme C677T/A1298C. Deasemenea, au evidențiat efectul protectiv al genotipului sălbatic CC al polimorfismului C677T, în timp ce genotipurile cu trei sau patru alele mutante reprezintă un factor de risc determinat pentru viabilitatea fetală și avortul spontan [77].

Reducerea activității funcționale a enzimei MTRR ca rezultat al mutației în codonul 66 A>G conduce la afectarea procesului de embriogeneză. De asemenea, a fost identificată relația dintre mutația genetică MTRR 66 A>G și avortul spontan recurent [61, p. 23]. Studiul efectuat de Popp R. și colab. (2009) determină legătura de cauzalitate între prezența polimorfismului MTRR A66G și pierderea recurentă a sarcinii [147]. Polimorfismele C677T MTHFR și A66G MTRR au fost studiate mai intens. Studii recente sugerează asocierea acestor polimorfisme cu avortul spontan habitual, sindromul Down și spina bifida [50; 88; 91].

Reducerea activității funcționale a enzimei MTR crește riscul de avort spontan și determină dereglarea procesului de embriogeneză [50; 61, p. 25]. Furness și colab. au studiat implicarea polimorfismele genelor MTRR A66G și MTR A2756G în dezvoltarea insuficienței utero-placentare și au relevat asocieri semnificative între alelele mutante ale acestor mutații și insufiența utero-placentară, ceea ce reprezintă un important factor de risc în dezvoltarea insuficienței utero-placentare [97]. Recent, s-a constatat faptul că genotipurile heterozigote MTR 2756AG și MTRR 66AG reprezintă un risc crescut pentru apariția defectului de tub neural [91].

Datele din acest capitol al tezei sunt culese din literatura de specialitate internațională, existând foarte puține studii naționale asupra impactului homocisteinei și rolul polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G la femeile diagnosticate cu avort spontan recurent. Cercetând sursele bibliografice, am constatat că polimorfismele genetice la nivelul genelor MTHFR, MTR, MTRR și homocisteina sunt sugerate a fi implicate în patogeniza avortului spontan recurent, însă rezultatele obținute sunt contradictorii. Pe baza analizei acestor date, am conchis că este necesar să se efectueze o cercetare complexă a implicării dereglărilor metabolismului metioninei la femeile cu avort spontan recurent.

Scopul cercetării constă în diagnosticul dereglărilor metabolismului metioninei la femeile cu avort spontan recurent pentru optimizarea managementului terapeutic. Scopul a fost realizat prin următoarele obiective: (1) evaluarea particularităților medico-sociale a femeilor cu avort spontan recurent; (2) aprecierea nivelului seric al homocisteinei, vitaminei B₁₂, acidului folic, frecvenței polimorfismelor genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G și MTR A2756G, și impactul lor asupra avortului spontan recurent; (3) identificarea relațiilor dintre nivelul seric al homocisteinei, vitaminei B₁₂, acidului folic și polimorfismele genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G la femeile cu avort spontan recurent; (4) evaluarea eficacității terapeutice, monitorizarea parametrilor hemostazei și biochimici la gravidele cu dereglări ale metabolismului metioninei; (5) elaborarea recomandărilor privind managementul clinic al pacientelor cu avort spontan recurent și dereglări ale metabolismului metioninei.

1.4. Concluzii la capitolul 1

1. Homocisteina este un aminoacid neproteinogen cu grupare tiolică, derivat din metabolismul metioninei, absent în dieta naturală. Nivelul homocisteinei plasmatică variază în funcție de cele două căi de metabolizare: reacția de transsulfurare, în care homocisteina este degradată la cisteină, și reacția de remetilare a homocisteinei în metionină, care necesită prezența enzimelor MTHFR, MTR și MTRR, având în calitate de cosubstrat acidul folic și coenzima vitamina B₁₂.

2. Hiperhomocisteinemia este o consecință a deficiențelor enzimaticice (mutații la nivelul genelor ce codifică enzimele: MTHFR, MTR, MTRR, CBS) și/sau a carențelor nutriționale de vitamine care interferează cu metabolismul normal al metioniei și homocisteinei.
3. Creșterea concentrației de homocisteină extracelulară este toxică pentru celule și țesuturi, și poate iniția o cascadă de complicații vasculare: dereglarea vasodilatării legate de endoteliu, stresul oxidativ, oxidarea lipidelor și proteinelor, de asemenea creșterea coagulabilității sângelui, care induce trombogeneza.
4. 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 placentă normal inserată și nașterea prematură.

2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

2.1. Caracteristica generală a cercetării: grupul de cercetare, etapele și design-ul studiului

Pentru a realiza scopul cercetării și obiectivele înaintate, a fost proiectat și realizat un studiu de cohortă. Lucrarea reprezintă o cercetare integrată, în care au fost incluse femeii de vârstă fertilă, care au fost recrutate din rândul pacientelor care s-au prezentat pentru un consult medical și investigații în perioada mai 2014 – decembrie 2016.

Cercetarea actuală are drept scop de a evalua dereglările metabolismului metioninei la pacientele cu avort spontan recurent prin evaluarea concentrației serice a homocisteinei și factorilor implicați în metabolismul ei: stilul de viață, valorile serice ale acidului folic și vitaminei B₁₂, cât și deficiențele enzimatică induse de mutațiile genetice în genele MTHFR, MTR și MTRR.

Cercetarea a fost organizată și realizată la Catedra Obstetrică și ginecologie nr. 2 din cadrul USMF „Nicolae Testemițanu”, Centrul medical „Repromed” și laboratorul clinic-diagnostic al IMSP Centrul Republican de Diagnosticare Medicală din Republica Moldova în perioada 2014-2016 și a prevăzut toate etapele cercetării statistice: (1) elaborarea programului și planului cercetării; (2) determinarea eșantionului; (3) observarea materialului statistic; (4) prelucrarea și prezentarea materialului statistic; (5) analiza rezultatelor obținute și elaborarea concluziilor și recomandărilor (Figura 2.1).

Cercetarea a fost avizată pozitiv de către Comisia de Etică a Cercetării din cadrul Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” (proces verbal nr. 26 din 08.05.2014).

Etapa I. Elaborarea programului și planului cercetării

La această etapă de lucru s-a realizat identificarea și documentarea științifică în domeniu prin studierea literaturii științifice pe tema ce vizează cercetarea. S-au determinat scopul și obiectivele cercetării. S-a precizat perioada de studiu și s-a elaborat planul cercetării.

Etapa II. Determinarea eșantionului

Calcularea eșantionului reprezentativ a fost făcută prin utilizarea formulei:

$$n = \frac{1}{(1-f)} \times \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \times P(1-P)}{(P_0 - P_1)^2}$$

unde:

P_0 - Conform datelor bibliografice [49; 55; 73] până la 60,0% de femei cu avort spontan recurent apare sarcina după tratament sau $P_0=0,60$.

P_1 - Presupunem, că în lotul de cercetare valoarea vor fi de 85,0% sau $P_1=0,85$.

$$P = (P_0 + P_1)/2=0,725$$

Z_α – valoarea tabelară, când semnificația statistică este de 95,0%, atunci coeficientul $Z_\alpha = 1,96$

Z_β – valoarea tabelară, când puterea statistică a comparației este de 80,0%, atunci $Z_\beta = 0,84$

f = Proporția subiecților care se așteaptă să abandoneze studiului din motive diferite de efectul investigat $q = 1/(1-f)$, $f=10,0\%$ (0,1).

Întroducând datele în formula am obținut

$$n = \frac{1}{(1-0.1)} \times \frac{2(1.96+0.84)^2 \times 0.725 \times 0.275}{(0.60-0.85)^2} = 56$$

Astfel, pentru realizarea studiului, volumul optim al unui lot de cercetare este de 56 de femei.

În cadrul cercetării, au fost selecționate un număr total de 114, care au fost repartizate în două loturi, după cum urmează:

- Lotul de cercetare L_1 a inclus 57 femei cu avorturi spontane în antecedente;
- Lotul de control L_0 a inclus 57 femei fără avorturi spontane în antecedente.

Etapa III. Observarea și acumularea materialului statistic

Lotul de cercetare L_1 a fost constituit în baza următoarelor criterii:

Criteriile de includere în studiu:

1. Vârsta femeilor – 20-45 ani;
2. Paciente cu cel puțin 2 avorturi spontane consecutive de cauză neprecizată în antecedente;
3. Lipsa administrării suplimentelor cu vitamine;
4. Acordul femeii pentru participarea în studiu.

Criteriile de excludere:

1. Femei cu vârsta sub 20 ani;
2. Femei cu avorturi de alte cauze cunoscute (morfologice, endocrine, infecțioase etc.);
3. Femei cu sarcină stagnată sau FIV eșuat în anamneză;
4. Femei cu antecedente personale de disfuncție renală severă și boli sistemice autoimune;
5. Lipsa acordului pentru participarea în studiu.

Astfel, pacientele din lotul de cercetare au prezentat cel puțin 2 avorturi spontane consecutive în antecedente, în primul și al doilea trimestru de sarcină, calificat ca idiopatic în urma anamnezei, investigațiilor clinice și paraclinice – imagistice, hormonale, dozarea

anticorpilor antifosfolipidici, investigații pentru complexul TORCH și, la necesitate, analiza cariotipului ambilor parteneri.

Lotul de control a fost format din 57 femei de vârstă reproductivă, fără pierderi spontane de sarcină în antecedente. Pacientele au fost selectate pe baza următoarelor criterii:

Criteriile de includere în studiu:

1. Vârsta femeilor – 20-45 ani;
2. Femei cu cel puțin 1 sarcină fiziologică și naștere la termen în antecedente;
3. Acordul femeii pentru participarea în studiu.

Criteriile de excludere:

1. Femei cu antecedente obstetricale în sarcină (naștere prematură, hipertensiune arterială indusă de sarcină, restricția de creștere intrauterină a fătului, decolarea de placentă normal inserată, moartea intrauterină a fătului);
2. Femei cu sarcina obținută după FIV;
3. Lipsa acordului pentru participarea în studiu.

Pacientele au fost supuse unei examinări complexe care a inclus: culegerea datelor anamnestice, examenul clinic, examenul antropometric (masa, talia, indicele de masă corporală) și examenul ginecologic cu evaluarea organelor genitale externe, aprecierea gradului de maturitate al acestora și eventualele abateri de la normă ale uterului, starea anexelor, fornixurile vaginale, evaluarea eliminărilor vaginale.

Programul de examinare a inclus: culegerea datelor clinico-anamnestice, determinarea serică a homocisteinei, acidului folic, vitaminei B₁₂ și efectuarea testelor molecular-genetice pentru identificarea polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G, evaluarea scorului de risc obstetrical la pacientele cu avort spontan recurent cu aprecierea tacticii ulterioare de conduită și tratament la etapa preconcepțională și pe parcursul sarcinii în vederea evitării avortului spontan și depășirea termenului de 22 săptămâni de gestație, evoluția sarcinii prezente, complicațiile survenite.

Etapa IV. Evaluarea în dinamică a pacientelor cu avort spontan recurent incluse în studiu

La această etapă a fost determinat scorul de risc obstetrical la pacientele cu avort spontan recurent și s-a apreciat strategia terapeutică în sarcina ulterioară în scopul evaluării importanței fiziopatologice și practice a terapiei anticoagulante.

Etapa V. Prelucrarea și prezentarea materialului statistic

Etapa VI. Analiza rezultatelor obținute și elaborarea concluziilor și recomandărilor

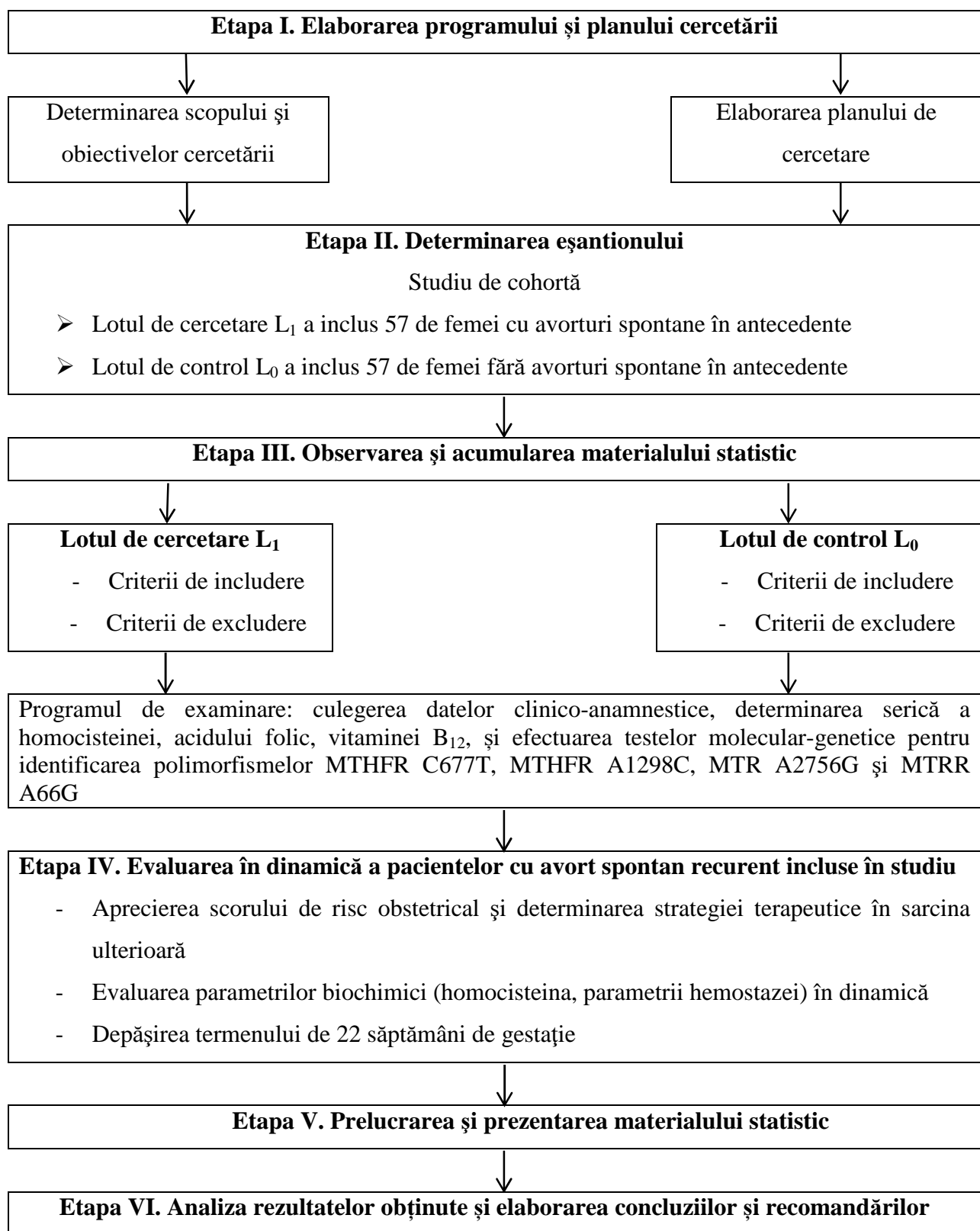


Fig. 2.1. Design-ul general al cercetării.

Subiecților studiului, premergător obținerii consimțământului de participare în studiu, le-au fost aduse la cunoștință, în baza fișei de informare, aspectele ce țin de scopul cercetării,

drepturile și responsabilitățile din timpul studiului, riscurile și beneficiile potențiale, confidențialitatea datelor. Acceptul participării în cercetare a fost consemnat prin acord informat.

Criteriile de evaluare nu au fost modificate pe parcursul studiului.

2.2. Metodele clinico-paraclinice de examinare și cercetare

Ipoteza cercetării este argumentată de: (1) Impactul hiperhomocisteinemiei și rolul polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G în patogeneza pierderii recurente a sarcinii; (2) Lipsa studiilor naționale privind rolul homocisteinei, vitaminei B₁₂, acidului folic și polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G la femeile cu avort spontan recurent; (3) Lipsa datelor asupra incidenței hiperhomocisteinemiei și frecvenței polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G la femeile cu avort spontan recurent din Republica Moldova.

Pentru demonstrarea ipotezei cercetării au fost aplicate următoarele metode de acumulare a datelor: metoda istorică, metoda comparației, metoda analitică, metoda observării statistice, metoda matematică. Metoda istorică a permis documentarea cu datele literaturii de specialitate și studierea noțiunilor generale privind dereglările metabolismului metioninei în diferite entități nosologice. Metoda comparației a permis evaluarea și compararea fenomenului studiat la diferite categorii (femei de vârstă reproductivă, femei însărcinate, femei cu anamneza obstetricală complicată în antecedente etc.) din diferite țări. Metoda analitică a fost aplicată pentru a studia dereglările metabolismului metioninei și homocisteinei la femeile cu pierderea recurentă a sarcinii, cu scopul de a realiza caracterizarea acestui fenomen. Metoda observării statistice a studiat dereglările metabolismului metioninei la femeile cu avort spontan recurent. S-au folosit următoarele metode de colectare a informației: metoda de anchetare, tip deschis și metoda extragerii informației din documentele medicale. Metoda matematică s-a folosit pentru aprecierea și prelucrarea informației acumulate.

Pentru o investigație multilaterală și ținând cont de scopul propus s-au aplicat metodele directă și indirectă de cercetare.

A. Metoda directă:

A.1. Anchetarea

Examinarea pacientelor a început cu interviu standard, care a avut drept scop obținerea datelor referitor la vârstă, distribuția demografică, statutul social, antecedente personale, anamneza obstetrical-ginecologică, anamneza somatică.

Analiza antecedentelor personale cuprinde următoarele informații: date antropometrice - înălțimea (cm) și greutatea (kg), fumat, consum de alcool, tipul alimentației. S-a calculat indicele de masă corporală (IMC), care reprezintă raportul între greutate (kg) și înălțimea la pătrat (m²).

Măsurarea greutății corporale s-a realizat prin cântărire cu un cântar standardizat, pentru fiecare participantă la studiu.

Anamneza obstetricală s-a axat pe colectarea datelor privind paritatea, numărul de avorturi spontane, termenul la care s-a produs pierderea spontană a sarcinii, numărul de avorturi la cerere, evoluția sarcinilor precedente și complicațiile survenite. Anamneza ginecologică a inclus vârsta menarhei, caracterul ciclului menstrual (durata, intervalul, cantitatea), contracepția utilizată. Analizând anamneza somatică, ne-am referit la colectarea informației despre maladiile aparatelor respirator, cardiovascular, despre tulburări gastrointestinale, maladii neurologice, patologii nefro-urinare, patologii oculare etc.

A.2. Determinarea parametrilor de laborator

Recoltarea probelor de sânge s-a efectuat dimineața, pe nemâncate.

2.1. Determinarea concentrației plasmatice a homocisteinei. Specimen recoltat: sânge venos recoltat pe EDTA, în tuburi de unică folosință, prin puncție venoasă. Investigația efectuată la analizatorul IMMULITE 2000XPi prin metoda chemiluminiscență pe aparatul Immulite Siemens, valori de referință între 5-12 $\mu\text{mol/l}$. Toate probele au fost păstrate la gheață după prelevare și înainte de prelucrare. Centrifugarea probelor de sânge a fost efectuată în maxim 30 minute de la momentul recoltării. Metoda chemiluminiscență de determinare a homocisteinei include 2 cicluri de incubare a câte 30 minute. Ciclul 1 – etapa preliminară de reducere, necesară pentru eliberarea homocisteinei libere din diferite complexe în care este legată prin legături disulfidice, iar apoi prin conversie este transformată în S-adenozin-L-homocisteina. Agenții reducători sunt: ditiotreitol și S-adenozin-L-homocisteina hidrolaza, enzimă implicată în sinteza homocisteinei în organism. Ciclul 2 – reacția imunologică de determinare a homocisteinei are la bază legarea specifică la un anticorp anti-S-adenozin-L-homocisteina marcat cu fosfataza alcalină. Complexul format este cuantificat folosind substratul de dioxetan pentru a produce lumină. Lumina a fost emisă atunci când substratul chemiluminiscent a reacționat cu marker-ul fosfataza alcalină. Emisia de lumină a fost detectată de Tubul de Fotomultiplicare.

2.2. Determinarea concentrației serice a acidului folic. Specimen recoltat: sânge venos recoltat în vacutainer de unică folosință, prin puncție venoasă. Investigația efectuată la analizatorul IMMULITE 2000XPi prin metoda chemiluminiscență pe aparatul Immulite Siemens, valori de referință între 13,5-45,3 nmol/L . Centrifugarea probelor de sânge a fost efectuată în maxim 30 minute de la momentul recoltării. Metoda chemiluminiscență de determinare a acidului folic include 4 cicluri de incubare a câte 30 minute. Ciclurile 1 și 2 – reprezintă etapele de denaturare alcalină a proteinelor endogene, în care acidul folic este tratat inițial cu agentul reducător ditiotreitol, ulterior cu hidroxid de sodium/cianura de potasiu. Ciclul

3 – etapa de legare: acidului folic eliberat formează un complex cu o proteină care leagă folatul și ciclul 4 – reacția imunologică care are la bază legarea specifică la un anticorp anti-folat marcat cu fosfataza alcalină. Complexul format este cuantificat folosind substratul de dioxetan pentru a produce lumină. Lumina a fost emisă atunci când substratul chemiluminiscent a reacționat cu marker-ul fosfataza alcalină. Emisia de lumină a fost detectată de Tubul de Fotomultiplicare.

2.3. Determinarea concentrației serice a vitaminei B₁₂. Specimen recoltat: sânge venos recoltat în vacutainer de unică folosință, prin puncție venoasă. Investigația efectuată la analizatorul IMMULITE 2000XPi prin metoda chemiluminiscentă pe aparatul Immulite Siemens, valori de referință între 259-725 pmol/L. Centrifugarea probelor de sânge a fost efectuată în maxim 30 minute de la momentul recoltării. Metoda chemiluminiscentă de determinare a acidului folic include 3 cicluri de incubare a câte 30 minute. Ciclul 1 – etapa de denaturare alcalină a proteinelor endogene, în care vitamina B₁₂ este tratată cu agenții reducători: ditiotritol și hidroxid de sodium/cianura de potasiu. Ciclurile 2 și 3 reprezintă reacții imunologice care au la bază formarea complexului vitamin B₁₂-factorul intrinsec hog și legarea specifică la un anticorp anti-factor intrinsec hog, marcat cu fosfataza alcalină. Complexul format este cuantificat folosind substratul de dioxetan pentru a produce lumină. Lumina a fost emisă atunci când substratul chemiluminiscent a reacționat cu marker-ul fosfataza alcalină. Emisia de lumină a fost detectată de Tubul de Fotomultiplicare.

2.4. Determinarea parametrilor hemostazei. Parametrii folosiți în evaluarea hemostazei sunt: numărul de trombocite (valoarea de referință 180-320×10⁹/l) cu ajutorul metodei microscopice tradiționale în frotiul sangvin, timpul de protrombină – metoda Quick (norma 70-100%), timpul de tromboplastină parțial activată (APTT) – metoda coagulometrică (valoarea de referință 35-50 sec.) și fibrinogenul – metoda Clauss (valoarea de referință 2-4 g/l).

A.3. Testarea molecular-genetică

Identificarea polimorfismelor MTHFR C677T (rs 1801133), MTHFR A1298C (rs 1801133), MTR A2756G (rs 1805087) și MTRR A66G (rs 180139) s-au realizat în cadrul laboratorului medical al Centrului medical „Repromed”.

Etapile analizei: (a) recoltarea probelor ale materialului biologic (sânge periferic); (b) extragerea ADN-ului din sânge; (c) efectuarea reacției de polimerizare în lanț (PCR) utilizând primeri specifici; (d) verificarea amplificării ADN-ului prin electroforeză în gel de poliacrilamidă de 7,5%; (e) restricția ampliconului cu restricțaza specifică în termostat la temperatura de 37 °C timp de 3 ore; (f) verificarea restricției prin electroforeză în gel de poliacrilamidă de 7.5%; (g) fotodocumentarea gelului și interpretarea rezultatelor.

Specimen recoltat: sânge venos recoltat pe EDTA, în tuburi de unică folosință, prin puncție venoasă. ADN-ul genomic a fost extras utilizând chituri specializate (GeneJet Whole Genomic DNA Purification Mini Kit, Fermentas) din leucocitele sângelui periferic. Pentru testarea genetică a polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G s-au realizat reacțiile de polimerizare în lanț și polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție (PCR/RFLP).

Pentru efectuarea reacției de polimerizare în lanț pentru polimorfismul C677T a genei MTHFR s-au utilizat următorii primeri:

- Forward primer cu secvența **GCCCATGTCGGTGCATGCCTTCA**;
- Reverse primer cu secvența **CCTTGAACAGGTGGAGGCCAGCC**.

Pentru efectuarea reacției de polimerizare în lanț pentru polimorfismul A1298C a genei MTHFR s-au utilizat următorii primeri:

- Forward primer cu secvența **CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTAC**;
- Reverse primer cu secvența **CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG**.

Pentru efectuarea reacției de polimerizare în lanț pentru polimorfismul A2756G a genei MTR s-au utilizat următorii primeri:

- Forward primer cu secvența **GGTGCCAGGTATACAGTGACTIONCT**;
- Reverse primer cu secvența **GATCCAAAGCCTTTTACACTCCTC**.

Pentru efectuarea reacției de polimerizare în lanț pentru polimorfismul A66G a genei MTRR s-au utilizat următorii primeri:

- Forward primer cu secvența **AAGGCCATCGCAGAAGACAT**;
- Reverse primer cu secvența **CACTTCCCAACCAAAATTCTTCAAAG**.

ADN-ul genomic a fost amplificat folosind polimeraza Dream Taq („Fermentas”, USA), la termociclu „Tprofessional Basic 96” (Biometra, Germania).

Regimul de amplificare pentru polimorfismele MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G în termociclu este prezentat în tabelul 2.1.

Condițiile reacției au fost asemănătoare pentru toate cele patru polimorfismele, cu excepția temperaturii de aliniere a primelor: 60.4°C pentru polimorfismul MTHFR C677T, 61°C pentru polimorfismul MTHFR A1298C, 58.4°C pentru polimorfismul MTR A2756G și 57.6°C pentru polimorfismul MTRR A66G. Condițiile protocolului standard au fost: (1) ciclul 1 – denaturarea inițială la 95°C – 3 minute; (2) ciclul 2 – 33 cicluri: 94°C – 30 secunde, 57.6°C – 61°C – 30 secunde, 72°C – 30 secunde; (3) ciclul 3 – elongația finală la 72°C – 5 minute.

Tabelul 2.1. Regimul de amplificare pentru polimorfismele MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G

Polimorfismul	Ciclul	Temperatura, °C	Timpul	Munărul de repetări ale ciclurilor
MTHFR C677T	1	95	3 min	1
	2	94	30 sec	33
		60.4	0 sec	
		72	30 sec	
	3	72	5 min	1
4	16	fără limită	1	
MTHFR A1298C	1	95	3 min	1
	2	94	30 sec	33
		61	30 sec	
		72	50 sec	
	3	72	5 min	1
4	16	fără limită	1	
MTR A2756G	1	95	3 min	1
	2	94	30 sec	33
		58.4	30 sec	
		72	30 sec	
	3	72	5 min	1
4	16	fără limită	1	
MTRR A66G	1	95	3 min	1
	2	94	30 sec	33
		57.6	30 sec	
		72	30 sec	
	3	72	5 min	1
4	16	fără limită	1	

Fragmentele amplificate de ADN au fost analizate prin metoda separării electroforetice, ADN-ul fiind separat în gel de poliacrilamidă de 7,5%. În urma confirmării amplificării fragmentelor, ampliconii au fost supuși restricției timp de 3 ore la 37°C cu enzimele de restricție specifice. S-au utilizat următoarele enzime: Hinf 1 pentru polimorfismul MTHFR C677T, Mbo

II pentru polimorfismul MTHFR A1298C, Hae II pentru polimorfismul MTR A2756G și Nde I pentru polimorfismul MTRR A66G. Verificarea și examinarea produșilor de restricție s-a realizat prin electroforeză în gel de poliacrilamidă cu concentrația de 7,5% - în condițiile: 200 V pe parcursul a 3 ore. Gelul a fost colorat cu soluție de etidiu. Rezultatele au fost vizualizate și interpretate la sistemul UV SOLO (Germania).

Evaluarea riscului de complicații obstetricale în prezența mutațiilor trombofilice la pacientele cu avort spontan recurent din studiu cu mutații genetice a enzimelor implicate în metabolismul homocisteinei și metioninei a fost efectuată prin acordarea unui punctaj fiecărui polimorfism identificat conform tabelului 2.2 [42; 43; 55].

Tabelul 2.2. Evaluarea riscului de complicații obstetricale în prezența mutațiilor trombofilice

Factori de risc	Punctaj
Polimorfismul heterozigot I/D în gena PLAT Polimorfismul heterozigot G/A în gena fibrinogenului	0
Polimorfismul heterozigot ale genelor ITGA2 (807C>T), ITGB3 (1565T>C) și PAI-1 (4G/5G) Polimorfismul homozigot A/A în gena fibrinogenului Polimorfismul heterozigot ale genelor MTR (2756A>G), MTRR (66A>G) Polimorfismul homozigot I/I în gena PLAT	1
Polimorfismul heterozigot a genei MTHFR (677C>T și 1298 A>C) Polimorfismul homozigot ale genelor ITGA2 (807C>T), ITGB3 (1565T>C) și PAI-1 (4G/5G) Polimorfismul homozigot mutant ale genelor MTR (2756A>G), MTRR (66A>G)	2
Polimorfismul homozigot mutant a genei MTHFR (677C>T și 1298 A>C) Polimorfismul heterozigot a genei F5 - factorul V Leiden (1691 G>A) Polimorfismul heterozigot a genei protrombinei F5 (20210 G>A)	3
Polimorfismul homozigot a genei F5 - factorul V Leiden (1691 G>A) Polimorfismul homozigot a genei protrombinei F5 (20210 G>A)	4

Acumularea observațiilor a fost realizată în baza unei anchete elaborate pentru cercetare (Anexa 1). În scopul asigurării principiului confidențialității, chestionarul a fost de tip depersonalizat și nu a inclus în structura sa rubrici care solicită menționarea informațiilor cu caracter personal.

Chestionarul utilizat a inclus un număr total de 80 întrebări și a fost structurat pe următoarele compartimente: (1) date personale despre pacientă; (2) antecedente obstetrical-ginecologice; (3) antecedente personale patologice; (4) antecedente heredocolaterale; (5) investigații de laborator, care au inclus: parametri biochimici, analize molecular-genetice și parametri hemostazei; (6) tratament preconcepțional și în sarcină; (7) anamneza obstetricală actuală; (8) investigații de laborator: I-ul trimestru de sarcină; (9) investigații de laborator: al II-a trimestru de sarcină.

Rezultatele cercetărilor clinice, de laborator și rezultatul testărilor molecular-genetice au fost incluse în cadrul chestionarului.

B. Metoda indirectă:

B.1. Date bibliografice

Au permis o sinteză succintă a datelor literaturii cu referire la realizările domeniului de interes investigațional. A fost efectuată în două etape: cercetarea bibliografică propriu-zisă și metaanaliza materialului studiat.

B.2. Extragerea datelor din documentele medicale

B.3. Statistica oficială

2.3. Metodele de evaluare statistică pentru analiza rezultatelor

Datele primare au fost procesate prin intermediul aplicației Excel (din pachetul Microsoft Office 2010) și online, cu aplicația OpenEpi v.2.3.1 [195]. Pentru fiecare set de valori au fost calculate elemente de statistică descriptivă. Analiza s-a efectuat prin gruparea și determinarea mediei aritmetice, veridicitatea rezultatelor s-a determinat prin evaluarea abaterii medii pătratică și a erorii standard pentru valorile medii, cu calcularea ratelor și proporțiilor.

Semnificația statistică pentru valorile relative a fost stabilită prin intervalul de încredere pentru 95% (\hat{I}_{95}). Semnificația statistică pentru comparația valorilor medii și relative în limitele a două populații analizate a fost apreciată prin calcularea testului de semnificație (t-Student) și pragului de semnificație (p) prin intermediul programului MedCalc.

Pentru a determina corelația dintre indicii obținuți în studiu, a fost utilizat coeficientul de corelație (r_{xy}), fiind calculat prin intermediul funcțiilor statistice MS Excel 2010. Coeficientul de corelație indică puterea de corelație dintre două variabile cu evoluție liniară. În medicină, întâlnim de obicei valori ale coeficientului de corelație intermediare valorilor -1 și $+1$ [27].

Genotipurile au fost introduse în baza de date de tip Excel. Frecvențele alelice și ale genotipurilor au fost calculate pentru ambele grupuri și testul χ^2 a fost aplicat pentru a stabili dacă distribuția genotipurilor este în echilibru Hardy-Weinberg. A fost realizată compararea frecvențelor variantelor genice între cele două grupuri pentru a vedea dacă diferențele sunt

semnificative statistic. Riscul este prezentat ca și Raportul șanselor (OR), pentru un interval de încredere de 95%, cu respectarea semnificației: OR (\hat{I}_{95}) < 1 factor protectiv, OR (\hat{I}_{95}) = 1 factor neutru și OR (\hat{I}_{95}) > 1 factor de risc.

Riscul relativ (RR) este prezența legăturii dintre o boală și prezența unui factor de risc, presupus a influența apariția ei. RR reprezintă raportul dintre riscul la cei expuși și riscul la cei neexpuși (Tabelul 2.3).

Tabelul 2.3. Tabelul de contingență 2x2

Factor de risc	Rezultat		Total
	prezentă	absentă	
Expuși	a	b	m ₁
Neexpuși	c	d	m ₂
Total	n ₁	n ₂	t

RR indică de câte ori este mai mare probabilitatea de a contracta boala când persoana este expusă, decât atunci când nu este expusă ($RR = a/(a+b):c/(c+d)$). Valori ale RR apropiate de 1 arată aproximativ aceeași probabilitate de a face boala, atât la expuși, cât și la neexpuși, și trebuie considerat că factorul de risc respectiv nu are o influență reală asupra apariției bolii. Dacă RR are valori mult mai mari decât 1, este o indicație că între factorul de risc și boală este o legătură de corelație care, de obicei este interpretată ca fiind cauzală.

Reprezentarea grafică a rezultatelor (diferite tipuri de tabele, grafice și diagrame) s-a realizat prin intermediul aplicației Excel (din pachetul Microsoft Office 2010).

2.4. Concluzii la capitolul 2

1. Cercetarea reprezintă un studiu de cohortă care are drept scop de a evalua dereglările metabolismului metioninei la pacientele cu avort spontan recurent prin evaluarea concentrației serice a homocisteinei și factorilor implicați în metabolismul ei: stilul de viață, valorile serice ale acidului folic și vitaminei B₁₂, cât și deficiențele enzimatică induse de mutațiile genetice în genele MTHFR, MTR și MTRR.
2. Cercetarea a fost realizată în perioada mai 2014 – decembrie 2016 și a prevăzut toate etapele cercetării statistice: (1) elaborarea programului și planului cercetării; (2) determinarea eșantionului; (3) observarea materialului statistic; (4) prelucrarea și prezentarea materialului statistic; (5) analiza rezultatelor obținute și elaborarea concluziilor și recomandărilor.

3. Acumularea observațiilor a fost instrumentată în baza unei anchete elaborate pentru studiu. În scopul asigurării principiului confidențialității, chestionarul a fost de tip depersonalizat.
4. Datele primare au fost procesate prin intermediul aplicației Excel (din pachetul Microsoft Office 2010) și online, cu aplicația OpenEpi v.2.3.1, și programului MedCalc.

3. PARTICULARITĂȚILE ANAMNESTICE OBSTETRICAL-GINECOLOGICE ȘI ANALIZELE DE LABORATOR LA PACIENTELE CU AVORT SPONTAN RECURENT

3.1. Caracteristicile socio-demografice și particularitățile anamnezei obstetrical-ginecologice ale pacientelor incluse în studiu

Studiile statistice au dovedit că există o scădere fiziologică a fertilității feminine odată cu avansarea în vârstă, aceasta fiind maximă între 20 și 24 ani, se reduce ușor între 25 și 29 ani, și apoi scade dramatic după 40 de ani [15]. Datele despre structura vârstei pacientelor incluse în studiu sunt prezentate în figura 3.1. În lotul de bază, vârsta pacientelor chestionate, la momentul luării în studiu, a fost cuprinsă între 20 și 45 ani, vârsta medie a pacientelor a constituit $30,15 \pm 0,76$ ani. Corespunzător vârstei, pacientele au fost repartizate pe următoarele grupe: 20-24 ani – 12 paciente ($21,05 \pm 5,39\%$), 25-29 ani – 15 paciente ($26,31 \pm 5,84\%$), 30-34 ani – 12 paciente ($21,05 \pm 5,39\%$), 34-39 ani – 16 paciente ($28,07 \pm 5,95\%$) și 40-45 ani – 2 paciente ($3,50 \pm 2,43\%$). În lotul martor, vârsta pacientelor a fost cuprinsă între 20 și 32 ani, vârsta medie fiind de $25,26 \pm 0,40$ ani. Grupa de vârstă 20-24 ani a inclus 18 paciente ($31,57 \pm 6,15\%$), 25-29 ani – 33 paciente ($57,90 \pm 6,53\%$) și 30-34 ani – 6 paciente ($10,53 \pm 4,06\%$). Paciente în grupele de vârstă 35-39 ani și 40-45 ani nu au fost depistate în lotul martor.

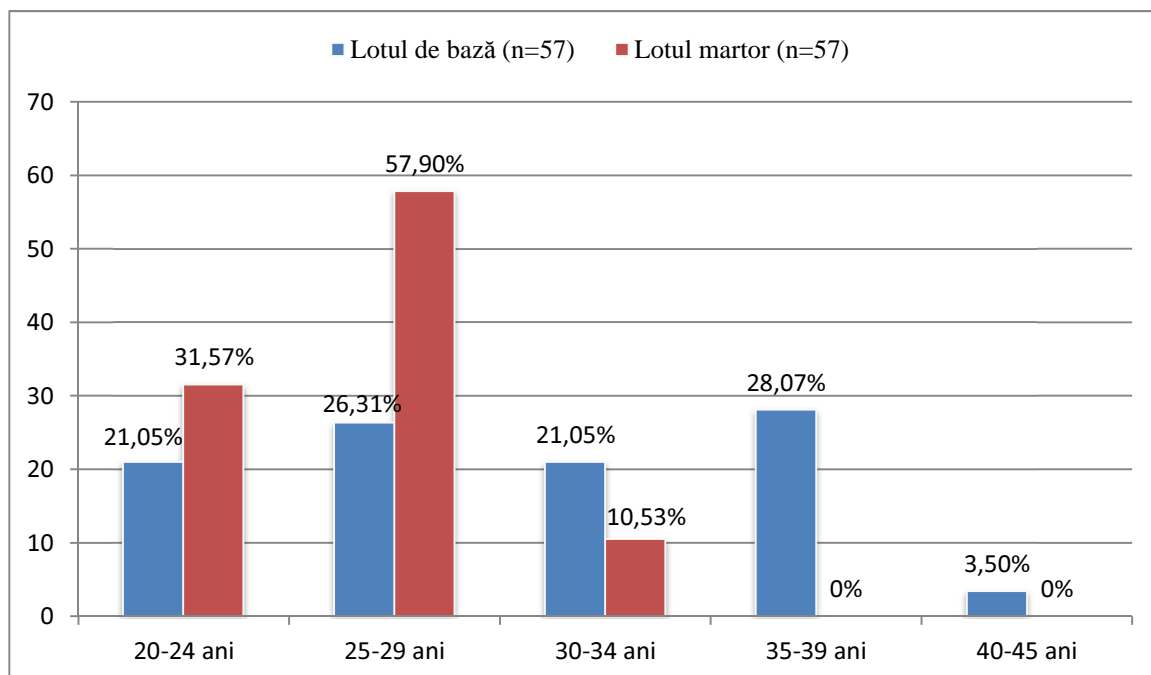


Fig. 3.1. Structura pe grupe de vârstă a pacientelor incluse în studiu (%).

Așa dar, în lotul de bază, cele mai multe paciente au vârsta cuprinsă între 30 și 39 ani, cu o rată de $49,12 \pm 6,62\%$. În lotul martor, numărul cel mai mare de femei a fost înregistrat în grupa de vârstă cuprinsă între 25-29 ani, cu o rată de $57,90 \pm 6,53\%$. Repartiția pe vârstă a pacientelor are relevanță, iar acest interval corespunde perioadei de vârstă în care pacientele prezintă o rată crescută de fertilitate. De asemenea, dorim să precizăm că în lotul pacientelor diagnosticate cu avort spontan recurent, grupa de vârstă 34-39 ani a constituit $28,07 \pm 5,95\%$, iar 40-45 ani – $3,50 \pm 2,43\%$, astfel putem presupune că incapacitatea de a menține o sarcină determină vârsta maternă avansată la momentul concepției. Repartizarea cazurilor incluse în studiu pe grupele de vârstă diferă semnificativ statistic pentru grupa de vârstă 34-39 ani ($p < 0.001$).

Repartizarea respondentelor în funcție de mediul de reședință este următoarea: în lotul de bază – 34 paciente ($59,64 \pm 6,49\%$) proveneau din mediul urban și 23 paciente ($40,36 \pm 6,49\%$) din mediul rural. În lotul martor s-a determinat că 42 paciente ($73,68 \pm 5,84\%$) sunt din mediul urban și 15 paciente ($26,32 \pm 5,84\%$) din mediul rural.

Statutul social al pacientelor a fost evaluat conform următorilor parametri: starea civilă, nivelul educațional și locul de muncă (Tabelul 3.1).

Din punct de vedere al statutului familial, în lotul de bază am constatat că 55 paciente ($96,5 \pm 2,43\%$) erau căsătorite, căsătorie neînregistrată s-a determinat doar la 2 paciente ($3,50 \pm 2,43\%$). Paciente necăsătorite nu au fost înregistrate. În lotul martor toate pacientele erau căsătorite. Acest aspect ar putea fi explicat de vârsta medie a pacientelor incluse în cercetare (L_1 – $30,15 \pm 0,76$ ani și L_0 – $25,26 \pm 0,40$ ani).

Analizând distribuția după nivelul educațional al pacientelor diagnosticate cu avort spontan recurent, putem menționa că cea mai mare parte dintre acestea au studii superioare – 30 respondente ($52,63 \pm 6,61\%$), urmate de grupul de paciente cu studii medii – 19 respondente ($33,33\%$), și o parte ne semnificativă a pacientelor au doar studii liceale/gimnaziale – 4 respondente ($7,02 \pm 3,38\%$). Studii superioare incomplete au fost înregistrate la 4 respondente ($7,02 \pm 3,38\%$). În lotul martor au fost înregistrate 36 femei cu studii superioare ($63,15 \pm 6,38\%$), urmate de cele cu studii medii – 14 femei ($24,57 \pm 5,70\%$) și studii superioare incomplete – 7 femei ($12,28 \pm 4,43\%$).

Estimarea datelor despre locul de muncă al pacientelor din lotul de bază, denotă faptul că 35 respondente ($61,40 \pm 6,44\%$) erau angajate în diverse sfere de activitate, urmate de grupul femeilor care erau muncitoare – 13 respondente ($22,80 \pm 5,55\%$), apoi femeile casnice – 5 respondente ($8,78 \pm 3,74\%$) și în final, în proporții apropiate, categoria studentelor – 4 respondente ($7,02 \pm 3,38\%$), prin comparație cu lotul martor, unde s-a constatat că 26 respondente ($45,62 \pm 6,59\%$) erau încadrate în domeniul muncii intelectuale, 22 femei ($38,60 \pm 6,44\%$) erau

muncitoare, 2 femei ($3,50\pm 2,43\%$) care efectuează lucrul casnic și 7 respondente ($12,38\pm 4,36\%$) erau studente. Studiind rezultatele obținute, prin comparația datelor dintre loturi, nu s-au stabilit diferențe statistice semnificative.

Tabelul 3.1. Statutul social al pacienților din loturile de studiu

Parametri		Lotul de bază, n=57		Lotul martor, n=57		t	p
		Abs.	P±ES	Abs.	P±ES		
Starea civilă	Căsătorie înregistrată	55	$96,5\pm 2,43$	57	100	1,440	>0.05
	Căsătorie neînregistrată	2	$3,50\pm 2,43$	0	0	1,440	>0.05
Nivelul educațional	Studii superioare	30	$52,63\pm 6,61$	36	$63,15\pm 6,38$	1,145	>0.05
	Studii superioare incomplete	4	$7,02\pm 3,38$	7	$12,28\pm 4,43$	0,944	>0.05
	Studii medii	19	$33,33\pm 6,24$	14	$24,57\pm 5,70$	1,036	>0.05
	Studii liceale	4	$7,02\pm 3,38$	0	0	2,076	<0.001
Locul de muncă	Funcționară	35	$61,40\pm 6,44$	26	$45,62\pm 6,59$	1,713	>0.05
	Muncitoare	13	$22,80\pm 5,55$	22	$38,60\pm 6,44$	1,858	>0.05
	Casnică	5	$8,78\pm 3,74$	2	$3,50\pm 2,43$	1,186	>0.05
	Studentă	4	$7,02\pm 3,38$	7	$12,38\pm 4,36$	0,972	>0.05

Datele din literatură de specialitate relatează despre rolul fumatului, consumului de cafea, consumului de alcool și sedentarismului în dezvoltarea hiperhomocisteinemiei [47, p. 36; 65; 75; 101; 103; 148, p. 17; 157]. În acest context, acești factori au fost studiați la pacientele din loturile cercetate.

Din analiza rezultatelor obținute privind IMC în lotul de bază (Figura 3.2), s-a apreciat că pe primul loc se situează statusul normoponderal (clasa de valori 18,50 – 24,99) determinat la 29 paciente ($50,87\pm 6,62\%$), urmat de statusul supraponderal (clasa de valori 25,00 – 29,99) determinat la 24 paciente ($42,11\pm 6,53\%$) și doar 4 paciente ($7,02\pm 3,38\%$) erau obeze (clasa de valori > 30). Ponderea cea mai mare, în rândul pacienților cu avort spontan recurent, o au două grupe de paciente, în această ordine: normoponderale și supraponderale, pacientele cu obezitate

fiind situate la distanță mare de celelalte două grupe. Astfel, o mare parte din femeile chestionate nu prezintă creșterea masei corporale și a tesutului adipos. Valoarea IMC mediu în lotul de bază este de $24,60 \pm 0,44 \text{ kg/m}^2$.

În lotul martor, analizând IMC am constatat că 32 paciente ($56,15 \pm 6,57\%$) erau normoponderale, 23 paciente ($40,35 \pm 6,49\%$) supraponderale și 2 paciente ($3,50 \pm 2,43\%$) erau obeze. Valoarea IMC mediu în lotul martor este de $24,20 \pm 0,44 \text{ kg/m}^2$. Nu există diferențe statistic semnificative între ponderea acestor categorii între loturile de cercetare ($p > 0,05$).

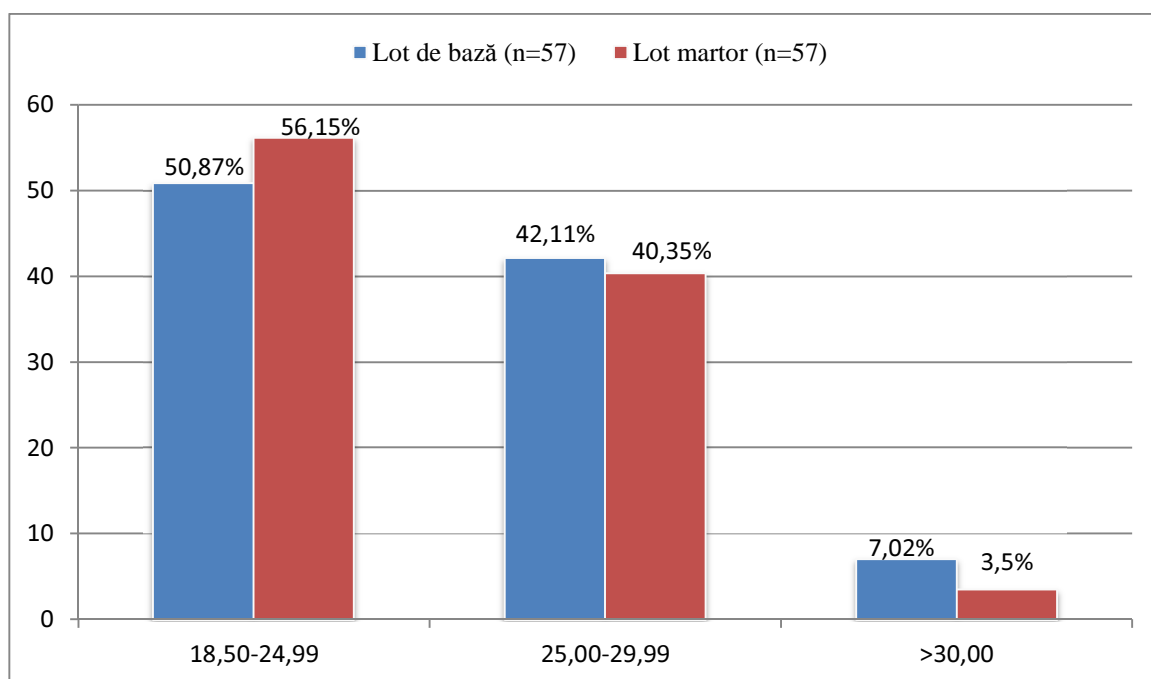


Figura 3.2. Repartiția valorilor IMC la pacientele din cercetare (%).

A fost evaluat nivelul de activitate fizică. În rândul pacientelor cu avort spontan recurent, sport practică 14 femei ($24,56 \pm 5,70\%$) din totalul pacientelor, iar 43 femei ($75,44 \pm 5,70\%$) nu prezintă preocupări în acest sens. Evaluând activitatea fizică în lotul martor, am determinat că 23 femei ($40,35 \pm 6,49\%$) desfășoară diverse activități sportive (frecventează secții sportive sau alte activități dinamice), iar 34 femei ($59,65 \pm 6,49\%$) prezintă un comportament sedentar.

A fost efectuată analiza factorilor de risc comportamentali și am apreciat că în lotul de bază 53 paciente ($92,98\%$) erau nefumătoare, iar 4 paciente ($7,02\%$) erau fumătoare active (Figura 3.3). În grupul pacientelor nefumătoare s-a constatat într-un caz o fostă fumătoare. Dintre pacientele fumătoare, 2 paciente au menționat că fumează sub 10 țigări pe zi (consum moderat) și altele 2 paciente au menționat că fumează peste 10 țigări pe zi (consum sever). Doamnele fumătoare au indicat că fumează timp de 5 ani. În lotul martor, 6 respondente ($10,53\%$) erau fumătoare active

și 51 paciente (89,47%) au afirmat că nu au fumat niciodată. Pacientele fumătoare au răspuns că fumează sub 10 țigări pe zi.

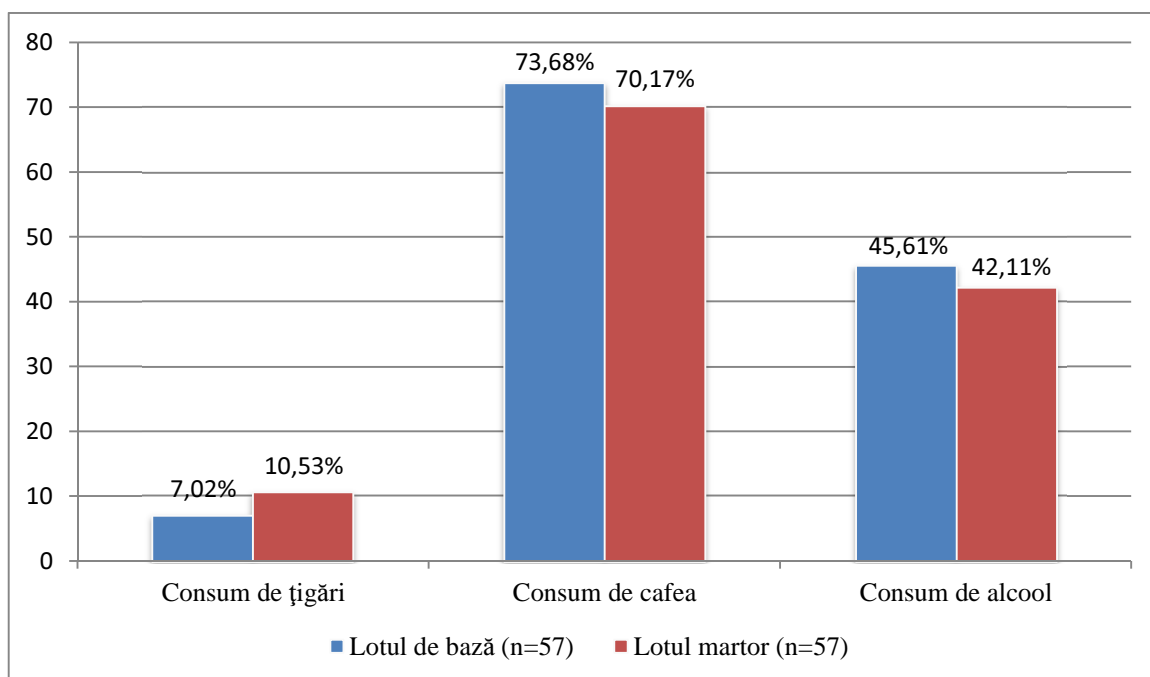


Fig. 3.3. Factorii de risc comportamentali la pacientele din cercetare (%).

Consumul de cafea în lotul de bază este frecvent întâlnit, fiind constatat la 42 respondente ($73,68 \pm 5,84\%$), iar la 15 participante ($26,32 \pm 5,84\%$) acesta este absent (Figura 3.3). În ceea ce privește numărul ceștilor de cafea, 20 paciente ($35,08\%$) din doamnele chestionate nu consumă mai mult de 1-2 cești de cafea pe zi, 10 paciente ($17,55\%$) prezintă un consum ridicat de cafea (3 și mai multe cești pe zi), iar la 12 paciente ($21,05\%$) consumul de cafea este ocazional. Consumul de cafea cu durată mai mică de 5 ani a fost înregistrat la 19 paciente ($45,23\%$), față de doar 23 paciente ($54,76\%$) care afirmă consum cu durată mai mare de 5 ani. În lotul martor, consumul de cafea, de asemenea, este frecvent întâlnit și s-a constatat la 40 respondente ($70,17 \pm 6,05\%$). Dintre acestea, 22 respondente ($38,60\%$) consumă 1-2 cești de cafea pe zi, 8 respondente ($14,08\%$) consumă ≥ 3 cești de cafea pe zi, iar 10 respondente ($17,54\%$) întrebuințează rar cafea.

În ceea ce privește consumul de alcool, în lotul de bază 26 paciente ($45,61 \pm 6,59\%$) răspund afirmativ la această întrebare, iar alte 31 paciente ($54,39 \pm 6,59\%$) susțin că nu consumă alcool (Figura 3.3). Dintre respondentele care consumă alcool, 8 respondente ($14,04\%$) consumă alcool o dată pe lună sau mai rar, iar 18 respondente ($31,57\%$) consumă cu ocazia unor petreceri sau evenimente. Ordinea preferințelor referitoare la tipul de alcool consumat este vin, afirmat de

19 respondente (33,33%), urmat de bere, menționat de 6 respondente (10,53%) și tărie, declarat doar de 5 respondente (8,78%). În acest context, nu a fost înregistrat nici un caz de consum moderat sau exagerat de alcool în rândul pacientelor cu avort spontan recurent.

În lotul martor, consumul de alcool este mai puțin frecvent, astfel că 24 paciente (42,11±6,53%) au raportat consum de alcool cu ocazia unor petreceri sau evenimente. Ordinea preferințelor alimentare fiind vin, declarat de 12 paciente (21,05%), bere – 8 paciente (14,04%) și tărie 4 paciente (7,02%).

Nu există diferențe semnificative statistice în raport cu factorii de risc comportamentali între loturile de cercetare ($p>0.05$).

Un aport alimentar redus de acid folic și vitamina B₁₂ este asociat cu creșterea nivelului plasmatic al homocisteinei [39; 47, p. 36; 64; 76; 82; 101; 170]. Un regim alimentar care să includă fructe, legume, cereale integrale, pește și carne slabă este cea mai bună alegere [76]. A fost analizat regimul alimentar al pacientelor din studiu, evaluând factorii de risc alimentari, în conformitate cu ancheta nutrițională întocmită.

Tipurile de regim alimentar (Tabelul 3.2) le-am studiat în funcție de clasificarea lor: omnivoră, omnivoră predominant carnată, ovolactovegetariană, lactovegetariană și vegetariană strictă.

Analizând datele referitor la regimul alimentar, per ansamblu, în ambele loturi de cercetare s-a constatat că ponderea cea mai mare o are regimul omnivor, fiind întâlnit la 51 respondente (89,47±4,06%) în lotul de bază și la 50 respondente (87,72±4,34%) în lotul martor. Regimul omnivor, predominant carnat a fost înregistrat la 5 respondente (8,78±3,74%) în lotul de bază și la 6 respondente (10,53±4,06%) în lotul martor. Regimul lactovegetarian a fost prezent la 1 respondentă (1,75±0,98%) doar în lotul de bază, iar în lotul martor 1 pacientă (1,75±0,98%) a declarat că a adoptat regimul ovolactovegetarian. Dieta strict vegetariană nu au fost înregistrată în loturile de studiu. Nu s-a constatat diferență semnificativă statistică între loturile de cercetare în raport cu tipul de regim alimentar ($p>0.05$).

Orarul meselor a fost nesistematizat în rândul pacientelor cu avort spontan recurent, astfel că 24 paciente (42,11±6,53%) au un consum regulat, respectând cele trei mese principale ale zilei (mic dejun, prânz și cina), iar 33 paciente (57,89±6,53%) declară un ritm alimentar inadecvat. Ritmul alimentar vizând numărul meselor pe zi în lotul martor arată astfel: 39 paciente (68,42±6,15%) au raportat cel puțin 3 prize alimentare pe zi, iar 18 paciente (31,58±6,15%) au raportat 1-2 prize alimentare pe zi. S-a constatat diferență semnificativă statistică între loturile de cercetare în raport cu ritmul alimentar ($p<0.01$).

Tabelul 3.2. Caracteristica loturilor de cercetare în funcție de preferințele alimentare

Preferințe alimentare		Lotul de bază, n=57		Lotul martor, n=57		t	p
		Abs.	P±ES	Abs.	P±ES		
Regimul alimentar	Omnivoră	51	89,47±4,06	50	87,72±4,34	0,29	>0.05
	Carnată	5	8,78±3,74	6	10,53±4,06	0,31	>0.05
	Ovolactovegetariană	0	0	1	1,75±0,98	1,78	>0.05
	Lactovegetariană	1	1,75±0,98	0	0	1,78	>0.05
Ritmul alimentar	Ritm alimentar adecvat	24	42,11±6,53	39	68,42±6,15	2,93	<0.01
	Ritm alimentar inadecvat	33	57,89±6,53	18	31,38±6,14	2,95	<0.01
Consumul de salată sau legume proaspete la prânz sau cină	Zilnic	15	26,32±5,84	24	42,10±6,53	1,80	>0.05
	De 2-4 ori pe săptămână	41	71,93±5,95	32	56,15±6,57	1,78	>0.05
	Cel puțin 1 dată pe săptămână	1	1,75±0,98	1	1,75±0,98	0	>0.05
Consumul de fructe proaspete	Zilnic	25	43,86±6,57	36	63,15±6,38	2,10	<0.05
	De 2-4 ori pe săptămână	31	54,39±6,59	21	36,85±6,38	1,91	>0.05
	Cel puțin 1 dată pe săptămână	1	1,75±0,98	0	0	1,78	>0.05

Consumul de salată sau legume proaspete la prânz sau cină a fost prezent zilnic la 15 paciente (26,32±5,85%), de 2-4 ori pe săptămână la 41 paciente (71,93±5,95%) și cel puțin o dată pe săptămână la 1 pacientă (1,75±0,98%) în lotul de cercetare, iar în lotul martor consumul zilnic de salată sau legume proaspete a fost apreciat la 24 paciente (42,10±6,53%), de 2-4 ori pe săptămână la 32 paciente (56,15±6,57%) și cel puțin o dată pe săptămână la 1 pacientă (1,75±0,98%), fără diferențe semnificative între loturi (p>0.05).

Consumul de fructe proaspete a fost prezent zilnic la 25 respondente (43,86±6,57%), de 2-4 ori pe săptămână la 31 paciente (54,39±6,59%), cel puțin o dată pe săptămână la 1 pacientă (1,75±0,98%) în lotul de bază, iar în lotul martor consumul de fructe proaspete a fost declarat zilnic de 36 respondente (63,15±6,38%), de 2-4 ori pe săptămână de 21 paciente (36,85±6,38%).

Diferență semnificativă statistică s-a constatat pe consumul zilnic de fructe proaspete între loturile de cercetare ($p < 0.01$).

Astfel, în rândul pacientelor cu avort spontan recurent s-a constatat prezența unui regim alimentar omnivor, dar neechilibrat, cu un ritm alimentar inadecvat și consum redus de fructe și legume proaspete.

Studierea antecedentelor personale patologice a pacientelor incluse în studiu s-a caracterizat printr-un procent relativ mare de depistare a patologiei somatice (Tabelul 3.3).

Tabelul 3.3. Antecedente personale patologice la pacientele incluse în studiu

Patologia somatică	Lotul de bază, n=57		Lotul martor, n=57		t	p
	Abs.	P±ES	Abs.	P±ES		
Afecțiuni nefro-urinare	9	15,78±4,82	8	14,04±4,60	0,261	>0.05
Afecțiuni cardio-vasculare	2	3,50±2,43	0	0	1,404	>0.05
Afecțiuni gastro-intestinale	7	12,28±4,34	5	8,78±3,74	0,611	>0.05
Patologie oculară	3	5,26±2,95	4	7,02±3,38	0,392	>0.05
Patologia sistemului nervos central	2	3,50±2,43	0	0	1,440	>0.05
Afecțiuni vasculare periferice	7	12,28±4,34	1	1,75±0,98	2,371	<0.05
Afecțiuni respiratorii	1	1,75±0,98	3	5,26±2,95	1,132	>0.05

Rata cea mai mare printre patologiile somatice au avut-o afecțiunile sistemului nefro-urinar (cistită cronică, pielonefrită cronică, rinichi dublu), cu o incidență în ansamblu de 15,78±4,82% cazuri în lotul de cercetare și 14,04±4,60% cazuri în lotul martor. Afecțiunile vasculare periferice (boala varicoasă a membrelor inferioare) au fost depistate în 12,28±4,34% cazuri în lotul de bază comparativ cu 1,75±0,98% cazuri în lotul martor. Prezența afecțiunilor gastro-intestinale (gastrită cronică, colecistită acalculoasă, pancreatită cronică) a fost remarcată, de asemenea, în 12,28±4,34% cazuri în lotul de bază și în 8,78±3,74% cazuri în lotul martor. Patologia oculară (miopie și hipermetropie de diferit grad) a fost evidențiată în 5,26±2,95% cazuri în lotul de cercetare și în 7,02±3,38% în lotul martor. Afecțiunile cardio-vasculare (prolapsul valvei mitrale și tricuspide de gradul I) și afecțiunile sistemului nervos central (nevroze) au fost depistate în 3,50±2,43% cazuri doar în lotul de cercetare. Afecțiunile aparatului respirator au fost prezente în 1,75±0,98% cazuri în lotul de bază și în 5,26±2,95% cazuri în lotul martor. Menționăm că rata afecțiunilor vasculare periferice a fost mai mare în lotul de cercetare

în comparație cu lotul martor, diferența dintre cele 2 categorii de paciente fiind statistic semnificativă ($p < 0.05$).

Analiza antecedentelor heredocolaterale (rude de gradul I) a evidențiat prezența evenimentelor tromboembolice (tromboza venoasă a membrelor inferioare) la 2 paciente ($3,50 \pm 2,43\%$) în lotul de bază.

Sintetizând datele despre instalarea și particularitățile funcției menstruale, s-a constatat că debutul menarhei la vârsta cuprinsă între 11-16 ani s-a determinat la 44 paciente ($77,19 \pm 5,55\%$) în lotul de bază și la 49 paciente ($85,96 \pm 4,60\%$) în lotul martor. Menarha timpurie (sub 11 ani) s-a constatat la 12 paciente ($21,05 \pm 5,39\%$) în lotul de bază și la 8 paciente ($14,04 \pm 4,60\%$) în lotul martor, iar menarha tardivă (peste 16 ani) s-a depistat la 1 pacientă ($1,75 \pm 0,98\%$) doar în lotul de bază.

Evaluarea datelor despre instalarea și particularitățile funcției menstruale, a constatat că, la pacientele incluse în studiu, vârsta medie la menarhă a constituit $12,21 \pm 0,24$ ani și a variat între 9 și 16,5 ani în lotul de bază, iar în lotul de cercetare vârsta medie la menarhă a constituit $12,32 \pm 0,18$ ani și a variat între 9,5 și 16 ani, fără a prezenta semnificație statistică ($p > 0.05$).

Ciclu menstrual regulat normal, în lotul de bază, cu durata de 21-35 de zile au prezentat 56 paciente ($98,25 \pm 0,98\%$), iar cicluri neregulate de la bun început, din momentul instalării funcției menstruale, a avut doar 1 pacientă ($1,75 \pm 0,98\%$). Analizând datele despre durata menstruației s-a constatat că 36 paciente ($63,16 \pm 6,38\%$) au prezentat o sângerare menstruală normală, timp de 4-5 zile. Durata sângerărilor menstruale ≥ 6 zile au avut 12 paciente ($21,05 \pm 5,39\%$), iar oligomenoreea (≤ 3 zile) a fost prezentă la 9 paciente ($15,79 \pm 4,82\%$). În lotul martor durata ciclului menstrual a fost în limitele normei la toate pacientele.

Nivelul homocisteinei serice totale poate fi, de asemenea, influențat de consumul de contraceptivele orale. Efectul depinde de tipul de contraceptiv oral [105; 151]. În acest scop, a fost efectuată evaluarea metodelor de contracepție la pacientele din ambele loturi.

Evaluarea metodelor de contracepție folosite de către pacientele cu avort spontan recurent (Figura 3.4), a evidențiat că 2 paciente ($3,50 \pm 2,43\%$) nu au utilizat nici una dintre metodele uzuale de contracepție. Metode naturale de contracepție: metoda calendarului au declarat 13 paciente ($22,80 \pm 5,55\%$) și coitus întrerupt au declarat 21 paciente ($36,84 \pm 6,38\%$). Rata pacientelor care utilizează metode naturale de contracepție în lotul de control este mică, astfel 2 paciente ($3,50 \pm 2,43\%$) se folosesc de metoda calendarului și 3 paciente ($5,26 \pm 2,95\%$) – coitus întrerupt.

Am remarcat o utilizare extrem de înaltă a contracepției mecanice la pacientele din lotul de bază. Prezervativul masculin a fost utilizat de 44 paciente ($77,19 \pm 5,55\%$), spermicidele au

fost folosite de 24 paciente (42,11±6,53%). În lotul de control, prezervativul masculin este preferat de 4 paciente (7,02±3,38%), iar spermicidele de 8 paciente (14,04±4,60%).

Contraceptivele orale combinate (COC) au fost folosite de 13 paciente (22,80±5,55%) în lotul de bază și de 15 paciente (26,32±5,84%) în lotul de control. Durata medie a utilizării contracepției hormonale a fost de 8,38±1,33 luni în cazul pacientelor cu avort spontan recurent. Dispozitivul intrauterin (DIU) a fost utilizat doar de 1 pacientă (1,75±0,98%) în lotul de bază, iar în lotul de control au utilizat DIU - 25 paciente (43,86±6,57%).

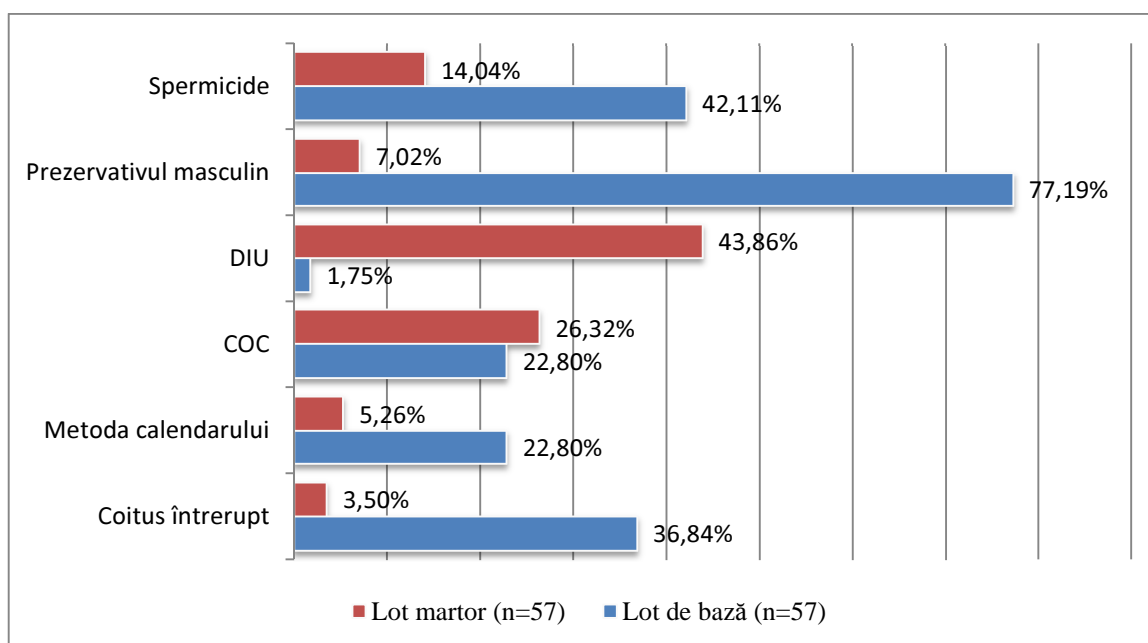


Fig. 3.4. Metodele de contracepție folosite de pacientele incluse în cercetare (%).

Există o diferență înalt semnificativă în ceea ce privește tipurile de metode contraceptive, astfel se observă că pacientele cu avort spontan recurent aleg acele metode la care apariția sarcinii este posibilă imediat după renunțarea la utilizarea acestora ($p < 0.01$). Analiza statistică ne-a arătat că nu avem o semnificație statistică semnificativă privind administrarea COC în loturile de cercetare ($p > 0.05$), rata procentuală pentru ambele grupe fiind aproape identică.

Avortul spontan recurent a fost calificat ca situația în care există 2 sau mai multe avorturi spontane în antecedente [14; 136; 158]. Astfel, în lotul de bază au fost identificate 57 paciente cu întreruperi spontane consecutive ale sarcinilor, cu caracter idiopatic, și s-a luat în considerare numărul de avorturi și tipul lor.

În funcție de tipul de avort spontan întâlnit, toate pacientele cu pierderea spontană a sarcinii (100,0%) au fost diagnosticate cu avort spontan recurent primar.

Totodată, s-a constatat că 50 paciente ($87,72 \pm 4,34\%$) au fost diagnosticate cu avort spontan recurent precoce pentru toate sarcinile în antecedente, 6 paciente ($10,53 \pm 4,06\%$) au fost diagnosticate atât cu avort spontan precoce, cât și cu avort spontan tardiv și doar 1 pacientă ($1,75 \pm 0,98\%$) a fost diagnosticată cu avort spontan recurent tardiv (Figura 3.5) [176].

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 56 paciente ($98,24 \pm 1,65\%$) și cu avortul spontan tardiv la 7 paciente ($12,28 \pm 4,34\%$) [30; 176].

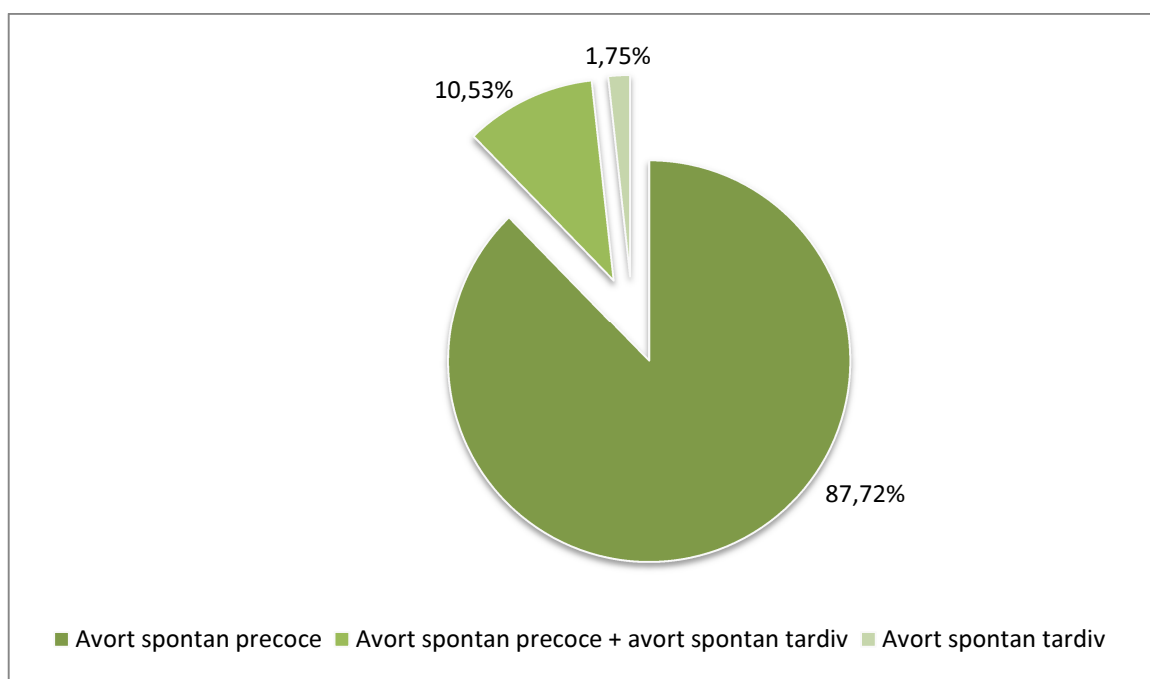


Fig. 3.5. Distribuția avorturilor spontane în funcție de termenul la care s-a produs întreruperea spontană a sarcinii în lotul de bază (%).

Evaluând datele privind numărul de avorturi spontane [30], am determinat că numărul mediu de avorturi spontane la pacientele cu avort spontan recurent a fost de $2,50 \pm 0,11$, înregistrându-se între minim 2 și maxim 5 avorturi spontane.

S-a investigat și vârsta gestațională a avortului în momentul producerii. Vârsta gestațională medie la care s-a produs avortul a fost $7,93 \pm 0,25$ săptămâni.

Din analiza lotului de bază (Tabelul 3.5), am constatat că la majoritatea femeilor avortul spontan precoce s-a produs la o vârstă gestațională medie de 7-8 săptămâni (24,81%), iar avortul spontan tardiv s-a produs, cel mai des, la o vârstă gestațională cuprinsă între 12-13 săptămâni (4,37%).

Tabelul 3.5. Vârsta gestațională la care s-au produs avorturile spontane în lotul de studiu

Vârsta gestațională	Abs.	%	$\hat{\Pi}_{95}$
4-5 săptămâni	1	0,72%	-0,69-2,13
5-6 săptămâni	24	17,52%	11,16-23,88
6-7 săptămâni	19	13,86%	8,08-19,64
7-8 săptămâni	34	24,81%	17,58-32,04
8-9 săptămâni	19	13,86%	8,08-19,64
9-10 săptămâni	24	17,52%	11,16-23,88
10-11 săptămâni	7	5,10%	1,42-8,78
11-12 săptămâni	1	0,72%	-0,69-2,13
12-13 săptămâni	6	4,37%	0,95-7,79
13-14 săptămâni	2	1,45%	-0,54-3,44

Analizând numărul de avorturi spontane în antecedente (Figura 3.6) am remarcat că 37 paciente au avut 2 avorturi spontane ($64,92 \pm 6,32\%$), 3 avorturi spontane au fost constatate la 14 paciente ($24,56 \pm 5,70\%$), 4 avorturi spontane au suportat 3 paciente ($5,26 \pm 2,95\%$) și 5 avorturi spontane au fost înregistrate, de asemenea, la 3 paciente ($5,26 \pm 2,95\%$) [176].

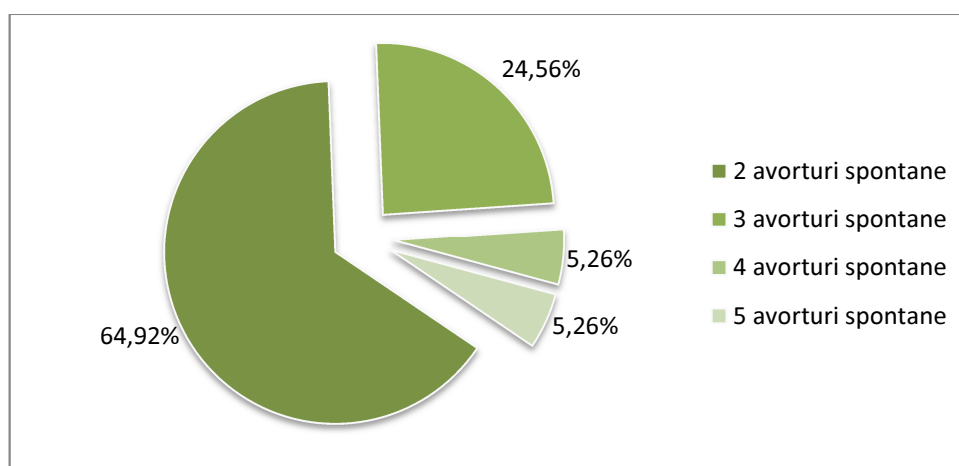


Fig. 3.6. Frecvența avorturilor spontane în antecedente la pacientele din lotul de bază (%).

În lotul de control am analizat frecvența nașterilor și am apreciat că 48 paciente ($84,22 \pm 4,82\%$) au în anamneză o naștere la termen, iar 9 paciente ($15,78 \pm 4,82\%$) – 2 nașteri la termen. Numărul mediu al nașterilor normale a fost de $1,15 \pm 0,04$.

Am luat în considerare și numărul avorturilor la cerere în antecedente declarate de pacientele din cercetare. De remarcat că 8 paciente ($14,04 \pm 4,60\%$) cu avort spontan recurent au

afirmat în antecedente avorturi la cerere. Dintre acestea, 5 paciente au prezentat câte un avort la cerere și 3 paciente au avut câte două avorturi medicale. În lotul martor 17 paciente ($29,82 \pm 6,05\%$) au efectuat avort la cerere. Rezultatul obținut poate fi explicat prin faptul că femeile de vârstă reproductivă diagnosticate cu avort spontan recurent din lotul de studiu conștientizează impactul pe care îl are avortul medical și dorința acestora de a avea o sarcină finalizată prin naștere, diferența fiind statistic semnificativă ($p < 0.05$).

Hiperhomocistinemia este adesea asociată cu concentrații reduse de vitamine B, în special de acid folic, iar suplimentarea insuficientă cu acid folic este unul dintre motivele pentru creșterea nivelului plasmatic al homocisteinei [75; 82; 91; 101; 169]. Călea de remetilare a homocisteinei este folat-dependentă. Acidul folic nu servește doar în calitate de coenzimă în procesul de remetilare a homocisteinei în metionină, dar furnizează grupările metil pentru sinteza metioninei și derivatului său SAM [192]. SAM este principalul donor de grupări metil în multe reacții biologice de metilare, incluzând metilarea ADN [65; 90-93; 107; 157; 158; 162; 165]. În ultimii ani, s-a arătat că metilarea ADN poate fi un indicator al activității genice, precum și al organizării întregului genom, aceste evenimente epigenetice fiind cele mai studiate și cunoscute [165]. Prin urmare, aceste reacții dependente de acidul folic sunt esențiale pentru dezvoltarea placentei și creșterea fetală [74; 166]. De asemenea, ingestia de acid folic în perioada preconcepțională poate preveni și împiedica recurențele de defect de tub neural. O dietă echilibrată nu poate acoperi cerințele crescute de acid folic în sarcină [91; 158].

Actualmente, în Republica Moldova, administrarea preconcepțională a acidului folic în doza de $0,4 \mu\text{g}$ este recomandată la toate femeile de vârstă reproductivă cu cel puțin 2-3 luni înainte de sarcină și în primele 3 luni ale sarcinii [6; 28], fapt ce necesită actualizare în conformitate cu noul ghid al OMS cu privire la îngrijirea antenatală [199].

În acest context, pacientele din ambele loturi de studiu au fost întrebat despre administrarea suplimentelor cu acid folic pe parcursul gravidităților anterioare. Administrarea corectă a suplimentelor cu acid folic a fost evaluată ca folosirea preparatelor pe parcursul a 2-3 luni înainte de graviditate și în primele 3 luni de graviditate, în corespundere cu standardele stabilite de Ministerul Sănătății al Republicii Moldova [6; 28].

Analiza informațiilor prelucrate arată că toate pacientele ($100,0\%$) au folosit supliment cu acid folic pe parcursul sarcinilor anterioare. Cât privește perioada de suplimentare cu acid folic (Figura 3.7), în lotul de bază am determinat că doar 25 paciente ($43,86 \pm 6,57\%$) au luat supliment cu acid folic în perioada de concepție și în primul trimestru de sarcină, cu toate că majoritatea femeilor au menționat că și-au planificat sarcina, comparativ cu 35 paciente ($61,40 \pm 6,44\%$) din lotul de control. Restul de 32 paciente ($56,14 \pm 6,57\%$) din lotul de bază au relatat că au folosit

supliment cu acid folic doar pe parcursul primelor 3 luni de graviditate, iar în lotul de control - 22 paciente (38,60±6,44%), însă fără a prezenta semnificație statistică.

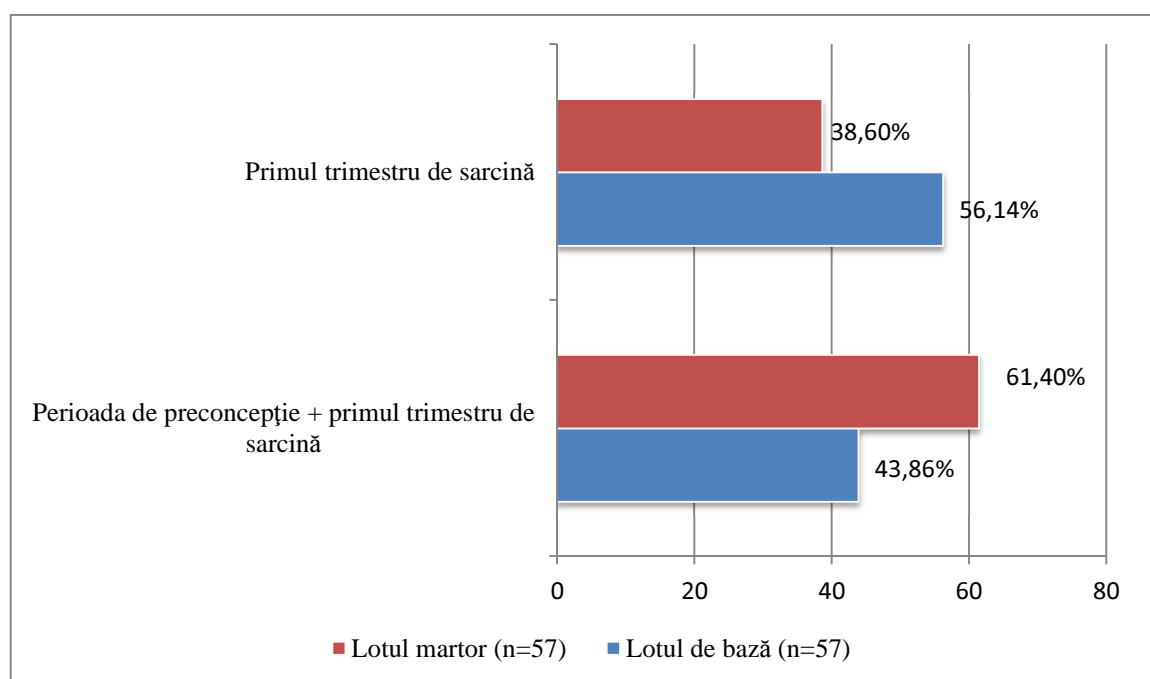


Fig. 3.7. Distribuția pacienților în funcție de perioada de suplimentare cu acid folic (%).

În continuare, ne-am propus să analizăm perioada de suplimentare cu acid folic din sarcinile precedente la pacientele cu avort spontan recurent în raport cu nivelul educațional, mediul de trai și tipul de avort spontan recurent (Tabelul 3.6) [30].

Conform tabelului, se atestă utilizarea suplimentului cu acid folic doar în primele 3 luni de graviditate mai mult la femeile din mediul rural (31,58±6,15%), preponderent cu studii medii (26,32±5,83%) comparativ cu femeile care au administrat supliment cu acid folic atât în perioada preconcepțională, cât și în primul trimestru de sarcină, unde se observă că predomină doamne din mediul urban (35,08±6,32%) cu studii superioare (33,33±6,24%). Am stabilit că femeile din lotul de studiu utilizează supliment cu acid folic, însă pacientele cu nivel general sau mediu de instruire nu dispun de informație cum și când să administreze acidul folic și cât de eficiente sunt acestea pentru conceperea și menținerea sarcinii.

În cadrul cercetării, se atestă (Tabelul 3.6) că avortul spontan recurent primar a survenit mai des la pacientele care au administrat supliment cu acid folic doar în primele 3 luni de graviditate versus pacinetele care au administrat supliment cu acid folic atât în perioada preconcepțională, cât și în primul trimestru de sarcină (56,14±6,57% versus 43,86±6,57%), însă nesemnificativ statistic. Un aspect similar a fost apreciat și pentru cazurile cu avort spontan

precoce și tardiv, care a survenit, de asemenea, mai des la pacientele care au utilizat supliment cu acid folic doar în primele 3 luni de graviditate versus pacinetele care au administrat supliment cu acid folic atât în perioada preconcepțională, cât și în primul trimestru de sarcină ($47,36\pm 6,61\%$ versus $40,36\pm 6,49\%$ și $8,78\pm 3,74\%$ versus $3,50\pm 2,43\%$), diferența nefiind însă semnificativ statistic.

Tabelul 3.6. Utilizarea suplimentului cu acid folic în raport cu nivelul educațional, mediul de trai și tipul de avort spontan recurent în lotul de bază

		Perioada de preconcepție + primul trimestru de sarcină		Primul trimestru de sarcină		t	p
		Abs.	P±ES	Abs.	P±ES		
Mediu de trai	Urban	20	35,08±6,34	14	24,56±5,7	1,23	>0.05
	Rural	5	8,78±3,74	18	31,58±6,15	3,17	<0.001
Nivelul educațional	Studii superioare	19	33,33±6,24	11	19,29±5,22	1,72	>0.05
	Studii superioare incomplete	2	3,50±2,43	2	3,50±2,43	0,41	>0.05
	Studii medii	4	7,02±3,38	15	26,32±5,84	2,86	<0.01
	Studii liceale	0	-	4	7,02±3,38	2,07	<0.01
Avort spontan recurent	Primar	25	43,86±6,57	32	56,14±6,57	1,32	>0.05
Avort spontan	Precoce	23	40,36±6,49	27	47,36±6,61	0,75	>0.05
	Tardiv	2	3,50±2,43	5	8,78±3,74	0,41	>0.05

Ținând cont de cele menționate, devine, totuși evident necesitatea administrării acidului folic în perioada de preconcepție și pe parcursul sarcinii, în condițiile în care foliații alimentari se absorb în proporție de aproximativ 50% [67; 72; 158; 181; 184; 193].

În prezent, acidul folic este considerat nu doar un nutrient necesar, dar și o vitamină esențială pentru sănătatea reproductivă a femeii [4; 137]. Studiile efectuate asupra

metabolismului acidului folic pe parcursul gestației au demonstrat că sarcina este asociată cu o cerere sporită în acid folic, iar în unele cazuri ajungându-se și la deficiența lui [4]. Conform datelor existente în literatura de specialitate, concentrațiile plasmaticice ale acidului folic se micșorează la femeile însărcinate la care acesta nu este administrat suplimentar [4; 137; 166]. Acest proces este multifactorial. Cauzele posibile ale diminuării concentrației sangvine ale acidului folic fiind: (1) necesitatea sporită pentru creșterea și dezvoltarea fătului, inclusiv pentru sistemul utero-placentar; (2) diluția folică ca rezultat la expansiunii volumului sangvin; (3) clearance-ul și excreția mărită al acidului folic; (4) absorbția diminuată a acidului folic; (5) influența hormonală fiziologică asupra metabolismului folic în gestație și (6) suplimentarea alimentară redusă de acid folic [4; 137; 166]. Indiferent care ar fi mecanismele implicate, este esențial ca folatul seric să se mențină deasupra indicelui critic de 7,0 nmol/L, deoarece folatul plasmatic este principalul determinant al transferului folic transplacentar la făt [3; 166].

Un nivel plasmatic adecvat poate fi căpătat prin suplimentarea preconcepțională sau fortificarea produselor alimentare cu acid folic. În acest context, terapia cu acid folic la femeile de vârstă reproductivă, în special în perioada preconcepțională (2-3 luni) și pe parcursul sarcinii reprezintă nu doar o metodă de profilaxie a malformațiilor congenitale, dar este fundamentală pentru dezvoltarea placentei și creșterea fetală ulterioară [166].

3.2. Evaluarea nivelului seric al homocisteinei, folatului seric, vitaminei B₁₂ și corelarea lor la pacientele incluse în cercetare

Un alt aspect, pe care l-am studiat, a fost determinarea nivelului seric al homocisteinei, acidului folic și vitaminei B₁₂ și aprecierea modificărilor de concentrație ale acestora.

Homocisteina serică totală a fost determinată prin metoda chemiluminiscență, limita de referință fiind 5-12 μmol/l.

Nivelul plasmatic al homocisteinei a variat în limite largi pentru fiecare din cele două categorii de paciente studiate, fiind cuprins între 2,19 μmol/l și 34,7 μmol/l în lotul de bază, iar valorile individuale ale homocisteinei înregistrate în lotul de control s-au încadrat în limitele 2,10 μmol/l și 13,0 μmol/l. Astfel, 30 paciente (52,64±6,61%) din lotul de bază au avut nivele plasmaticice crescute pentru acest parametru comparativ cu 3 paciente (5,26±2,95%) din lotul de control (Figura 3.8), diferența dintre cele două loturi de paciente fiind statistică înalt semnificativă (p<0.001).

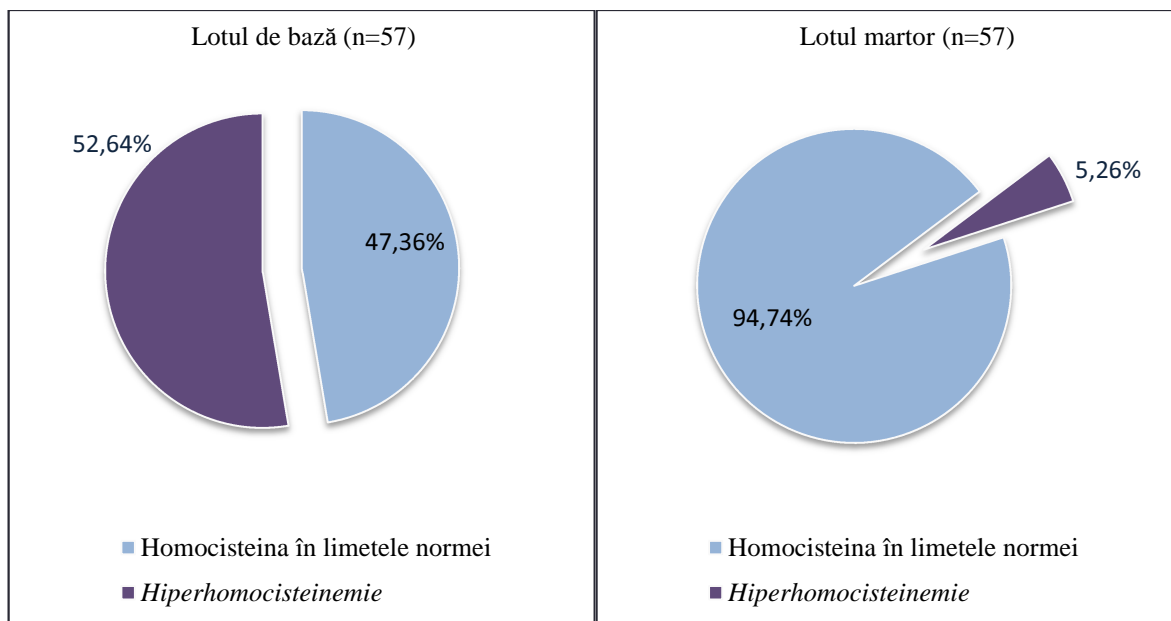


Fig. 3.8. Incidența hiperhomocisteinemiei la paciențele incluse în studiu (%).

Valoarea medie a nivelului seric de homocisteină totală în lotul de control a fost de $6,90 \pm 0,40 \mu\text{mol/l}$, iar în lotul de bază aceasta a constituit $13,31 \pm 0,87 \mu\text{mol/l}$, constatându-se semnificație statistică înalt semnificativă cu $p < 0.0001$, deci hiperhomocisteinemia se corelează cu avortul spontan recurent. În acest context a fost apreciat RR și s-a constatat că RR de avort spontan recurent în cazul paciențelor cu hiperhomocisteinemie are valoare de 10,4 cu $\hat{I}I_{95}$ 6,76-14,04.

Astfel, paciențele cu hiperhomocisteinemei prezintă riscul de a dezvolta avort spontan recurent de 10,4 mai mare decât femeile din lotul de control ($RR = 10,4$).

Analiza nivelului homocisteinei totale la paciențele cu avort spontan recurent (Figura 3.9) a arătat că la 27 paciențe (47,36% $\hat{I}I_{95}$: 34,4-60,32) valorile homocisteinei se încadrează în limitele normale.

Valoarea serică a homocisteinei ce depășea $12 \mu\text{mol/l}$ s-a întâlnit la 30 paciențe (52,64% $\hat{I}I_{95}$: 39,68-65,6) [30]. Dintre acestea, 28 paciențe (49,14% $\hat{I}I_{95}$: 36,17-62,11) au avut concentrația homocisteinei totale cuprinsă între $12-30 \mu\text{mol/l}$ și 2 paciențe (3,50% $\hat{I}I_{95}$: -1,27-8,27) au avut concentrația homocisteinei totale mai mare de $> 30 \mu\text{mol/l}$ [179].

Nu a fost înregistrat nici un caz de hiperhomocisteinemie severă.

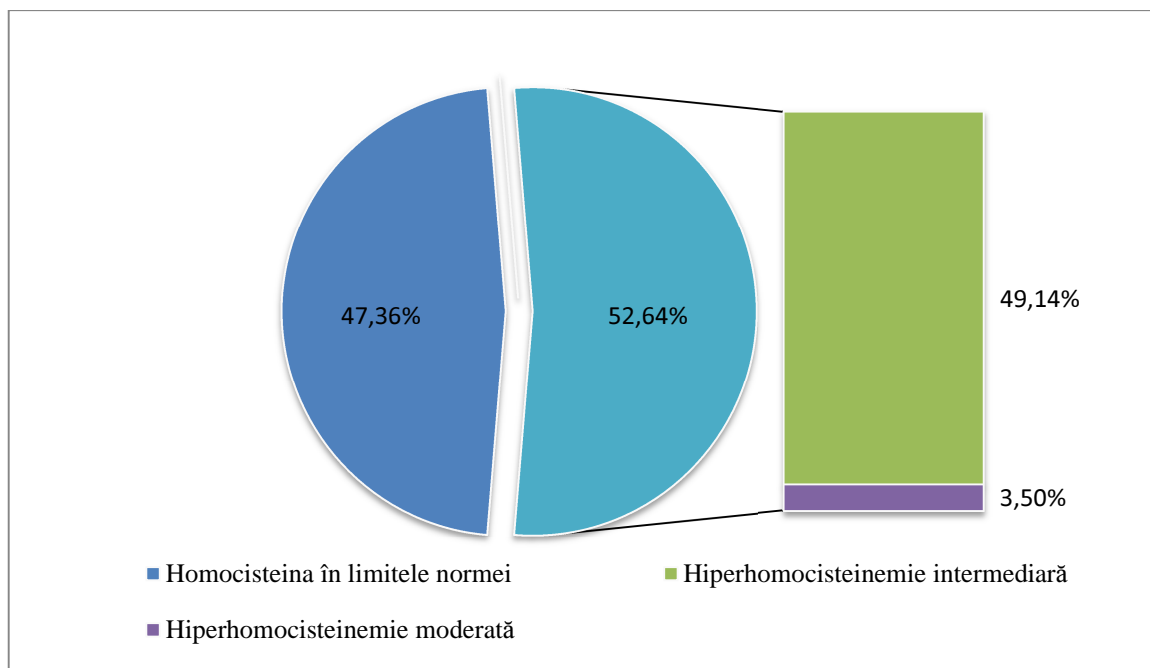


Fig. 3.9. Distribuția cazurilor în funcție de valorile homocisteinei la pacientele cu avort spontan recurent (%).

Rezultatele noastre susțin sursele de literatură [8; 90; 110;], precum că hiperhomocisteinemia ușoară și moderată este frecvent asociată deficiențelor de vitamine și defectelor genetice, implicând mutații la nivelul MTHFR, MTR, iar forma severă este asociată homocistinuriei sau bolilor congenitale severe.

Vollset și colab. (2000) sugerează că nivelul plasmatic al homocisteinei $>10 \mu\text{mol/l}$ este responsabil de apariția complicațiilor în sarcină [181]. Mai mult decât atât, Twigt (2013) a determinat că prezența concentrației crescute de homocisteină în lichidul folicular are un efect negativ asupra ovocitului și calitatea embrionului [68, p. 20]. Iar perfuzia placentară alterată din cauza hiperhomocisteinemiei produce efecte negative asupra sarcinii [39; 166; 181].

Studii recente arată că, în normă homocisteina serică este în concentrații foarte mici ($< 10 \mu\text{mol/l}$) [112; 161]. Concentrațiile homocisteinei serice totale $\geq 10 \mu\text{mol/l}$ favorizează dezvoltarea mecanismelor patologice ce stau la baza complicațiilor vasculare, precum stresul oxidativ, disfuncția endotelială, astfel contribuind la creșterea trombogenezei și a coagulabilității sângelui [71; 112; 151; 152].

Dezvoltarea placentei, la etapa timpurie a sarcinii, poate fi influențată negativ de creșterea concentrației homocisteinei materne [40-42; 137; 192]. Studiile experimentale relevă faptul că nivelurile ridicate de homocisteină ($16-24 \mu\text{mol/L}$) pot induce stresul oxidativ și efectul citotoxic, ceea ce determină disfuncția endotelială și lezarea endoteliului [75; 137]. În plus,

expunerea celulelor trofoblastice la homocisteină ($> 15 \mu\text{mol/L}$) pot crește apoptoza celulară și inhibarea funcției trofoblastice [55; 75; 180]. Se consideră că homocisteina poate influența placentarea timpurie, astfel încât poate afecta creșterea fetală ulterioară [64; 75; 137].

La pacientele cu avort spontan recurent au fost evaluate nivelurile serice ale vitaminei B₁₂ și acidului folic prin metoda chemiluminiscență, valorile de referință pentru vitamina B₁₂ fiind 259-725 pmol/L și pentru acidul folic 13,5-45,3 nmol/L.

Valorile individuale ale folatului seric apreciat s-au încadrat în limitele 2,27-37,4 nmol/L. Concentrația serică a acidului folic încadrată în limitele valorilor de referință a fost înregistrată la 16 paciente (28,07% \hat{I}_{95} : 16,41-39,73). La 41 paciente (71,93% \hat{I}_{95} : 60,27-83,59) s-au găsit valori semnificativ mai mici decât domeniul de normalitate pentru folatul seric [30]. Dintre acestea, 32 paciente (56,14% \hat{I}_{95} : 43,26-69,02) au avut concentrația folatului seric cuprinsă între 6,8-13,5 nmol/L, ceea ce se consideră deficiență posibilă, iar 9 paciente (15,79% \hat{I}_{95} : 6,32-25,24) au avut concentrația de acid folic $< 6,8 \text{ nmol/L}$, ceea ce semnifică deficit de folat (Figura 3.10) [179]. Valoarea medie a nivelului seric de acid folic a fost de $12,12 \pm 0,89 \text{ nmol/L}$.

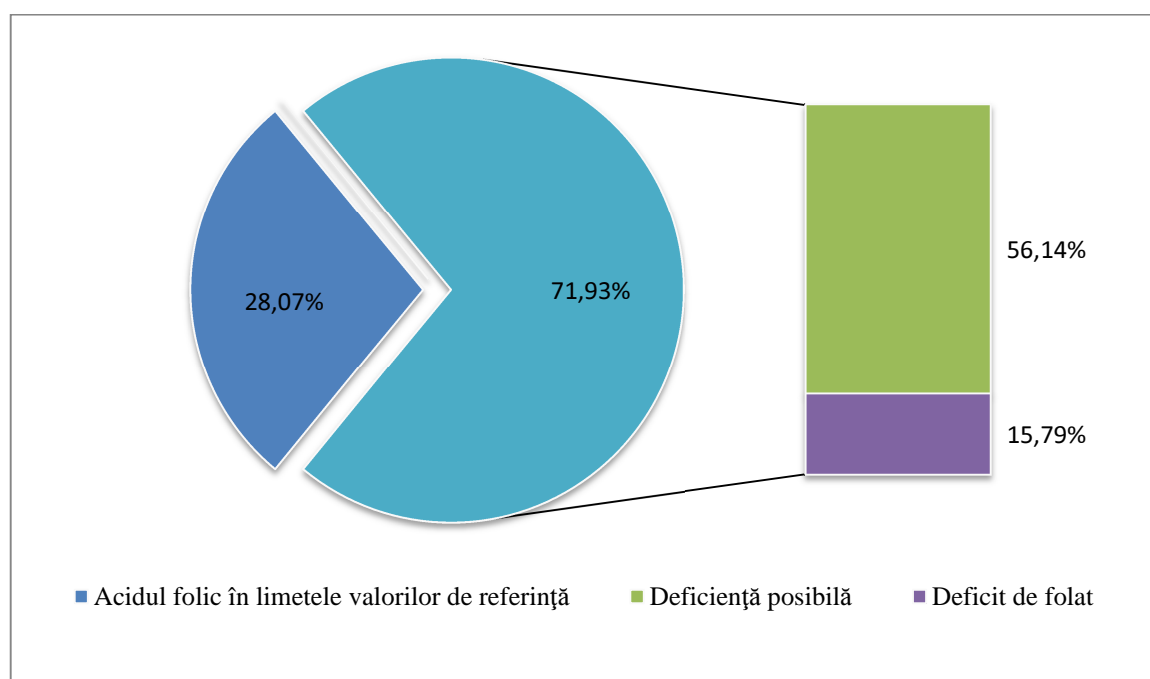


Fig. 3.10. Structura pacientelor cu avort spontan recurent în funcție de concentrația folatului seric (%).

Acidul folic reprezintă o vitamină și un nutrient de importanță vitală, necesar pentru evoluția fiziologic normală a proceselor de creștere, dezvoltare și proliferare tisulară, în special pentru dezvoltarea sistemului hematopoietic, imun și evoluția embriogenezei [4; 193].

Studiile lui Bergen și colab. (2012) au demonstrat că efectul acidului folic asupra vascularizației placentare nu este sugerată doar de creșterea semnificativă a greutatei placentei, dar, de asemenea, de creșterea rezistenței vasculare placentare la concentrații joase de acid folic. În plus, acidul folic are proprietatea de a manifesta acțiune antioxidantă deoarece acesta acționează ca un captator de radicali liberi. Acest lucru poate afecta implantarea placentară și remodelarea vasculară independent de statutul seric al homocisteinei. Aceste efecte ale acidului folic, împreună cu efectul homocisteinei, pot explica riscul înalt de apariție a anumitor complicații ale sarcinii la femeile cu concentrații scăzute de acid folic și ridicate de homocisteină [75].

Valorile individuale a concentrației serice a vitaminei B₁₂ apreciate s-au încadrat în limitele 111-499 pmol/L. Concentrația serică a vitaminei B₁₂ (Figura 3.11) încadrată în limitele de referință ale acestui parametru a fost apreciată la 14 paciente (24,56% Î₉₅: 13,39-35,73). Valori mai mici de limitele de referință pentru vitamina B₁₂ au fost înregistrate la 43 paciente (75,44% Î₉₅: 64,27-86,61).

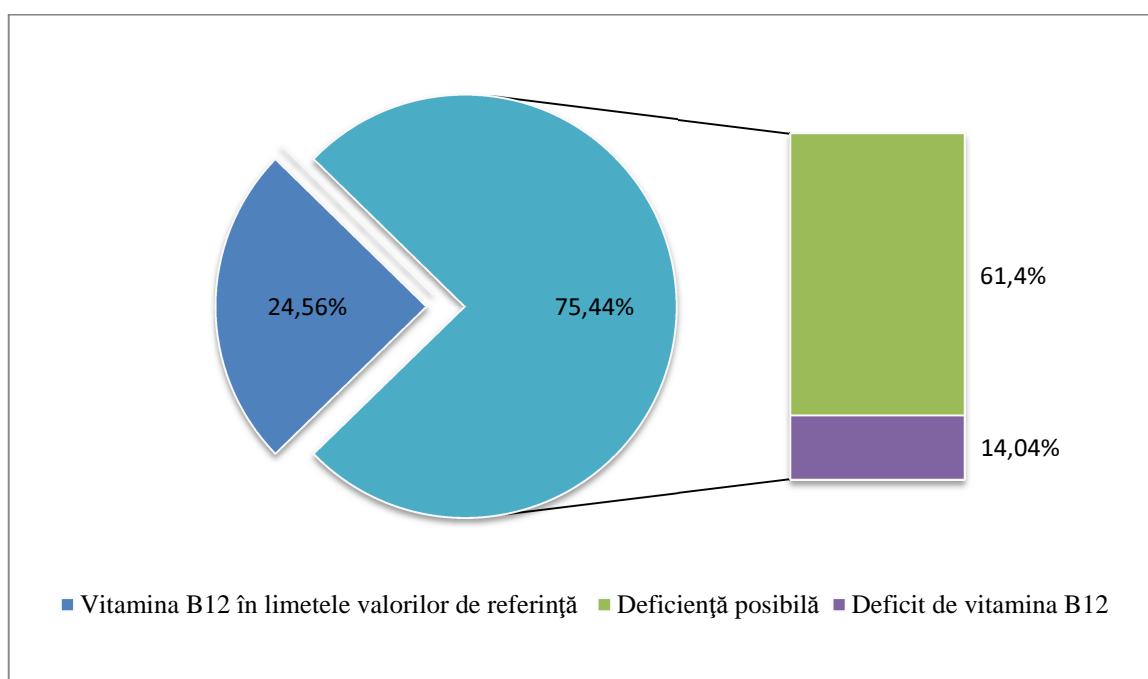


Fig. 3.11. Distribuția pacienților cu avort spontan recurent în funcție de concentrația serică a vitaminei B₁₂ (%).

Astfel, 35 paciente (61,40% Î₉₅: 48,77-74,03) au avut concentrația vitaminei B₁₂ cuprinsă între 150-258,9 pmol/L, ceea ce se consideră deficiență posibilă, și 8 paciente (14,04% Î₉₅: 5,03-23,05) au avut concentrația vitaminei B₁₂ < 150 pmol/L, ceea ce semnifică deficit de vitamina

B₁₂ [179]. Valoarea medie a concentrației serice a vitaminei B₁₂ a fost de 235,77±15,65 nmol/L [30].

Vitamina B₁₂ și folatul se suplinesc una pe alta, iar deficitul de ciancobalamină, în asociere cu deficitul de acid folic reprezintă o problema de sănătate în timpul sarcinii [127; 137]. Studiile efectuate de Hubner și colab. (2008) confirmă nivelul seric scăzut al vitaminei B₁₂ la pacientele cu avort spontan recurent [111]. Bennett și colab. (2001) au estimat că hipercoagulabilitatea din cauza nivelului ridicat de homocisteină poate duce la pierderea fetală atunci când deficitul de vitamina B₁₂ se dezvoltă mai întâi. Mai mult, expunerea prelungită la deficiența de vitamina B₁₂ conduc la dereglarea ovulației și implantarea defectuoasă a embrionului [74].

Acidul folic furnizează grupul metil pentru procesele de metilare. Procesele de sinteză și metilare ADN sunt corelate cu activitățile de metabolizare în celulă a folatilor și vitaminei B₁₂, sinteza de metionină și SAM. Alterarea acestor procese induce instabilitate genomică [165].

În continuare, interacțiunea dintre valoarea serică a homocisteinei cu nivelul seric al acidului folic și vitaminei B₁₂ în grupul de femei cu pierderea recurentă a sarcinii este expusă în tabelul 3.7.

Tabelul 3.7. Concentrațiile homocisteinei serice totale, folatului seric și vitaminei B₁₂ în raport cu valoarea serică a homocisteinei la pacientele cu avort spontan recurent

Parametrii	Valoarea serică a homocisteinei totale		t	p
	< 12 μmol/l	> 12 μmol/l		
Homocisteina, μmol/l	8,37±0,53	17,75±1,07	7.066	<0.001
Folat seric, nmol/L	14,62±1,37	9,88±1,02	2.7752	<0.01
Vitamina B ₁₂ , pmol/L	279,36±27,35	196,54±14,01	2.6951	<0.01

Concentrația serică crescută a homocisteinei la pacientele cu avort spontan recurent din studiu se corelează semnificativ cu valoarea plasmatică scăzută a folatului și vitaminei B₁₂. Astfel, valoarea medie a homocisteinei a constituit 17,75±1,07 μmol/l pe fon de concentrație joasă a folatului seric (9,88±1,02 nmol/L) și vitaminei B₁₂ (196,54±14,01 pmol/L) (p <0.001). În schimb, atunci când valoarea serică a folatului și vitaminei B₁₂ au depășit limita inferioară de referință (14,62±1,37 nmol/L și 279,36±27,35 pmol/L) nivelul homocisteinei serice totale a fost de 8,37±0,53 μmol/l. În acest context, este necesar de remarcat că hiperhomocisteinemia se asociază deficitului de folat și vitamina B₁₂.

Homocisteina este metabolizată prin intermediul reacției de remetilare în metionină, cofactor în acest proces fiind vitamina B₁₂, iar acidul folic, un cosubstrat esențial [4; 100; 158; 162]. Concentrația totală a homocisteinei reprezintă un indicator sensibil funcțional al deficitului de folat și vitamina B₁₂ [82; 198]. Valori crescute ale homocisteinei, scăderea folatului și vitaminei B₁₂ au fost raportate la femeile cu avort spontan recurent [142-144; 152; 170], fapt apreciat și demonstrat în cadrul cercetării actuale.

Deficitul de folat are cauze multiple, precum ar fi: dieta deficitară, absorbția scăzută, scăderea captării, scăderea retenției hepatice, creșterea excreției urinare [67; 158]. Pe de altă parte, în timpul sarcinii, se atestă o creștere a cererii de acid folic [91]. Iar suplimentarea cu acid folic poate reduce și mai mult concentrația totală de homocisteină serică pe parcursul sarcinii [137].

Di Simone și colab. (2004) au investigat rolul acidului folic în remetilarea homocisteinei în placenta umană și au demonstrat utilitatea acidului folic în prevenirea leziunilor trofoblastice legate de homocisteină. Efectul acidului folic a fost semnificativ mai pronunțat atunci când celulele trofoblastice au fost inițial pretratate cu acid folic și ulterior expuse homocisteinei (s-a observat micșorarea ratei de fragmentare ADN) decât atunci când acidul folic a fost administrat după expunerea trofoblastului la homocisteină. De asemenea, administrarea acidului folic a determinat o creștere semnificativă a secreției gonadotropinei corionice în celulelor trofoblastice, iar tratarea cu homocisteină a rezultat în inhibarea secreției de gonadotropină corionică, cu aproximativ 43% comparativ cu celulele netratate. De asemenea, Di Simone și colab. au evaluat rolul potențial al acidului folic asupra secreției de gonadotropină corionică în celulele trofoblastice tratate cu homocisteină. Secreția de gonadotropină corionică a crescut semnificativ atunci când concentrația acidului folic a fost de 40 nmol/L [86]. În acest context, se estimează importanța asigurării unui nivel optim de acid folic și administrarea în perioada preconcepțională. În continuare, luând în considerație cele menționate mai sus, în mod ipotetic, valoarea serică a homocisteinei totale a fost raportată în funcție de perioada de suplimentare cu acid folic la femeile cu avort spontan recurent din lotul de studiu (Tabelul 3.8).

Tabelul 3.8. Valoarea serică a homocisteinei în funcție de perioada de suplimentare cu acid folic la pacientele cu avort spontan recurent

	Perioada de preconcepție + primul trimestru de sarcină	Primul trimestru de sarcină	t	p
Homocisteina, μmol/l	11,96±0,88	14,37±1,40	1.4574	>0.05

Astfel, se estimează că acidul folic influențează nivelul de homocisteină plasmatică. Femeile care au administrat acid folic în perioada preconcepțională și în primul trimestru de sarcină au prezentat valori mai scăzute ($11,96 \pm 0,88 \mu\text{mol/l}$) decât în cazul pacientelor care au administrat suplimente cu acid folic doar în primul trimestru de sarcină ($14,37 \pm 1,40 \mu\text{mol/l}$), însă ne semnificativ statistic ($p > 0,05$).

Valorile plasmaticice ale homocisteinei se găsesc într-un raport invers proporțional cu valorile plasmaticice ale acidului folic și vitaminei B₁₂, întrucât aceste vitamine intervin direct în calitate de coenzime în metabolismul homocisteinei [3; 4; 50; 65; 66; 72; 101; 113; 120; 131]. Fumatul, consumul de cafea și alcool, inactivitatea fizică de asemenea constituie o condiție ce determină hiperhomocisteinemie [65; 75; 101; 103; 148, p. 17; 157]. Pentru pacientele incluse în studiu s-au determinat corelațiile următorilor parametri: fumat, consum de alcool, consum de cafea, IMC, nivelul seric al acidului folic și vitaminei B₁₂ cu valorile homocisteinei serice totale. În acest mod poate fi apreciată influența pe care o au parametrii analizați asupra homocisteinei serice la femeile cu avort spontan recurent.

Nivelul de homocisteină plasmatică crește cu vârsta, datorită declinului metabolic al homocisteinei în rinichi [15]. În continuare, am încercat să vedem dacă vârsta pacientelor are influență și se corelează cu nivelul plasmatic al homocisteinei și s-a observat prezența unei corelații de sens negativ, de intensitate slabă ($r = -0,07$) atât în lotul de bază, cât și în cel de control ($r = -0,02$).

În lotul de bază s-a constatat prezența corelației de intensitate slabă, dar de sens pozitiv între nivelul homocisteinei și IMC ($r = 0,05$), pe când în lotul de control corelația între nivelul homocisteinei și IMC este, de asemenea, pozitivă, dar de intensitate medie ($r = 0,35$).

Corelație de sens negativ, de intensitate slabă a fost observată între nivelul seric al homocisteinei și activitatea fizică ($r = -0,10$) în lotul de bază, dar în lotul de control s-a determinat o corelație de sens pozitiv, însă de intensitate slabă ($r = 0,23$).

Evaluarea relației dintre consumul de țigări la respondentele din cadrul cercetării și nivelul seric al homocisteinei a evidențiat prezența unei corelații de intensitate puternică, directă ($r = 0,98$) în lotul pacientelor cu avort spontan recurent, în lotul de control s-a determinat unei corelații directe, dar de intensitate medie ($r = 0,62$).

Luând în considerație lipsa consumului frecvent de alcool în rândul pacientelor cu avort spontan recurent, s-a estimat o corelație de intensitate slabă, dar de sens pozitiv între nivelul homocisteinei și consumul de alcool ($r = 0,21$). Și în lotul de control s-a determinat o corelație de intensitate slabă, pozitivă ($r = 0,26$).

De asemenea, s-a determinat prezența corelației de intensitate slabă, dar de sens pozitiv între nivelul homocisteinei și consumul de cafea atât în lotul de bază ($r = 0,17$), cât și în lotul de control ($r = 0,19$). Prezența corelațiilor de sens pozitiv susțin rolul fumatului, consumului de cafea și alcool în elevarea concentrației de homocisteină în cadrul cercetării.

Corelând valorile folatului seric și vitaminei B₁₂ cu cele ale homocisteinei la pacientele cu avort spontan recurent, se remarcă faptul că corelația acestor parametri a fost indirectă, însă de intensitate medie cu folatul seric ($r = -0,40$) și de intensitate slabă cu vitamina B₁₂ ($r = -0,28$). Prezența corelațiilor de sens negativ indică faptul că acești parametri se găsesc într-un raport invers proporțional, dar intensitatea acestor corelații a reușit să identifice o asociere mai puternică între folatul seric și homocisteină (Figura 3.12).

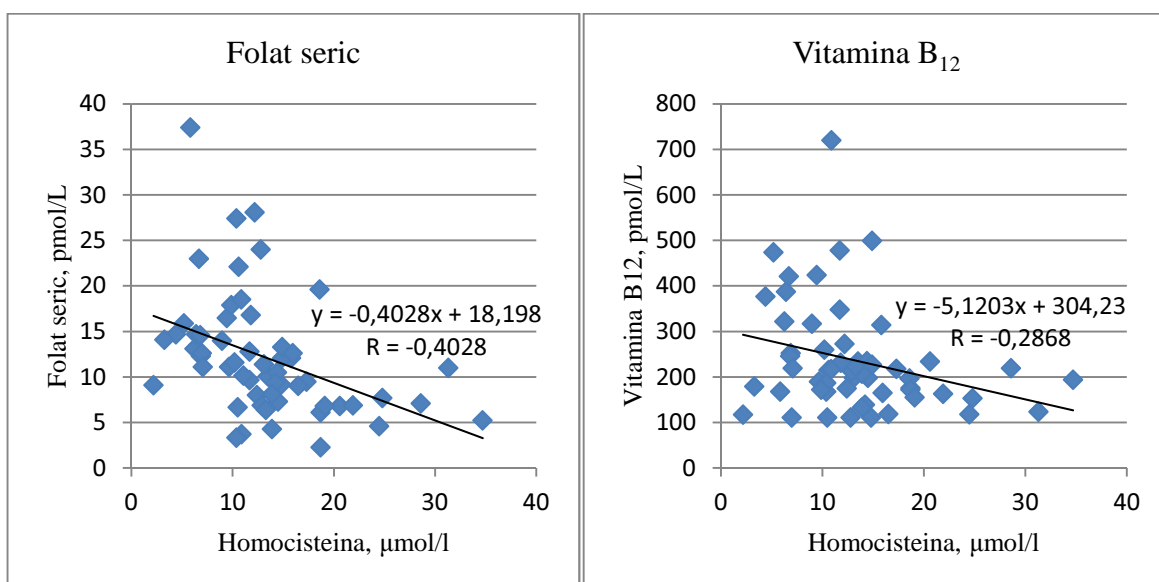


Fig. 3.12. Aspecte corelaționale între homocisteină cu folatul seric și vitamina B₁₂ la pacientele cu avort spontan recurent din studiu.

3.3. Concluzii la capitolul 3

1. În rezultatul cercetării efectuate am apreciat că pacientele cu avort spontan recurent au vârsta cuprinsă între 30 și 39 ani, cu o rată de $49,12 \pm 6,62\%$, majoritatea căsătorite ($96,5 \pm 2,43\%$), cu studii superioare ($52,63 \pm 6,61\%$), consumatoare de cafea ($73,68 \pm 5,84\%$), fumătoare ($7,02 \pm 3,38\%$). Rata cea mai mare o au pacientele normoponderale ($50,87 \pm 6,62\%$), cu regim alimentar tip omnivor ($89,47 \pm 4,06\%$), dar neechilibrat, cu un ritm alimentar inadecvat ($57,89 \pm 6,53\%$) și consum redus de fructe și legume proaspete.

2. În funcție de tipul de avort spontan recurent întâlnit, toate pacientele cu pierderea spontană a sarcinii (100,0%) au fost diagnosticate cu avort spontan recurent primar. Examinând distribuția după termenul la care s-a produs întreruperea spontană a sarcinii în lotul de bază, am constatat că sarcinile s-au finalizat cu avort spontan precoce în $98,24 \pm 1,74\%$ cazuri și cu avortul spontan tardiv în $12,28 \pm 4,43\%$ cazuri.
3. Analizând numărul de avorturi spontane în antecedente am determinat că $64,92 \pm 6,32\%$ din paciente au avut 2 avorturi spontane, 3 avorturi spontane au fost constatate în $24,56 \pm 5,70\%$ cazuri, 4 și 5 avorturi spontane au suportat câte $5,26 \pm 2,95\%$ cazuri.
4. Administrarea suplimentelor cu acid folic pe parcursul sarcinilor anterioare a fost menționată de toate pacientele din cercetare. În lotul de bază, doar $43,86 \pm 6,57\%$ cazuri au administrat supliment cu acid folic preconcepțional și în primul trimestru de sarcină, iar $56,14 \pm 6,57\%$ cazuri din pacientele au relatat că au primit suplimente cu acid folic doar pe parcursul primelor 3 luni de graviditate. Avortul spontan recurent primar, avortul spontan precoce și tardiv au survenit mai des la pacientele care au administrat supliment cu acid folic doar în primele 3 luni de graviditate.
5. Hiperhomocisteinemia a fost înregistrată în $52,64 \pm 6,61\%$ cazuri în lotul de bază și în $5,26 \pm 2,95\%$ cazuri în lotul de control, diferența înalt semnificativă statistic ($p < 0.001$). Pacientele cu hiperhomocisteinemei prezintă riscul de a dezvolta avort spontan recurent de 10,4 mai mare decât femeile din lotul de control ($RR = 10,4$). În rândul pacientelor cu avort spontan recurent, deficitul de acid folic s-a întâlnit în $15,79 \pm 4,82\%$ cazuri și deficitul de vitamina B₁₂ a fost depistată în $14,04 \pm 4,60\%$ cazuri. Analiza rezultatelor parametrilor hemostazei la pacientele cu avort spontan recurent din studiu a determinat valori normale față de limitele normale admise.
6. Concentrația serică crescută a homocisteinei s-a corelat semnificativ cu valoarea plasmatică scăzută a folatului și vitaminei B₁₂ în rândul femeilor cu avort spontan recurent. Valoarea medie a homocisteinei a constituit $17,75 \pm 1,07$ μmol/l pe fon de concentrație joasă a folatului seric ($9,88 \pm 1,02$ nmol/L) și vitaminei B₁₂ ($196,54 \pm 14,01$ pmol/L) ($p < 0.001$). În schimb, atunci când valoarea serică a acidului folic și vitaminei B₁₂ au depășit limita inferioară de referință ($14,62 \pm 1,37$ nmol/L și $279,36 \pm 27,35$ pmol/L) nivelul homocisteinei serice totale a fost de $8,37 \pm 0,53$ μmol/l.
7. Corelațiile negative, de intensitate medie a valorilor homocisteinei cu cele ale acidului folic ($r = - 0,40$) și corelația de intensitate slabă cu vitamina B₁₂ ($r = - 0,28$) consemnată la pacientele cu avort spontan recurent în prezentul studiu, denotă faptul că regimul alimentar neechilibrat cu consum redus de fructe și legume proaspete, precum și

administrarea inadecvată a suplimentelor cu acid folic în perioadă preconcepțională și primul trimestru de sarcină, facilitează dezvoltarea hiperhomocisteinemiei și reprezintă o potențială legătură cu avortul spontan recurent.

8. S-a determinat o corelație de intensitate puternică, directă între nivelul seric al homocisteinei și consumul de țigări ($r = 0,98$) în lotul de bază. Prezența corelațiilor pozitive, de intensitate medie dintre homocisteină cu IMC ($r = 0,35$) și cu consumul de țigări ($r = 0,62$), precum și identificarea corelației pozitive, dar de intensitate slabă dintre homocisteină și gradul de activitate fizică ($r = 0,23$) evidențiază influența factorilor de risc dobândiți în dezvoltarea hiperhomocisteinemiei în grupul de control.

4. FRECVENȚA POLIMORFISMELOR GENELOR MTHFR, MTR, MTRR ȘI IMPLICAȚIILE LOR ÎN AVORTUL SPONTAN RECURENT

4.1. Identificarea și asocierea polimorfismelor genetice MTHFR, MTR și MTRR la pacientele incluse în studiu

Identificarea genotipurilor polimorfismelor MTHFR, MTR și MTRR reprezintă o metodă mai exactă de evaluare a relațiilor lor cu avortul spontan recurent. Genotipurile posibile pentru cele patru polimorfisme pe genele MTHFR, MTR și MTRR pot fi următoarele:

- homozigot neafectat (homozigot normal) – MTHFR C677C, MTHFR A1298A, MTR A2756A și MTRR A66A;
- heterozigot pentru alela mutantă (heterozigot mutant) – MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G;
- homozigot pentru alela mutantă (homozigot mutant) – MTHFR T677T, MTHFR C1298C, MTR G2756G și MTRR G66G;
- heterozigot compus – MTHFR C677T + MTHFR A1298C + MTR A2756G + MTRR A66G.

Rezultatele testărilor în cele două loturi ceea ce privește polimorfismul MTHFR C677T relevă faptul că în lotul de bază – 20 paciente (35,08±6,32%) prezintă genotipul normal CC, 29 paciente (50,88±6,62%) sunt heterozigote CT și 8 paciente (14,04±4,60%) au genotipul homozigot mutant TT (Figura 4.1) [178]. În lotul de control – 42 paciente (73,68±5,83%) prezintă genotipul normal CC, 15 paciente (26,32±5,83%) sunt heterozigote CT.

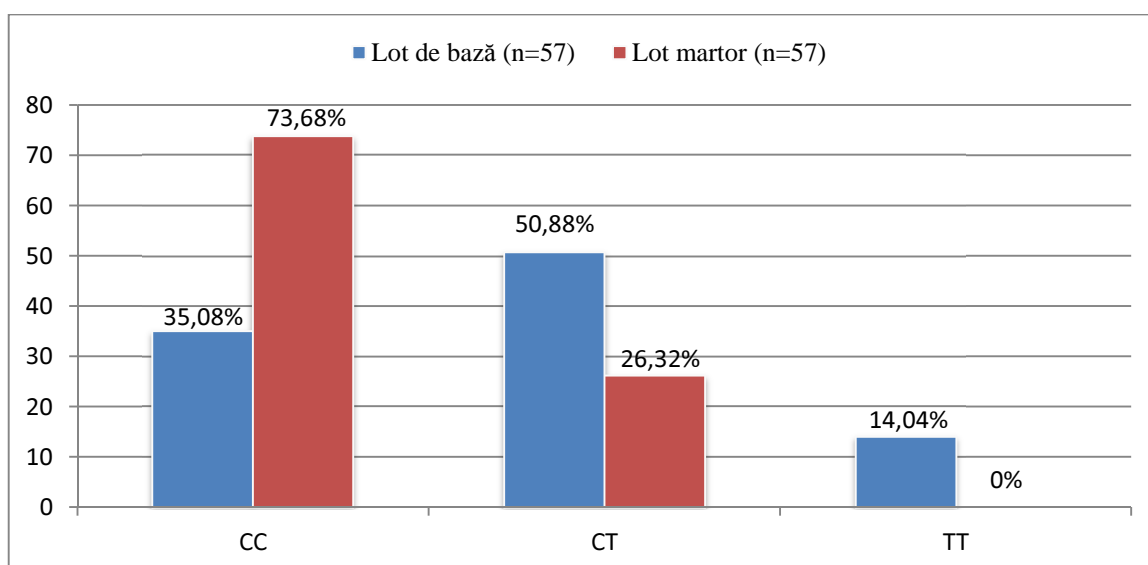


Fig. 4.1. Frecvența genotipurilor polimorfismului MTHFR C677T la pacientele din studiu (%).

Astfel, se observă că mutația homozigotă MTHFR T677T este prezentă doar la pacientele cu avort spontan recurent în anamneză ($p < 0.001$).

Evaluarea prezenței genotipului normal (CC) și genotipului modificat (CT + TT) în loturile de studiu a evidențiat prezența mutației genei MTHFR în poziția 677 la 37 paciente ($64,92 \pm 6,32\%$) în lotul de bază [30; 31] și la 15 paciente ($26,32 \pm 5,83\%$) în lotul de control (Tabelul 4.1), diferența dintre cele două categorii de paciente fiind semnificativă statistic ($\chi^2 = 17,11$; $p = 0.0004$; OR – 5,18 cu \hat{I}_{95} 2,32-11,55).

Tabelul 4.1. Compararea între genotipul CT+TT versus CC în cele două loturi (modelul dominant) pentru polimorfismul MTHFR C677T

MTHFR 677	Lot de bază, n = 57		Lot martor, n = 57		χ^2	p	OR	
	Abs.	%	Abs.	%			OR	\hat{I}_{95}
CC	20	35,08	42	73,68	17,11	0.0004	0,19	0,09 – 0,43
CT+TT	37	64,92	15	26,32			5,18	2,32 – 11,55

Analiza polimorfismului MTHFR C677T a identificat că frecvența alelei C este de 0,60 în lotul de bază și de 0,86 în lotul de control, iar frecvența alelei mutante T a fost de 0,39 în lotul de bază, comparativ cu 0,13 în lotul de control, diferența fiind semnificativă statistic ($\chi^2 = 20,36$; $p = 0.00007$; OR – 4,30 cu \hat{I}_{95} 2,22 – 8,33).

În continuare a fost evaluat polimorfismul MTHFR A1298C (Figura 4.2).

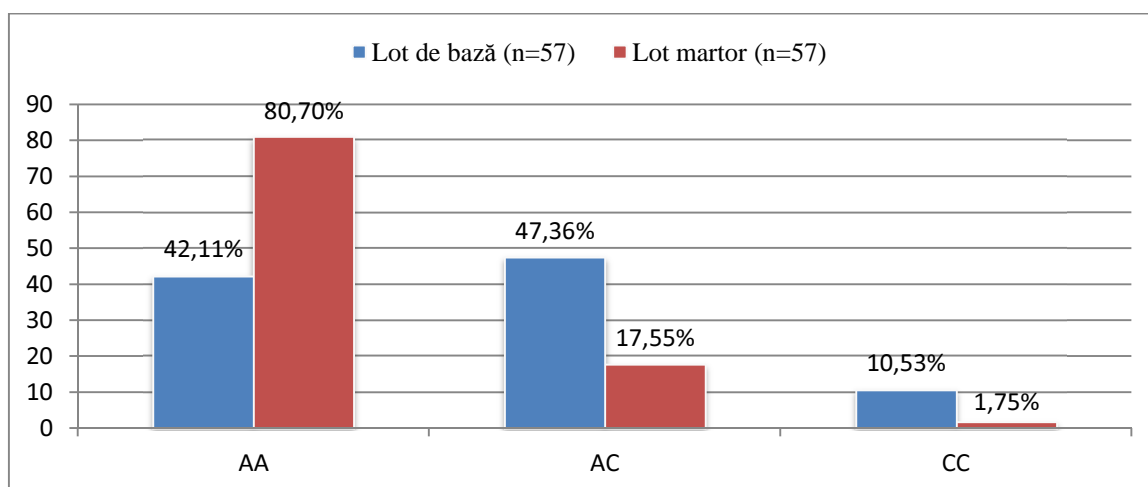


Fig. 4.2. Frecvența genotipurilor polimorfismului MTHFR A1298C la pacientele din studiu (%).

Cercetarea prezenței mutației A>C în poziția 1298 a genei MTHFR a arătat că lotul de bază – 24 paciente (42,11±6,53%) prezintă genotipul normal AA, 27 paciente (47,36±6,61%) sunt heterozigote AC și 6 paciente (10,53±4,06%) au genotipul homozigot mutant CC [31; 178]. În lotul de control – 46 paciente (80,70±5,22%) prezintă genotipul normal CC, 10 paciente (17,55±5,03%) sunt heterozigote CT și 1 pacientă (1,75±0,98%) are genotip homozigot mutant CC.

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 33 paciente (57,89±6,53%) din lotul de bază au genotip modificat (AC+CC), comparativ cu 11 paciente (19,30±5,22%) în lotul de control (Tabelul 4.2), diferența dintre cele două categorii de paciente fiind semnificativă statistic ($\chi^2 = 17,91$; $p = 0,0001$; OR – 5,75 cu \hat{I}_{95} 2,48 – 13,35).

Tabelul 4.2. Comparația între genotipul AC+CC versus AA în cele două loturi (modelul dominant) pentru polimorfismul MTHFR A1298C

MTHFR 1298	Lot de bază, n = 57		Lot martor, n = 57		χ^2	p	OR	
	Abs.	%	Abs.	%			OR	\hat{I}_{95}
AA	24	42,11	46	80,70	17,91	0,0001	0,19	0,07 – 0,40
AC+CC	33	57,98	11	19,30			5,75	2,48 – 13,35

Am constatat că purtătoarele alelei A pentru polimorfismul MTHFR A1298C au prezentat o frecvență de 0,65 în lotul de control și de 0,89 în lotul martor, iar purtătoarele alelei mutante C au înregistrat o frecvență de 0,34 în lotul de bază, comparativ cu 0,10 în lotul de control, diferența fiind semnificativă statistic ($\chi^2 = 18,41$; $p = 0,0002$; OR – 4,42 cu \hat{I}_{95} 2,17 – 9,01).

Cercetarea polimorfismului MTR A2756G a arătat că în lotul de bază - 38 paciente (66,67±6,24%) au genotipul normal AA, 16 paciente (28,07±5,95%) sunt heterozigote AG și 3 paciente (5,26±2,95%) au genotip homozigot mutant GG (Figura 4.3) [31; 178]. În lotul de control – 53 paciente (92,98±3,38%) au genotip normal AA și 4 paciente (7,02±3,38%) au genotip heterozigot AG. Paciente cu genotip homozigot mutant GG nu au fost depistate în lotul nartor.

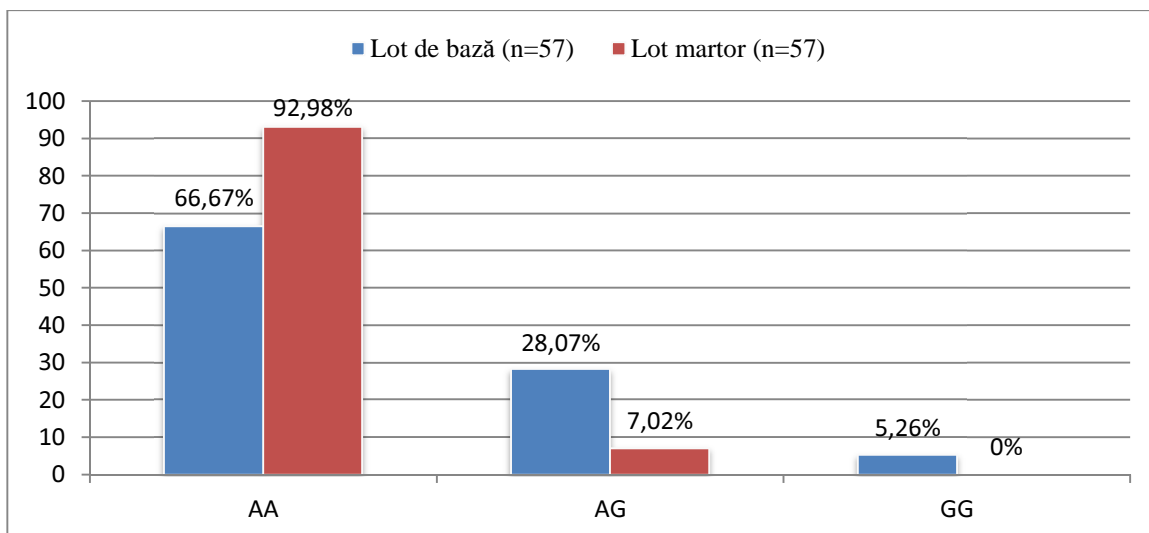


Fig. 4.3. Frecvența genotipurilor polimorfismului MTR A2756G la pacientele din studiu (%).

Evaluarea prezenței genotipului normal (AA) și genotipului modificat (AG + GG) a evidențiat prezența mutației genei MTR în poziția 2756 la 19 paciente (33,33±6,24%) în lotul de bază [30; 31] și la 4 paciente (7,02±3,38%) în lotul de control (Tabelul 4.3), diferența dintre cele două categorii de paciente fiind semnificativă statistic ($\chi^2 = 12,26$; $p = 0,0005$; OR – 6,63 cu \hat{I}_{95} 2,09 – 21,05).

Tabelul 4.3. Comparația între genotipul AG+GG versus AA în cele două loturi (modelul dominant) pentru polimorfismul MTR A2756G

MTR 2756	Lot de bază, n = 57		Lot martor, n = 57		χ^2	p	OR	
	Abs.	%	Abs.	%			OR	\hat{I}_{95}
AA	38	66,67	53	92,98	12,26	0,0005	0,15	0,05 – 0,48
AG+GG	19	33,33	4	7,02			6,63	2,09 – 21,05

Frecvența alelei A a polimorfismului MTR A2756G a fost de 0,80 în lotul de bază și de 0,96 în lotul martor, iar frecvența alelei mutante G a polimorfismului MTR A2756G a fost de 0,19 în lotul de bază, comparativ cu 0,035 în lotul de control, diferența fiind semnificativă statistic ($\chi^2 = 14,07$; $p = 0,0002$; OR – 6,58 cu \hat{I}_{95} 2,19 – 19,77).

Genotiparea polimorfismului MTRR A66G arată că în lotul de bază 19 paciente (33,33±6,24%) au genotipul normal AA, 25 paciente (43,86±6,57%) sunt heterozigote AG și 13

paciente ($22,80 \pm 5,55\%$) au genotip homozigot mutant GG (Figura 4.4) [31; 178]. În lotul de control – 49 paciente ($85,97 \pm 4,60\%$) au genotip normal AA, 6 paciente ($10,53 \pm 4,06\%$) au genotip heterozigot AG și 2 paciente ($3,50 \pm 2,43\%$) au genotip homozigot mutant GG.

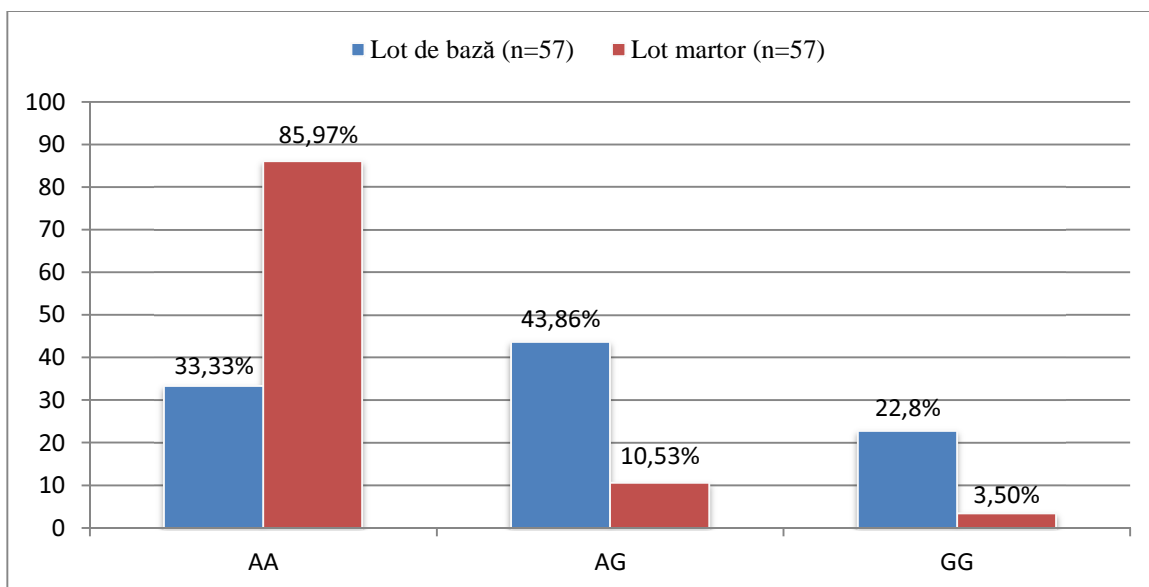


Fig. 4.4. Frecvența genotipurilor polimorfismului MTRR A66G la pacientele din studiu (%).

Separarea pacientelor din lotul de studiu în două categorii, cu genotip normal și genotip modificat în poziția 66 a genei MTRR, a determinat că 38 paciente ($66,67 \pm 6,24\%$) au avut genotip modificat (AG+GG) în lotul de bază, comparativ cu 8 paciente ($14,04 \pm 4,60\%$) în lotul de control (Tabelul 4.4), diferența dintre cele două categorii de paciente fiind semnificativă statistic ($\chi^2 = 32,80$; $p = 0,0000001$; OR – 12,25 cu $\hat{\Pi}_{95}$ 4,84 – 31,00).

Tabelul 4.4. Compararea între genotipul AG+GG versus AA în cele două loturi (modelul dominant) pentru polimorfismul MTRR A66G

MTRR 66	Lot de bază, n = 57		Lot martor, n = 57		χ^2	p	OR	
	Abs.	%	Abs.	%			OR	$\hat{\Pi}_{95}$
AA	19	33,33	49	85,97	32,80	0,0000001	0,08	0,03 – 0,21
AG+GG	38	66,67	8	14,04				

Frecvența alelei A a polimorfismului MTRR A66G a fost înregistrată în 0,55 în lotul de bază și în 0,91 în lotul martor, iar frecvența alelei mutante G a fost înregistrată în 0,44 în lotul de bază, comparativ cu 0,08 în lotul martor, diferența fiind semnificativă statistic ($\chi^2 = 37,62$; $p = 0.000000009$; OR – 8,42 cu \hat{I}_{95} 3,99 – 17,76).

Așadar, genotipurile homozigot mutante pentru cele patru polimorfisme: MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G au fost mai frecvent întâlnite în grupul pacientelor cu avort spontan recurent decât în lotul de control, excepție fiind genotipurile MTHFR 677TT și MTRR 66GG întâlnite exclusiv în grupul pacientelor cu avort spontan recurent primar. Acest fapt poate sublinia o oarecare corelație a avort spontan recurent primar cu genotipurile homozigot mutante pentru polimorfismele testate. Studiile efectuate de Kim și colab.(2004) au demonstrat o frecvență mai mare a genotipului homozigot mutant MTHFR C677T și niveluri serice mai mari a homocisteinei la femeile cu avort spontan recurent comparativ cu cele din grupurile de control [118]. Cu toate acestea, Holmes și colab. (1999), Creus și colab. (2013) și Pihusch și colab. (2001) nu au demonstrat o astfel de asociere [84; 110; 146].

Echilibrul Hardy-Weinberg a fost testat pentru fiecare polimorfism și am determinat că nu a fost elucidată deviație statistic semnificativă de la echilibrul Hardy-Weinberg nici pentru un polimorfism studiat (Anexa 4).

În continuare, am analizat RR pentru fiecare polimorfism genetic în parte, presupuse a influența dezvoltarea avortului spontan recurent. Astfel, RR prezintă de câte ori este mai mare probabilitatea de a face avort spontan recurent la pacientele cu mutația prezentă, decât la cele cu mutația absentă. În cazul genotipurilor mutante heterozigot CT și homozigot mutant TT pentru polimorfismul genetic MTHFR C677T, RR are valoarea de 2,46 cu \hat{I}_{95} 1.30 – 3,61, deci riscul este apreciat ca fiind dublu în prezența mutației. Pentru genotipurile mutante heterozigot AC și homozigot mutant CC pentru polimorfismul genetic MTHFR A1298C, RR are valoarea de 3,0 cu \hat{I}_{95} 1.62 – 4,38, riscul este apreciat ca fiind triplu în prezența mutației respective.

RR de avort spontan recurent în cazul pacientelor pentru mutația heterozigotă AG și homozigotă mutantă GG pentru polimorfismul MTR A2756G comparativ cu genotipul normal AA are valoare de 4,71 cu \hat{I}_{95} 2,07 – 7,34, deci riscul este apreciat ca fiind de 4 ori mai mare în prezența mutației. Pentru polimorfismul genetic MTRR A66G, genotipurile mutante heterozigot AG și homozigot mutant GG determină, de asemenea, un risc de 4 ori mai mare în prezența mutației comparative cu genotipul normal AA, valoarea RR fiind 4,72 cu \hat{I}_{95} 3,11 – 6,32.

Analiza genotipurilor polimorfismelor testate a permis identificarea mutațiilor în genele MTHFR, MTR și MTRR. În lotul de bază am identificat cel puțin una din mutațiile studiate la 56

pacientele ($98,25 \pm 1,73\%$). Comparând cele două loturi de cercetare, se poate observa că în timp ce în lotul de bază s-a găsit doar 1 pacientă ($1,75 \pm 0,98\%$) fără nici un polimorfism, comparativ cu 23 femei ($40,35 \pm 6,49\%$) din lotul martor. Analiza statistică ne-a arătat semnificație statistică înalt semnificativă ($p < 0.001$) și acest lucru este un indiciu că polimorfismele genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G la pacientele din lotul de bază pot fi implicate ca și factor de risc în avortul spontan recurent. Se poate admite deci că absența mutațiilor ar putea avea un rol protectiv în producerea tulburărilor de circulație placentară. Frecvența genotipurilor polimorfismelor testate la pacientele din loturile de studiu este prezentată în Anexa 5.

În continuare, am analizat dacă există polimorfisme asociate ale mutațiilor genelor MTHFR, MTR și MTRR la pacientele din cercetare. În lotul de bază am determinat că din cele 57 de cazuri studiate, 1 pacientă ($1,75 \pm 0,98\%$) nu a prezentat nici un polimorfism, 6 paciente ($10,53 \pm 4,06\%$) au prezentat polimorfism unic, iar 50 paciente ($87,72 \pm 4,34\%$) au prezentat asocieri de polimorfisme (Figura 4.5) [31]. În lotul de control au înregistrate 30 paciente ($52,63 \pm 6,61\%$) cu polimorfism unic și 4 paciente cu polimorfism asociat ($7,02 \pm 3,38\%$), diferență statistic semnificativă ($p < 0.001$).

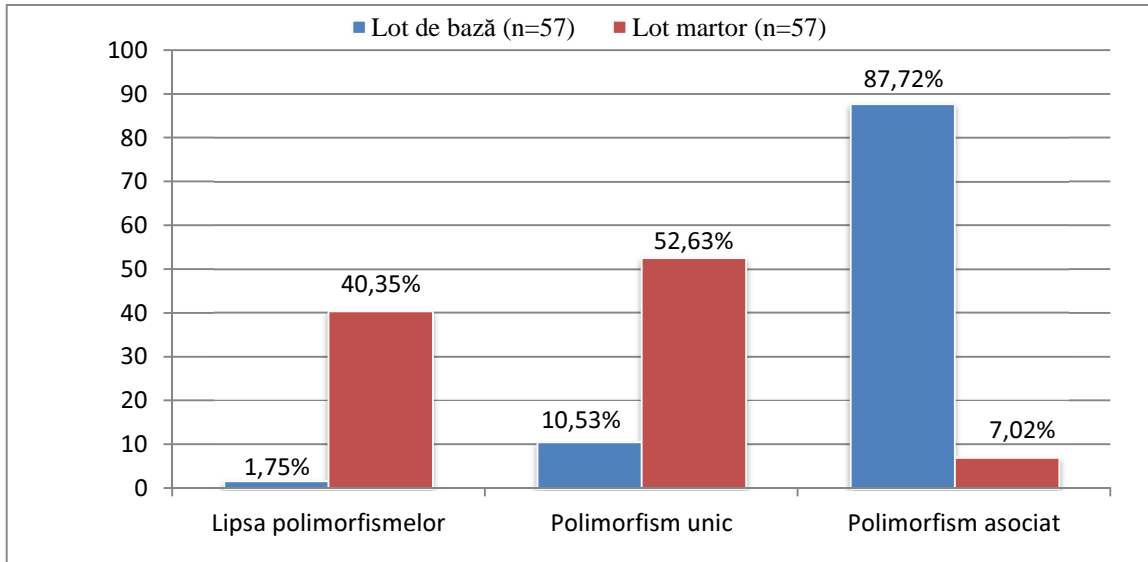


Fig. 4.5. Distribuția polimorfismelor asociate la pacientele din loturile de studiu (%).

Numărul polimorfismelor asociate MTHFR, MTR și MTRR la pacientele din loturile de studiu este prezentat în tabelul 4.5 [31]. Astfel, am apreciat că în lotul de bază 30 paciente ($52,64 \pm 6,61\%$) au câte 2 combinații ale polimorfismelor genetice analizate, 3 combinații s-au întâlnit la 19 paciente ($33,33 \pm 6,24\%$) și doar 1 pacientă ($1,75 \pm 0,98\%$) a prezentat 4 combinații,

comparativ cu 4 paciente ($7,02 \pm 3,38\%$) din lotul martor, care au prezentat doar câte 2 combinații ale polimorfismelor genetice testate.

Tabelul 4.5. Numărul polimorfismelor asociate MTHFR, MTR și MTRR la pacientele din lotul de studiu (abs., %)

Număr polimorfisme	Lot de bază, n = 56		Lot martor, n = 30		t	p
	Abs.	P±ES	Abs.	P±ES		
Polimorfism unic	6	10,53±4,06	30	52,63±6,61	5,432	<0.001
2 asocieri	30	52,64±6,61	4	7,02±3,38	6,148	<0.001
3 asocieri	19	33,33±6,24	0	0	5,341	<0.001
4 asocieri	1	1,75±0,98	0	0	1,785	>0.05

În afecțiunile poligenice, cum este și boala abortivă, o singură mutație genică ar putea fi insuficientă pentru a provoca pierderea spontană a sarcinii, fiind dificil de demonstrat implicarea sa atunci când este cercetată individual. Cu toate acestea, o combinație de anumiți factori de mediu și polimorfisme genetice poate determina susceptibilitatea și chiar gravitatea pentru avort spontan recurent [46, p. 19; 93].

Studii publicate recent au arătat importanța genotipului mutant și asocieri ale acestora în identificarea riscului pentru avortul spontan [19; 64; 77; 93]. Zetterberg și col. (2004) au constatat că prezența uneia sau mai multor alele mutante în gena MTHFR poate afecta procesul de embriogeneză când concentrația folatului este scăzută [188; 200].

Polimorfismele multiple de la nivelul aceleiași gene ar putea stimula expresia acesteia, expresia proteinei sau funcția proteinei, astfel încât am considerat că ar trebui să analizăm genotipul de cosegregare pentru MTHFR (C677T și A1298C) în lotul pacientelor cu avort spontan recurent.

În continuare am examinat modul de înlănțuire a alelelor genei MTHFR (SNPs-urile C677T și A1298C), care sunt în dezechilibru de înlănțuire [10; 34, p. 289; 108]. 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, 677TT/1298CC și 677CT/1298CC sunt rareori observate [10; 108].

În baza rezultatelor obținute a fost efectuată distribuția polimorfismelor și combinațiile genotipice ale genei MTHFR (Tabelul 4.6) [30; 31].

Tabelul 4.6. Combinațiile genotipice ale genei MTHFR (677/1298) la pacientele cu avort spontan recurent

Combinații de genotipuri MTHFR		Cazuri		
677	1298	Abs.	%	Î ₉₅
CC (homozigot normal)	AA (homozigot normal)	3	5,26%	-0,44-10,96
CC (homozigot normal)	AC (heterozigot mutant)	11	19,29%	3,09-19,51
CC (homozigot normal)	CC (homozigot mutant)	6	10,53%	2,57-18,49
CT (heterozigot mutant)	AA (homozigot normal)	13	22,81%	11,91-33,69
CT (heterozigot mutant)	AC (heterozigot mutant)	16	28,07%	11,91-33,69
CT (heterozigot mutant)	CC (homozigot mutant)	0	-	-
TT (homozigot mutant)	AA (homozigot normal)	8	14,04%	5,03-23,05
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 (28,07%), C677T/A1298A (22,81%), C677C/A1298C (19,29%).

Incidența moderată e la următoarele variante: T677T/A1298A (14,04%), C677C/C1298C (10,53%) și C677C/A1298A (5,26%).

Din cele expuse se atestă că în cadrul cercetării nu se întâlnesc următoarele combinații alelice: C677T/C1298C, T677T/A1298C și T677T/C1298C, ceea ce corespunde cu datele literaturii.

Combinațiile polimorfismelor MTHFR: C677T/C1298C, T677T/A1298C sunt rare, iar combinația homozigot mutantă pentru ambele mutații T677T/C1298C nu poate fi întâlnită [26].

Evaluarea distribuției alelelor genelor MTHFR 677 și MTRR 66 sunt reprezentate în tabelul 4.7 [31].

Cele mai frecvente combinații au fost: C677T/A66A (26,32%), C677C/A66G (19,29%) și C677T/A66G (17,55%). La 6 paciente (10,53%) s-au întâlnit combinațiile C677C/G66G și T677T/A66G. Incidența combinației celor două genotipuri normale 677CC/66AA a fost prezentă doar la 3 paciente (5,26%), iar combinația genotipurilor mutante 677TT/66GG s-a întâlnit doar la 1 pacientă (1,75%).

Tabelul 4.7. Combinațiile genotipice ale genelor MTHFR 677 și MTRR 66 la pacientele cu avort spontan recurent

Combinații de genotipuri		Cazuri		
MTHFR 677	MTRR 66	Abs.	%	$\hat{\Pi}_{95}$
CC (homozigot normal)	AA (homozigot normal)	3	5,26%	-0,44-10,96
CC (homozigot normal)	AG (heterozigot mutant)	11	19,29%	3,09-19,51
CC (homozigot normal)	GG (homozigot mutant)	6	10,53%	2,57-18,49
CT (heterozigot mutant)	AA (homozigot normal)	15	26,32%	14,88-37,74
CT (heterozigot mutant)	AG (heterozigot mutant)	10	17,55%	7,68-27,42
CT (heterozigot mutant)	GG (homozigot mutant)	4	7,02%	0,39-13,65
TT (homozigot mutant)	AA (homozigot normal)	1	1,75%	-1,65-5,15
TT (homozigot mutant)	AG (heterozigot mutant)	6	10,53%	2,57-18,49
TT (homozigot mutant)	GG (homozigot mutant)	1	1,75%	-1,65-5,15

Rezultatele evaluării distribuției alelelor genelor MTHFR 677 și MTR 2756 sunt reprezentate în tabelul 4.8 [31].

Tabelul 4.8. Combinațiile genotipice ale genelor MTHFR 677 și MTR 2756 la pacientele cu avort spontan recurent

Combinații de genotipuri		Cazuri		
MTHFR 677	MTR 2756	nr.	%	$\hat{\Pi}_{95}$
CC (homozigot normal)	AA (homozigot normal)	13	22,81%	11,91-33,69
CC (homozigot normal)	AG (heterozigot mutant)	6	10,53%	2,57-18,49
CC (homozigot normal)	GG (homozigot mutant)	1	1,75%	-1,65-5,15
CT (heterozigot mutant)	AA (homozigot normal)	21	36,85%	24,32-49,36
CT (heterozigot mutant)	AG (heterozigot mutant)	7	12,28%	3,76-20,80
CT (heterozigot mutant)	GG (homozigot mutant)	1	1,75%	-1,65-5,15
TT (homozigot mutant)	AA (homozigot normal)	4	7,02%	0,39-13,65
TT (homozigot mutant)	AG (heterozigot mutant)	3	5,26%	-0,44-10,96
TT (homozigot mutant)	GG (homozigot mutant)	1	1,75%	-1,65-5,15

S-a observat că cel mai des a fost combinația: C677T/A2756A, care s-a întâlnit la 21 paciente (36,85%). Incidența combinației celor două genotipuri sălbatice: C677C/A2756A s-a

determinat la 13 paciente (22,81%), iar frecvența combinațiilor genotipurilor mutante T677T/G2756G a fost prezentă doar la 1 pacientă (1,75%). Haplotipul heterozigot mutant pentru ambele mutații: C677T/A2756G s-a întâlnit la 7 paciențe (12,28%).

Incidența moderată se atestă la următoarele variante: C677C/A2756G (10,53%), T677T/A2756A (7,02%) și T677T/A2756G (5,26%).

4.2. Aprecierea corelațiilor genetice și fenotipice ai parametrilor studiați și implicațiile lor la pacientele cu avort spontan recurent

Concentrațiile serice ale acidului folic, vitaminei B₁₂ și homocisteinei serice totale au fost studiate în raport cu genotipurile genelor MTHFR, MTR și MTRR. Genele produc enzime care ajută la reglarea nivelului de homocisteină [112; 152].

În prezența mutațiilor genetice, este posibil ca nivelul de homocisteină să nu poată fi reglementat în mod corespunzător. În acest context, scopul a fost determinarea și compararea modificărilor concentrației de homocisteină în raport cu genotipurile genelor MTHFR, MTR și MTRR.

Ținem să menționăm că rezultatele cercetării au evidențiat diferențe între nivelul homocisteinei serice în raport cu genotipurile polimorfismelor analizate în loturile de studiu (Tabelul 4.9) [17; 179].

La pacientele cu avort spontan recurent cu genotip homozigot mutant, se observă creșteri variind între ușoare și moderate ale nivelului plasmatic al homocisteinei. Incidența hiperhomocisteinemiei ($\geq 12 \mu\text{mol/l}$) a fost mai mare la pacientele cu genotipul 677TT MTHFR ($22,35 \pm 2,59 \mu\text{mol/l}$), urmată de genotipul 2756GG MTR ($21,63 \pm 8,01 \mu\text{mol/l}$), genotipul 66GG MTRR ($14,30 \pm 2,24 \mu\text{mol/l}$) și genotipul 1298CC MTHFR ($12,12 \pm 1,69 \mu\text{mol/l}$) [33; 178]. În lotul martor valorile homocisteinei serice totale s-au încadrat în limitele normei, indiferent de genotipul polimorfismului analizat, dar se determină o ușoară creștere a nivelului de homocisteină la pacientele cu genotipuri mutante pentru polimorfismele testate. Pacientele cu avort spontan recurent care au fost heterozigote sau homozigote pentru alela mutantă pentru polimorfismele MTHFR C677T, MTR A66G și MTRR A2756G au prezentat valorile homocisteinei semnificativ mai mari decât cele înregistrate comparativ cu genotipul sălbatic al acestor polimorfisme. Prezența alelelor mutante au avut o influență asupra nivelului seric al homocisteinei, cu excepția polimorfismului MTHFR A1298C. Pentru acest polimorfism s-au depistat valori moderate ale nivelului plasmatic al homocisteinei atât pentru genotipul sălbatic, cât și pentru genotipurile heterozigot și mutant homozigot. Acest lucru se poate datora dezechilibrului de înlănțuire observat pentru alelele genelor MTHFR 677 și MTHFR 1298, aspect care va fi abordat mai departe.

Tabelul 4.9. Homocisteina serică în raport cu genotipurile polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A66G și MTRR A2756G

	Genotip	Lot de bază, n = 57	Lot martor, n = 57	t	p
Nivelul homocisteinei serice totale, (μmol/l)	MTHFR C677T				
	CC	11,94±1,36	6,68±0,47	3,678	<0.001
	CT	11,75±0,91	7,52±0,83	3,439	<0.001
	TT	22,35±2,59	0	8,629	<0.001
	MTHFR A1298C				
	AA	13,96±1,56	6,71±0,44	4,503	<0.001
	AC	13,02±1,23	7,85±1,15	3,077	<0.01
	CC	12,12±1,69	6,3	3,443	<0.001
	MTR A2756G				
	AA	12,36±0,98	6,90±0,42	5,150	<0.001
	AG	14,01±1,62	6,97±1,80	2,909	<0.001
	GG	21,63±8,01	0	2,700	<0.001
	MTRR A66G				
	AA	12,21±1,38	6,79±0,70	3,519	<0.001
	AG	13,63±1,34	7,11±0,70	4,346	<0.001
	GG	14,30±2,24	8,95±4,59	1,049	>0.05

Astfel, s-a constatat că pacientele cu avort spontan recurent din lotul de studiu cu genotip mutant pentru polimorfismele MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G și MTR A2756G dezvoltă hiperhomocisteinemie, ceea ce este în concordanță cu datele publicate în literatura de specialitate [2; 45; 125; 139]. Aceste combinații genotipice nu exclud participarea lor în patogenia avortului spontan recurent.

De asemenea, a fost realizată o evaluare a nivelului plasmatic al homocisteinei în asociere cu unul sau mai multe polimorfisme MTHFR, MTR și MTRR la pacientele din lotul de studiu (Tabelul 4.10). Astfel, valoarea serică a homocisteinei a fost mai mare în cazul pacientelor cu avort spontan recurent cu polimorfisme asociate MTHFR, MTR și MTRR (13,78±0,97 μmol/l) comparativ cu pacientele din același lot, dar cu un singur polimorfism detectat (9,83±1,26 μmol/l) (p <0.01). În lotul martor, de asemenea, pacientele cu polimorfism unic au avut valoarea serică a homocisteinei (6,69±0,52 μmol/l) mai mică decât la pacientele cu polimorfism asociat

($7,32 \pm 2,20$ $\mu\text{mol/l}$), dar nu a depășit limita superioară de referință. Acest fapt demonstrează că variațiile nivelului homocisteinei este asociat cu mai multe polimorfisme MTHFR, MTR, MTRR și scoate în evidență rolul mutațiilor genelor MTHFR, MTR, MTRR în dezvoltarea hiperhomocisteiniei.

Tabelul 4.10. Homocisteina serică în raport cu polimorfismul unic și asociat al mutațiilor MTHFR, MTR și MTRR la pacientele din cercetare

	Lot de bază, n = 57	Lot martor, n = 57	t	p
	Nivelul homocisteinei serice totale, ($\mu\text{mol/l}$)			
Polimorfism unic	$9,83 \pm 1,26$	$6,69 \pm 0,52$	2,308	<0.01
Polimorfism asociat	$13,78 \pm 0,97$	$7,32 \pm 2,20$	2,691	<0.01

Nivelul plasmatic al homocisteinei este influențat de interacțiunea factorilor genetici și de mediu. Studiile arată că starea vitaminelor B modifică relația dintre mutațiile la nivelul genelor MTHFR, MTR, MTRR și nivelul seric al homocisteinei [65; 66; 91; 162].

Schimbarea C în T la poziția 677 nucleotidică a genei MTHFR a fost intens studiată, consecințele sale clinice fiind dependente de starea folatului, pe când celelalte polimorfisme: MTHFR A1298C, MTRR A66G și MTR A2756G sunt mai puțin clar conturate.

În continuare, la pacientele cu avort spontan recurent concentrația folatului seric și vitaminei B₁₂ (Tabelul 4.11) au fost evaluate în dependență de genotipurile genelor MTHFR, MTR și MTRR [178]. Evaluarea folatului seric și vitaminei B₁₂ în raport cu genotipurile MTHFR, MTRR și MTR a constatat prezența valorilor semnificativ mai mici decât domeniul de normalitate pentru acidul folic și vitamina B₁₂ pentru statusul heterozigot și homozigot mutant al acestor mutații.

Nivelul seric de acid folic ($6,90 \pm 0,42$ nmol/L, $9,27 \pm 2,54$ nmol/L) și vitamina B₁₂ ($185,14 \pm 15,01$ pmol/L, $213,29 \pm 27,60$ pmol/L) pun în evidență mutațiile homozigot mutante MTHFR T677T, MTRR G66G și MTR G2756G. Se atestă concentrații plasmatice relativ scăzute de folat seric ($6,90 \pm 0,42$ nmol/L, p <0.001) și vitamina B₁₂ ($185,14 \pm 15,01$ pmol/L, p <0.05) la pacientele cu genotipul 677TT MTHFR. Această situație se observă și la pacientele cu genotipul heterozigot și homozigot mutant MTR A2756G unde se constată, de asemenea, concentrații plasmatice relativ scăzute de folat seric ($11,50 \pm 2,28$ și $9,27 \pm 2,54$ nmol/L, p >0.05), în timp ce la pacientele cu genotipul mutant 66GG MTRR au fost observate concentrații plasmatice scăzute de vitamina B₁₂ ($213,29 \pm 27,60$ pmol/L, p >0.05).

Tabelul 4.11. Folatul seric și vitamina B₁₂ în raport cu genotipurile polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A66G și MTRR A2756G la pacientele cu avort spontan recurent

Genotipurile polimorfismului MTHFR C677T						
	CC n = 20	CT n = 29	TT n = 8	CC/CT t, p	CC/TT t, p	CT/TT t, p
Folat seric (nmol/L)	13,32±1,36	12,73±1,40	6,90±0,42	0.3023 >0.05	4.5104 <0.001	3.9887 <0.001
Vitamina B ₁₂ (pmol/L)	230,81±24,19	253,17±25,66	185,14±15,01	0.6341 >0.05	1.6042 >0.05	2.2884 <0.05
Genotipurile polimorfismului MTHFR A1298C						
	AA n = 24	AC n = 27	CC n = 6	AA/AC t, p	AA/CC t, p	AC/CC t, p
Folat seric (nmol/L)	12,23±1,82	12,04±1,02	12,06±1,31	0.0911 >0.05	0.0758 >0.05	0.0120 >0.05
Vitamina B ₁₂ (pmol/L)	339,03±28,02	225,53±21,10	268,86±41,10	3.2358 <0.01	1.4107 >0.05	0.9379 >0.05
Genotipurile polimorfismului MTRR A66G						
	AA n = 19	AG n = 25	GG n = 13	AA/AG t, p	AA/GG t, p	AG/GG t, p
Folat seric (nmol/L)	13,11±1,82	11,34±1,44	12,18±1,42	0.7627 >0.05	0.0354 >0.05	0.4029 >0.05
Vitamina B ₁₂ (pmol/L)	253,94±12,99	233,65±22,33	213,29±27,60	0.7854 >0.05	1.3326 >0.05	0.5735 >0.05
Genotipurile polimorfismului MTR A2756G						
	AA n = 38	AG n = 16	GG n = 3	AA/AG t, p	AA/GG t, p	AG/GG t, p
Folat seric (nmol/L)	12,61±0,95	11,50±2,28	9,27±2,54	0.4494 >0.05	1.2316 >0.05	0.6533 >0.05
Vitamina B ₁₂ (pmol/L)	237,90±20,12	228,5±30,18	247,66±43,12	0.2592 >0.05	0.2051 >0.05	0.3640 >0.05

Dorim să menționăm că nivelul folatului seric și vitaminei B₁₂ au fost sub limitele considerate normale pentru acești parametri pentru genotipurile heterozigot și mutant homozigot ale polimorfismelor MTHFR C677T, MTRR A66G și MTR A2756G la pacientele din lotul de studiu cu avort spontan recurent. Pentru polimorfismul MTHFR A1298C se atestă doar valoarea serică a acidului folic sub limita de referință (12,06±1,31 nmol/L), dar relativ mai mare în comparație cu celelalte polimorfisme testate.

Această interacțiune între genetică și nutriție contribuie la dezvoltarea hiperhomocisteinемiei, fapt constatat în tabelul 4.9, unde nivelul seric al homocisteinei la pacientele cu genotipurile homozigot mutante și heterozigote pentru polimorfismele MTHFR C677T, MTRR A66G și MTR A2756G este crescut.

Studiul de cohortă, realizat de Fredriksen și colab. (2007), a investigat asocierea dintre polimorfismele genelor care controlează procesele metabolice legate de grupa metil și un set de parametri biochimici, printre care era acidul folic, vitamina B₁₂ și homocisteina. S-a confirmat o asociere puternică între polimorfismul MTHFR C677T, polimorfismul MTHFR A1298C, hiperhomocisteinемie și folat scăzut. Polimorfismul MTR A2756G, de asemenea, a fost strâns asociat cu nivel ridicat de homocisteină în plasmă, dar nu s-a observat asociere între polimorfismul MTRR A66G și homocisteină [94].

Barbosa și colab. (2008) au raportat că nivelul scăzut de folat, polimorfismele MTHFR C677T și MTR A2756G sunt factorii determinanți pentru nivelul seric mărit al homocisteinei [73].

Puri și colab. (2013) raportează că deficiența vitaminei B₁₂ determină hiperhomocisteinемie, în special în prezența genotipului mutant 677TT MTHFR, sugerând că prezența alelei mutante T este în detriment cu deficiența vitaminei B₁₂ la femeile cu avort spontan recurent din India. Interacțiunea dintre concentrația serică joasă a vitaminei B₁₂, polimorfismele MTHFR C677T și MTRR A66G au fost asociate cu creșterea nivelului plasmatic al homocisteinei [149]. Aceste rezultate sunt în concordanță cu datele obținute în cadrul cercetării.

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, acidului folic și vitaminei B₁₂ după modul de înlănțuire a alelelor genelor MTHFR 677 și MTHFR 1298 (Tabelul 4.12) la pacientele cu avort spontan recurent [17].

Tabelul 4.12. Concentrația serică a homocisteinei, acidului folic și vitaminei B₁₂ în raport cu combinațiile genotipice ale genei MTHFR (677/1298) la pacientele cu avort spontan recurent

Combinații de genotipuri MTHFR		Valoarea serică		
677	1298	Homocisteina	Acid folic	Vitamina B ₁₂
CC	AA	10,5±0,07	18,72±7,61	164,66±36,82
CC	AC	12,24±2,4	12,54±1,72	228,09±37,64
CC	CC	12,12±1,69	12,06±1,31	268,86±41,10
CT	AA	9,52±0,89	14,01±2,79	285,35±47,59
CT	AC	13,56±1,37	11,70±1,30	223,77±26,61
CT	CC	0	0	0
TT	AA	22,35±2,59	6,90±0,42	185,14±15,01
TT	AC	0	0	0
TT	CC	0	0	0

Analizând nivelul homocisteinei în raport cu genotipurile polimorfismului MTHFR A1298C la pacientele cu avort spontan recurent incluse în studiu, am constatat că genotipul mutant 1298CC MTHFR este asociat cu hiperhomocisteinemie (12,12±1,69 μmol/L).

Rezultatele testărilor concentrației serice a homocisteinei, acidului folic și vitaminei B₁₂ în ceea ce privește polimorfismele genei MTHFR 677 și 1298 au evidențiat prezența hiperhomocisteinemiei în prezența genotipurilor 677CT/1298AC (13,56±1,37 μmol/L) și 677TT/1298AA (22,35±2,59 μmol/L) pe fon de concentrație joasă ale folatului seric și vitaminei B₁₂. Se pare că mutația din poziția 1298 în forma homozigotă sau heterozigotă duce la creșterea homocisteinei dacă se asociază cu o mutație în poziția 677, homozigotă sau heterozigotă, ultima potențând efectul mutației în poziția 1298. Această ipoteză a fost constatată și demonstrată în referințe detaliate în literatura de specialitate [16; 84; 122], dar este în contradicție cu alte studii [78; 119].

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. 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 [93]. Comparativ cu acest

studiu, cercetarea noastră nu 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, dar și purtătorii genotipul heterozigot în rândul pacienților cu aport scăzut de acid folic [113]. Mai mult, prezența mutației genei MTHFR în sine a fost, de asemenea, legată cu avortul spontan recurent [84; 192].

Studiile recente indică legătura între un nivel scăzut de acid folic și hiperhomocisteinemie în prezența polimorfismului MTHFR 677TT [76; 95; 101; 108; 110; 122]. Interacțiunea dintre folatul seric și prezența polimorfismului MTHFR C677T ca determinanți ai concentrației plasmatice de homocisteină este în continuare demonstrată în tabelul 4.13. Datele din tabelul 4.13 prezintă concentrațiile serice ale homocisteinei totale și acidului folic în raport cu genotipurile polimorfismului MTHFR C677T în dependența de statusul seric al acidului folic (folatul seric < 13,5 nmol/L și folatul seric > 13,5 nmol/L) la pacientele cu avort spontan recurent [30].

Tabelul 4.13. Concentrațiile serice ale homocisteinei totale și acidului folic în raport cu polimorfismul MTHFR C677T în dependența de statusul seric al acidului folic la pacientele cu avort spontan recurent

Parametrii	Genotipul polimorfismului MTHFR C677T	Statutul seric al acidului folic		t	p
		< 13,5 nmol/L	>13,5 nmol/L		
Homocisteina, $\mu\text{mol/l}$	CC	13,70 \pm 1,82	8,68 \pm 1,42	2.1746	<0.05
	CT	12,91 \pm 1,07	9,17 \pm 1,53	2.0032	<0.05
	TT	22,35 \pm 2,59	0	8.6293	<0.001
Folat seric, nmol/L	CC	9,99 \pm 0,86	19,52 \pm 2,06	4.2691	<0.001
	CT	9,26 \pm 0,86	20,45 \pm 2,78	3.8454	<0.001
	TT	6,90 \pm 0,42	0	16.4286	<0.001

Influența genotipului TT al MTHFR asupra nivelului homocisteinei serice totale a fost observat, 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 nmol/L [180]. 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: 22,35 \pm 2,59 $\mu\text{mol/l}$ versus 13,70 \pm 1,82 $\mu\text{mol/l}$, p <0.05) când folatul seric

a fost $< 13,5$ nmol/L, în timp ce această diferență nu se observă când folatul seric este $> 13,5$ 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 grupa cu folatul seric $< 13,5$ nmol/L, a fost însoțită de un nivel semnificativ mai scăzut de acid folic ($6,90 \pm 0,42$ nmol/L) comparativ cu genotipul CT ($9,26 \pm 0,86$ nmol/L) și genotipul CC ($9,99 \pm 0,86$ nmol/L) ($p < 0,05$) [180]. Această diferență nu se observă la pacientele cu genotipurile CC și CT atunci când folatul seric a fost $> 13,5$ nmol/L ($19,52 \pm 5,05$ și $20,45 \pm 7,87$ nmol/L) ($p < 0,001$).

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 [158]. Disponibilitatea insuficientă a SAM conduce apoi la reacții de metilare inadecvate, cu multiple consecințe, mai ales în ceea ce privește metilare ADN-ului [75; 93]. Având în vedere impactul major al metilării, Ueland și colab., Reik W. și Walter J. au constatat că metilarea defectă poate duce la expresia aberantă a genelor care rezultă în abaterile de la dezvoltarea embrionară normală și boli maligne [91; 93]. În cele din urmă, Blount și colab. și Fenech și colab. au demonstrat că deficitul alimentar de acid folic și, ca urmare scăderea sintezei celulare de 5,10-metilentetrahidrofolat, precum și activitatea redusă a MTHFR conduc la incorporarea excesivă a uracilului în ADN, cu dezvoltarea rupturilor cromozomiale [55; 93].

Enzima MTR necesită vitamina B₁₂ în calitate de cofactor în reacția de remetilare a homocisteinei în metionină [158; 161; 162]. În continuare s-a încercat de a evalua legătura dintre valoarea serică a vitaminei B₁₂ și hiperhomocisteinemie în prezența polimorfismului MTR A2756G la pacientele cu avort spontan recurent din cercetare. Relația dintre prezența mutațiilor A2756G și G2756G ale genei MTR și valoarea serică a vitaminei B₁₂ asupra nivelului seric al homocisteinei totale este elucidată în tabelul 4.14. Se atestă influența genotipurilor mutante A2756G și G2756G ale genei MTR asupra nivelului seric al homocisteinei totale atunci când concentrația plasmatică a vitaminei B₁₂ a fost mai joasă de 259 pmol/L. Menționăm că nivelul de homocisteină serică a depășit domeniul de normalitate în grupul pacientelor cu statutul seric al vitaminei B₁₂ mai < 259 pmol/L, astfel posesoarele genotipului homozigot mutant G2756G au înregistrat cel mai mare nivel de homocisteină ($24,55 \pm 14,35$ $\mu\text{mol/l}$) ($p < 0,001$), urmate de pacientele cu genotipul heterozigot A2756G ($15,85 \pm 1,84$ $\mu\text{mol/l}$) ($p < 0,01$) și genotipul homozigot normal A2756A ($13,26 \pm 1,19$ $\mu\text{mol/l}$) ($p < 0,05$) pe fon de concentrații joase de vitamina B₁₂ ($214,5 \pm 6,18$ pmol/L, $185,70 \pm 8,57$ pmol/L și $167,58 \pm 10,81$ pmol/L) [156]. Această

deosebire nu se atestă la pacientele cu genotipul homozigot normal A2756A ($9,43 \pm 1,23 \mu\text{mol/l}$) și heterozigot A2756G ($8,52 \pm 1,46 \mu\text{mol/l}$) ($p < 0.01$) atunci când concentrația serică a vitaminei B₁₂ > 259 pmol/L ($406,11 \pm 50,52 \text{ pmol/L}$ și $411,25 \pm 37,53 \text{ pmol/L}$) ($p < 0.01$).

Tabelul 4.14. Concentrațiile serice ale homocisteinei totale și vitaminei B₁₂ în raport cu polimorfismul MTR A2756G în dependența de statusul seric al vitaminei B₁₂ la pacientele cu avort spontan recurent

Parametrii	Genotipul polimorfismului MTR A2756G	Statutul seric al vitaminei B ₁₂		t	p
		< 259 pmol/L	> 259 pmol/L		
Homocisteina, $\mu\text{mol/l}$	AA	$13,26 \pm 1,19$	$9,43 \pm 1,23$	2.2378	<0.05
	AG	$15,85 \pm 1,84$	$8,52 \pm 1,46$	3.1206	<0.01
	GG	$24,55 \pm 14,35$	15,8	3.7805	<0.001
Vitamina B ₁₂ , pmol/L	AA	$185,70 \pm 8,57$	$406,11 \pm 50,52$	4.3014	<0.001
	AG	$167,58 \pm 10,81$	$411,25 \pm 37,53$	6.2360	<0.001
	GG	$214,5 \pm 6,18$	314	23.2758	<0.01

Deși se relatează o incidență mică a genotipului homozigot mutant G2756G al genei MTR în cadrul cercetării actuale, aspect concordant cu datele din literatura de specialitate [90; 173], se atestă, cu certitudine, influența genotipului GG al genei MTR asupra nivelului homocisteinei plasmatică ($15,8 \mu\text{mol/l}$) chiar și atunci când concentrația serică a vitaminei B₁₂ a depășit 259 pmol/L (314 pmol/L) ($p < 0.01$).

Astfel, se atestă influența genotipurilor homozigot mutante asupra homocisteinei serice totale atunci când concentrația vitaminelor B sunt în cantități insuficiente, luând în considerație că acidul folic și vitamina B₁₂ servesc în calitate de cosubstrat coenzimatic în procesul de remetilare a homocisteinei în metionină.

Mutațiile genelor metabolismului homocisteinei în diferite combinații între ele pot crește riscul de tulburări în circulația placentară [100]. Rezultatul analizei genotipurilor polimorfismelor MTHFR, MTR și MTRR a demonstrat faptul că pacientele cu avort spontan recurent prezintă o proporție mare a genotipurilor heterozigote și homozigot mutante (Anexa 5).

Mutațiile în genele MTHFR, MTRR, MTR duc la insuficiența metioninei ce provoacă dereglarea biosintezei proteinelor, încetinirea creșterii și dezvoltării organismului, și dereglări severe funcționale, iar mecanismele prin care acționează aceste mutații, menționate anterior, sunt

hipometilarea și alterarea sintezei ADN [126]. Cu toate că purtătorii polimorfismelor MTHFR, MTRR și MTR prezintă perturbări ușoare în metabolismul acidului folic și homocisteinei din cauza scăderii activității enzimatică, efectul uneia sau mai multor alele mutante MTHFR, MTRR și MTR pot fi dăunătoare în timpul embriogenezei, atunci când cerința de acid folic este mare [188; 200]. În acest context, din punct de vedere clinic, detecția genotipurilor heterozigote și homozigot mutante în polimorfismele testate prezintă un impact mare în riscul apariției avortului spontan. Nelen și colab. (2000) susțin rolul mutației MTHFR C677T în patogeneza avorturilor spontane recurente inexplicabile și au stabilit o incidență de 2-3 ori mai mare a întreruperii spontane a sarcinii în rândul femeilor cauziene cu genotip homozigot mutant 677TT față de lotul martor cu genotip sălbatic 677CC [142]. Cercetările lui Coa și colab. (2014) au demonstrat o asociere semnificativă între polimorfismul MTHFR C677T și avortul spontan recurent idiopatic. Evaluarea polimorfismului MTHFR A1298C nu a prezentat nici o asociere semnificativă cu avortul spontan recurent idiopatic [78].

În continuare, am analizat dacă există vreo relație între prezența polimorfismelor genelor MTHFR, MTR și MTRR și numărul de avorturi spontane la pacientele din lotul de bază (Tabelul 4.15).

Tabelul 4.15. Corelarea polimorfismelor MTHFR, MTR și MTRR cu numărul de avorturi spontane la pacientele din lotul de bază

Polimorfismele MTHFR, MTR și MTRR	Polimorfism unic		Polimorfism asociat		t	p
	Abs.	P±ES	Abs.	P±ES		
2 avorturi spontane	5	8,78±3,74	31	54,39±6,59	6.0111	<0.001
3 avorturi spontane	1	1,75±0,98	13	22,81±5,55	3.6168	<0.001
4 avorturi spontane	0	-	3	5,26±2,95	1.7789	>0.05
5 avorturi spontane	0	-	3	5,26±2,95	1.7789	>0.05

Putem remarca că 5 paciente (8,78%) cu polimorfism unic și 31 paciente (54,39%) cu polimorfism asociat au prezentat 2 avorturi spontane în anamneză (p <0.001), 1 pacientă (1,75%) cu polimorfism unic și 13 paciente (22,81%) cu polimorfism asociat au prezentat 3 avorturi în anamneză (p <0.001), 3 paciene (5,26%) cu polimorfism asociat au prezentat 4 avorturi în anamneză și 3 paciene (5,26%) cu polimorfism asociat au prezentat 5 avorturi în anamneză. Se atestă că pacientele care au declarat în anamneză ≥ 3 avorturi spontane au prezentat polimorfisme asociate ale genelor MTHFR, MTR și MTRR.

La evaluarea relației între polimorfismele asociate ale genelor MTHFR, MTR și MTRR și numărul de avorturi spontane s-a observat că nu există diferență semnificativă în ce privește corelarea numărului de polimorfisme cu numărul de avorturi spontane în antecedente la femeile cu avort spontan recurent. Polimorfismele neasociate au prezentat în medie $2,16 \pm 0,18$ avorturi spontane în antecedente în timp ce polimorfismele asociate au în istoric, în medie, un număr de $2,56 \pm 0,12$ avorturi spontane în antecedente.

În continuare, am studiat relația dintre genotipurile polimorfismelor MTHFR, MTR și MTRR cu termenul la care s-a produs întreruperea spontană a sarcinii la pacientele cu avort spontan recurent (Anexa 6). La evaluarea pacientelor cu avort spontan recurent pe două categorii: cu genotip normal și modificat, se observă că pacientele cu genotip modificat heterozigot pentru toate cele patru polimorfisme MTHFR, MTR și MTRR s-au întâlnit mai frecvent în grupul pacientelor cu avort spontan precoce decât în grupul pacientelor cu avort spontan tardiv ($p < 0.001$), excepție fiind genotipurile homozigot mutante pentru toate cele patru polimorfisme MTHFR, MTR și MTRR, care s-au întâlnit exclusiv în grupul pacientelor cu avort spontan precoce ($p < 0.001$).

În ceea ce privește nivelul plasmatic al homocisteinei în raport cu termenul sarcinii la care s-a produs întreruperea spontană la pacientele cu avort spontan recurent (Tabelul 4.16), se observă că pacientele cu avort spontan precoce prezintă hiperhomocisteinemie intermediară ($13,61 \pm 0,87 \mu\text{mol/l}$), în timp ce pacientele cu avort spontan tardiv au avut nivelul seric normal de homocisteină ($9,14 \pm 1,62 \mu\text{mol/l}$) ($p < 0.05$) [33; 176; 179].

Tabelul 4.16. Nivelul plasmatic al homocisteinei în raport cu termenul sarcinii la care s-a produs întreruperea spontană la pacientele cu avort spontan recurent

Nivelul homocisteinei serice totale, ($\mu\text{mol/l}$)	Avort spontan precoce	Avort spontan tardiv	t	p
		$13,61 \pm 0,87$	$9,14 \pm 1,62$	2.4293

Așa cum arată diferența dintre nivelul plasmatic al homocisteinei la pacientele cu avort spontan precoce și tardiv, acest parametru se asociază cu avort spontan precoce la grupul analizat. Acest rezultat este în conformitate cu meta-analiza efectuată de Nelen și colab. care a raportat hiperhomocisteinemia ca factor de risc pentru avort spontan recurent precoce [142].

Luând în considerație că pacientele din lotul de bază au prezentat între 2 și 5 avorturi spontane, s-a analizat și relația dintre genotipurile polimorfismelor MTHFR, MTR și MTRR cu frecvența avorturilor spontane în antecedente (Anexa 7), cu scopul de a evalua legătura de

cauzalitate dintre polimorfismele testate și numărul de avorturi spontane în antecedente. Prin analiza comparativă a distribuției genotipurilor în raport cu frecvența avorturilor spontane în antecedente din lotul de bază, a rezultat faptul că genotipurile heterozigote ale polimorfismelor testate au fost mai frecvente în grupul pacientelor cu 2 avorturi spontane în anamneză comparativ cu grupul pacientelor cu ≥ 3 avorturi spontane în anamneză, după cum urmează: 677CT MTHFR (62,07% versus 37,93%, $p < 0.01$), 1298AC MTHFR (70,37% versus 29,63%, $p < 0.001$), 66AG MTRR (68,0% versus 32,0%, $p < 0.001$) și 2756AG MTR (75,0% versus 25,0%, $p < 0.001$).

Distribuția genotipurilor homozigot mutante pentru cele patru polimorfisme analizate în raport cu frecvența avorturilor spontane în antecedente din lotul de bază a elucidat unele tendințe de asociere a genotipurilor mutant atât în grupul pacientelor cu ≥ 3 avorturi spontane, cât și pentru cel cu 2 avorturi spontane în anamneză, diferența fiind însă mică. Acest lucru ne permite să susținem contribuția polimorfismelor analizate în etiopatogeneza avort spontan recurent (Figura 4.6).

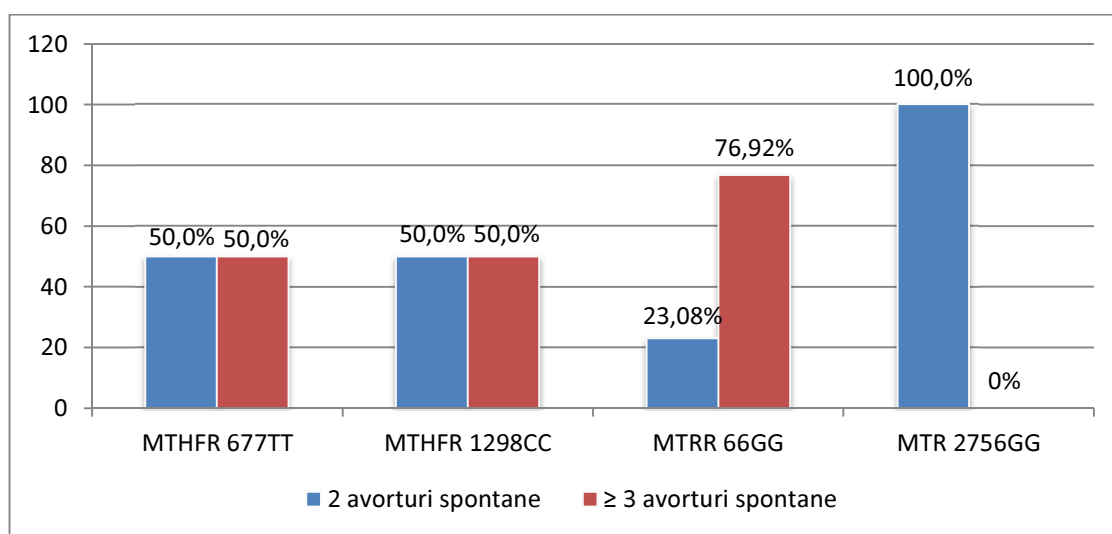


Fig. 4.6. Distribuția genotipurilor homozigot mutante în raport cu frecvența avorturilor spontane în antecedente la pacientele din lotul de bază (%).

Evaluând polimorfismul MTHFR C677T, am constatat că genotipul homozigot mutant 677TT se întâlnește cu o frecvență egală atât în grupul pacientelor cu 2 avorturi spontane în anamneză (50,0% \hat{I}_{95} : 15,36-84,64), cât și la grupul pacientelor cu ≥ 3 avorturi spontane în anamneză (50,0% \hat{I}_{95} : 15,36-84,64). Acest lucru evidențiază rolul genotipului homozigot mutant 677TT în producerea avorturilor spontane. Aceiași situație se atestă și în cazul polimorfismului MTHFR A1298C, unde genotipul homozigot mutant predomină în proporții egale (50,0% \hat{I}_{95} :

10,0 – 90,0) atât în grupul în grupul pacientelor cu 2 avorturi spontane în anamneză, cât și la grupul pacientelor cu ≥ 3 avorturi spontane în anamneză.

Pentru polimorfismul MTR A2756G, se atestă că genotipul homozigot mutant 2756GG predomină exclusiv în grupul pacientelor cu 2 avorturi spontane (100,0% versus 0,0%). Însă frecvența genotipului homozigot mutant 66GG MTRR a fost mai mare pentru grupul pacientelor cu ≥ 3 avorturi spontane în anamneză (76,92% versus 23,08%, $p < 0.001$).

În acest context a fost evaluat și nivelul plasmatic al homocisteinei serice totale în raport cu frecvența avorturilor spontane în antecedente la pacientele din lotul de bază (Tabelul 4.17).

Tabelul 4.17. Nivelul plasmatic al homocisteinei serice totale în raport cu frecvența avorturilor spontane în antecedente la pacientele din lotul de bază

Nivelul homocisteinei serice totale, ($\mu\text{mol/l}$)	2 avorturi spontane	≥ 3 avorturi spontane	t	p
	12,19 \pm 1,18	15,38 \pm 1,13	2.001	<0.05

Nivelul seric al homocisteinei a fost mai mare decât domeniul de normalitate pentru acest parametru pentru ambele subgrupe, însă în grupul pacientelor cu ≥ 3 avorturi spontane consecutive în anamneză nivelul homocisteinei serice a fost mai mare (15,38 \pm 1,13 $\mu\text{mol/l}$) comparativ cu pacientele cu 2 avorturi spontane în anamneză (12,19 \pm 1,18 $\mu\text{mol/l}$) ($p < 0.05$) [33; 176; 179].

Acest rezultat sugerează că hiperhomocisteinemia poate juca un rol în etiologia avortului spontan recurent, în special, și în prezența altor factori de risc și este în concordanță cu studiile efectuate de Sikora și colab. (2007) care atestă ca urmare a creșterii numărului de avorturi spontane, sporește concentrația serică a homocisteinei, iar concentrația folatului seric scade [159].

Astfel putem constata, că prezența hiperhomocisteinemiei la pacientele cu avort spontan recurent primar și precoce ar sugera ideea că există o corelație evidentă între prezența hiperhomocisteinemiei și avort.

De asemenea, având în considerație implicațiile majore ale acidului folic și vitaminei B₁₂, care servesc în calitate de cofactori în reacția de remetilare a homocisteinei, astfel contribuind la sinteza SAM în cantități suficiente, s-a încercat de a evalua relația lor cu termenul la care s-a produs pierderea spontană a sarcinii și cu frecvența avorturilor spontane în antecedente la femeile cu avort spontan recurent din lotul de studiu (Tabelul 4.18).

Tabelul 4.18. Relația dintre acidul folic și vitamina B₁₂ cu tipul de avort spontan și frecvența avorturilor spontane în lotul de bază

	Avort spontan precoce	Avort spontan tardiv	t	p
Folat seric, nmol/L	11,93±0,88	14,10±2,55	0.806	0.4219
Vitamina B ₁₂ , pmol/L	232,47±15,57	306,88±54,65	0.141	0.8881
	2 avorturi spontane	≥ 3 avorturi spontane		
Folat seric, nmol/L	12,70±1,23	11,05±1,15	0.985	0.3236
Vitamina B ₁₂ , pmol/L	242,16±20,90	223,96±23,40	0.581	0.5621

Din tabelul 4.18, în ceea ce privește concentrația serică de acid folic și vitamina B₁₂ în raport cu termenul la care s-a produs pierderea spontană a sarcinii, se poate de remarcat că pacientele cu avort spontan precoce au prezentat valori mai reduse pentru acidul folic (11,93±0,88 nmol/L) și vitamina B₁₂ (232,47±15,57 pmol/L) comparație cu pacientele la care s-a înregistrat avort spontan tardiv (14,10±2,55 nmol/L și 306,88±54,65 pmol/L), însă nesemnificativ statistic (p>0.05).

Chanarin și colab. au raportat că sarcina este asociată cu o cerere crescută de acid folic. Tamura și colab. (2006) indică că nivelul folatului în sarcină variază, observându-se un declin la începutul sarcinii, urmat de o ușoară creștere în al doilea trimestru de gestație [166]. Creșterea necesarului de acid folic în timpul sarcinii se datorează dezvoltării fătului și compartimentelor uteroplacentare. La rândul său, numărul pierderilor de sarcină duce la epuizarea rezervelor de folat, ceea ce necesită un aport adecvat de acid folic în perioada preconcepțională [166]. În această circumstanță a fost evaluată concentrația acidului folic și vitaminei B₁₂ în raport cu frecvența avorturilor spontane în antecedente din lotul de bază. Nivelul plasmatic al acidului folic (11,05±1,15 nmol/L) și vitaminei B₁₂ (223,96±23,40 pmol/L) a fost mai mic în grupul pacientelor cu ≥ 3 avorturi spontane consecutive în anamneză în comparație cu valoarea serică a acidului folic (12,70±1,23 nmol/L) și a vitaminei B₁₂ (242,16±20,90 pmol/L) în grupul pacientelor cu 2 avorturi spontane consecutive în anamneză, însă nesemnificativ statistic (p>0.05).

Studiile referitoare la perfuzia circulației utero-placentare, efectuate de Henderson și colab., au constatat că forma metabolic activă de acid folic 5-MTHF este extensiv și rapid legată de placentă, dar transferul la făt este în cantități reduse și într-un ritm lent printr-un schimb bidirecțional și saturabil. Receptorii placentari pentru folați favorizează legarea 5-MTHF și pot

transfera folații împotriva unui gradient de concentrație; prin urmare, perfuzia fetală este aproximativ de 3 ori mai mare decât perfuzia maternă a placentei, ceea ce indică faptul că folatul este concentrat în timpul transportului placentar. Concentrația de acid folic matern trebuie păstrată adecvat pentru a menține folatul plasmatic peste o anumită concentrație pentru transferul placentar [166]. Astfel putem constata, că pierderile spontane de sarcină, pe fon de aport inadecvat de acid folic contribuie la depleția și deficitul de folat, aspect argumentat în respectiva cercetare.

4.3. Stratificarea riscului obstetrical și managementul clinic al pacientelor cu avort spontan recurent

La etapa actuală, cercetarea clinică a pacientelor cu avort spontan recurent incluse în studiu a fost orientată spre analiza următorilor parametri: evaluarea scorului de risc obstetrical cu aprecierea tacticii ulterioare de conduită și tratament la etapa preconcepțională și pe parcursul sarcinii în vederea evitării avortului spontan și depășirea termenului de 22 săptămâni de gestație, evoluția sarcinii prezente, complicațiile survenite. De asemenea, am studiat parametrii hemostazei preconcepțional și monitorizarea lor pe parcursul sarcinii, precum și evaluarea examenului ultrasonografic pentru stabilirea evoluției sarcinii.

Evaluarea riscului de complicații obstetricale în prezența mutațiilor trombofilice se va face prin acordarea unui punctaj fiecărui polimorfism identificat (Tabelul 2.1). Scorul de risc determină predicția riscului leziunilor trombotice în patul placentar și managementul gravidelor cu trombofilie [43; 44; 56].

Prezența polimorfismelor genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G a permis aprecierea scorului de risc pentru apariția complicațiilor obstetricale la pacientele cu mutații genetice a enzimelor implicate în metabolismul homocisteinei și metioninei. În lotul de bază, scorul de risc pentru fiecare pacientă s-a determinat prin adunarea punctajului fiecărui polimorfism identificat (Figura 4.7).

Am obținut următoarele rezultate:

- 0 puncte – 1 pacientă (1,75±0,98%);
- 1 punct – 1 pacientă (1,75±0,98%);
- 2 puncte – 6 paciente (10,53±4,06%);
- 3 puncte – 8 paciente (14,04±4,60%);
- 4 puncte – 20 paciente (35,08±6,32%);
- 5 puncte – 15 paciente (26,32±5,83%);
- 6 puncte – 6 paciente (10,53±4,06%).

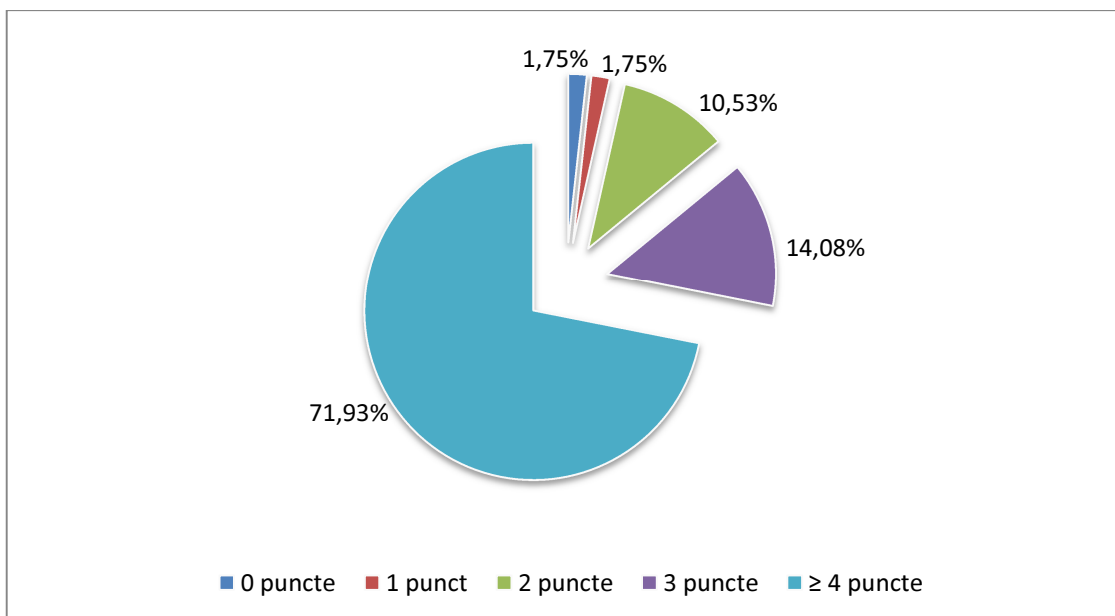


Fig. 4.7. Scorul de risc al pacientelor cu avort spontan în raport cu polimorfismele genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G (%).

Se observă că un scor ≥ 4 puncte a fost identificat la 41 paciente ($71,93 \pm 5,95\%$), un scor de 2-3 puncte a fost înregistrat la 14 paciente ($24,57 \pm 5,70\%$), iar un scor 0-1 puncte – la 2 paciente ($3,50 \pm 2,43\%$).

Deficiența enzimatică ca rezultat al mutațiilor genetice determină acumularea de homocisteină în circulație cu efect toxic vascular, cu risc crescut trombotic, inclusiv de tromboze placentare [136]. În acest context, valoarea scorului și prezența hiperhomocisteinemiei ($52,64 \pm 6,61\%$) în rândul pacientelor cu avort spontan recurent determină atitudinea terapeutică la o sarcină ulterioară (Anexa 8) [43; 44; 56]. Astfel, un scor de risc reprezintă un mijloc de ajutor al clinicianului pentru a alege un management terapeutic adecvat și devine cu adevărat util dacă este aplicat concomitent și în acord cu observațiile clinice.

Pe baza rezultatelor clinice și a genotipizării, pacientele pot avea o clasificare a riscului și recomandările pentru tromboprofilaxia sarcinii pot fi individualizate. Testare genetică pentru trombofilia ereditară devine o parte importantă în monitorizarea și prevenirea complicațiilor trombotice în sarcină și post partum.

Sistemul hemostatic joacă un rol important în sarcină, inclusiv în procesul de implantare și în dezvoltarea placentei. Implantarea ovocitului fecundat la nivelul mucoasei uterine determină o legătură între placenta, circulația maternă și embrion. Starea de hipercoagulabilitate și tromboza pot interfera cu aceste procese și pot fi asociate cu avortul spontan [12, p. 9]. Nivelul crescut al procoagulanților, nivelul scăzut al anticoagulanților și scăderea activității fibrinolitice

determină o stare de hipercoagulabilitate în sarcină [14; 37, p. 4; 149]. Acest potențial trombotic asociat sarcinii este exacerbat și de unele condiții, cum ar fi: staza venoasă la nivelul membrelor inferioare, datorită compresiei la nivelul venei cave inferioare și venelor uterine de către uterul mărit, creșterea capacității venoase legată de modificările hormonale, astfel pe parcursul sarcinii normale înregistrându-se un risc de circa 4-10 ori mai mare pentru producerea evenimentelor tromboembolice [14].

Hiperhomocisteinemia, în prezent, reprezintă un factor de risc pentru accidentul trombotic [14]. Hemostaza organismului matern diferă de cea din afara perioadei de sarcină [84]. Markerii hemostazei în sarcină contribuie atât la creșterea generării de trombină, cât și la creșterea fibrinolizei. Modificările factorilor plasmatici și modificările fluxului sangvin nu produc alterări ale hemostazei, dar relevă prezența sau conduc la agravarea unor boli asociate sau induse de către sarcină [84].

În acest context, au fost investigați parametrii hemostazei la etapa preconcepțională: numărul de trombocite, concentrația fibrinogenului plasmatic, timpul de protrombină și APTT la femeile cu avort spontan recurent. Valorile parametrilor hemostazei s-au încadrat în limite normale, menționând că la 4 paciente ($7,02 \pm 3,38\%$) concentrația fibrinogenului a depășit limita de referință pentru acest parametru. Determinarea indicilor hemostazei a relevat următoarele valori medii: numărul de trombocite – $281,40 \pm 4,59$, fibrinogen – $3,13 \pm 0,09$, timpul de protrombină – $84,21 \pm 0,99$ și APTT – $33,87 \pm 0,29$. Astfel, se atestă că toate mediile se înscriu în limitele normale.

Analiza rezultatelor parametrilor hemostazei la pacientele cu avort spontan recurent sunt normale față de limitele normale admise.

S-a determinat valoarea coeficienților de corelație dintre nivelul homocisteinei și parametrii hemostazei (Figura 4.8). În acest mod poate fi apreciată influența pe care o are homocisteina asupra parametrilor analizați. S-a observat că există corelații de intensitate medie pentru trei parametri ai hemostazei, astfel homocisteina se asociază cel mai mult cu APTT ($r = 0,54$), urmează timpul de protrombină ($r = 0,34$) și trombocite ($r = 0,35$), și corelație de intensitate slabă cu fibrinogenul ($r = 0,28$).

Corelațiile homocisteinei cu parametrii hemostazei ne face să considerăm că homocisteina redă tendința spre tromboză, ceea ce poate conduce la virarea echilibrului fluido – coagulant spre hipercoagulare, fapt confirmat și în literatura de specialitate [128; 171]. De asemenea, considerăm că este importantă și calitatea endoteliului pe care se pot forma „evenimentele” trombotice, deoarece un endoteliu alterat de prezența homocisteinei devine mai

sensibil pentru trombocite și factorii coagulării, potențând proprietățile protrombogene ale homocisteinei.

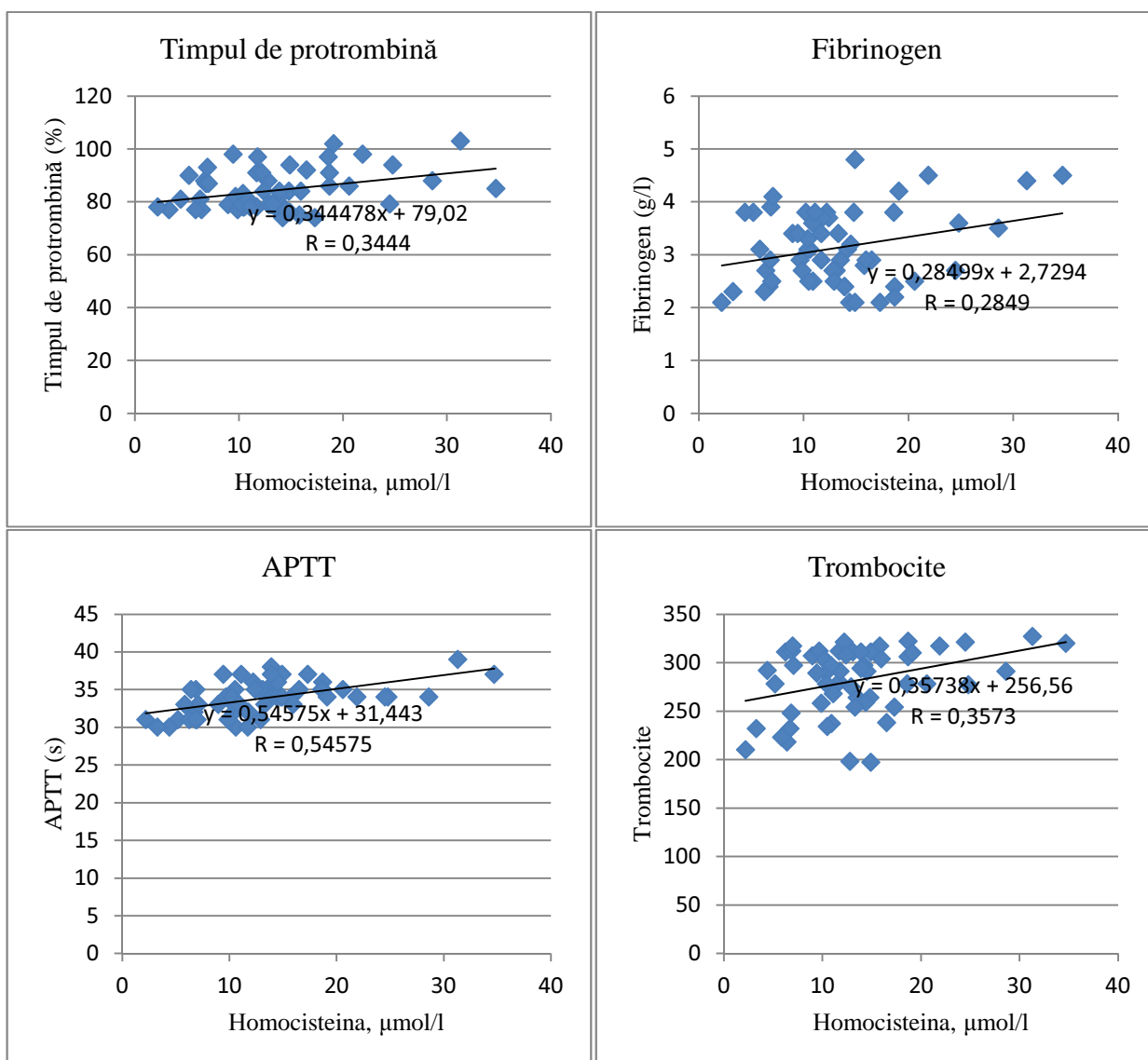


Fig. 4.8. Aspecte corelaționale între valoarea serică a homocisteinei și parametrii hemostazei la pacientele cu avort spontan recurent din studiu.

Astfel prezența hiperhomocisteinемiei, polimorfismelor genetice și aprecierea scorului de risc ≥ 4 puncte în $71,93 \pm 5,95\%$, precum și identificarea corelațiilor de intensitate medie dintre homocisteină și parametrii hemostazei determină atitudinea terapeutică ulterioară.

Stratificarea riscului obstetrical reprezintă o etapă esențială pentru stabilirea strategiei și a metodelor de tromboprofilaxie, precum și pentru estimarea prognosticului apariției sarcinii la aceste paciente.

Tromboprofilaxia a fost realizată prin terapie anticoagulantă cu heparină cu fracție moleculară mică, cu efect anticoagulant de tip fiziologic, care se exercită direct asupra factorilor plasmatici, cu biodisponibilitate superioară, cu efect antiplachetar mic și profil de siguranță ridicat la gravide, precum și prin medicația antitrombotică de tip antiplachetar (acid acetilsalicilic).

La momentul actual, se utilizează heparină cu greutate moleculară mică în doze profilactice și doze terapeutice, în tratamentul accidentelor tromboembolice. În timpul sarcinii, eficacitatea heparinei cu masă moleculară mică, în doză profilactică - 40mg/zi (4000-5000 UI/zi), este dovedită în practica clinică și a fost demonstrată de multiple studii clinice controlate multicentrice [83; 125]. Dozele mici de acid acetilsalicilic (75 mg/zi) pot fi administrate în asociere cu heparina cu masă moleculară mică, dacă efectul anticoagulant se monitorizează atent [125].

În cadrul cercetării, toate pacientele în perioada preconcepțională au primit suplimente de acid folic și vitamina B₁₂, indiferent de scorul de risc identificat. Pacientele cu avort spontan recurent care au avut un scor de risc ≥ 4 puncte au beneficiat de acid folic în doza de 5 mg/zi și vitamina B₁₂ (500 μ g), și de un tratament specific anticoagulant și antiagregant, menit să combată hipercoagulabilitatea. Tratamentul a durat cel puțin 2 luni înainte de concepție și a continuat pe parcursul sarcinii. Vitamina B₁₂ a fost administrată doar la etapa preconcepțională [176].

Astfel, am efectuat evaluarea clinică în dinamică ale pacientelor cu avort spontan recurent, în conformitate cu tratamentul administrat, și în raport cu scorul de risc identificat.

Timpul obținerii unei sarcini a fost urmărit la toate pacientele, indiferent de scorul de risc obstetrical și tratamentul medicamentos administrat. Astfel, 16 paciente (28,07 \pm 5,95%) au obținut o sarcină în primele 3 luni, din totalitatea cazurilor investigate. În următoarele 3-6 luni, au rămas gravide 24 paciente (42,10 \pm 6,53%). În perioada 6-12 luni doar 6 paciente (10,53 \pm 4,06%) au obținut sarcina.

Cu toate că ritmul vizitelor din cadrul protocolului de urmărire a gravidei a fost mai mare în cazul acestor paciente, sarcinile au avut o evoluție normală, complicată cu contracții uterine nesistematizate. Astfel, studiind evoluția sarcinii actuale la pacientele cu avort spontan recurent în anamneză până la termenul sarcinii de 22 săptămâni de gestație, am constatat: iminența de avort spontan precoce – 19 paciente (41,30 \pm 7,25%), iminența de avort spontan tardiv – 5 paciente (10,86 \pm 4,58%), avort spontan precoce – 1 pacientă (2,17 \pm 2,14%), avort spontan tardiv – 2 paciente (4,34 \pm 3,0%), disgravidie precoce – 29 paciente (63,04 \pm 7,11%).

S-au înregistrat următoarele rezultate obstetricale:

- Grupul pacientelor cu scor de risc ≥ 4 puncte: sarcina a survenit la 34 paciente (59,65±6,49%). 32 paciente (56,15±6,57%) au depășit termenul de gestație de 22 săptămâni de sarcină, iar la 2 paciente (3,50±2,43%) sarcina s-a soldat cu avort spontan precoce (10-11 săptămâni de sarcină) și tardiv (13-14 săptămâni de sarcină).
- Grupul pacientelor cu scor de risc 2-3 puncte: sarcina a survenit la 10 paciente (17,54±5,03%), toate depășind termenul de gestație de 22 săptămâni de sarcină. Într-un caz (1,75±0,98%) s-a inițiat terapia anticoagulantă și antiagregantă.
- Grupul pacientelor cu scor de risc 0-1 puncte: sarcina a survenit în ambele cazuri (3,50±2,43%), dar într-un caz cursul sarcinii s-a soldat cu avort spontan tardiv (12-13 săptămâni de sarcină).
- Sarcina nu a survenit la 11 paciente (19,30±5,22%) [176].

Ultrasonografia reprezintă la ora actuală o achiziție deosebit de valoroasă în practica obstetricii moderne. Diagnosticul ultrasonografic oferă date importante pentru înțelegerea dezvoltării morfologice și fiziologice fetale. Având în vedere calitățile examenului ultrasonografic, acesta este în mod frecvent metoda de examinare utilizată de primă intenție, care dirijează investigațiile ulterioare.

În cadrul cercetării actuale, beneficiile examenului ultrasonografic au inclus: confirmarea sarcinii, identificarea existenței sarcinii intrauterine și excluderea sarcinii ectopice, determinarea corectă a vârstei gestaționale, evaluarea riscului și prezenței anomaliilor cromozomiale sau malformațiilor congenitale, ceea ce a permis studierea aspectelor fiziologice și patologice ale sarcinilor la pacientele incluse în studiu. Valoarea ecografiei morfologice din trimestrul al doilea nu ar trebui subestimată, deoarece reprezintă un reper important la care scanările ecografice anterioare și ulterioare pot fi raportate pentru evaluarea creșterii și dezvoltării normale fetale.

Frecvența efectuării măsurărilor ecografice a fost în corespundere cu standardul național privind numărul de examene ultrasonografice obligatorii în timpul sarcinii. Conform datelor obținute în cadrul cercetării, a fost determinată o corespundere a parametrilor biometriei fetale cu vârsta de gestație la examenul ultrasonografic pentru trimestrul I și II de sarcină. Într-un singur caz (1,75±0,98%) a fost documentat ecografic hematom decidual. Terapia anticoagulantă a fost suspendată, iar sarcina s-a soldat cu avort spontan.

În ceea ce urmează vom dezvolta informațiile referitoare la modificările parametrilor investigați în funcție de timp, în special, de a surprinde modificarea/lipsa modificării în relație cu tratamentul administrat.

Statusul hipercoagulant produs de homocisteină și ulterior, terapia anticoagulantă, creează o circumstanță unică care trebuie să fie gestionată cu atenție.

Determinarea și compararea modificărilor concentrației de homocisteină se observă în figura 4.9.

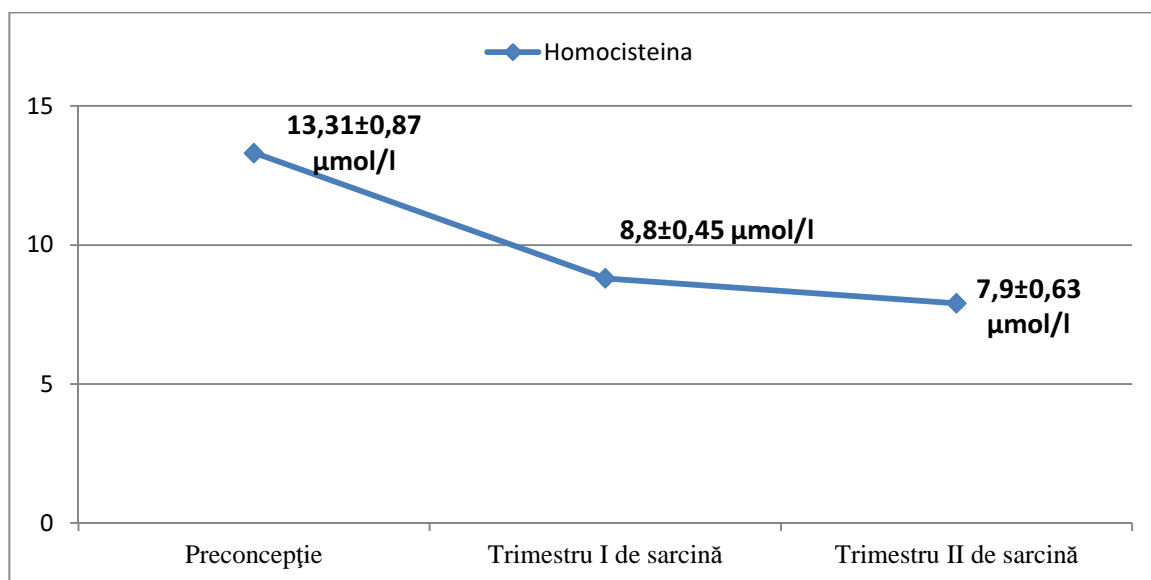


Figura 4.9. Dinamica valorilor medii ale homocisteinei serice totale.

Valorile medii ale homocisteinei serice totale au fost de 13,31 μmol/l înainte de tratament și au scăzut la 8,8±0,45 μmol/l în primul trimestru de sarcină, și la 7,9±0,63 μmol/l în al doilea trimestru de sarcină, diferența fiind semnificativă statistic ($p < 0.001$).

Evaluarea coagulostatului la femeia gravidă este extrem de importantă, cu atât mai mult la gravida care are și trombofilie asociată, pentru că sarcina în sine este un factor de risc suplimentar pentru accidentul trombotic.

Toate gravidele din studiul efectuat în această perioadă, au fost monitorizate din punct de vedere al statusului coagulant. Valorile medii ale parametrilor analizați: numărul de trombocite, fibrinogen, timpul de protrombină și APTT sunt expuse în tabelul 4.19.

Se atestă, că pe parcursul trimestrului I și II de sarcină valorile parametrilor hemostazei în urma tratamentului anticoagulant sunt normale față de limitele de referință. Însă, se observă o creștere a numărului de trombocite și nivelului plasmatic al fibrinogenului, deviația fiind semnificativă statistic ($p < 0.001$).

Aceste constatări corespund modificărilor adaptive ale hemostazei în timpul sarcinii.

Tabelul 4.19. Valorile medii ale parametrilor hemostazei în urma administrării tratamentului anticoagulant

Parametrul	Preconcepțional	Trimestru I de sarcină	Trimestru II de sarcină	t	p
Numărul de trombocite ($\times 10^9$ g/l)	281,4 \pm 4,59	336,3 \pm 4,27	331,2 \pm 3,9	8,272	<0.001
Fibrinogen (g/l)	3,13 \pm 0,09	3,4 \pm 0,13	3,6 \pm 0,18	11,750	<0.001
Timpul de protrombină (%)	84,21 \pm 0,99	82,32 \pm 0,97	85,29 \pm 0,78	0,857	>0.05
APTT (secunde)	33,87 \pm 0,29	33,94 \pm 0,21	34,21 \pm 0,19	1,0	>0.05

În cursul tratamentului nu au fost înregistrate accidente hemoragice, trombotice sau trombopenie.

În acest context, a fost argumentat rolul terapiei de corecție a metabolismului homocisteinei și terapiei anticoagulante cu viză profilactică la pacientele cu avort spontan recurent și dereglări ale metabolismului metioninei, prin obținerea unui scor de risc obstetrical ≥ 4 în 71,93 \pm 5,95%. Sarcina a survenit la 46 paciente (80,70 \pm 5,22%), s-a soldat cu avort spontan în 5,27 \pm 2,95%, iar în 75,43 \pm 5,70% sarcina a depășit termenul de 22 săptămâni de gestație

Aplicarea eficientă a stratificării riscului orientează decizia terapeutică, și pledează în favoarea unui abord profilactic și a unei conduite terapeutice adecvată preconcepțional și în timpul sarcinii. Utilizarea profilactică a tratamentului antitrombotic, justificată de un diagnostic corect, conduce spre rezultate obstetricale favorabile. Diagnosticul corect al riscului de tromboză, cu aplicarea tratamentului constituie, prin urmare, un factor de reducere a patologiei legate de sarcină, și anume avortului spontan recurent.

4.4. Concluzii la capitolul 4

1. Identificarea genotipurilor polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G, cu evaluarea ponderii alelelor la pacientele cu avort spontan recurent din studiu, a permis evidențierea: genotipurilor mutante 677CT și 677TT MTHFR în 64,92 \pm 6,32% cazuri, frecvența alelei mutante T - 0,39; genotipurilor mutante 1298AC și 1298CC MTHFR în 57,89 \pm 6,53%, frecvența alelei mutante C - 0,34; genotipurilor mutante 2756AG și 2756GG MTR în 33,33 \pm 6,24%, frecvența alelei mutante G - 0,19 și genotipurilor mutante 66AG și 66GG MTRR în 66,67 \pm 6,24%, frecvența alelei mutante G - 0,44.

2. Identificarea polimorfismelor genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G a permis estimarea riscului avortului spontan pentru fiecare polimorfism genetic în parte: RR pentru MTHFR C677T = 2,46, RR pentru MTHFR A1298C = 3,0, RR pentru MTR A2756G = 4,71 și RR pentru MTRR A66G = 4,72.
3. Genotiparea polimorfismelor MTHFR, MTR și MTRR a atestat prezența polimorfismelor la pacientele cu avort spontan recurent în 98,25±0,98%, iar asocieri de polimorfisme în 87,72±4,43% (p<0.001).
4. Pacientele cu avort spontan recurent care au fost heterozigote sau homozigote pentru alela mutantă pentru polimorfismele MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A66G și MTRR A2756G au prezentat valorile homocisteinei semnificativ mai mari decât pacientele din lotul martor. Incidența hiperhomocisteinемiei ($\geq 12 \mu\text{mol/L}$) a fost cea mai mare la pacientele cu avort spontan recurent cu genotipul 677TT MTHFR (22,35±2,59 $\mu\text{mol/L}$), urmată de genotipul 2756GG MTR (21,63±8,01 $\mu\text{mol/L}$), genotipul 66GG MTRR (14,30±2,21 $\mu\text{mol/L}$) și genotipul 1298CC MTHFR (12,12±1,69 $\mu\text{mol/L}$), pe fon de concentrații plasmatice relativ scăzute de folat seric și vitamina B₁₂.
5. Valoarea serică a homocisteinei a fost mai mare în cazul pacientelor cu avort spontan recurent cu polimorfisme asociate MTHFR, MTR și MTRR (13,78±0,97 $\mu\text{mol/l}$) comparativ cu pacientele cu un singur polimorfism detectat (9,83±1,26 $\mu\text{mol/l}$) (p <0.05).
6. Genotipurile homozigot mutante pentru cele patru polimorfisme: MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G au fost mai frecvent întâlnite în grupul pacientelor cu avort spontan recurent primar decât în lotul martor, excepție fiind genotipurile 677TT MTHFR și 66GG MTRR întâlnite exclusiv în grupul pacientelor cu avort spontan recurent primar.
7. Evaluarea relației dintre cele patru polimorfisme MTHFR, MTR și MTRR cu termenul la care s-a produs întreruperea spontană a sarcinii, atestă că pacientele cu avort spontan recurent cu genotip modificat hetrozigot pentru toate cele patru polimorfisme MTHFR, MTR și MTRR s-au întâlnit mai frecvent la pacientelor cu avort spontan precoce decât în la pacientelor cu avort spontan tardiv (p <0.001), excepție fiind genotipurile homozigot mutante pentru toate cele patru polimorfisme MTHFR, MTR și MTRR, care s-au întâlnit exclusiv la pacientelor cu avort spontan precoce (p <0.001). Pacientele cu avort spontan precoce prezintă hiperhomocisteinемie intermediară (13,61±0,87 $\mu\text{mol/l}$), în timp ce pacientele cu avort spontan tardiv au avut nivelul seric normal de homocisteină (9,14±1,62 $\mu\text{mol/l}$) (p <0.05).

8. Prezența hiperhomocisteinemiei, polimorfismelor genetice și aprecierea scorului de risc ≥ 4 în $71,93 \pm 5,95\%$, precum și identificarea corelațiilor de intensitate medie dintre homocisteină și parametrii hemostazei reprezintă o etapă esențială pentru stabilirea strategiei și a metodelor de tromboprofilaxie, și pledează în favoarea unui abord profilactic și a unei conduite terapeutice adecvată preconcepțional și în timpul sarcinii.

SINTEZA REZULTATELOR OBȚINUTE

Avortul spontan reprezintă cea mai comună complicație a sarcinii și cea mai frecventă cauză de sângerare în primul trimestru de sarcină [15]. În prezent, pierderea spontană a sarcinii este una dintre cele mai delicate probleme a obstetricii moderne.

Aproximativ 20% dintre sarcini se pierd spontan, riscul de avort fiind corelat cu vârsta gestațională, astfel: la 2 săptămâni de gestație riscul este de 75%, între 3-6 săptămâni de gestație riscul este de 10% și scade la 5% între 6-12 săptămâni de gestație, iar după primul trimestru de sarcină riscul independent calculat este de 1-3% [15; 22]. Astfel, aproximativ 80% din pierderile de sarcină survin în primul trimestru de gestație, incidența scăzând cu fiecare săptămână gestațională.

Avortul spontan, conform criteriilor OMS este definit ca pierderea sarcinii înainte de a 22-a săptămână de gestație. Acesta se stabilește prin expulsiunea produsului de concepție cu o greutate de 500 g sau mai puțin [6].

Avortul spontan recurent, la momentul actual, este definit ca pierderea a două sau mai multe sarcini consecutive și afectează aproximativ 1% dintre toate femeile, iar riscul de a pierde o altă sarcină după trei avorturi consecutive fiind de 55% [15]. Tot mai mulți autori au constatat, în baza datelor statistice, o majorare a incidenței avortului spontan recurent în ultimii ani, până la 2%, iar după unele surse chiar până la 5% [22]. De remarcat, că avortul spontan recurent constituie o problemă devastatoare reproductivă cu implicații majore psiho-sociale asupra cuplurilor și o experiență negativă pentru personalul medical.

Această problemă reproductivă complexă condiționează o abordare multidisciplinară în vederea evaluării factorilor etiologici și managementului terapeutic adecvat.

La baza avortului spontan recurent se pot afla un șir de factori medicali care pot fi grupați în genetici, anatomici, endocrini, infecțioși, imunologici și andrologici [15]. În pofida eforturilor cercetătorilor de a soluționa această problemă, mecanismele implicate în dezvoltarea pierderii spontane a sarcinii nu pot fi întotdeauna elucidate. Literatura de specialitate estimează că între 50-60% cazuri, cu tot setul investigațiilor de înaltă performanță, cauza nu poate fi precizată și avortul este declarat idiopatic.

Progresul tehnico-științific din ultimii ani a înlesnit remarcabil dezvoltarea, într-un ritm accelerat, a științei medicale. Astfel, avortul spontan recurent implică diverse ramuri de cercetare – de la ginecologie și obstetrică, la anatomie patologică, imunologie, genetică și cercetare fundamentală.

În ultimii 50 de ani s-a înregistrat un interes excepțional pentru diagnosticul trombofiliilor și profilaxia trombozelor în practica obstetricală, iar asocierea polimorfismelor

genetice implicate în procesul de coagulare reprezintă un important aspect în cercetarea medicală și un factor de risc sporit pentru manifestările clinice de trombofilie.

Trombofilia este definită ca o anomalie a coagulării care predispoze la formarea de tromboze intravasculare și caracterizează o serie de stări de hipercoagulabilitate [83; 100]. Ea reprezintă o afecțiune cu caracter heterogen, multifactorial, având cauze non-genetice și genetice [100; 102]. Manifestările clinice și gravitatea trombofiliei ereditare se corelează într-o manieră incomplet înțeleasă și cunoscută cu tipul și numărul mutațiilor genetice.

Natura ereditară a avortului spontan recurent este un moment acceptat și cunoscut, și multe cercetări cu substrat molecular-genetic au ca țintă acest domeniu de studiu. Cercetarea în domeniul geneticii etalează o nouă strategie în abordarea etiopatogenezei pierderii recurente a sarcinii.

Identificarea pacientelor cu risc crescut de a dezvolta avort spontan recurent reprezintă o prioritate și o necesitate, iar diagnosticul corect și precoce face parte din managementul integrat al pacientelor cu avort spontan recurent. În ultimii 10 ani, pe această temă, au fost evaluate peste 40 de polimorfisme genetice care, în anumite condiții determină dezvoltarea pierderilor reproductive. Detectarea mutațiilor este utilă și necesară pentru stabilirea diagnosticului etiologic, a riscului de recurență și tromboză în avortul spontan recurent. Mutația la nivelul factorului V Leiden și mutația G20210A a protrombinei sunt cele mai frecvent studiate și asociate cu avortul spontan recurent [83; 146]. Pe lângă acești factori trombofilici ereditari, polimorfismele C677T și A1298C ale genei MTHFR sunt considerate a altă cauză genetică implicate în apariția pierderilor spontane de sarcină [19; 142; 146]. Gena MTHFR, împreună cu genele MTR și MTRR contribuie la reglarea nivelului de homocisteină din organism, iar acidul folic și vitamina B₁₂ servesc în calitate de coenzime pentru aceste reacții.

Nivelul crescut al homocisteinei a fost asociat cu afectarea placentară, inclusiv avort spontan recurent [152].

În ultimii ani, există dovezi fundamentate științific privind rolul hiperhomocisteinemie, în patogeniza complicațiilor trombotice și afectării microvasculare în diferite boli, inclusiv și în practica obstetricală. Pentru prima dată, legătură între homocisteinurie și tulburările vasculare a fost formulată de Gibson și colab. în anul 1964. Mai târziu, în 1969, McCully și colab. au demonstrat legătură între nivelele ridicate de homocisteină în sânge și dezvoltarea timpurie a aterosclerozei [131]. Ulterior, mai multe studii au demonstrat rolul hiperhomocisteinemie în patogeniza infarctului miocardic și afecțiunile trombotice, dezvoltarea trombozelor venoase superficiale și profunde, boala Crohn, demența și mai ales boala Alzheimer, etc. Există dovezi că

niveluri crescute de homocisteina pot juca un rol important în dezvoltarea sindromului Down [152].

Până în prezent, implicarea homocisteinei în patologia obstetricală a fost dovedită în numeroase cercetări. Au fost descrise cazuri de pierderi recurente de sarcină, defecte de tub neural cum ar fi spina bifida și anencefalie, insuficiența placentară, restricția de creștere intrauterină a fătului, preeclampsie, decolarea prematură a placentei normal inserate [152; 156; 170; 181].

Analiza literaturii de specialitate, realizată în cadrul cercetării, a permis să identificăm date generale privind metabolismul și rolul metioninei, homocisteinei, acidului folic și vitaminei B₁₂, precum și variantele alelice ale genelor MTHFR, MTR și MTRR ce codifică enzimele implicate în metabolismul foliaților, homocisteinei și metioninei. S-au evidențiat mecanismele prin care homocisteina generează disfuncția endotelială și exercită acțiuni protrombogene, detaliind acele mecanisme care sunt cel mai bine evaluate și susținute experimental, până în acest moment.

S-a estimat conexiunea dintre hiperhomocisteinemie și patologia reproductivă. S-au adus dovezi privind valoarea predictivă a homocisteinei serice asupra evoluției avortului spontan recurent, defectului de tub neural, infertilității și eșecului FIV, preeclampsia, nașterea prematură, fapt ce consolidează, totodată, suportul patogenetic al stresului oxidativ, disfuncției endoteliale și efectul protrombotic al homocisteinei și polimorfismelor analizate.

Cercetările au demonstrat faptul că hiperhomocisteinemia reprezintă un marker al trombofiliilor ereditare. Nivelul seric al ei este supus reglementării enzimaticice ale genelor MTHFR, MTR, MTRR și CBS, însă, în același timp, legătura de interdependență cu acidul folic, vitamina B₁₂ și vitamina B₆ poate determina hiperhomocisteinemia dobândită.

Paralel cu cercetările care vizează rolul MTHFR în avortul spontan recurent, am remarcat că studiile care implică rolul polimorfismelor MTR A2756G și MTRR A66G în pierderea recurentă a sarcinii sunt insuficiente, iar părerea autorilor este neuniformă. În acest context, s-a încercat ca cercetarea actuală să identifice interacțiunea dintre trăsăturile genotipice și fenotipice ale metabolismului metioninei și impactul lor asupra etiopatogenezei avortului spontan recurent, regiune unde aceste variante genetice și parametri biochimici nu au fost investigați până în prezent. Prin intermediul mijloacelor statistice s-a stabilit legătura de cauzalitate între avortul spontan recurent și parametrii analizați. Acest lucru a permis elaborarea recomandărilor și calcularea scorului de risc necesar pentru o atitudine terapeutică adecvată pentru sarcina ulterioară.

În acest scop s-a realizat un studiu de cohortă care a inclus 57 de femei de vârstă reproductivă care prezentau în anamneză cel puțin 2 pierderi consecutive spontane de sarcină, calificate ca idiopatice în urma anamnezei, investigațiilor clinice și paraclinice. Lotul de control a fost constituit dintr-un număr similar de paciente fără pierderi spontane de sarcină, cu cel puțin o naștere la termen în antecedente.

Programul de examinare a inclus: anchetarea, dozarea serică a homocisteinei, acidului folic, vitaminei B₁₂, efectuarea testelor molecular-genetice pentru identificarea polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G, determinarea numărului de trombocite, concentrația fibrinogenului plasmatic, timpul de protrombină și APTT.

Homocisteina este metabolizată prin intermediul reacției de remetilare în metionină, cofactor în acest proces fiind vitamina B₁₂, iar acidul folic un cosubstrat esențial. Concentrația totală a homocisteinei reprezintă un indicator sensibil funcțional al deficitului de folat și vitamina B₁₂. În același timp, nivelul plasmatic al homocisteinei este influențat de interacțiunea factorilor genetici și de mediu. Studiile arată că starea vitaminelor B modifică relația dintre mutațiile MTHFR, MTR, MTRR și nivelul seric al homocisteinei

Aceste momente de conduită le-am utilizat în cadrul studiului de cohortă în scopul de a evalua dereglările metabolismului metioninei la pacientele cu avort spontan recurent, iar acțiunile sunt prezentate schematic în algoritmul de mai jos (Figura 5.1).

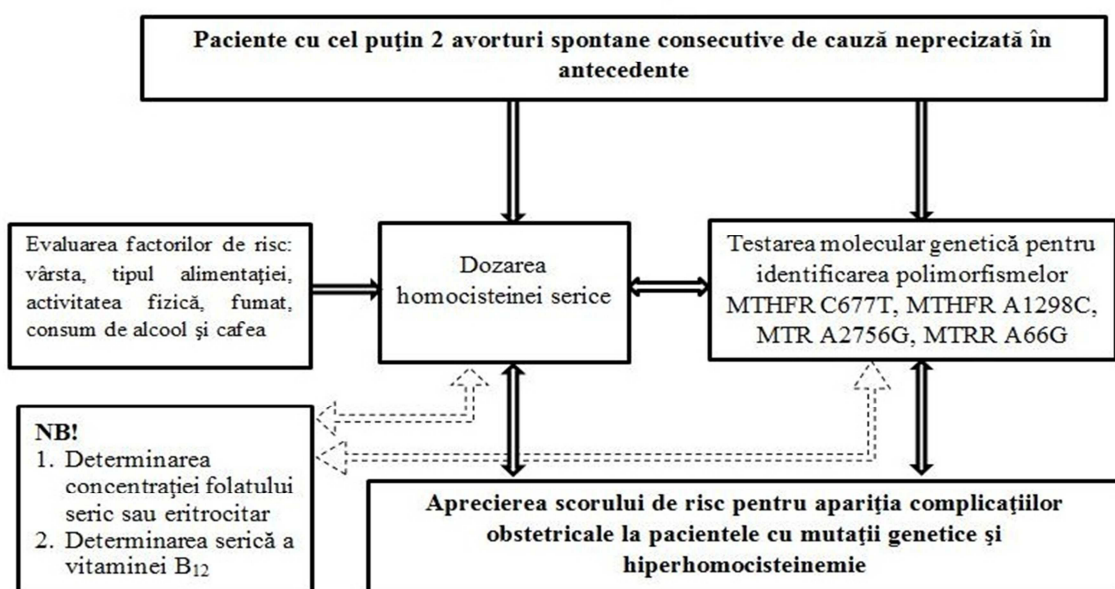


Fig. 5.1. Algoritmul evaluării dereglărilor metabolismului metioninei la femeile cu avort spontan recurent.

În funcție de tipul de avort spontan întâlnit, toate pacientele cu pierderea spontană a sarcinii (100,0%) au fost diagnosticate cu avort spontan recurent primar. Totodată, s-a constatat că în $87,72 \pm 4,34\%$ pacientele au prezentat avort spontan precoce pentru toate sarcinile în antecedente, în $10,53 \pm 4,06\%$ pacientele au fost diagnosticate atât cu avort spontan precoce, cât și cu avort spontan tardiv, și în $1,75 \pm 0,98\%$ – doar cu avort spontan tardiv în anamneză.

Rezultatele decelate pun în evidență o prevalență crescută a hiperhomocisteinemiei în rândul pacientelor cu pierderea recurentă de sarcină. Hiperhomocisteinemia s-a întâlnit în $52,64 \pm 6,61\%$ comparativ cu $5,26 \pm 2,95\%$ din lotul de control, diferența dintre cele două loturi de paciente fiind statistică înalt semnificativă ($p < 0.001$). În acest context a fost apreciat RR și s-a constatat că RR de avort spontan recurent în cazul pacientelor cu hiperhomocisteinemie are valoare de 10,4 cu \hat{I}_{95} 6,76-14,04. Astfel, pacientele cu hiperhomocisteinemie prezintă riscul de a dezvolta avort spontan recurent de 10,4 mai mare decât femeile din lotul de control (RR = 10,4).

Studiile epidemiologice au demonstrat că nivelul crescut de homocisteină inițiază o cascadă de complicații vasculare [85; 87; 89; 161; 162]. Luând în considerație că metabolismul homocisteinei în celulele endoteliale vasculare se bazează exclusiv pe reacția de remetilare a homocisteinei în metionină și lipsa degradării ireversibile a homocisteinei prin intermediul reacției de transsulfurare la acest nivel, determină, în caz de hiperhomocisteinemie, exportul extracelular al acestui metabolit toxic cu instalarea disfuncției endoteliale, lezarea endotelului, și inducerea unui mediu procoagulant prin activarea plachetară și inhibarea fibrinolizei [161; 162; 183]. Acumularea homocisteinei serice induce tromboza vaselor placentare, cu dezvoltarea și apariția necrozei fibrinoide, vasculitei, trombozei intraluminale ale arterelor spiralate placentare, astfel alterând dezvoltarea și funcționarea placentei, vascularizația acesteia. Din alt punct de vedere, sarcina, în mod fiziologic, se asociază cu o stare de hipercoagulabilitate, fiind un mecanism necesar pentru susținerea funcției placentare și prevenirea sângerării pe parcursul sarcinii și în perioada postpartum. Interacțiunea dintre aceste două stări poate influența în sens negativ procesul de dezvoltare a produsului de concepție.

Acidul folic și vitamina B₁₂ au o importanță vitală în diviziunea celulară, fiind furnizorii principali ai grupului de metil necesar pentru sinteza metioninei și derivatului său SAM, responsabil pentru sinteza acizilor nucleici. Rolul folaților și vitaminei B₁₂ în sănătatea reproductivă a femeii a fost descoperit de curând. Concentrații joase a vitaminei B₁₂ și acidului folic în plasma maternă au fost asociate cu creșterea homocisteinei serice totale și micșorarea raportului SAM:SAH la făt, ceea ce sugerează funcționarea defectuasă a procesului de metilare [197]. Un proces primordial în dezvoltarea fătului este proliferarea și diferențierea celulară

rapidă [166]. În urma sintezei acizilor nucleici, necesitatea în acid folic și vitamina B₁₂ se acutizează în timpul creșterii tisulare rapide, ceea ce necesită menținerea unor concentrații adecvate a acestor vitamine în plasma maternă.

Evaluarea concentrației de acid folic și vitamina B₁₂ la pacientele cu avort spontan recurent a permis identificarea în 15,79% (ÎÎ₉₅: 6,32-25,24) a deficitului de acid folic și în 14,04% (ÎÎ₉₅: 5,03-23,05) a deficitului de vitamina B₁₂.

Hiperhomocisteinemia este adesea asociată cu concentrații reduse de vitamine B și servește un indicator funcțional de deficit de acid folic și vitamina B₁₂ [82]. Efectul toxic al homocisteinei constă în acumularea SAH cu inhibarea reacțiilor de metilare și sinteza defectuoasă de ADN, reacții fundamentale pentru embrionul în curs de dezvoltare, efect dublat și de insuficiența acidului folic și vitaminei B₁₂ [166].

Concentrația serică crescută a homocisteinei la pacientele cu avort spontan recurent din studiu se corelează semnificativ cu valoarea plasmatică scăzută a folatului și vitaminei B₁₂. Astfel, valoarea medie a homocisteinei a constituit 17,75±1,07 μmol/l pe fon de concentrație joasă a folatului seric (9,88±1,02 nmol/L) și vitaminei B₁₂ (196,54±14,01 pmol/L) (p <0.001). În schimb, atunci când valoarea serică a acidului folic și vitaminei B₁₂ au depășit limita inferioară de referință (14,62±1,37 nmol/L și 279,36±27,35 pmol/L) nivelul homocisteinei serice totale a fost de 8,37±0,53 μmol/l. În acest context, este necesar de remarcat că hiperhomocisteinemia se asociază deficitului de folat și vitamina B₁₂.

La ora actuală, OMS recomandă utilizarea suplimentelor cu acid folic în doza de 400 μg/zi, atât în perioada preconcepțională, cât și pe parcursul întregii perioade de sarcină [199]. Am determinat că doar în 43,86±6,57% pacientele au administrat suplimente cu acid folic în perioada de concepție și în primul trimestru de sarcină, cu toate că majoritatea femeilor au menționat că și-au planificat sarcina. Iar în 56,14±6,57% s-a constatat utilizarea suplimentelor cu acid folic doar pe parcursul primelor 3 luni de graviditate. Luând în considerație interdependența dintre homocisteina serică și acidul folic, se impune organizarea programelor educaționale pentru conștientizarea impactului acidului folic asupra sarcinii, în special în rândul pacientelor cu avort spontan recurent în antecedente.

Luând în considerație că hiperhomocisteinemia poate fi dobândită și ereditară, au fost analizați factorii de risc care determină dezvoltarea hiperhomocisteiniei dobândite. Astfel, în cadrul cercetării, am constatat o corelație de intensitate puternică, directă între nivelul seric al homocisteinei și consumul de țigări (r = 0,98) în lotul pacientelor cu avort spontan recurent. Prezența corelațiilor pozitive, de intensitate medie dintre homocisteină cu IMC (r = 0,35) și cu consumul de țigări (r = 0,62), precum și identificarea corelației pozitive, dar de intensitate slabă

dintre homocisteină și gradul de activitate fizică ($r = 0,23$) evidențiază influența factorilor de risc dobândiți în dezvoltarea hiperhomocisteinemiei în grupul de control.

Mutațiile și polimorfismele genetice cresc probabilitatea de întrerupere a sarcinii până la 50% [84]. Stabilirea cât mai precoce a etiologiei pierderii recurente de sarcină este necesară pentru stabilirea unei strategii terapeutice adecvate în sarcina următoare. Explorarea molecular-genetică, o metodă modernă cu valoare incontestabilă, abordată din ce în ce mai frecvent în această entitate nosologică, oferă noi oportunități și date incontestabile privind diagnosticul defectelor trombofilice în avortul spontan recurent.

Studiul de față și-a propus examinarea profilului genotipic pentru polimorfismele MTHFR C677T, MTR A2756G, MTRR A66G implicate în ciclul metilării, spre o înțelegere mai bună a acestei patologii. Am investigat frecvența și incidența a patru polimorfisme: MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G în rândul pacientelor cu avorturi recurente, de origine idiopatică.

Cea mai mare pondere a fost înregistrată pentru genotipurile mutante A66G și G66G ale genei MTRR – $66,67 \pm 6,24\%$, total alele mutante 0,44. Genotipurile mutante C677T și T677T ale genei MTHFR au fost identificate în $64,92 \pm 6,32\%$, total alele mutante 0,39. Genotipurile mutante 1298AC și 1298CC ale genei MTHFR au fost apreciate în $57,89 \pm 6,53\%$, total alele mutante 0,34 și ponderea cea mai redusă a fost depistată pentru genotipurile mutante 2756AG și 2756GG MTR în $33,33 \pm 6,24\%$, total alele mutante 0,19. Rezultatele cercetării arată prevalența mai crescută a genotipurilor mutante în grupul pacientelor cu avort spontan recurent, diferența fiind semnificativă statistic ($p < 0,001$). Acest fapt subliniază asocierea avortului spontan recurent cu dereglările metabolismului metioninei la femeile cu avort spontan recurent din studiu.

Ținem să menționăm că rezultatele cercetării au evidențiat diferențe între nivelul homocisteinei serice totale în raport cu genotipurile analizate. Incidența hiperhomocisteinemiei ($\geq 12 \mu\text{mol/l}$) a fost cea mai mare la pacientele cu avort spontan recurent cu genotipul 677TT MTHFR ($22,35 \pm 2,59 \mu\text{mol/l}$), urmată de genotipul 2756GG MTR ($21,63 \pm 8,01 \mu\text{mol/l}$), genotipul 66GG MTRR ($14,30 \pm 2,24 \mu\text{mol/l}$) și genotipul 1298CC MTHFR ($12,12 \pm 1,69 \mu\text{mol/l}$).

Evaluarea folatului seric și vitaminei B₁₂ în raport cu genotipurile MTHFR, MTRR și MTR a constatat prezența valorilor semnificativ mai mici decât domeniul de normalitate pentru acidul folic și vitamina B₁₂ pentru statusul heterozigot și homozigot mutant al acestor mutații. Nivelul seric de acid folic ($6,90 \pm 0,42 \text{ nmol/L}$, $9,27 \pm 2,54 \text{ nmol/L}$) și vitamina B₁₂ ($185,14 \pm 15,01 \text{ pmol/L}$, $213,29 \pm 27,60 \text{ pmol/L}$) pun în evidență mutațiile homozigot mutante MTHFR T677T, MTRR G66G și MTR G2756G.

De asemenea, a fost evaluată concentrația serică a homocisteinei și rolul acidului folic și vitaminei B₁₂ în raport cu genotipurile polimorfismelor MTHFR C677T și MTR A2756G la pacientele cu avort spontan recurent, deoarece aceste vitamine servesc în calitate de cosubstrat în reacția de remetilare a homocisteinei în metionină.

Astfel, 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: 22,35±2,59 versus 13,70±1,82 μmol/l, p <0.05) când folatul seric a fost < 13,5 nmol/L, în timp ce această diferență nu se atestă când folatul seric este > 13,5 nmol/L la pacientele cu genotipurile CC și CT (valoarea medie a homocisteinei: 8,68±3,49 și 9,17±4,34 μmol/l, p <0.05). Creșterea nivelului plasmatic al homocisteinei la pacientele cu genotipul TT, din grupa cu folatul seric < 13,5 nmol/L, a fost însoțită de un nivel semnificativ mai scăzut de acid folic (6,90±0,42 nmol/L) comparativ cu genotipul CT (9,26±0,86 nmol/L) și genotipul CC (9,99±0,86 nmol/L) (p <0.05). Această diferență nu se observă la pacientele cu genotipurile CC și CT atunci când folatul seric a fost > 13,5 nmol/L (19,52±5,05 și 20,45±7,87 nmol/L) (p <0.001).

De asemenea s-a determinat influența genotipurilor mutante A2756G și G2756G ale genei MTR asupra nivelului seric al homocisteinei totale atunci când concentrația plasmatică a vitaminei B₁₂ a fost mai joasă de 259 pmol/L. Nivelul homocisteinei serice a depășit domeniul de normalitate în grupul pacientelor cu statutul seric al vitaminei B₁₂ < 259 pmol/L, astfel posesoarele genotipului homozigot mutant G2756G au înregistrat cel mai mare nivel de homocisteină (24,55±14,35 μmol/l) (p <0.001), urmate de pacientele cu genotipul heterozigot A2756G (15,85±1,84 μmol/l) (p <0.01) și genotipul homozigot normal A2756A (13,26±1,19 μmol/l) (p <0.05) pe fon de concentrații joase de vitamina B₁₂ (214,5±6,18 pmol/L, 185,70±8,57 pmol/L și 167,58±10,81 pmol/L). Această deosebire nu s-a atestat la pacientele cu genotipul homozigot normal A2756A (9,43±1,23 μmol/l) și heterozigot A2756G (8,52±1,46 μmol/l) (p <0.01) atunci când concentrația serică a vitaminei B₁₂ > 259 pmol/L (406,11±50,52 pmol/L și 411,25±37,53 pmol/L) (p <0.01). Putem menționa cu certitudine, influența genotipului GG al genei MTR asupra nivelului homocisteinei plasmatică (15,8 μmol/l) chiar și atunci când concentrația serică a vitaminei B₁₂ a depășit 259 pmol/L (314 pmol/L) (p <0.01).

A fost demonstrat că femeile de vârstă reproductivă, femeile cu antecedente obstetricale complicate (sarcina afectată de defect de tub neural, avort spontan recurent etc.) reprezintă un grup țintă cu risc crescut pentru deficiențe de folat sau vitamina B₁₂ [152], care la rândul său poate contribui la creșterea valorilor homocisteinei serice. În cadrul cercetării, pacientele cu avort spontan recurent primar și precoce au prezentat valori relativ scăzute de acid folic

(11,42±1,09 nmol/L și 11,93±0,88 nmol/L) și vitamina B₁₂ (228,93±19,25 pmol/L și 232,47±15,57 pmol/L), iar frecvența avortului spontan în antecedente a contribuit la epuizarea rezervelor de vitamine, astfel că valoarea serică a acidului folic (11,05±1,15 nmol/L) și vitaminei B₁₂ (223,96±23,40 pmol/L) în grupul pacientelor cu ≥ 3 pierderi spontane în anamneză a fost mai mică decât în grupul pacientelor cu 2 pierderi spontane în anamneză (12,70±1,23 nmol/L și 242,16±20,90 pmol/L), însă nesemnificativ statistic.

La nivel mondial, au fost adoptate și implementate diverse strategii pentru a reduce incidența defectului de tub neural prin suplimentarea cu fier și acid folic [198], dar prevalența ridicată de deficit și de epuizare a vitaminei B₁₂ în timpul sarcinii și copilărie, care conduce la creșterea riscului de defect de tub neural, greutate mică la naștere, imaturitate neurologică și un risc mai mare pentru dezvoltarea și apariția bolilor mai târziu în viață, a primit mai puțină atenție în agenda de politici a sistemului de sănătate.

La ora actuală, nu există ghiduri de practică pentru medicii obstetricieni-ginecologi și pediatri privind administrarea dozelor optime de vitamina B₁₂ în perioada preconcepțională, în sarcină și perioada postpartum. Cu toate acestea, definirea unei strategii adecvate pentru prevenirea deficienței vitaminei B₁₂ depinde, în mod critic, de rezultatele bazate pe dovezi științifice. Cele mai multe dintre studiile raportate indică o prevalență crescută de deficit de vitamina B₁₂ în rândul populației cu venituri mici și mijlocii. Iar studii clinice randomizate privind evaluarea rezultatelor suplimentării cu vitamina B₁₂ lipsesc [197].

Astfel, există o nevoie urgentă pentru a actualiza și a îmbogăți orientările actuale ale intervențiilor nutriționale privind rolul vitaminei B₁₂ și rolul acidului folic, la femeile de vârstă reproductivă, gestante și femeile care alăptează pentru a menținerea sarcinii, sănătății fătului și copilului.

În momentul de față, diagnosticul trombofiliilor ereditare în rândul pacientelor cu avort spontan recurent reprezintă un eveniment relativ sporadic. Cu toate acestea, însă, frecvența complicațiilor în cazul trombofiliilor (restricția de creștere intrauterină a fătului, pierderea recurentă a sarcinii, decolarea de placentă normal inserată, nașterea prematură etc.) consemnează o creștere semnificativă. Un alt aspect relevat de studiu a fost prezența exclusivă a genotipurilor homozigot mutante pentru toate cele patru polimorfisme analizate în grupul pacientelor cu avort spontan precoce ($p < 0.001$) și o frecvență relativ mai mare a genotipurilor homozigot mutante la pacientele cu avort spontan recurent primar decât la pacientele din lotul de control, excepție fiind genotipurile MTHFR T677T și MTRR G66G întâlnite doar în grupul pacientelor cu avort spontan recurent primar ($p < 0.001$). Valori ridicate de homocisteină s-au asociat cu avort spontan

recurent primar ($p < 0.001$), avort spontan precoce ($p < 0.05$) și cu frecvența avorturilor spontane în antecedente ($p < 0.05$).

Astfel, în urma acestui studiu, s-a reușit de a stabili o legătură, în conformitate cu studiile din literatura de specialitate [10; 84; 102; 104; 110; 111; 143; 172; 187], între pierderea recurentă spontană primară și precoce a sarcinii, polimorfismele genetice analizate, hiperhomocisteinemie și deficitul de acid folic și vitamina B₁₂.

Prezența polimorfismelor asociate ale genelor MTHFR, MTR și MTRR a permis aprecierea scorului de risc pentru apariția complicațiilor obstetricale la pacientele cu mutații genetice a enzimelor implicate în metabolismul homocisteinei și metioninei.

Deficiența enzimatică ca rezultat al mutațiilor genetice determină acumularea de homocisteină în circulație cu efect toxic vascular, cu risc crescut trombotic, inclusiv de tromboze placentare [136]. A fost cercetată valoarea scorului de risc obstetrical cu scop de evaluare a managementului terapeutic. A fost argumentat rolul terapiei de corecție a metabolismului homocisteinei și terapiei anticoagulante cu viză profilactică la pacientele cu avort spontan recurent și dereglări ale metabolismului metioninei, prin obținerea unui scor de risc obstetrical ≥ 4 în $71,93 \pm 5,95\%$. Sarcina a survenit la 46 paciente ($80,70 \pm 5,22\%$), s-a soldat cu avort spontan în $5,27 \pm 2,95\%$, iar în $75,43 \pm 5,70\%$ sarcina a depășit termenul de 22 săptămâni de gestație.

Problema științifică soluționată în teză constă în fundamentarea patogenetică a factorilor genetici și biochimici în dezvoltarea avortului spontan recurent, identificarea cărora contribuie la aprecierea riscului pentru apariția complicațiilor obstetricale la pacientele cu mutații genetice a enzimelor implicate în metabolismul homocisteinei și metioninei, și optimizarea managementului terapeutic, printr-o abordare individualizată.

Rezultatele acumulate în cercetarea actuală reprezintă o bază științifică pentru elaborarea recomandărilor pentru femeile cu avort spontan recurent în antecedente privind necesitatea dozării serice a homocisteinei și testarea polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G. În baza rezultatelor clinice și investigațiilor molecular-genetice, pacientele pot aprecia o clasificare a riscului și implementa recomandările pentru managementul terapeutic adecvat și individualizat.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Concluzii generale

1. În baza rezultatelor obținute am apreciat că femeile de vârstă reproductivă diagnosticate cu avort spontan recurent sunt consumatoare de cafea ($73,68 \pm 5,84\%$), fumătoare ($7,02 \pm 3,38\%$), prezintă regim alimentar tip omnivor, dar neechilibrat, cu un ritm alimentar inadecvat și consum redus de fructe și legume proaspete.
2. Rezultatele cercetării efectuate elucidează prezența valorilor patologice ale homocisteinei ($52,64 \pm 6,61\%$) și polimorfismelor genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G MTRR ($98,25 \pm 0,98\%$) semnificativ statistic la pacientele cu avort spontan recurent față de lotul martor ($p > 0.001$), și arată tendința de asociere a valorilor crescute ale homocisteinei ($RR=10,4$), genotipurilor mutante pentru polimorfismele MTHFR C677T ($RR=2,47$), MTHFR A1298C ($RR=3,0$), MTR A2756G ($RR=4,71$) și MTRR A66G ($RR=4,72$) cu pierderea recurentă spontană a sarcinii.
3. În urma studiului realizat s-a constatat că prezența hiperhomocisteinемiei la pacientele cu avort spontan recurent este influențată atât de factorul genetic, incidența fiind mai mare la pacientele cu genotipul 677TT MTHFR ($22,35 \pm 2,59 \mu\text{mol/L}$), urmată de 2756GG MTR ($21,63 \pm 8,01 \mu\text{mol/L}$), 66GG MTRR ($14,30 \pm 2,21 \mu\text{mol/L}$) și 1298CC MTHFR ($12,12 \pm 1,69 \mu\text{mol/L}$), cât și de concentrația folatului seric ($r = -0,40$) și vitaminei B₁₂ ($r = -0,28$).
4. Stratificarea riscului obstetrical la pacientele cu avort spontan recurent și dereglări ale metabolismului metioninei a pus în evidență că hiperhomocisteinemia, polimorfismele asociate și unice determină individualizarea conduitei obstetricale ulterioare.
5. În cercetarea actuală a fost argumentat rolul terapiei de corecție a metabolismului homocisteinei și terapiei anticoagulante cu viză profilactică la pacientele cu avort spontan recurent și dereglări ale metabolismului metioninei prin menținerea sarcinii și depășirea termenului de 22 săptămâni de gestație în $75,43 \pm 5,70\%$ cazuri.
6. Problema științifică soluționată în teză constă în aprecierea rolului factorilor genetici și biochimici în dezvoltarea avortului spontan recurent, identificarea cărora contribuie la aprecierea riscului pentru apariția complicațiilor obstetricale și optimizarea managementului terapeutic, printr-o abordare individualizată, la pacientele cu mutații genetice a enzimelor implicate în metabolismul homocisteinei și metioninei.

Recomandări

Pentru valorificarea unui management rațional și eficient de conduită al pacienților cu avort spontan recurent și dereglări ale metabolismului metioninei este necesar:

1. Implementarea în practica medicală a determinării valorii homocisteinei serice totale, ca analiză de uz curent pentru pacientele care prezintă cel puțin 2 avorturi spontane consecutive în antecedente.
2. Se recomandă testarea polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G la pacientele cu avort spontan recurent primar și precoce.
3. Se recomandă aprecierea scorului de risc obstetrical la pacientele cu mutații genetice a enzimelor implicate în metabolismul homocisteinei și metioninei în vederea alegerii unui management profilactic și terapeutic adecvat în perioada preconcepțională și în timpul sarcinii ulterioare.
4. Se recomandă administrarea acidului folic și terapiei anticoagulante cu viză profilactică la etapa preconcepțională și în sarcină la pacientele cu avort spontan recurent și dereglări ale metabolismului metioninei pentru evoluția ulterioară a sarcinii.

BIBLIOGRAFIE

Surse bibliografice în limba română

1. Anestiadi V ș. a. Unele aspecte în patogenia aterosclerozei. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale, 2005, nr. 2, p. 41 – 42.
2. Boiciuc K. ș. a. Trombofilia ereditară ca una din principalele cauze ale problemelor reproductive la femeile din Republica Moldova. În: Buletin de Perinatologie, 2015, nr. 1, p. 61 – 68.
3. Dutca G., Groppa S. Homocisteina – factor de risc în apariția accidentului vascular cerebral acut și corecția ei medicamentoasă. În: Analele Științifice ale USMF „N. Testemițanu”, 2008, nr. 3, p. 354 – 356.
4. Friptu V. ș. a. Acidul folic: influența asupra sarcinii și lactației. În: Buletin de Perinatologie, 2008, nr. 1, p. 57 – 59.
5. Gavrilă A. Evaluarea riscului tromboembolic și a particularităților anestezice la gravidele cu trombofilie ereditară. Autoref. tezei de dr. șt. Medicale. Craiova, 2012. 2 p., 3 p.
6. Ghidul A Național de Perinatologie. “Principii de organizare și acordare a asistenței perinatale”. Chișinău, 2006. 12 p.
7. 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.
8. Hoțoleanu C. ș. a. Noi factori de risc în trombozele venoase profunde. În: Clujul Medical, 2007, nr. 3, p. 578 – 582.
9. Hurjui L. et al. Impactul clinic al hiperhomocisteinемiei: rol, cauze, tratament. În: Clasic și modern în fiziopatologie. O abordare integrativă în educație și cercetare, 2015, p. 229 – 235.
10. 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.
11. Kozma K. et al. Factorii genetici ai trombofiliilor ereditare și implicarea lor în avortul spontan. În: Practica Medicală, 2015, vol. 10, nr. 2, p. 94 – 101.
12. Kozma K. Trombofilii ereditare – implicații în reproducerea umană. Autoref. tezei de dr. șt. medicale. Oradea, 2015. 6 p., 9 p.
13. Lățea L., Negrea Ș. Beneficiul tratamentului cu blocați ai receptorilor AT1 ai angiotensinei II, în disfuncția endotelială. În: Acta Medica Transilvanica, 2008, vol. 2, nr. 4, p. 44 – 46.

14. Mitran M. et al. Hipercoagulabilitatea în sarcină. Modificări adaptative și patologice. În: *Ginecologia+ro*, 2015, nr. 7, p. 20 – 25.
15. Moșin V. *Ginecologie Reproductivă*. Chișinău, 2010, 618p.
16. Moșin V. ș. a. Hiperhomocisteinemia și patologia reproductivă. În: *Buletin de Perinatologie*, 2014, nr. 1, p. 40 – 46.
17. Moșin V., Visternicean E. ș. a. Homocisteina și polimorfismele genei MTHFR la femeile cu avort spontan recurent. În: *Arta Medica*, 2017, nr. 1 (62), p. 24 – 27.
18. Moșin V., Visternicean E. Hiperhomocisteinemia și reproducerea umană. *Îndrumare metodică*. Chișinău, 2018. 15 p., 19p.
19. Neagoș D. ș. a. Polimorfismele C677T și A1298C ale genei metilentetrahidrofolat reductază la pacientele cu avorturi spontane în populația din România. În: *Revista Medicală Română*, 2012, nr. 4, p. 315 – 320.
20. Oncescu A. ș. a. Detecția mutațiilor trombofilice în boala abortivă recurentă. În: *Ginecologia+ro*, 2014, p. 2 – 6.
21. Opopol N., Obreja G., Ciobanu A. *Nutriția în sănătatea publică*. Chișinău: Casa editorial-poligrafică Bons Offices, 2006. 68 p., 84 p.
22. 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.
23. Popp R. *Aspecte genetice în cazul cuplurilor cu eșecuri reproductive*. Autoref. tezei de dr. șt. medicale. Cluj – Napoca, 2010. 3p., 4p.
24. Puia O., Pleșca-Manea L. Markeri biologici de diagnostic și prognostic în disfuncția endotelială premergătoare aterogenezei experimentale la iepure. În: *Clujul Medical*, 2011, vol. 84, nr. 3, p. 382 – 387.
25. Sacară V. ș. a. Frecvența variantelor alelei C677T în gena 5,10-metilentetrahidrofolatreductaza 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.
26. Sacară V. ș. a. Influența genelor ciclului folat asupra manifestărilor fenotipice în distrofia musculară Duchenne/Becker. În: *Buletin de Perinatologie*, 2009, nr. 2, p. 45 – 51.
27. Spinei L., Lozan O., Badan V. *Biostatistica*. Chișinău, 2009. 80p.
28. *Supliment la Ghidul C Național de Perinatologie (volumul 2) „Protocoale de îngrijire și tratament în obstetrică și neonatologie”*. Chișinău, 2005. 14p., 28p.

29. Ștefănescu C., Așchie M. Pierderea recurentă spontană a sarcinii – o analiză clinicohistologică. În: Revista Medicală Română, 2009, nr. 3, p. 203 – 207.
30. Visternicean E., Moșin V. ș. a. Implicațiile homocisteinei, vitaminelor grupului B și polimorfismul MTHFR C677T în avortul spontan recurent. În: Buletin de Perinatologie. 2017, 2 (74), p. 53 - 59.
31. Visternicean E., Moșin V. ș. a. Polimorfismele genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G și MTR A2756G la femeile cu avort spontan recurent. În: Buletin de Perinatologie. 2017, 2 (74), p. 36 - 42.
32. Visternicean E., Moșin V. Hiperhomocisteinemia ca factor potential de risc pentru patologia obstetricală: sinteză de literatură. În: Moldovan Journal of Health Sciences. Revista de Științe ale Sănătății din Moldova. 2017, 12 (2), p. 81 – 91.
33. Visternicean E., Moșin V. Rolul polimorfismelor genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G, MTRR A66G și homocisteinei în pierderea recurentă a sarcinii. În: Materialele Conferinței Științifice a Doctoranzilor „Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători” (cu participare internațională), ediția a VI-a, volumul 1, Universitatea Academiei de Științe a Moldovei. Chișinău, 15 iunie, 2017, p. 263 – 268. ISBN 978-9975-108-16-4.

Surse bibliografice în limba rusă

34. Баранова В. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. Санкт-Петербург: Н – Л, 2009. 288 p., 289 p.
35. Беспалова О. Генетика невынашивания беременности. În: Журналь акушерства и женскихъ болезней, 2007, nr. 1, p. 81 – 95.
36. Беспалова О. Генетические факторы риска невынашивания беременности. Autoref. tezei de dr. șt. medicale. Санкт-Петербург, 2009. 3p.
37. Блинецкая С.Л. Основные наследственные тромбофилии и их роль при привычном невынашивании беременности. În: АГ-инфо, 2013, n 1, p. 16 – 21.
38. Вайнер А. и соавт. Система фолатного обмена и врожденные пороки развития: эффект материнского генотипа. În: Мать и Дитя в Кузбасе, 2012, n 4, p. 7 – 12.
39. Весич Т., Таравнех Д. Роль тромбофилии в структуре этиопатогенеза женского бесплодия. În: Международный Медицинский Журнал, 2013, n 1, p. 78 – 81.
40. Гурьева В. и соавт. Течение и исходы беременности у женщин с гипергомоцистеинемией с различным началом фолатной терапии. În: Сибирский медицинский журнал, 2012, vol. 27, n 3, p. 86 – 90.

41. Добролюбов А. и соавт. Полиморфизмы генов фолатного обмена у женщин с привычной потерей беременности ранних сроков. *În: Вестник Новых Медицинских Технологий*, 2006, n 4, p. 60.
42. Доброхотова Ю. и соавт. Роль гемостазиологических нарушений в генезе невынашивания беременности (обзор литературы). *În: Проблемы Репродукции*, 2004, nr. 2, p. 52 – 58.
43. Зайнулина М. и соавт. Тромбофилия: этиологический фактор или патогенетический аспект осложненного течения беременности? *În: Журналь Акушерства и Женскихъ Болезней*, 2010, n 1, p. 18 – 30.
44. Зайнулина М. Пути снижения материнской и перинатальной смертности при нарушении системы гемостаза. *În: Медицинский Академический Журнал*, 2013, vol. 13, nr. 1, p. 73 – 82.
45. Кашежева А. Гипергомоцистеинемия — реальный источник тромбофилических нарушений при беременности, осложненной инсулин-независимым сахарным диабетом. *În: Тромбоз, гемостаз и реология*, 2005, vol. 4, p. 12 – 16.
46. Ковалева Ф. Клинико-патоморфологическое обоснование применения эфферентных методов лечения у пациенток с привычным невынашиванием беременности. *Teza de dr. şt. medicale*. Москва, 2016. 15p., 18p., 19p.
47. Коваленко К. Молекулярно-генетическая характеристика факторов цитокиновой системы при ранних эмбриональных потерях. *Teza de dr. şt. medicale*. Ростов-на-Дону, 2014. 33p., 34p., 35p., 36p., 37p., 38p.
48. Корнюшина Е. Клинико-патогенетическое обоснование применения курантила и фраксипарина у беременных с невынашиванием и тромбофилией. *Autoref. tezei de dr. şt. medicale*. Санкт-Петербург, 2011. 4p
49. Макацария А., Белобородова Е., Баймурадова С. Гипергомоцистеинемия и осложнения беременности. Москва: Триада-Х, 2005. 220p.
50. Малышева О и др. Невынашивание беременности и полиморфизм генов системы свертывания крови. *În: Журналь акушерства и женскихъ болезней*, 2007, nr. 1, p. 21 – 27.
51. Манухин И. и соавт. Роль гомоцистеина при синдроме потери плода. *În: Проблемы репродукции*, 2008, vol. 1, p. 105 – 109.
52. Машкина Е. Молекулярно-генетические предикторы репродуктивных потерь. *Teza de dr. şt. medicale*. Belgorod, 2014. 39p., 40p.

53. Миктадова А. и соавт. Полиморфизм генов фолатного цикла и предрасположенность к сердечно-сосудистым заболеваниям. *În: Главный Врач*, 2011, n 4, p. 16 – 18.
54. Плоцкий А. Роль гомоцистеина в генезе врожденных пороков развития плода. *În: Репродуктивное здоровье в Беларуси*, 2009, n 5, p. 58 – 65.
55. 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.
56. Россоха З. и соавт. Диагностика и лечение наследственной тромбофилии в акушерско-гинекологической практике. Обзор клинических рекомендаций и литературы. *În: Медицинские аспекты здоровья женщины*, 2014, n 6, p. 5 – 13.
57. Сидельникова В. Полиморфизм генов ферментов фолатного цикла. Принципы терапии. *În: Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*, 2009, nr. 6, p. 76 – 78.
58. Снежицкого В., Пырочкина В. Клинические аспекты гипергомоцистеинемии. Гродно: ГрГМУ, 2011. 188р.
59. Спиридонова М. и соавт. Молекулярно-генетический анализ полиморфных маркеров генов ответственных за функционирование факторов эндотелиальной системы в связи с осложненным протеканием беременности. *În: Медицинская Генетика*, 2007, vol. 6, n 7, p. 38 – 42.
60. Строзенко Л. Первичная тромбопрофилактика у подростков на основе выявления и модификации постоянных и временных факторов тромбогенного риска. *Teza de dr. şt. medicale*. Барнаул, 2014. 33р., 34р.
61. Тверская А. Изучение роли генов – кандитатов фолатного обмена в формировании преэклампсии. *Teza de dr. şt. medicale*. Belgorod, 2014. 19р., 23р.
62. Тишкова О. Клинико-диагностическое и прогностическое значение маркеров биологических жидкостей при неразвивающейся беременности. *Teza de dr. şt. medicale*. Волгоград, 2014. 19р.
63. Трифонова Е. и соавт. Молекулярно-генетический анализ факторов наследственной тромбофилии при гестозе. *În: Сибирский медицинский журнал*, 2010, vol. 25, n 4, p. 34 – 36.
64. Фетисова И. и соавт. Полиморфизм генов фолатного обмена и болезни человека. *În: Вестник Новых Медицинских Технологий*, 2007, vol. 10, n 1, p. 23 – 28.

Surse bibliografice în limba engleză

65. Alan L. et al. Homocysteine metabolism: nutritional modulation and impact on health and disease. *În: Alternative Medicine Review*, 1997, nr. 4, p. 234 – 254.

66. Alan L. et al. Methionine and homocysteine metabolism and the nutritional prevention of certain birth defects and complications of pregnancy. *În: Alternative Medicine Review*, 1996, nr. 4, p. 220 – 235.
67. Allen L. Causes of vitamin B₁₂ and folate deficiency. *În: Food and Nutrition Bulletin*, 2008, nr. 2 (supplement), p. S20 – S34.
68. Andresson A. et al. Decreased serum homocysteine in pregnancy. *În: Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem*, 1992, vol. 30, p. 377 – 379.
69. Antoniadou C. et al. Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate fortification to the recent clinical trials. *În: European Heart Journal*, 2009, vol. 30, p. 6 – 15.
70. Asutosh P. et al. Evaluation of serum homocysteine as an independent risk factor for myocardial infarction in young patients. *În: National journal of medical research*, 2012; vol. 4, nr. 2, p. 423 – 426.
71. Austin R., Lentz S., Werstuck G. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *În: Cell Death and Differentiation*, 2004, vol. 11, p. S56 – S64.
72. Bailey R. et al. Total folate and folic acid intake from foods and dietary supplements in the United States: 2003–2006. *În: American Journal of Clinical Nutrition*, 2010, vol. 91, p. 231 – 237.
73. Barbosa P. et al. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women. *În: European Journal of Clinical Nutrition*, 2008, vol. 62, p. 1010 – 1021.
74. Bennett M. Vitamin B₁₂ deficiency, infertility and recurrent fetal loss. *În: The journal of reproductive medicine*, 2001, vol. 46, nr. 3, p. 209 – 212.
75. 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.
76. Boas W. et al. Metabolism and gene polymorphisms of the folate pathway in Brazilian women with history of recurrent abortion. *În: Revista brasileira de ginecologia e obstetrica*, 2015, vol. 37, nr. 2, p. 71 – 76.
77. Calejjon G. et al. Genotypes of the C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as a cause of human spontaneous embryo loss. *În: Human Reproduction*, 2007, vol. 22, nr. 12, p. 3249–3254.

78. 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.
79. Carmel R. Current concepts of cobalamin deficiency. *În: Annual Reviews Medicine*, 2000; nr. 51, p. 357 – 375.
80. Cattaneo M., Lussana F. Hyperhomocysteinemia and cardiovascular aging. *În: Cell Aging and Gerontology*, 2002, vol. 11, p. 309 – 335.
81. Chen N. et al. Regulation of homocysteine metabolism and methylation in human and mouse tissues. *În: The FASEB Journal*, 2010, vol. 24, p. 2804 – 2817.
82. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *În: Food and Nutrition Bulletin*, 2008, nr. 2 (supplement), p. S238 – S244.
83. Coulam C. et al. Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage. *În: American journal of reproductive immunology*, 2006, vol. 55, nr. 5, p. 360 – 368.
84. 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.
85. Den Heijer M. et al. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. *În: Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2000, vol. 3, nr. 2, p. 292 – 299.
86. Di Simone. et al. Effect of folic acid on homocysteine-induced trophoblast apoptosis. *În: Molecular Human Reproduction*, 2004, vol. 10, nr. 9, p. 665 – 669.
87. 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.
88. 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.
89. Durand P. et al. Impaired Homocysteine Metabolism and Atherothrombotic Disease. *În: Laboratory Investigation*, 2001, nr..5, p. 645 – 672.
90. Eldibany M., Caprini J. Hyperhomocysteinemia and Thrombosis. *În: Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2007, vol. 131, p. 872 – 884.

91. 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.
92. Finkelstein J. The metabolism of homocysteine: pathways and regulations. *În: European journal of pediatrics*, 1998, nr. 157 (supplement 2), p. S40 – S44.
93. 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.
94. Fredriksen A. et al. Largescale population-based metabolic phenotyping of thirteen genetic polymorphisms related to one-carbon metabolism. *În: Human Mutation*, 2007; vol. 28, nr. 9, p. 856 – 865.
95. 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.
96. 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.
97. Furness D. et al. One-carbon metabolism enzyme polymorphisms and uteroplacental insufficiency. *În: American journal of obstetrics and gynecology*, 2008, vol. 199, nr. 3, p. 2761 – 2768.
98. 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.
99. Gerdes V. et al. Homocysteine and markers of coagulation and endothelial cell activation. *În: Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2003, vol. 2, p. 445 – 451.
100. Goodman C. et al. Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *În: American journal of reproductive immunology*, 2006, vol. 56, nr. 4, p. 230 – 236.
101. Green R. Indicators for assessing folate and vitamin B₁₂ status and for monitoring the efficacy of intervention strategies. *În: Food and Nutrition Bulletin*, 2008, nr. 2 (supplement), p. S52 – S63.
102. Gris J. et al. Antiphospholipid/antiprotein antibodies, hemostasis-related autoantibodies, and plasma homocysteine as risk factors for a first early pregnancy loss: a matched case-control study. *În: Blood*, 2003, vol. 10, p. 3502 – 3513.

103. Williams T. Homocysteine – A Risk Factor for Vascular Diseases: Guidelines for the Clinical Practice. *In: The Journal of the American Nutraceutical Association*, 2004, vol. 7, 10 – 24.
104. Hague W. Homocysteine and pregnancy. *In: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 2003, vol. 17, nr. 3, p. 459 – 469.
105. Harpel P. et al. Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis. *In: The journal of nutrition*, 1996, Supplement, 1285S – 1289S.
106. Hart S. et al. Effect of methionine loading on pulse wave analysis in elderly volunteers. *In: Postgraduate Medical Journal*, 2006, vol. 82, p. 524–527.
107. Herrmann W., Obeid R. Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases. *In: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2011, vol. 49, nr. 3, p. 435 – 441.
108. Hickey S. et al. ACMG Practice Guideline: lack of evidence for MTHFR polymorphism testing. *In: Genetics in medicine*, 2013, vol. 15, nr. 2, p. 153 – 156.
109. Hobbs C. et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *In: American Journal of Human Genetics*, 2000, vol. 67, p. 623 – 630.
110. Holmes Z. et al. The C677T MTHFR gene mutation is not predictive of risk for recurrent fetal loss. *In: British Journal of Haematology*, 1999, vol. 105, p. 98 – 101.
111. Hübner U. et al. Low serum vitamin B12 is associated with recurrent pregnancy loss in Syrian women. *In: Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2008, vol. 46, nr. 9, p. 1265 – 1269.
112. Jacobsen W. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *In: Clinical Chemistry*, 1998, vol. 44, nr. 8(B), p. 1833–1843.
113. Jacques P. et al. Relation Between Folate Status, a Common Mutation in Methylene tetrahydrofolate Reductase, and Plasma Homocysteine Concentrations. *In: Circulation*, 1996, vol. 93, nr. 1, p. 7 – 9.
114. Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *In: Journal of physiology and pharmacology*, 2008, vol. 59, supplement 9, p. 155 – 167.
115. Kazerooni T et al. Correlation between thrombophilia and recurrent pregnancy loss in patients with polycystic ovary syndrome: A comparative study. *In: Journal of the Chinese Medical Association*, 2013, vol. 76, p. 282 – 288.
116. Key N., McGlennen R. Hyperhomocyst(e)inemia and Thrombophilia. *In: Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2002, vol. 126, p. 1367 – 1375.

117. Khaleghparast A. et al. Polymorphism of the Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene and Abortion. *In: Iranian Journal of Neonatology*, 2014, vol. 5, nr. 2, p. 7 – 11.
118. Kim K. et al. Effects of the interaction between the C677T 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism and serum B vitamins on homocysteine levels in pregnant women. *In: European Journal of Clinical Nutrition*, 2004, vol. 58, p. 10 – 16.
119. Klai S. et al. Association of MTHFR A1298C polymorphism (but not of MTHFR C677T) with elevated homocysteine levels and placental vasculopathies. *In: Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 2011, vol. 22, nr. 5, p. 374 – 378.
120. Klee G. Cobalamin and Folate Evaluation: Measurement of Methylmalonic Acid and Homocysteine vs Vitamin B₁₂ and Folate. *In: Clinical Chemistry*, 2000, vol. 46, nr. 8, p. 1277 – 1283.
121. Kramer M. et al. Vasculopathic and thrombophilic risk factors for spontaneous preterm birth. *In: International Journal of Epidemiology*, 2009, vol. 38, p. 715 – 723.
122. Kumar K. et al. Plasma homocysteine levels correlated to interactions between folate status and methylene tetrahydrofolate reductase gene mutation in women with unexplained recurrent pregnancy loss. *In: Journal of obstetrics and gynaecology: the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, 2003, vol. 23, p. 55 – 58.
123. Langan R. et al. Update on Vitamin B₁₂ Deficiency. *In: American Family Physician*, vol. 83, 2011, nr. 12, p. 1425 – 1430.
124. Li W. et al. Homocysteine metabolism gene polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) jointly elevate the risk of folate deficiency. *In: Nutrients*, 2015, nr. 7, p. 6770 – 6687.
125. Lockwood C. Inherited Thrombophilias in Pregnant Patients: Detection and Treatment Paradigm. *In: Obstetrics & Gynecology*, 2002, vol. 99, nr. 2, p. 333 – 341.
126. López-Quesada E. et al. Plasma total homocysteine in uncomplicated pregnancy and in preeclampsia. *In: European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Medicine*, 2003, vol. 108, nr. 1, p. 45 – 49.
127. Maira A. et al. Vitamin B12 Metabolism during Pregnancy and in Embryonic Mouse Models. *In: Nutrients*, 2013, n 5, p. 3531 – 3550.
128. Malinowska J. et al. Comparison of the effect of homocysteine in the reduced form, its thiolactone and protein homocysteinylation on hemostatic properties of plasma. *In: Thrombosis Research*, 2011, vol. 127, p. 214 – 219.

129. Mamedalieva N. et al. The role of polymorphisms in genes of folate metabolism and hyperhomocysteinemia in realization of missed abortion in the 1st trimester. *În: Medical and Health Science Journal*, 2011, vol. 6, p. 17 – 22.
130. Mayor – Olea et al. Human genetic selection on the MTHFR 677C>T polymorphism. *În: BMC Medical Genetics*, 2008, vol. 9:104 <http://www.biomedcentral.com/1471-2350/9/104>
131. McCully K. The Biomedical Significance of Homocysteine. *În: Journal of Scientific Exploration*, 2001, vol. 15, nr. 1, p. 5 – 20.
132. 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.
133. Matthews R. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthetase: biochemistry and molecular biology. *În: European journal of pediatrics*, 1998, supplement 2, p. S54 – S59.
134. 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.
135. Micle O. et al. The influence of homocysteine and oxidative stress on pregnancy outcome. *În: Journal of Medicine and Life*, 2012, vol. 1, p. 68 – 73.
136. Mohamed M. et al. Hyperhomocysteinemia and Thrombosis: An Overview. *În: Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2007, nr. 6, p. 872 – 884.
137. 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.
138. Montgomery G. et al. Dizygotic twinning is not associated with methylenetetrahydrofolate reductase haplotypes. *În: Human Reproduction*, 2003, vol. 18, nr. 11, p. 2460 – 2464.
139. 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.
140. Muthayya S. et al. Low maternal vitamin B₁₂ status is associated with intrauterine growth retardation in urban South Indians. *În: European Journal of Clinical Nutrition*, 2006, vol. 60, p. 791 – 801.
141. Nair R. et al. Association of maternal and fetal MTHFR A1298C polymorphism with the risk of pregnancy loss: a study of an Indian population and a meta-analysis. *În: Fertility and sterility*, 2013, vol. 99, nr. 5, p. 1311 – 1318.

142. Nelen W. et al. Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. În: *Obstetrics and Gynecology*, 2000, vol. 95, p. 519 – 524.
143. Nelen W. et al. Maternal homocysteine and chorionic vascularization in recurrent early pregnancy loss. În: *Human Reproduction*, 2000, vol. 15, nr. 4, p. 954 – 960.
144. Patel A. et al. Effect of Homocysteine ,Vitamin B12 , Folic acid during pregnancy. În: *NHL Journal of Medical Sciences*, 2012, vol. 1, nr. 1, p. 27 – 31.
145. Picciano M. Is homocysteine a biomarker for identifying women at risk of complications and adverse pregnancy outcomes? În: *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, vol. 71, p. 857 – 858.
146. Pihusch R. et al. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. În: *American journal of reproductive immunology*, 2001, vol 46, nr. 2, p. 124 – 131.
147. Popp R. et al. Methionine synthase reductase (MTRR) gene 66G>A polymorphism as a possible risk factor for recurrent spontaneous abortion. În: *Annals of RSCB*, 2009, vol. XIV, nr. 1, p. 28 – 32.
148. Postea O. Influence of homocysteine on the interaction between circulating monocytes and endothelial cells. Teza de dr. șt. Medicale. București, 2005. 12 p., 13 p., 17 p., 18 p., 19 p., 21 p.
149. Puri M. et al. MTHFR C677T polymorphism, folate, vitamin B12 and homocysteine in recurrent pregnancy losses: a case control study among North Indian women. În: *Journal of Perinatal Medicine*, 2013, vol. 41, nr. 5, p 549 – 554.
150. Quere I. et al. Homocysteine and venous thrombosis. În: *Seminars in vascular medicine*, 2005, vol. 5, nr. 2, p. 183 – 189.
151. Rasmussen K., Moller J. Total homocysteine measurement in clinical practice. În: *Annals of Clinical Biochemistry*, 2000, vol. 37, p. 627 – 648.
152. Refsum H. et al. Facts and Recommendations about Total Homocysteine Determinations: An Expert Opinion. În: *Clinical Chemistry*, 2004, vol. 50, nr. 1, p. 3 – 32.
153. Refsum H. et al. Homocysteine and cardiovascular disease. În: *Annual Reviews Medicine*, 1998, nr. 49, p. 31 – 62.
154. Refsum H. ș. a. The Hordaland Homocysteine Study: A Community-Based Study of Homocysteine, Its Determinants, and Associations with Disease. În: *JN The Journal of Nutrition*, 2006, Supplement, p. 1731S – 1740S.

155. Rocha M. Crossroads of homocysteine, nitric oxide and asymmetric dimethylarginine metabolisms. Involvement of S-adenosylhomocysteine and impaired cellular methylation. Teza de dr. șt. Medicale, Lisbon 2012. 23 p., 24 p., 25 p., 26 p., 27 p.
156. Ronnenberg A. et al. Preconception homocysteine and B vitamin status and birth outcomes in Chinese women. În: American Journal of Clinical Nutrition, 2002, nr. 76, p. 1385 – 1391.
157. Selhub J. Public health significance of elevated homocysteine. În: Food and Nutrition Bulletin, 2008, nr. 2 (supplement), p. S116 – S125.
158. Shane B. Folate and vitamin B₁₂ metabolism: Overview and interaction with riboflavin, vitamin B₆, and polymorphisms. În: Food and Nutrition Bulletin, 2008, nr. 2 (supplement), p. S5 – S16.
159. Sikora J. et al. Homocysteine, folic acid and vitamin B₁₂ concentration in patients with recurrent miscarriages. În: Neuro Endocrinology Letters., 2007, vol. 28, nr. 4, p. 507 – 512.
160. Snow C. Laboratory diagnosis of vitamin B₁₂ and folate deficiency. A guide for the primary care physician. În: ARCH Internal medicine, 1999, vol. 159, p. 1289 – 1298.
161. Stanger O. et al. Clinical use and rational management of homocysteine, folic acid, and B vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases. În: Zeitschrift für Kardiologie, 2004, vol. 93, p. 439 – 453.
162. Steed M., Tyagi S. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia. În: Antioxidants & Redox Signaling, 2011, vol. 15, nr. 7, p. 1927 – 1943.
163. Steegers-Theunissen R., Steegers E. Nutrient–gene interactions in early pregnancy: A vascular hypothesis. În: European journal of obstetrics, gynecology and reproductive biology, 2003, nr. 106, p. 115 –117.
164. Stephenson M. Management of recurrent early pregnancy loss. În: The Journal of reproductive medicine, 2006, nr. 51, p. 303 – 310.
165. 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.
166. Tamura T., Picciano M. Folate in human reproduction. În: American Journal of Clinical Nutrition, 2006, vol. 83, nr. 5, p. 993 – 1016.
167. 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.

168. Twigt J. Preconception nutrition and the microenvironment of the human oocyte. Proteomic and epidemiologic studies on IVF/ICSI treatment outcomes. Teza de dr. șt. medicale. Rotterdam, 2013. 17p., 19p.
169. Ubeda N. et al. Physiologic changes in homocysteine metabolism in pregnancy: A longitudinal study in Spain. În: Nutrition, 2011, vol. 27, p. 925–930.
170. Ueland P., Vollset S. Homocysteine and Folate in Pregnancy. În: Clinical Chemistry, 2004, nr. 8, p. 1293 – 1295.
171. Undas A. et al. Plasma Homocysteine Affects Fibrin Clot Permeability and Resistance to Lysis in Human Subjects. În: Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2006, vol. 26, p. 1397 – 1404.
172. Unfried G. et al. The C677T Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and Idiopathic Recurrent Miscarriage. În: Obstetrics and gynecology, 2002, vol. 99, nr. 4, p. 614 – 619.
173. Vaughn J. et al. Methionine synthase reductase 66A→G polymorphism is associated with increased plasma homocysteine concentration when combined with the homozygous methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T variant. În: The Journal of nutrition, 2004, vol. 134, p. 2985 – 2990.
174. Vettriselvi V. A study on genetic polymorphisms associated with unexplained recurrent pregnancy loss in south indian population. Teza de dr. șt. biomedicale, Chennai, 2008. 11p., 12p., 40p., 41p.
175. Virtanen J. Homocysteine, Folate and Cardiovascular Diseases. Teza de dr. șt. medicale, Kuopio 2005. 17p., 18p., 19p., 20p., 22p., 23p., 25p., 26p., 27p.
176. Visternicean E. Homocysteine and recurrent miscarriage. În: Curierul medical, 2017, vol. 60, nr. 1, p. 15 – 19.
177. Visternicean E. The role of homocysteine in endothelial dysfunction. În: Curierul medical, 2017, vol. 61, nr. 2 (60), p. 35 – 40.
178. Visternicean E., Moshin V. Implications of MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G and MTR A2756G polymorphisms, folate, vitamin B₁₂ and homocysteine in recurrent pregnancy losses. În: Medial, 2017, vol. 19, nr. 1 în care au fost publicate rezumatele Conferinței Internaționale «СОВРЕМЕННОЕ РЕШЕНИЕ АКТУАЛЬНЫХ НАУЧНЫХ ПРОБЛЕМ МЕДИЦИНЫ», ediția a 14-a, Niznij Novgorod, 15 – 16 martie, 2017, p. 50 – 51. ISSN 2225-0026.
179. Visternicean E., Moshin V. Prevalence of hyperhomocysteinemia and MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTRR A66G, MTR A2756G polymorphisms and their relation with

- recurrent pregnancy loss. În care au fost publicate rezumatele Conferinței Internaționale «Актуальные Вопросы Медицины», ediția a 6-a. În: Conference Abstractbook. Azerbaijan, Baku, May 10-11, 2017, p. 57 – 58.
180. Visternicean E. The role of folic acid and vitamin B₁₂ in genetic disorders of homocysteine metabolism in women with recurrent pregnancy loss. În care au fost publicate rezumatele Conferinței Internaționale «Актуальные Вопросы Медицины», ediția a 6-a. În: Conference Abstractbook. Azerbaijan, Baku, May 10-11, 2017, p. 55 – 56.
181. 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.
182. Wallace J. et al. Homocysteine concentration, related B vitamins, and betaine in pregnant women recruited to the Seychelles Child Development Study. În: The American Journal of Clinical Nutrition, 2008, vol. 87, nr. 2, p. 391 – 397.
183. Weiss N. Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. În: Current Drug Metabolism, 2005, nr. 6, p. 27 – 36.
184. Welch G., Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. În: The New England Journal of Medicine, 1998, vol. 338, nr. 15, p. 1042 – 1050.
185. Wu J. Circulating Homocysteine Is An Inflammation Marker And A Risk Factor of Life-Threatening Inflammatory Diseases. În: International Journal of Biomedical Laboratory Science, 2007, vol. 19, nr. 4, p. 107 – 112.
186. Yang K. et al. The role of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on the peripheral blood natural killer cell proportion in women with unexplained recurrent miscarriages. În: Clinical and Experimental Reproductive Medicine, 2011, vol. 38, nr. 3, p. 168 – 173.
187. Yunlei C. et al. Association study between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and unexplained recurrent pregnancy loss: A meta-analysis. În: Gene, 2013, vol. 514, nr. 2, p. 105 – 111.
188. Zetterberg H. et al. Gene±gene interaction between fetal MTHFR 677C>T and transcobalamin 776C>G polymorphisms in human spontaneous abortion. În: Human Reproduction, 2003, vol. 18, nr. 9, p. 1948 – 1950.
189. 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.

Surse bibliografice electronice

190. Banca de date statistice Moldova. Întreruperi de sarcină, 1995 – 2015. http://statbank.statistica.md/pxweb/pxweb/ro/30%20Statistica%20sociala/30%20Statistica%20sociala__08%20SAN__SAN040/SAN040100.px/table/tableViewLayout1/?rxid=9a62a0d7-86c4-45da-b7e4-fecc26003802 (vizitat 14.11.2016)
191. Banca de date statistice Moldova. Întreruperi de sarcină, 1995 – 2016. http://statbank.statistica.md/pxweb/pxweb/ro/30%20Statistica%20sociala/30%20Statistica%20sociala__08%20SAN__SAN040/SAN040100.px/table/tableViewLayout1/?rxid=9a62a0d7-86c4-45da-b7e4-fecc26003802 (vizitat 14.11.2016)
192. 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. <http://www.thrombosisjournal.com/content/5/1/17> (vizitat 05.04.2015)
193. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (Scientific Opinion on Dietary Reference Values for folate). În: *EFSA Journal* 2014;12(11):3893. www.efsa.europa.eu/efsajournal (vizitat 07.05.2015)
194. Kupfermink M. Thrombophilia and pregnancy. În: *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003, n 1:111. <http://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-1-111> (vizitat 12.05.2016)
195. OpenEpi 2.3.1 – Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, <http://www.openepi.com> (vizitat 16.11.2016)
196. Sengpiel V. et al. Folic acid supplementation, dietary folate intake during pregnancy and risk for spontaneous preterm delivery: a prospective observational cohort study. În: *BMC Pregnancy and Childbirth*, 2014, vol. 14:375. <http://www.biomedcentral.com/1471-2393/14/375> (vizitat 18.06.2016)
197. Siddiqua T. ș. a. Vitamin B₁₂ Deficiency in Pregnancy and Lactation: Is there a Need for Pre and Post-natal Supplementation? *J Nutr Disorders Ther* 4: 142. doi:10.4172/2161-0509.1000142 (27.08.2016)
198. WHO. Serum and red blood cell folate concentrations for assessing folate status in populations. Vitamin and Mineral Nutrition Information System. Geneva, World Health Organization, 2012. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75584/1/WHO_NMH_NHD_EPG_12.1_eng.pdf (vizitat 31.10.2016)
199. 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)

200. Zetterberg H. Metylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. În: *Reproductive Biology and Endocrinology* 2004, 2:7. <http://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-2-7> (vizitat 15.08.2016)

ANEXE

Anexa 1.

Formular de anchetă

Cod de identificare chestionar

Nr.	Compartiment		Cod răspuns
1	Date personale		
1.1	Vârsta ani	20 – 24 ani 1 25 – 29 ani 2 30 – 34 ani 3 35 – 39 ani 4 40 – 45 ani 5
1.2	Mediu de trai	urban	1
		rural	2
1.3	Starea civilă	căsătorie înregistrată	1
		căsătorie neînregistrată	2
		necăsătorită	3
1.4	Studii	superioare	1
		superioare incomplete	2
		medii	3
		liceale	4
1.5	Locul de muncă	Funcționară	1
		Muncitoare	2
		Casnică	3
1.6	Masa kg	IMC (indicele de masă corporală)
			subponderal 1 normoponderal 2
1.7	Talia m	supraponderal 3 obezitate 4
1.8	Fumat	Da	1
		Nu	2
1.8.1	Numărul de țigărete fumate pe zi	1 – 9 țigări/zi	1
		10 – 19 țigări/zi	2

		20 – 29 țigări/zi	3
		> 30 țigări/zi	4
1.8.2	Durata fumatului	< 1 an	1
		2– 5 ani	2
		> 5 ani	3
1.9	Consum de alcool	Da	1
		Nu	2
1.9.1	În mediu, consumul de băuturi alcoolice	Ocazional (evenimente, petreceri)	1
		O dată pe lună sau mai rar	2
		O dată pe săptămână sau mai rar	3
		De mai multe ori pe săptămână	4
		Zilnic	5
1.9.2	Tipul băuturii alcoolice	Bere (1 sticlă – 330 ml)	1
		Vin (1 pahar de vin – 150 ml)	2
		Tărie (1 pahar mic de tărie – coniac, rom, vodcă etc. – 40ml)	3
1.10	Consum de cafea	Da	1
		Nu	2
1.10.1	Cantitatea de cafea consumată pe zi	1 – 2 cești/zi	1
		3 – 5 cești/zi	2
		6 – 10 cești/zi	3
		> 10 cești/zi	4
		Ocazional	5
1.10.2	Durata consumului de cafea	< 1 an	1
		2 – 5 ani	2
		> 5 ani	3
1.11	Tipul alimentației	Omnivoră (de toate)	1
		Carnată (carne + pește)	2
		Ovolactovegetariană (ouă + lapte)	3
		Lactovegetariană (lapte)	4
		Vegetariană strictă	5
1.11.1	Respectați cele trei mese principale ale zilei (mic dejun, prânz și cina)	Da	1
		Nu	2

1.11.2	Cât de des mâncați salată sau legume la prânz sau cină?	O dată pe zi	1	
		De 2-4 ori pe săptămână	2	
		Cel puțin 1 dată pe săptămână	3	
		Ocazional	4	
1.11.3	Consumați fructe și legume proaspete?	O dată pe zi	1	
		De 2-4 ori pe săptămână	2	
		Cel puțin 1 dată pe săptămână	3	
		Ocazional	4	
1.12	Practicarea sportului	Da	1	
		Nu	2	
2	Antecedente obstetricale – ginecologice			
2.1	Menarha ani	≤ 10 ani	1
			11 – 16 ani	2
			> 16 ani	3
2.2	Ciclul menstrual	Regulat	1	
		Neregulat	2	
2.3	Menstruația	≤ 3 zile	1	
		4 – 5 zile	2	
		≥ 6 zile	3	
2.4	Paritatea	2	1	
		3	2	
		4	3	
		5	4	
		≥ 6	5	
2.5	Avort medical	0	1	
		1	2	
		2	3	
		3	4	
		≥ 4	5	
2.6	Avort spontan	2	1	
		3	2	
		4	3	
		5	4	

		≥ 6	5
2.6.1	Termenul la care s-a produs întreruperea spontană a sarcinii	Avort spontan precoce (vârsta săptămâni)	1
		Avort spontan tardiv (vârsta săptămâni)	2
2.7	Nașteri anterioare	0	1
		1	2
		2	3
		3	4
		≥ 4	5
2.7.1	Modalitatea de finisare a nașterii anterioare	per vias naturalis	1
		operație cezariană	2
2.7.2	Termenul nașterii	pretermensp	1
		la termen	2
		Post-termensp	3
2.7.3	Complicații în sarcină	Hipertensiune arterială indusă de sarcină	1
		Preeclampsie	2
		Restricție de creștere intrauterină a fătului	3
		Oligoamnios	4
		Decolare de placentă normal inserată	5
		Hemoragie postpartum	6
		Moartea intrauterină inexplicabilă a fătului	7
		Placenta praevia	8
		Tromboflebită în timpul sarcinii	9
		Diabet zaharat gestațional	10
		Altele	11
		Fără complicații	12
2.8	Metoda de contracepție utilizată	Metoda calendarului	1
		Prezervativul masculin	2

		Pilule hormonale	3
		Spermicide	4
		Dispozitiv intrauterin (sterilet)	5
		Coitus întrerupt	6
		Nici o metodă contraceptivă	7
2.9	Administrarea suplimentelor cu acid folic în sarcinile anterioare	Da	1
		Nu	2
2.9.1	Perioada administrării suplimentelor cu acid folic	Înainte de graviditate și în primele 3 luni de graviditate	1
		Doar în primele 3 luni de sarcină	2
3	Antecedente personale patologice		
3.1	Afecțiuni ale sistemului nervos central (nervoze, neuralgii)	Da	1
		Nu	2
3.2	Afecțiuni respiratorii (bronșite, pneumonii, astm bronșic)	Da	1
		Nu	2
3.3	Afecțiuni digestive (gastrită, ulcer, hepatită, colecectită)	Da	1
		Nu	2
3.4	Afecțiuni cardiovasculare (malformații congenitale, hipertensiune arterială, cardiopatii)	Da	1
		Nu	2
3.5	Afecțiuni ORL (rinită, sinuzită, adenită, amigdalită)	Da	1
		Nu	2
3.6	Afecțiuni endocrine (pancreas, hipofiza, suprarenale)	Da	1
		Nu	2
3.7	Afecțiuni nefrouinare (cistită, pielonefrită)	Da	1
		Nu	2
3.8	Patologia oculară	Da	1
		Nu	2
3.9	Reacții alergice (alimentară, nealimentară, medicamentoasă)	Da	1
		Nu	2
3.10	Afecțiuni vasculare periferice (boala varicoasă, tromboza venoasă)	Da	1
		Nu	2
4	Antecedente heredocolaterale		

4.1	Antecedente heredocolaterale de evenimente tromboembolice (tromboză venoasă profundă sau superficială, embolie pulmonară, infarct miocardic, atac vascular cerebral)	Da	1	
		Nu	2	
5	Investigații de laborator			
5.1	Parametrii biochimici			
5.1.1	Homocisteina	Rezultat	Valori de referință: 5 – 12 $\mu\text{mol/l}$	1
			Hiperhomocisteinemia moderată: 12 – 30 $\mu\text{mol/l}$	2
			Hiperhomocisteinemia intermediară: 30 – 100 $\mu\text{mol/l}$	3
			Hiperhomocisteinemia severă: > 100 $\mu\text{mol/l}$	4
5.1.2	Acid folic	Rezultat	Valori de referință: 13,5 – 45,3 nmol/L	1
			Deficit de folat: < 6,8 nmol/L	2
			Deficiență posibilă: 6,8 – 13,5 nmol/L	3
			Folat crescut: > 45,3 nmol/L	4
5.1.3	Vitamina B ₁₂	Rezultat	Valori de referință: 259 – 725 pmol/L	1
			Deficit de vitamina B ₁₂ : < 150 pmol/L	2
			Deficiență posibilă: 150 – 258.23 pmol/L	3
			Creșteri de vitamina B ₁₂ : >725 pmol/L	4
5.2	Analize molecular – genetice			
5.2.1	MTHFR C677T	Rezultat	Homozigot după alela normală: C/C	1
			Heterozigot: C/T	2

			Homozigot după alela mutantă: T/T	3
5.2.2	MTHFR A1298C	Rezultat	Homozigot după alela normală: A/A	1
			Heterozigot: A/C	2
			Homozigot după alela mutantă: C/C	3
5.2.3	MTRR A66G	Rezultat	Homozigot după alela normală: A/A	1
			Heterozigot: A/G	2
			Homozigot după alela mutantă: G/G	3
5.2.4	MTR A2756G	Rezultat	Homozigot după alela normală: A/A	1
			Heterozigot: A/G	2
			Homozigot după alela mutantă: G/G	3
5.3	Parametrii hemostazei			
5.3.1	Timpul de protrombină (timpul Quick)	Rezultat	Valori de referință: 70 – 100%	1
			Deficit protrombinic: < 70%	2
5.3.2	Fibrinogen	Rezultat	Valori de referință: 2,0 – 4,0 g/l	1
			Fibrinogen scăzut: < 2,0 g/l	2
			Fibrinogen crescut: > 4,0 g/l	3
5.3.3	Timpul de tromboplastină parțial activat (APTT)	Rezultat	Valori de referință: 30 – 40 sec	1
			Valori anormale	2
5.3.4	Numărul de trombocite	Rezultat	Valori de referință: 180 – 320 × 10 ⁹ /l	1
			Trombocitoză: > 320 × 10 ⁹ /l	2
			Trombocitopenie: < 180 × 10 ⁹ /l	3
6	Tratament preconcepțional/sarcină			
6.1	Acid folic 5 mg/zi	Da		1
		Nu		2
6.2	Vitamina B ₁₂ 500μg/zi	Da		1

		Nu	2	
6.4	Aspirina 75 mg/zi	Da	1	
		Nu	2	
6.5	Heparina cu fracție moleculară mică 40 mg/zi	Da	1	
		Nu	2	
7	Anamneza obstetricală actuală			
7.1	Sarcina a survenit la (după administrarea tratamentului la etapa preconcepțională)	1 lună	1	
		2 luni	2	
		3 luni	3	
		4 luni	4	
		5 luni	5	
		≥ 6 luni	6	
		Nu a survenit	7	
7.2	Iminența de avort spontan precoce	Da	1	
		Nu	2	
7.2.1	Simptome	Dureri în regiunea inferioară a abdomenului	1	
		Eliminări sangvine vaginale, uneori cheaguri	2	
		Dureri lombare	3	
7.3	Iminenta de avort spontan tardiv	Da	1	
		Nu	2	
7.3.1	Simptome	Dureri în regiunea inferioară a abdomenului	1	
		Eliminări sangvine vaginale, uneori cheaguri	2	
		Dureri lombare	3	
7.4	Examen ultrasonografic - I trimestru	Da	1	
		Nu	2	
7.5	Examen ultrasonografic - II trimestru	Da	1	
		Nu	2	
7.6	Avort spontan	Da	1	
		Nu	2	
7.6.1	Termenul la care s-a produs intreruperea spontana a sarcinii	Avort spontan precoce	1	
		Avort spontan tardiv	2	
8	Investigații de laborator – I-ul trimestru de sarcină			
8.1	Homocisteina	Rezultat	Valori de referință: 5 – 12 μmol/l	1
			Hiperhomocisteinemia moderată: 12 – 30 μmol/l	2
			Hiperhomocisteinemia intermediară: 30 – 100 μmol/l	3
			Hiperhomocisteinemia severă: > 100 μmol/l	4
8.2	Timpul de	Rezultat	Valori de referință: 70 – 100%	1

	protrombină (timpul Quick)		Deficit protrombinic: < 70%	2
	Fibrinogen	Rezultat	Valori de referință: 2,0 – 4,0 g/l	1
			Fibrinogen scăzut: < 2,0 g/l	2
			Fibrinogen crescut: > 4,0 g/l	3
8.4	Timpul de tromboplastină parțial activat (APTT)	Rezultat	Valori de referință: 30 – 40 sec	1
			Valori anormale	2
			Valori de referință: 180 – 320 × 109g/l	1
8.5	Numărul de trombocite	Rezultat	Trombocitoză: > 320 × 109g/l	2
			Trombocitopenie: < 180 × 109g/l	3
9	Investigații de laborator – al II-a trimestru de sarcină			
9.1	Homocisteina	Rezultat	Valori de referință: 5 – 12 μmol/l	1
			Hiperhomocisteinemia moderată: 12 – 30 μmol/l	2
			Hiperhomocisteinemia intermediară: 30 – 100 μmol/l	3
			Hiperhomocisteinemia severă: > 100 μmol/l	4
9.2	Timpul de protrombină (timpul Quick)	Rezultat	Valori de referință: 70 – 100%	1
			Deficit protrombinic: < 70%	2
9.3	Fibrinogen	Rezultat	Valori de referință: 2,0 – 4,0 g/l	1
			Fibrinogen scăzut: < 2,0 g/l	2
			Fibrinogen crescut: > 4,0 g/l	3
9.4	Timpul de tromboplastină parțial activat (APTT)	Rezultat	Valori de referință: 30 – 40 sec	1
			Valori anormale	2
			Valori de referință: 180 – 320 × 109g/l	1
9.5	Numărul de trombocite	Rezultat	Trombocitoză: > 320 × 109g/l	2
			Trombocitopenie: < 180 × 109g/l	3

Factorii care influențează nivelul plasmatic al homocisteinei

Factori		Efect	Mecanism de acțiune
Factori genetici	Mutații genetice în genele MTHFR, MTR, MTRR, CBS	↑ - ↑↑↑	Reacția de remetilare redusă, reacția de transsulfurare redusă, reacția de transsulfurare inhibată
	Homocistinuria	↑↑↑	Reacția de transsulfurare inhibată
Factori fiziologici	Vârsta avansată	↑	Schimbări în funcția renală, menopauza
	Sexul masculin	↑	Influența hormonilor sexuali masculini, masa musculară mare
	Sarcina	↓	Hemodiluție, nivel plasmatic redus de albumină
Regimul alimentar	Deficit de folat	↑↑	Reacția de remetilare redusă
	Deficit de vitamina B ₁₂	↑↑	Reacția de remetilare redusă
	Deficit de vitamina B ₆	↑	Reacția de transsulfurare și remetilare redusă
	Aportul ridicat de vitamine (acid folic, vitamina B ₁₂ , vitamina B ₆)	↓	Reacțiile de remetilare și transsulfurare adecvate
	Dieta bogată în metionină	↑	Aport crescut de metionină
Stilul de viață	Fumat	↑	Leziuni celulare, inhibarea activității enzimatiche
	Cafea	↑	Antagonistul vitaminei B ₆ , acid clorogenic în cafea
	Alcool	↑	Modificări în activitatea enzimatică a ciclului metioninei
	Lipsa de activitate fizică	↑	Mod de viață nesănătos
Preparate medicamentoase	Anticonvulsivante	↑	Epuizarea rezervelor de folați
	Preparate utilizate în	↑	Inhibă procesul de absorbție a

	tratamentul dislipidemiilor (fibratii, Niacina, Colestiramina)		folaiilor, inhibă activitatea enzimei piridoxal kinaza, alterarea funcției renale
	Androgenii	↑	Cresc masa musculară, sinteza creatininei
	Metotrexat (preparat antireumatic)	↑	Inhibă activitatea enzimei dihidrofolat reductaza
	Ciclosporina, L- dopa, Teofilin, Trimetoprim	↑	Alterarea funcției renale, reduc rata de filtrare glomerulară, inhibă activitatea enzimelor piridoxal kinaza și dihidrofolat reductaza
Condiții clinice	Insuficiența renală	↑↑	Alterarea funcției renale
	Hipotiroidie	↑	Necunoscut
	Afecțiuni intestinale	↑	Alterarea procesului de absorbție intestinală a vitaminelor grupului B
	Artrita reumatoidă	↑	Preparatele utilizate cu scop de tratament în artrita reumatoidă, deficiența de vitamine, disfuncții gastrointestinale
	Diabet zaharat, stadiu avansat	↑	Alterarea funcției renale

*↓ - reduc nivelul homocisteinei, ↑ - hiperhomocisteinemie moderată, ↑↑ - hiperhomocisteinemie intermediară, ↑↑↑ - hiperhomocisteinemie severă.

Hiperhomocisteinemia și patologia vasculară

Studiu	Constatare
Boushey și colab.	O creștere cu 5 $\mu\text{mol/L}$ a homocisteinemiei plasmatice este asociată cu risc crescut de boală coronariană, accidente vasculare cerebrale și boala vasculară periferică
Proiectul European de Acțiune Comună, studiu multicentric (un consorțiu de medici și cercetători de la 19 centre medicale din nouă țări europene)	Hiperhomocisteinemia este asociată cu un risc crescut de afectare vasculară periferică, interacționând cu alți factori de risc (efect multiplicativ)
Stampfer și colab.	Un risc crescut de 3,1 ori pentru infarct miocardic cu valori ale homocisteinei la percentila 95 comparativ cu percentila sub 90
Malinow și colab. și Voutilainen și colab.	Concentrația plasmatică a homocisteinei este corelată semnificativ cu îngroșarea arterelor carotide
Nygard și colab. și Wald și colab.	Corelația puternică între concentrația plasmatică de homocisteină și rata de mortalitate la pacienți cu boala arterială coronariană
Kluijtmans și colab. și Mudd și colab.	Genotipului homozigot TT a genei MTHFR reprezintă un risc genetic pentru boala arterială coronariană
Falcon și colab.	Prevalența ridicată a hiperhomocisteinemiei la pacienții cu tromboza venoasă juvenilă
den Heijer și colab.	Hiperhomocisteinemia mai mare decât percentila 95 reprezintă un factor de risc pentru tromboza venoasă profundă
Simioni și colab.	Prevalența ridicată a hiperhomocisteinemiei la pacienții cu tromboza venoasă periferică a extremităților superioare
Eichinger și colab.	Hiperhomocisteinemia a fost înregistrată la 25% dintre pacienții cu un prim episod de tromboembolism venos idiopatic
Kottke-Marchant și colab.	Concentrația plasmatică a homocisteinei $> 13\mu\text{mol/L}$ reprezintă un factor de risc pentru tromboza arterială și venoasă la pacienții cu profil de coagulare normal
Fermo și colab.	Hiperhomocisteinemia moderată a fost înregistrată la 13,1% dintre

	pacienții cu tromboză venoasă și 19,2% dintre pacienți cu boala arterială ocluzivă
Arruda și colab., Salomon și colab. și Margaglione și colab.	Polimorfismul 677C →T în gena MTHFR constituie un factor de risc pentru tromboza venoasă (genotipul homozigot conferă un risc ușor mai mare vs genotipul heterozigot)
Kluijtmans și colab.	Polimorfismul 677C →T în gena MTHFR poate fi un factor de risc în apariția trombozei la pacienții cu deficit de enzima CBS
Lalouschek și colab.	Risc crescut de accident ischemic tranzitor sau accident vascular cerebral minor la pacienții cu polimorfismul 677CT în gena MTHFR

Anexa 4

Echilibrul Hardy-Weinberg pentru polimorfismele MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G la pacientele din studiu

Genotip	Lot de bază, n=57	Echilibrul Hardy-Weinberg	χ^2	p	Lot martor, n=57	Echilibrul Hardy-Weinberg	χ^2	p
MTHFR C677C	0.351	0.366	0.24	0.63	0.737	0.754	1.31	0.25
MTHFR C677T	0.509	0.478			0.263	0.229		
MTHFR T677T	0.140	0.156			0.000	0.017		
MTHFR A1298A	0.421	0.433	0.16	0.69	0.807	0.801	0.27	0.6
MTHFR A1298C	0.474	0.450			0.175	0.188		
MTHFR C1298C	0.105	0.117			0.018	0.011		
MTR A2756A	0.667	0.651	0.56	0.46	0.930	0.931	0.08	0.78
MTR A2756G	0.281	0.311			0.070	0.068		
MTR G2756G	0.053	0.037			0.000	0.001		
MTRR A66A	0.333	0.305	0.73	0.39	0.860	0.832	6.68	0.01
MTRR A66G	0.439	0.494			0.105	0.160		
MTRR G66G	0.228	0.200			0.035	0.008		

Anexa 5.

Frcevența genotipurilor polimorfismelor MTHFR, MTR și MTRR la pacientele din studiu

Genotip	Lot de bază, n=57	Lot martor, n=57	χ^2	p	OR	
					OR	Î ₉₅
MTHFR C677T						
CC	0.351	0.737	20,26	0.0004	0.19	0.09 – 0.43
CT	0.509	0.263			2.90	1.32 – 6.36
TT	0.140	0.000			19.75	1.11 – 350.88
MTHFR A1298C						
AA	0.421	0.807	18.30	0.0001	0.17	0.07 – 0.40
AC	0.474	0.175			4.23	1.79 – 9.98
CC	0.105	0.018			6.59	0.77 – 56.60
MTR A2756G						
AA	0.667	0.930	12.67	0.002	0.15	0.05 – 0.48
AG	0.281	0.070			5.17	1.61 – 16.64
GG	0.053	0.000			7.39	0.37 – 146.32
MTRR A66G						
AA	0.333	0.860	32.95	0.000007	0.08	0.03 – 0.21
AG	0.439	0.105			6.64	2.46 – 17.95
GG	0.228	0.035			8.13	1.74 – 37.92

Anexa 6.

Relația dintre genotipurile polimorfismelor testate cu termenul la care s-a produs avortul spontan recurent la pacientele din lotul de bază

Genotip		Avort spontan precoce		Avort spontan tardiv		t	p
		Abs.	%, Î ₉₅	Abs.	%, Î ₉₅		
MTHFR 677	CC	20	100,0% 95,62-104,38	5	25,0% 6,03-43,97	13.0767	<0.001
	CT	28	96,55% 89,91-103,1	2	6,90% -2,32-16,12	21.6709	<0.001
	TT	8	100,0% 93,08-106,92	0	-	-	-
MTHFR 1298	AA	24	100,0% 96,0-104,0	1	4,16% -3,82-12,14	36.2379	<0.001
	AC	26	96,29% 89,17-103,41	5	18,51% 3,87-33,15	13.5955	<0.001
	CC	6	100,0% 92,0-108,0	1	16,67% -13,15-46,49	16.8799	<0.001
MTRR 66	AA	19	100,0% 95,58-104,42	1	5,26% -4,77-15,29	32.0414	<0.001
	AG	24	96,0% 88,32-103,68	5	20,0% 4,32-35,68	12.8819	<0.001
	GG	13	100,0% 94,57-105,43	1	7,69% -6,79-22,17	26.1576	<0.001
MTR 2756	AA	38	100,0% 96,83-103,17	5	13,51% 2,65-24,37	19.1026	<0.001
	AG	15	93,75 81,89-105,6	2	12,5% -3,7-28,7	7.9452	<0.001
	GG	3	100,0% 88,69-111,3	0	-	-	-

Anexa 7.

Relația dintre genotipurile polimorfismelor testate cu frecvența avorturilor spontane în antecedente la pacientele cu avort spontan recurent

Genotip		2 avorturi spontane		≥ 3 avorturi spontane		t	p
		Abs.	%, $\hat{\Pi}_{95}$	Abs.	%, $\hat{\Pi}_{95}$		
MTHFR 677	CC	15	75,0% 56,03-93,97	5	25,0% 6,03-43,97	6.1644	<0.001
	CT	18	62,07% 44,42-79,72	11	37,93% 20,28-55,58	2.6559	<0.01
	TT	4	50,0% 15,36-84,64	4	50,0% 15,36-84,64	0.0000	>0.05
MTHFR 1298	AA	15	62,50% 43,14-81,86	9	37,50% 18,14-56,86	2.7568	<0.01
	AC	19	70,37% 53,17-87,57	8	29,63% 12,43-46,83	4.7630	<0.001
	CC	3	50,0% 10,0-90,0	3	50,0% 10,0-90,0	0.0000	>0.05
MTRR 66	AA	15	78,94% 60,61-97,27	4	21,06% 2,73-39,39	7.5783	<0.001
	AG	17	68,0% 49,72-86,28	8	32,0% 13,72-50,28	4.1199	<0.001
	GG	3	23,08% 0,19-45,97	10	76,92% 54,03-99,81	6.8217	<0.001
MTR 2756	AA	29	76,31% 62,8-89,82	9	23,69% 10,18-37,20	6.6069	<0.001
	AG	12	75,0 53,79-96,21	4	25,0 3,79-46,21	6.1644	<0.001
	GG	3	100,0 88,96-111,3	0	-	-	-

Algoritm diagnostic și terapeutic în trombofilia ereditară

Grupa de risc	Tactica de conduită
Risc înalt Trombofilie ereditară, ≥ 4 Sindrom antifosfolipidic Hiperhomocisteinemie	Coagulograma preconcepțional Evaluarea coagulogramei pe parcursul sarcinii (1 dată la 2 săptămâni) Administrarea terapiei anticoagulante și antiagregante preconcepțional, pe parcursul sarcinii și postnatal și reajustată sub controlul coagulogramei Administrarea suplimentelor de acid folic și vitaminelor B
Risc moderat Trombofilie ereditară, 2 – 3 puncte	Coagulograma preconcepțional Evaluarea coagulogramei pe parcursul sarcinii Administrarea terapiei anticoagulante și antiagregante în cazul dereglărilor în sistemul de hemostază, începând cu primul trimestru de sarcină
Risc redus Trombofilie ereditară, 0 – 1 puncte	Evaluarea coagulogramei pe parcursul sarcinii, la fiecare 4 săptămâni, începând cu primul trimestru de sarcină Administrarea suplimentelor de acid folic și vitaminelor B

Acte de implementare și certificat de drept de autor

"APROB"

Prorector pentru activitatea științifică

IP USMF „Nicolae Testemițanu” din RM

Prof. univ., dr. hab. în șt. med.,

Gh.ROJNOVEANU

"10" mai 2017 a.

ACTUL nr. 37

DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI

(în procesul științifico-practic)

1. *Denumirea ofertei pentru implementare:* "ALGORITMUL EVALUĂRII DEREGLĂRILOR METABOLISMULUI METIONINEI LA FEMEILE CU AVORT SPONTAN RECURENT".

2. *Autorii:* VISTERNICEAN Elena, doctorand, MOȘIN Veaceslav, prof. univ., dr. hab. șt. med., PETROV Victor, dr. șt.med., conf. cercetător, SPINEI Larisa, prof. univ., dr. hab. șt. med.

3. *Numarul inovației 5567 din 06 aprilie 2017 a.*

4. *Unde și când a fost implementată:* În IMSP Institutul Mamei și Copilului în perioada mai 2014 – decembrie 2016.

5. *Eficacitatea implementării:* Algoritmul reprezintă o modalitate practică de evaluare a dereglărilor metabolismului metioninei și homocisteinei la femeile cu avort spontan recurent de cauză neprecizată în antecedente. Aplicarea algoritmului permite aprecierea profilului seric și molecular – genetic la pacientele cu ASR idiopatic, inclusiv și a determinantelor medico-sociale ce condiționează dezvoltarea hiperhomocisteinемiei, cu evaluarea riscului de complicații obstetricale în prezența mutațiilor trombofilice și aprecierea scorului de risc. Aplicarea eficientă a stratificării riscului orientează decizia terapeutică, și pledează în favoarea unui abord profilactic și o conduită terapeutică adecvată în timpul sarcinii.

6. *Obiecții/Propuneri:* Aplicarea algoritmului evaluării dereglărilor metabolismului metioninei la pacientele cu 2 pierderi consecutive de sarcină în anamneză, în special, în cazul în care nu a fost elucidată etiologia ASR.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere

Director IMSP Institutul Mamei și Copilului

Dr. șt. med., conf. univ.



Sergiu GLADUN

Șef departament știință,
Prof. univ., dr. hab. în șt. med.



Ghenadie CUROCICHIN

“APROB”

Prorector pentru activitatea științifică

IP USMF „Nicolae Testemițanu” din RM

Prof. univ., dr. hab. în șt. med.,

Gh.ROJNOVEANU

“10” mai 2017 a.



DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI
(în procesul științifico-practic)

1. *Denumirea ofertei pentru implementare:* “DOZAREA HOMOCISTEINEI SERICE LA PACIENTELE CU AVORT SPONTAN RECURENT”.

2. *Autorii:* VISTERNICEAN Elena, doctorand, MOȘIN Veaceslav, prof. univ., dr. hab. șt. med., PETROV Victor, dr. șt.med., conf. cercetător, SPINEI Larisa, prof. univ., dr. hab. șt. med., CREȚU Adrian, cercetător științific.

3. *Numarul inovației 5568 din 06 aprilie 2017 a.*

4. *Unde și când a fost implementată:* În Centrul medical “Repromed” în perioada mai 2014 – decembrie 2016.

5. *Eficacitatea implementării:* În urma aprecierii homocisteinei serice totale a fost posibil de identificat incidența hiperhomocisteiniei la pacientele cu ASR idiopatic. Analiza nivelului homocisteinei serice totale la pacientele cu ASR a permis identificarea și stabilirea relației acestui parametru biochimic cu pierderea recurentă a sarcinii. Hiperhomocisteinemia a fost înregistrată în 52,64% (Î₉₅ 39,68 – 65,6). Dintre acestea, în 49,14% (Î₉₅ 36,17 – 62,11) au prezentat hiperhomocisteinemie moderată și doar în 3,50% (-1,27 – 8,27) au prezentat hiperhomocisteinemie intermediară. Nivelul seric al homocisteinei a fost mai mare în grupul pacientelor cu ASR primar (14,74±1,12 μmol/l, p <0.01) și ASR precoce (13,61±0,87 μmol/l, p <0.05). Valoarea homocisteinei serice a depășit domeniul de normalitate atât în grupul pacientelor cu ≥3 avorturi spontane, cât și pentru cel cu 2 avorturi spontane în anamneză, dar în grupul pacientelor cu ≥3 avorturi spontane în anamneză, nivelul homocisteinei serice a fost mai mare (15,38±1,13 μmol/l) comparativ cu pacientele cu 2 avorturi spontane în anamneză (12,19±1,18 μmol/l). (p <0.05).

6. *Obiecții/Propuneri:* Dozarea homocisteinei serice totale la pacientele cu pierderea recurentă a sarcinii.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere

Director Centrul Medical “Repromed”
Dr. șt. med., conf. cercetător

 Alina HOTINEANU

Șef departament știință,
Prof. univ., dr. hab. în șt. med.

 Ghenadie CUROCICHIN

“APROB”

Prorector pentru activitatea științifică

USMF „Nicolae Testemițanu” din RM

Prof. univ., dr. hab. în șt. med.,

Gh.ROJNOVEANU

“10” mai 2017 a.

ACTUL nr. 29

DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI

(în procesul științifico-practic)

1. Denumirea ofertei pentru implementare: “IDENTIFICAREA POLIMORFISMELOR GENETICE MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G ȘI MTRR A66G LA PACIENTELE CU AVORT SPONTAN RECURENT”.

2. Autorii: VISTERNICEAN Elena, doctorand, MOȘIN Veaceslav, prof. univ., dr. hab. șt. med., PETROV Victor, dr. șt.med., conf. cercetător, SPINEI Larisa, prof. univ., dr. hab. șt. med., CREȚU Adrian, cercetător științific.

3. Numarul inovației 5569 din 06 aprilie 2017 a.

4. Unde și când a fost implementată: În Centrul medical “Repromed” în perioada mai 2014 – decembrie 2016.

5. Eficacitatea implementării: În urma aprecierii polimorfismelor genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTR A66G a fost posibil de identificat incidența și implicațiile lor la pacientele cu ASR idiopatic. Analiza polimorfismelor genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTR A66G a identificat genotipurile homozigot mutante pentru cele patru polimorfisme s-au întâlnit exclusiv în grupul pacientelor cu ASR precoce ($p < 0.001$): MTHFR 677TT (100,0% \hat{I}_{95} : 93,08 – 106,92), MTHFR 1298CC (100,0% \hat{I}_{95} : 92,0 – 108,0), MTR 2756GG (100,0% \hat{I}_{95} : 88,69 – 111,3) și MTRR 66GG (100,0% \hat{I}_{95} : 94,57 – 105,43) și au fost mai frecvent întâlnite în grupul pacientelor cu ASR primar decât în grupul pacientelor cu ASR secundar: MTHFR 1298CC (66,67% \hat{I}_{95} : 28,95 – 104,39), MTRR 66GG (92,30% \hat{I}_{95} : 77,81 – 106,79), MTR 2756GG (66,67% \hat{I}_{95} : 13,33 – 120,0), excepție fiind genotipul 677TT MTHFR întâlnit exclusiv în grupul pacientelor cu ASR primar (100,0% \hat{I}_{95} : 93,08 – 106,92)

6. Obiecții/Propuneri: Identificarea polimorfismelor genetice MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTR A66G la femeile cu ASR.

Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere


Director Centrul Medical “Repromed”

Dr. șt. med., conf. cercetător

 Alina HOTINEANU

Șef departament știință,

Prof. univ., dr. hab. în șt. med.

 Ghenadie CUROCICHIN



REPUBLICA MOLDOVA

Agenția de Stat pentru
Proprietatea Intelectuală

CERTIFICAT
DE ÎNREGISTRARE A OBIECTELOR
DREPTULUI DE AUTOR ȘI DREPTURILOR CONEXE

SERIA OȘ NR. 5666
DIN 12.07.2017

Eliberat în temeiul Legii nr.139/2010 privind dreptul de autor
și drepturile conexe, obiectul de pe verso a fost înregistrat în Registrul
de Stat al obiectelor protejate de dreptul de autor și drepturile conexe



Director General

CHIȘINĂU

Seria: OȘ (operă științifică)

Numărul de înregistrare: 5666

Data înregistrării: 20.06.2017

Numărul cererii: 410

Denumirea obiectului: „IMPACTUL HIPERHOMOCISTEINEMIEI ȘI
POLIMORFISMELOR GENETICE MTHFR C677T,
MTHFR A1298C, MTR A2756G ȘI MTRR A66G LA
FEMEILE CU AVORT SPONTAN RECURENT”

Autori:

Visternicean Elena **IDNP:** 2001015216523

Moșin Veaceslav **IDNP:** 0972901893567

Titularii drepturilor patrimoniale:

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "NICOLAE TESTEMIȚANU"
din Republica Moldova **IDNO:** 1007600000794

Societatea Comercială "REPROMED" S.R.L. **IDNO:** 1005600054977

L.S.



Sef Direcție Drept de Autor

AGENZIA DE STAT
PENTRU PROPRIETATEA INTELLECTUALĂ
A REPUBLICII MOLDOVA
ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНСТВО
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА

DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

Subsemnata, declar pe răspunderea personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Visternicean Elena

Data

CURRICULUM VITAE

<i>Numele de familie și prenumele</i>	Visternicean Elena 30 septembrie 1986
<i>Cetățenia</i>	Republica Moldova
<i>Studii – superioare, doctorat, postdoctorat (instituție, perioada, specialitatea, calificarea)</i>	Noiembrie 2013 – 2017 - studii doctorale, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova 2009 – 2013 - licențiat Obstetrică și Ginecologie, studii rezidențiat, USMF „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova 2003 – 2009 - licențiat în Medicină Generală, USMF „Nicolae Testemițanu”, Republica Moldova
<i>Stagii (instituție, perioada, calificarea)</i>	Cursul postuniversitar de perfecționare a pregătirii profesionale cu titlul: Colposcopie. Modulul II. 4-30 martie 2013, UMF "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca, România
<i>Domeniile de interes științific</i>	Ginecologie endocrinologică, Sănătatea reproducerii
<i>Participări în proiecte științifice naționale și internaționale</i>	Atelierul de lucru „Creșterea gradului de conștientizare a populației privind sănătatea reproductivă și drepturile sexual-reproductive în Republica Moldova", CIDSR, 21-23 noiembrie 2013, Chișinău, Republica Moldova Atelierul de lucru „Health priorities – as part of Millennium Development Goals", 25-26 ianuarie 2013, Moscova, Rusia Atelierul de lucru „Managementul organizatoric în prevenirea cancerului de col uterin în Republica Moldova", CIDSR, 3-4 decembrie 2012, Chișinău, Republica Moldova Atelierul de lucru „Servicii comprehensive și de calitate în avort: Aspirare Vacuum Manuală și Avort Medicamentos", CIDSR, 20-21 iunie 2012, Chișinău, Republica Moldova
<i>Participări la foruri științifice (naționale și internaționale)</i>	Conferința științifică anuală USMF "Nicolae Testemițanu", 18-20 octombrie 2017, Chișinău, Republica Moldova Conferința „Trombofiliile în obstetrică și ginecologie”, Societatea de Obstetrică și ginecologie din Republica Moldova, Chișinău, 8 septembrie 2017 Conferința Științifică a doctoranzilor (cu participare internațională) "Tendințe contemporane ale dezvoltării științei: viziuni ale tinerilor cercetători", UnAȘM, 15 iunie 2017, Chișinău, Republica Moldova Conferința Științifică a Tinerilor Cercetători și Studenți (cu participare internațională) „Modern Solutions of Current Scientific Issues in Medicine”, ediția a III-a, 15-16 martie 2017, Niznij Novgorod, Rusia. FIGO initiative on unsafe abortion, Fouth Central and Eastern Europe Regional Workshop. Raport oral: "Implementation of national action plan

	to prevent unsafe abortions in Republic of Moldova ", 11-12 iulie 2013, Tbilisi, Georgia
	Conferința științifică anuală USMF "Nicolae Testemițanu", 17-19 octombrie 2012, Premiul gradul II
	Conferința științifică anuală USMF "Nicolae Testemițanu", 16-18 octombrie 2009, Premiul gradul III
	Congresul Internațional medical pentru studenți și rezidenți – MedEspera, 14-17 Mai, 2008. Premiul gradul II
<i>Lucrări științifice și științifico-metodice publicate</i>	Până în prezent – 25 articole publicate. Coautor al unei îndrumări metodice. Coautor la 1 Protocol Clinic Național.
<i>Premii, mențiuni, distincții, titluri onorifice</i>	Bursa nominală „Nicolae Testemițanu”, 2016-2017 Burse de merit, 2008. Premiul gradul II. Pentru studenții instituțiilor de învățământ superior din RM, organizate de către Centrul de Informație Universitară sub egida Consiliului Rectorilor din RM
<i>Cunoașterea limbilor</i>	Rusa (C1), engleza (B2)
<i>Date de contact de serviciu (adresa, telefon, email)</i>	Tel. mobil: (+373 69) 013645; (+373 79) 716525 elena.visternicean@gmail.com Str. Gh. Asachi 79/2, ap. 3, Chișinău, Republica Moldova