

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://SciVerse.ScienceDirect.com)

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Praca oryginalna/Original research article

Łagodna hiperhomocysteinemia u chorych z nadpłytkowością samoistną (NS), związek z mutacją genu MTHFR i poziomem kwasu foliowego



Mild hyperhomocysteinemia in patients with essential thrombocythemia (ET) and its relation with MTHFR gene mutation and folic acid concentration

Bożena Sokołowska^{1,*}, Ksenia Bykowska², Ewa Mendek-Czajkowska², Aleksandra Nowaczyńska¹, Adam Walter-Croneck¹, Tomasz Gromek¹, Anna M. Kowalska³, Sylwia Chocholska¹, Katarzyna Wejksza⁴, Martyna Kandefer-Szerszeń⁴, Adam Sokołowski⁵, Jerzy Windyga², Krzysztof Warzocha², Anna Dmoszyńska¹

¹Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Kierownik: prof. dr hab. Anna Dmoszyńska, Lublin, Polska

²Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Dyrektor: prof. dr hab. n. med. Krzysztof Warzocha, Warszawa, Polska

³The Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia PA, United States of America

⁴Zakład Wirusologii i Immunologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Kierownik: prof. zw. dr hab. n. med. Małgorzata Polz-Dacewicz, Lublin, Polska

⁵Szkoła Główna Handlowa, Warszawa, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 31.05.2013

Zaakceptowano: 04.07.2013

Dostępne online: 24.07.2013

Słowa kluczowe:

- nadpłytkowość samoistna (NS)
- mutacja genu MTHFR
- homocysteina

ABSTRACT

In this study we assessed homocysteine level in 106 patients with ET – 80 females and 26 males, mean age 54 (23–82) and in 20 healthy persons – 6 males and 14 females, mean age 41 (31–54). We also searched for a relation between homocysteine level and MTHFR gene mutation as well as vitamin B12 and folic acid concentration. Median homocysteine serum level was higher in ET patients than in control group. Elevated homocysteine level primarily stems from folic acid deficiency rather than from the presence of MTHFR gene mutation. Median folic acid level was lower in ET patients presenting thrombotic and bleeding complications than in ET patient without vascular episodes. We concluded that

* Adres do korespondencji: Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku UM, ul. Staszica 11, 20-081 Lublin, Polska.
Tel.: +48 (81) 534 54 68.

Adres email: besokolowska@o2.pl (B. Sokołowska).

- kwas foliowy

folic acid substitution may not only prevent hyperhomocysteinemia but also the development of vascular complications in ET patients.

Keywords:

- Essential thrombocythemia (ET)
- MTHFR gene mutation
- Homocysteine
- Folic acid

© 2013 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

Wstęp

Wrodzony defekt metabolizmu metioniny prowadzi do ciężkiej hiperhomocysteinemii, w której poziom homocysteiny jest bardzo wysoki i przekracza 100 $\mu\text{mol/l}$. Pozostawienie tych chorych bez leczenia mogłoby doprowadzić u połowy z nich do poważnych powikłań naczyniowych (zawału mięśnia serca, udaru mózgu lub żylnej choroby zakrzepowo-zatorowej) przed 30. rokiem życia. To duże ryzyko powikłań naczyniowych udaje się znacząco zmniejszyć poprzez odpowiednie leczenie obniżające poziom homocysteiny nawet wówczas, gdy nie osiąga się całkowitej jego normalizacji [1]. W przeciwieństwie do ciężkiej postaci hiperhomocysteinemii, łagodna jej postać, w której poziom homocysteiny mieści się w granicach 16–30 $\mu\text{mol/l}$, jest częściej spotykana, dotyczy bowiem 5–7% populacji ogólnej [2]. Spowodowana jest ona zwykle niedoborami w pożywieniu kwasu foliowego, witaminy B12, stosowaniem niektórych leków (niacyny, fibratów, metotreksatu, izoniazydu, L-dopa, teofiliny, fenytoiny, tlenu azotu oraz trimetoprimu), obecnością często występującego polimorfizmu genu reduktazy metylenotetrahydrofolianu (MTHFR) oraz chorobą nerek. Łagodna hiperhomocysteinemia jest również często spotykana u chorych z mieloproliferacjami [3, 4].

Celem pracy było poszukiwanie związku pomiędzy poziomem homocysteiny, występowaniem polimorfizmu genu MTHFR, zmianami stężenia witaminy B12 i kwasu foliowego, a także obecnością i rodzajem powikłań naczyniowych u chorych z NS.

Materiał i metody

Charakterystyka chorych

Grupę badaną stanowiło 106 chorych z nadpłytkowością samoistną (NS). W tej grupie 72 chorych zostało zdiagnozowanych w Klinice Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku UM w Lublinie i pozostawało pod opieką Przyklinicznej Poradni Hematologicznej. Pozostałych 34 chorych zostało zdiagnozowanych w Klinice Hematologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie i pozostawało pod opieką Poradni Chorób Krwi w Warszawie. W grupie badanej było 80 kobiet i 26 mężczyzn. Wiek chorych wahał się w granicach 23–82 (średnio 54 lata).

Charakterystykę kliniczną i laboratoryjną chorych przedstawiono w tabeli I.

Chorzy wymagający leczenia cytotoredukcyjnego otrzymywali: hydroksykarbamid, anagrelid lub oba leki łącznie. Leczenie rozpoczynano na podstawie wskazań zawartych

w wytycznych panelu polskich ekspertów w modyfikacji wynikającej ze wskazań do leczenia anagrelidem zawartych w programie NFZ [5]. W tabeli II przedstawiono sposób leczenia badanych chorych.

U 21 chorych wystąpiły powikłania zakrzepowe (ZAK), a u 22 powikłania krwotoczne (KRW). U dwóch chorych wystąpiły zarówno powikłania zakrzepowe jak i krwotoczne (KRW, ZAK). Na rycinie 1. przedstawiono liczbowy rozkład powikłań.

W badanej grupie chorych wystąpiło 68 powikłań naczyniowych, w tym 27 krwotocznych i 41 zakrzepowych. Wśród powikłań zakrzepowych było: 17 powikłań tętniczych i 24 żylnych.

Powikłania tętnicze to: zawał serca (10), udar mózgu (5), TIA (1), miażdżycza zarostowa tętnic (1). Powikłania żyłne były następujące: DVT (11), ciąża obumarła (1), poronienia (2) zakrzepica żyły śledzionowej i wrotnej (1), zakrzepica żyły udowej (1), zakrzepica żył palucha (2), zapalenia żył powierzchownych (5), zatorowość płucna (1). W nawiasie podano, ile razy dane powikłanie wystąpiło.

Powikłania krwotoczne obejmowały: powikłania ginekologiczne w tym obfite miesiączki (11), krwotoki z dróg rodnych (3), krwawienia po ekstrakcji zęba (3), krwotok z przewodu pokarmowego (1), krwawienie po trepanobiopsji (1), krwawienia z nosa (3), krwiaki po urazach (4). W nawiasach podano, ile razy dane powikłanie wystąpiło.

Grupę kontrolną dla mutacji genu MTHFR stanowiło 238 zdrowych dawców i pracowników szpitala (156 mężczyzn i 82 kobiety) w wieku średnio 30 lat (19–69). U żadnej z osób nie zanotowano powikłań zakrzepowych żylnych i tętniczych [6].

Grupę odniesienia do wykrywania obecności mutacji JAK2, badań biochemicznych, oceny poziomów homocysteiny, witaminy B12, kwasu foliowego stanowiło 20 pracowników szpitala (14 kobiet, 6 mężczyzn) w wieku średnio 41 lat

Tabela I – Charakterystyka kliniczna i laboratoryjna chorych
Table I – Clinical and laboratory characteristics of patients

Parametr	NS
Liczba chorych (n)	106
Wiek, lata (mediana)	54 (23–82)
Płeć K/M (n)	80/26
Hg, g/dl (mediana)	13,6 (8,4–16,8)
WBC, G/l (mediana)	7,8 (3,2–23,0)
PLT, G/l (mediana)	748 (279–1729)
Czas od rozpoznania, mies. Mediana (zakres)	7 (0–243)
WBC przy rozpoznaniu, G/l, mediana (zakres)	8,3 (3,6–19,5)

Tabela II – Sposób leczenia badanych chorych
Table II – A method of treatment of the patients

Grupy chorych	Odsetek (n = 106 łącznie) % (n)
Nieleczeni	63,2 (67)
Leczeni ANA	18,0 (19)
Leczeni ANA + HU	0,9 (1)
Leczeni HU	16,0 (17)
Leczeni Inne (HU + Endoxan, 6MP, INF)	1,9 (2)

(31–54). U dwóch osób wystąpiły powikłania zakrzepowe (u jednej osoby DVT po porodzie, u drugiej – udar mózgu).

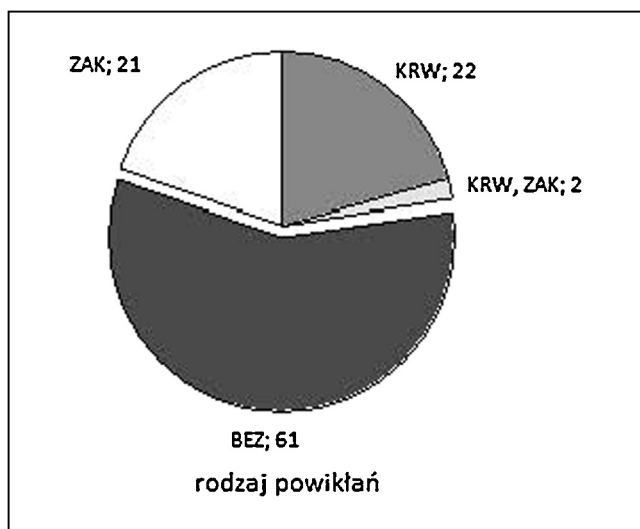
Mutacje C677T genu reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR) wykrywano według Frossta i wsp. [7], stosując enzym restrykcyjny Hinfl (Invitrogen, Lexington, USA). Oceny mutacji punktowej V617F w genie JAK2 dokonano techniką ASO-PCR na podstawie protokołów Baxtera i wsp. [8] oraz Koksala i wsp. [9]. Ilościowej oceny homocysteiny w surowicy krwi dokonano za pomocą testu IMx Homocysteine firmy ABBOTT Diagnostics według zaleceń producenta.

Wyniki

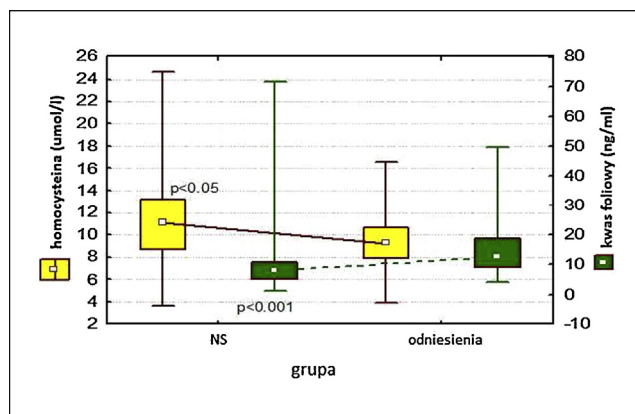
1. Ocena stężenia homocysteiny w wybranych grupach chorych: hiperhomocysteinemię wykryto u 41 chorych z NS (38,68%). Stężenie homocysteiny było istotnie statystycznie wyższe u chorych z NS w stosunku do grupy odniesienia;

- NS: mediana 11,10 $\mu\text{mol/l}$ (P 25-P75; 8,74–13,2),
- grupa odniesienia: mediana 9,21 $\mu\text{mol/l}$ (P25-P75; 7,94–10,6) $p < 0,05$.

Nie zanotowano istotnych statystycznie różnic w poziomie homocysteiny w zależności od wystąpienia i rodzaju powikłań naczyniowych.



Ryc. 1 – Liczbowy rozkład powikłań w grupie chorych z NS
Fig. 1 – The numerical distribution of complications in patients with NS



Ryc. 2 – Homocysteina i kwas foliowy u chorych z NS i w grupie odniesienia

Fig. 2 – Homocysteine and folic acid in patients with NS and the reference group

2. Ocena poziomu kwasu foliowego w grupie chorych z NS i w grupie odniesienia: poziom kwasu foliowego był istotnie statystycznie niższy u chorych z NS w stosunku do grupy odniesienia (Ryc. 2);

- NS: mediana 7,96 ng/ml (P25-P75; 5,15–10,8),
- grupa odniesienia: mediana 10,8 ng/ml (P25-P75; 9,03–12,6) $p < 0,001$.

3. Ocena poziomu kwasu foliowego w grupie chorych z NS i z obydwojoma rodzajami powikłań (KRW, ZAK) oraz w grupie chorych bez powikłań (BEZ): w grupie chorych z NS i obydwojoma rodzajami powikłań (KRW i ZAK) poziom kwasu foliowego był istotnie statystycznie niższy niż w grupie bez powikłań naczyniowych (BEZ) (Tab. III).

4. Poziom kwasu foliowego u chorych z NS i z powikłaniami naczyniowymi (KRW + ZAK) oraz w grupie chorych z NS bez powikłań naczyniowych (BEZ): u chorych z NS i powikłaniami naczyniowymi (ZAK + KRW) poziom kwasu foliowego był istotnie statystycznie niższy w stosunku do chorych z NS bez powikłań naczyniowych (BEZ);

- ZAK + KRW: mediana 8,48 ng/l (P25-P75; 5,16–7,85),
- BEZ: mediana 8,92 ng/ml (P25-P75; 4,98–7,92) $p = 0,034$.

5. Oznaczenie mutacji genu MTHFR w wybranych grupach chorych: w tabeli IV przedstawiono rodzaje mutacji genu MTHFR w grupie chorych z NS, w grupie kontrolnej i w grupie odniesienia.

6. Obecność mutacji genu MTHFR a powikłania naczyniowe: nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w występowaniu powikłań krwotocznych i zakrzepowych w zależności od obecności mutacji MTHFR.

7. Obecność mutacji MTHFR genu a poziom homocysteiny: nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie homocysteiny u osób z i bez obecności mutacji genu MTHFR;

- NS z mutacją MTHFR, mediana poziomu homocysteiny: 10,5 $\mu\text{mol/l}$, P25-P75: 8,5–13,1 $\mu\text{mol/l}$,
- NS bez mutacji MTHFR, mediana poziomu homocysteiny: 11,0 $\mu\text{mol/l}$; P25-P75: 8,5–13,2 $\mu\text{mol/l}$.

8. Homozygotyczna mutacja genu MTHFR – dane kliniczne: w grupie chorych z NS u 7 stwierdzono obecność

Tabela III – Poziom kwasu foliowego w grupach KRW, ZAK i BEZ
Table III – Folate levels in groups KRW, ZAK and BEZ

Parametr	Liczba oznaczeń Grupa KRW, ZAK	Liczba oznaczeń Grupa BEZ	Mediana P25-P75 KRW, ZAK	Mediana P25-P75 BEZ	p
Kwas foliowy (ng/ml)	2	58 3,28–3,29	3,285 5,16–10,3	7,85	<0,05

Tabela IV – Mutacje genu MTHFR w wybranych grupach chorych
Table IV – MTHFR gene mutations in selected groups of patients

Rodzaj mutacji	NS (n = 100)	Grupa kontrolna (n = 129)	Grupa odniesienia (n = 20)
MTHFR het (CT)	37 (37%)	52 (40%)	12 (60%)
MTHFR homo (TT)	7 (7%)	14 (11%)	1 (5%)
MTHFR WT (CC)	56 (56%)	63 (49%)	7 (35%)

homozygotycznej mutacji genu MTHFR. U 3 (42,86%) chorych z tej grupy wystąpiły powikłania zakrzepowe;

- wszyscy chorzy z tej grupy byli JAK2 V617F+,
 - u jednej chorej wystąpiły 4 epizody zakrzepowe, tylko w przypadku jednego epizodu (udar mózgu) płytki były >400G/l,
 - u jednego chorego stwierdzono hiperhomocysteinemię.
- U 4 (57,14%) nie stwierdzono powikłań zakrzepowych;
- dwoje chorych z tej grupy było JAK2 V617F +, dwoje JAK2 V617F-,
 - u wszystkich chorych wystąpiła hiperhomocysteinemia.
9. Wybrane parametry kliniczne i laboratoryjne w poszczególnych grupach chorych z NS (Tab. V):
- nadciśnienie tętnicze występowało istotnie statystycznie częściej u chorych z NS i ZAK w stosunku do chorych z NS i KRW ($p < 0,05$, test χ^2),
 - poziom cholesterolu >200 mg% stwierdzono wysoce istotnie statystycznie częściej u chorych z NS i ZAK w stosunku do chorych z NS i KRW ($p < 0,001$, test χ^2),
 - wiek powyżej 60 lat stwierdzono istotnie statystycznie częściej w grupie chorych z NS i ZAK w stosunku do chorych z NS i KRW ($p < 0,05$, test χ^2),
 - mutacja JAK2 występowała istotnie statystycznie częściej u chorych z NS i ZAK w stosunku do chorych z NS i KRW ($p < 0,0001$, test χ^2) oraz w stosunku do chorych z NS i BEZ ($p < 0,001$, test χ^2).

W naszym materiale u żadnego z chorych wartość homocysteiny nie przekroczyła 30 $\mu\text{mol/l}$, co spełnia nawet te bardziej restrykcyjne kryteria łagodności.

Poziom homocysteiny był istotnie statystycznie wyższy u chorych z NS w stosunku do grupy odniesienia (11,10 $\mu\text{mol/l}$ versus 9,21 $\mu\text{mol/l}$). Amtrano i wsp. [12] w pracy z 2003 przebadali 79 chorych z mieloproliferacjami (26 z NS, 27 z CzP oraz 26 z mielofibrozą) i, podobnie jak w naszym materiale, poziom homocysteiny okazał się wyższy u chorych w stosunku do grupy kontrolnej. Amtrano i wsp. ponadto stwierdzili, że poziom homocysteiny był istotnie statystycznie wyższy u chorych z powikłaniami tętniczymi. My natomiast nie zanotowaliśmy istotnych statystycznie różnic w poziomie homocysteiny w zależności od wystąpienia i rodzaju powikłań naczyniowych. Brak zależności pomiędzy poziomem homocysteiny a powikłaniami zakrzepowymi zaobserwowali również Gisslinger i wsp. na podstawie analizy 134 chorych z mieloproliferacjami, wśród których było 74 chorych z CzP i 60 z NS [3]. Natomiast, gdy zanalizowałam odsetek osób z hiperhomocysteinemią w poszczególnych grupach chorych z NS, okazało się, że jest on najwyższy w grupie z powikłaniami zakrzepowymi (ZAK – 52,38%), niższy w grupie bez powikłań naczyniowych (BEZ – 37,93%) i najniższy w grupie z powikłaniami krwotocznymi (KRW – 33,3%). W grupie chorych z NS i ZAK stwierdziliśmy ponadto istotnie statystycznie (w stosunku do chorych z KRW) częstsze występowanie nadciśnienia tętniczego, hipercholesterolemii, wieku powyżej 60 lat i obecności mutacji punktowej JAK2. Wszystkie wymienione powyżej czynniki: obecność mutacji JAK2, zaawansowany wiek, nadciśnienie tętnicze i hipercholesterolemia sprzyjają powikłaniom zakrzepowym. Hiperhomocysteinemia z uwagi na swój niekorzystny wpływ na śródbłonek naczyń krwionośnych może również przyczynić się do nasilenia zagrożenia zakrzepicą.

Komórki śródbłonek naczyń odgrywają istotną rolę w regulowaniu przepływu krwi, procesach krzepnięcia, adhezji leukocytów. Badania na modelach zwierzęcych: małp, myszy, szczurów z hiperhomocysteinemią wywołaną dietą wykazały obecność dysfunkcji komórek śródbłonek naczyń [1]. Objawiała się ona przede wszystkim ograniczeniem biodostępności tlenu azotu, co powodowało zahamowanie zależnego od niego rozszerzania naczyń. Potwierdziły to

Omówienie

Łagodna hiperhomocysteinemia a ryzyko zakrzepicy

W grupie 106 chorych z NS hiperhomocysteinemię wykryto u 41 (38,68%) osób. Hiperhomocysteinemia miała charakter łagodny, gdyż u żadnego chorego jej wartość nie przekroczyła ani 30, ani 50 $\mu\text{mol/l}$. Zakresy wartości określających stopień nasilenia hiperhomocysteinemii różnią się. Według Zawilskiej [10], hiperhomocysteinemia łagodna charakteryzuje się wartościami w granicach 15–30 $\mu\text{mol/l}$, natomiast według Jaques i wsp., zakres ten wynosi 12–50 $\mu\text{mol/l}$ [11].

Tabela V – Wybrane parametry w poszczególnych grupach chorych z NS; podkreślono wartości powyżej 50%
Table V – Selected parameters in different groups of patients with HF; underlined values above 50%

Grupa	Wiek >60. rż.	Mutacja JAK2	Nadciśnienie tętnicze	Homocysteina >12 µg%	Cholesterol całkowity >200mg%	Hiperhomocysteinemia + hiper cholesterolemia razem	Sercowo- naczyniowe czynniki ryzyka
KRW (n = 22)	22,73%	22,73%	19,04%	31,82%	27,27%	18,18%	33,3%
KRW, ZAK (n = 2)	50%	0%	0%	50%	50%	50%	0%
BEZ (n = 61)	18,03%	47,54%	34,43%	36,07%	39,34%	14,75%	43,33%
ZAK (n = 21)	<u>52,38*</u>	<u>66,67**</u>	<u>52,38*</u>	<u>52,38</u> Ns	<u>76,19*</u>	33,33% ns	<u>57,89</u> ns
Ogół grupy NS (n = 106)	26,42%	45,28%	33,96%	38,68%	44,34%	19,81%	43,14%

* istotność statystyczna w porównaniu grup chorych z NS i ZAK w stosunku do chorych z NS i KRW
 ** istotność statystyczna w porównaniu grup chorych z NS i ZAK w stosunku do chorych z NS i BEZ

również badania u ludzi, u których za pomocą diety doprowadzono do szybkiego zwiększenia poziomu homocysteiny i obserwowano upośledzenie relaksacji naczyń krwionośnych [13]. W wyniku autooksydacji homocysteiny powstają wolne rodniki i nadtlenek wodoru uszkadzające komórki śródbłonna, co dodatkowo przyczynia się do aktywacji płytek krwi. Hiperhomocysteinemia nie tylko sprzyja powstawaniu zakrzepicy tętniczej, ale nasila również procesy miażdżycowe, co wykazano u myszy z deficytem apolipoproteiny E [1]. Potencjalny wpływ wysokich stężeń homocysteiny na rozwój powikłań tętniczych ilustrują przykłady dwojga spośród badanych chorych z NS. Chora lat 76 przeżyła trzykrotnie zawał serca. Wśród innych czynników ryzyka stwierdziliśmy obecność mutacji JAK2 V617F oraz nadciśnienie tętnicze. Poziom homocysteiny wynosił 24,6 µmol/l, bez obecności mutacji genu MTHFR. Badanie koronarograficzne wykazało prawidłowe naczynia wieńcowe. U drugiego chorego, 79-letniego mężczyzny, u którego poziom homocysteiny w momencie oceniania czynników ryzyka wynosił 21,7 µmol/l, zarostową miażdżycę tętnic kończyn dolnych zdiagnozowano w tym samym roku co nadpłytkowość samoistną. U chorego tego nie wykryto ani obecności mutacji genu MTHFR, ani mutacji punktowej JAK2 V617F. Wiadomo, że samo podwyższenie poziomu homocysteiny nie było odpowiedzialne za wystąpienie powikłań zakrzepowych u przedstawianych chorych, jednak dołączyło się do innych czynników prozakrzepowych, takich jak nadciśnienie tętnicze czy choroba nowotworowa, czyli w tych przypadkach nadpłytkowość samoistna.

Hiperhomocysteinemia a obecność mutacji genu MTHFR

Obecność mutacji genu MTHFR stwierdzono u 43 (41%) chorych z NS. Wśród nich 37 chorych było heterozygotami, a 7 homozygotami. Poziom homocysteiny nie różnił się pomiędzy grupą chorych bez mutacji (mediana 11,0 µmol/l) a grupą chorych, u których była obecna (mediana 10,5 µmol/l). Wskazuje to na to, że hiperhomocysteinemia występująca u chorych z NS nie jest uwarunkowana genetycznie.

Ponadto nie wykazano istotnych statystycznie różnic w występowaniu powikłań zakrzepowych w zależności od występowania homozygotycznej postaci mutacji genu MTHFR, którą stwierdziliśmy u 7 chorych z NS, bowiem u 3 chorych z tej grupy wystąpiły powikłania zakrzepowe, a u 4 nie. Dane dotyczące związku pomiędzy obecnością polimorfizmu genu MTHFR a ryzykiem zakrzepicy są rozbieżne. W pracy Ma

i wsp. z roku 1996 na podstawie badań przeprowadzonych u 293 chorych z zawałem serca i u 290 osób grupy kontrolnej wykazano, że polimorfizm genu MTHFR ma związek z hiperhomocysteinemią, natomiast nie stanowi ryzyka wystąpienia zawału serca [14]. Podobnie Kluijtmans i wsp. w pracy z roku 1998 udowodnili, że homozygotyczna mutacja genu MTHFR powoduje wzrost stężenia homocysteiny, ale nie jest genetycznym czynnikiem ryzyka zakrzepicy żył głębokich [15]. Natomiast Wu i Tsongalis w metaanalizie, której wyniki zostały opublikowane w roku 2001, wykazali podwyższone ryzyko rozwoju choroby naczyń wieńcowych u osób z homozygotyczną mutacją genu MTHFR [16]. Podobnie metaanaliza dokonana przez grupę Den Heijer i wsp., na podstawie elektronicznej oceny publikacji sprzed roku 2003, wykazała również istnienie związku pomiędzy homozygotycznym typem mutacji MTHFR a ryzykiem zakrzepicy żyłnej [17]. Następną metaanalizę obejmującą dane opublikowane do stycznia 2008 roku potwierdziła ponownie związek zakrzepicy żyłnej z polimorfizmem MTHFR, ale tylko w populacji chińskiej i tajskiej [18]. Natomiast u osób rasy kaukaskiej takiej zależności nie stwierdzono. U przebadanych przez mnie chorych rasy kaukaskiej, podobnie jak Gohil i wsp., nie wykazałam związku pomiędzy obecnością polimorfizmu genu MTHFR, a powikłaniami zakrzepowymi. Natomiast obserwując 7 chorych z homozygotyczną mutacją MTHFR, zwrócono uwagę na fakt, że u wszystkich chorych z powikłaniami zakrzepowymi obecna była dodatkowo mutacja JAK2, a u wszystkich chorych bez powikłań stwierdzono hiperhomocysteinemię. Czyżby więc współwystępowanie homozygotycznej postaci mutacji MTHFR z mutacją JAK2 u chorych z NS miało silniejszy efekt prozakrzepowy niż współwystępowanie homozygotycznej postaci mutacji MTHFR z hiperhomocysteinemią? Wydaje się, że warto byłoby tę ciekawą hipotezę sprawdzić na większej liczbie chorych.

Hiperhomocysteinemia a poziom kwasu foliowego

W całej badanej grupie chorych stwierdzono wysoce statystycznie istotnie obniżony poziom kwasu foliowego. Potwierdzają to również dane z literatury, mówiące o tym, że u chorych z mieloproliferacjami najczęstszą przyczyną hiperhomocysteinemii jest obniżenie poziomu kwasu foliowego [12]. Wydaje się więc zasadne poważnie potraktowanie sugestii zawartej w pracy Amitrano, aby u każdego chorego z mieloproliferacją oznaczać poziom homocysteiny, witaminy

B12 i kwasu foliowego. Hiperhomocysteinemia jest bowiem łatwo modyfikowalnym czynnikiem ryzyka zakrzepicy. Odpowiednia suplementacja kwasem foliowym, witaminą B12 i witaminą B6 jest na ogół wystarczająca. U wielu chorych z hiperhomocysteinemią stosowałam ten zestaw, posiłkując się oznaczeniem poziomu witaminy B12, kwasu foliowego. U dwóch przedstawionych powyżej chorych również zastosowałam to leczenie. U kobiety w momencie rozpoznania hiperhomocysteinemii, zarówno poziom kwasu foliowego, jak i witaminy B12 mieściły się w granicach normy. Po roku leczenia poziom homocysteiny obniżył się do $12,2 \mu\text{mol/l}$. U przedstawianego mężczyzny w momencie wykrycia hiperhomocysteinemii również poziom witaminy B12 i kwasu foliowego mieściły się w normie. W ciągu roku leczenia poziom homocysteiny obniżył się do normy (wynosił $11,3 \mu\text{mol/l}$), równocześnie jednak obniżyło się stężenie witaminy B12 poniżej 150 pg/ml . Zintensyfikowano leczenie witaminą B12, stosując zamiast preparatu Vegevit (zawierającego $5 \mu\text{g}$ witaminy B12) preparat witaminy B12 zawierający $10 \mu\text{g}$ tej witaminy. Po około 10 miesiącach leczenia stężenie witaminy B12 powróciło do normy, ale poziom homocysteiny wyraźnie zwiększył się ponownie do $20,8 \mu\text{mol/l}$. W tym czasie chory zgłaszał nasilenie dolegliwości bólowych kończyn dolnych. Wydaje się, że miały one związek w większym stopniu ze wzrostem homocysteiny, a nie z aktywnością choroby, gdyż w tym czasie pod wpływem leczenia hydroksykarbamidem uzyskano normalizację liczby płytek. Znamienne jest również to, że w obu przypadkach mieliśmy do czynienia z powikłaniami tętniczymi. Istnieje wiele grup chorych potencjalnie zagrożonych hiperhomocysteinemią. Kraczkowska i wsp. wyróżnili trzy takie grupy: ze zdiagnozowaną chorobą sercowo-naczyniową (grupa 1), podwyższonego ryzyka chorób naczyniowych (grupa 2) i podwyższonego ryzyka ze względu na niedobór witamin z grupy B (grupa 3) [19]. W grupie 1 znajdują się m.in. choroba wieńcowa, zawał serca, zrostowa miażdżyca tętnic, zakrzepica żylna i zatorowość płuc. W grupie 2 znajdują się: nadciśnienie tętnicze, palenie tytoniu, choroba przewodu pokarmowego z hiperlipidemią, cukrzyca. Do grupy 3 zaliczono: osoby starsze, stany zapalne przewodu pokarmowego, nadużywanie alkoholu, niezdrowo-ważona dieta. Przedstawiony mężczyzna miał czynniki ryzyka hiperhomocysteinemii z każdej z grup: zarostową chorobę tętnic (grupa 1), nadciśnienie tętnicze (grupa 2) oraz przewlekłą chorobę nerek i zaawansowany wiek (grupa 3). Podobnie opisana powyżej chora: miała trzykrotnie zawał mięśnia serca (grupa 1), nadciśnienie tętnicze (grupa 2) oraz zaawansowany wiek (grupa 3).

Poziom kwasu foliowego a powikłania naczyniowe

W materiale badanym 106 chorych z NS u dwóch chorych wystąpiły zarówno powikłania krwotoczne, jak i zakrzepowe. Grupa ta w stosunku do innych grup (chorych z NS i ZAK oraz chorych z NS BEZ) charakteryzowała się istotnie statystycznie wyższą liczbą płytek i istotnie statystycznie niższym poziomem kwasu foliowego. Oczywiście bardzo mała liczebność grupy ogranicza znaczenie tego spostrzeżenia, jednak wydaje się ono warte odnotowania. Gdy bowiem porównaliśmy poziom kwasu foliowego w grupie chorych z NS i z powikłaniami naczyniowymi (zakrzepowymi i krwotocznymi)

i w grupie chorych z NS bez powikłań naczyniowych, okazało się, że poziom kwasu foliowego jest istotnie statystycznie niższy u chorych z powikłaniami naczyniowymi. Kwas foliowy jest niezbędny dla prawidłowego funkcjonowania naczyń krwionośnych. Folian w ścianie tętnicy jest zarówno donorem grupy metylowej, jak i donorem wodoru i elektronów. Grupa metylowa jest wykorzystywana w procesie detoksykacji homocysteiny, który odbywa się poprzez jej remetylację do metioniny. Natomiast wodór i elektrony potrzebne są do redukcji dihydrobiopteryny (BH2) do tetrahydrobiopteryny (BH4). BH4 z kolei jest kofaktorem śródbłonkowej syntazy tlenu azotu wytwarzającej rozszerzający naczynia tlenek azotu, a także pełni rolę miejscowego przeciwutleniacza [19]. Niedobór kwasu foliowego poprzez doprowadzanie do hiperhomocysteinemii sprzyja zatem jej toksycznemu działaniu na komórki śródbłonka naczyń. Z drugiej strony, poprzez zmniejszenie wytwarzania BH4 hamuje zależne od tlenu azotu rozszerzanie naczyń. Na podstawie badań własnych i danych z literatury wydaje się bardzo wskazane oznaczenie u chorych z NS poziomu kwasu foliowego i w przypadku stwierdzenia jego niedoboru zastosowanie substytucji nie tylko jako prewencji hiperhomocysteinemii, ale również w celu zapewnienia prawidłowego funkcjonowania komórek śródbłonka i zapobiegania powikłaniom naczyniowym.

Podsumowanie

W przedstawionej pracy wykazano, że stężenie homocysteiny było wyższe u chorych z NS w stosunku do grupy odniesienia. Hiperhomocysteinemia miała charakter łagodny i nie była spowodowana obecnością mutacji genu MTHFR, lecz obniżeniem poziomu kwasu foliowego. Substytucja kwasem foliowym miałaby na celu nie tylko zapobieganie i leczenie hiperhomocysteinemii, ale również zapewnienie prawidłowego funkcjonowania komórek śródbłonka i przeciwdziałanie powikłaniom naczyniowym.

Wkład autorów/Authors' contributions

Według kolejności.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Nie występuje.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

- [1] Lentz SR. Mechanisms of homocysteine-induced atherothrombosis. *J of Thromb Haemost* 2005;3:1646-1654.
- [2] Bold E, Czupryński L. Homocysteina przyczyną miażdżycy. *Sprawy Nauki. Biuletyn Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego* 2003;10:12.
- [3] Gisslinger H, Rodeghiero F, Ruggeri M, et al. Homocysteine levels in polycythemia vera and essential thrombocythaemia. *Br J Haematol* 1999;105:551-555.
- [4] Faurischou M, Nielsen OJ, Jensen MK, Hasselbalch HC. High prevalence of hiperhomocysteinemia due to marginal deficiency of kobalamin or folate in chronic myeloproliferative disorders. *Am J Hematol* 2000;65:136-140.
- [5] Hellmann A, Bieniaszewska M, Podolak-Dawidziak M, et al. Aktualne wskazania diagnostyczno-terapeutyczne panelu ekspertów w nadplytkowości samoistnej. *Acta Haematol Pol* 2008;39:527-535.
- [6] Lopaciuk S, Bykowska K, Kwiecinski H, et al. Factor V Leiden, Prothrombin Gene G20210A Variant, and Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Genotype in Young Adults With Ischemic Stroke. *Clin Appl Thrombosis/Haemostasis* 2001;7:346-350.
- [7] Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-113.
- [8] Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al., Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054-1061.
- [9] Koksai V, Etlik O, Arica-Baris ST, Baris I. A tetra-primer polymerase chain reaction approach for the detection of JAK2 V617F mutation. *Genetic Testing* 2007;11:463-466.
- [10] Zawilska K. Trombofilie wrodzone i nabyte. *Wielka Interna*, tom Hematologia. Warszawa: Medical Tribune; 2011, 631-642.
- [11] Jacques PF, Rosenberg JH, Rogers G, et al. Serum total homocysteine concentrations in adolescent and adult Americans: results from the third national health and nutrition examination survey. *Am J Clin Nutr* 1999;69:482-489.
- [12] Amitrano L, Guardascione MA, Ames PR, et al. Thrombophilic genotypes, natural anticoagulants, and plasma homocysteine in myeloproliferative disorders: relationship with splanchnic vein thrombosis and arterial disease. *Am J Hematol* 2003;72:75-81.
- [13] Bellamy MF, McDowell IF, Ramsey MW, et al. Hyperhomocysteinemia after an oral methionine load acutely impairs endothelial function in healthy adults. *Circulation* 1998;98:1848-1852.
- [14] Ma J, Stampfer MJ, Hennekens CH, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, plasma folate, homocysteine, and risk of myocardial infarction in US physicians. *Circulation* 1996;94:2410-2416.
- [15] Kluijtmans LA, den Heijer M, Reitsma PH, et al. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase and factor V Leiden in the risk of deep-vein thrombosis. *Thromb Haemost* 1998;79:254-258.
- [16] Wu AH, Tsongalis GJ. Correlation of polymorphism to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular diseases. *Am J Cardiol* 2001;87:1361-1366.
- [17] Den Heijer M, Lewington S, Clarke R. Homocysteine. MTHFR and risk of venous thrombosis a meta-analysis of published epidemiological studies *J Thromb Haemost* 2005;3:292-299.
- [18] Gohil R, Peck G, Sharma P. The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120,000 case and 180,000 controls. *Thromb Haemost* 2009;102:360-370.
- [19] Kraczkowska S, Suchocka Z, Pachecka J. Podwyższone stężenie homocysteiny we krwi jako wskaźnik zagrożenia zdrowia. *Biul Wydziału Farm AMW* 2005;3:1-9.