

Veaceslav Moșin, Alina Hotineanu, Adrian Crețu, Vitalie Scurtu, Iuliana Holban
HIPERHOMOCISTEINEMIA ȘI PATOLOGIA REPRODUCTIVĂ
Centrul Medical „Repromed”

SUMMARY

HYPERHOMOCYSTEINEMIA AND REPRODUCTIVE PATHOLOGY

Keywords: hyperhomocysteinemia; MTHFR; MTR; MTRR; spontaneous miscarriages; thrombophilia.

Hyperhomocysteinemia defines the state in which concentrations of the non-protein forming amino acid homocysteine exceeds normal level. Mutations in the genes of folic acid cycle (MTHFR, MTR, MTRR) together with decreased intake of vitamins of B group involved in homocysteine metabolism have a great contribution to hyperhomocysteinemia. Elevated concentration of homocysteine is toxic for the blood vessels and can initiate a cascade of vascular complications, including thrombosis. At the moment, hyperhomocysteinemia may be associated with adverse events during pregnancy: placental abruption, preeclampsia, neural tube defects, intrauterine growth retardation. Genetic testing for patients allows to predict the risk of hyperhomocysteinemia and thrombotic events, indicate an appropriate treatment and monitor evolution of pregnancy.

РЕЗЮМЕ

ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЯ И РЕПРОДУКТИВНАЯ ПАТОЛОГИЯ

Ключевые слова: гипергомоцистеинемия, MTHFR, MTR, MTRR, невынашивание беременности, тромбофилия

Гипергомоцистеинемия характеризуется повышением концентрации небелковой аминокислоты - гомоцистеина. Мутации в генах цикла фолиевой кислоты (MTHFR, MTR, MTRR) при дефиците витаминов особенно группы B, воздействуют на уровень гомоцистеина в крови. Повышенные концентрации гомоцистеина оказывают токсическое действие на кровеносные сосуды и могут инициировать каскад воспалительных реакций, и даже образование тромбов. Во время беременности повышенные уровни гомоцистеина могут быть причиной невынашивания беременности и таких осложнений как: отслойка плаценты, преэклампсия, дефекты нервной трубки, синдром задержки внутриутробного развития плода. Генетическое тестирование пациентов позволяет предсказать риск гипергомоцистеинемии и образования тромбов, назначения соответствующего лечения и мониторинг беременности.

Hiperhomocysteinemia

Homocisteina (Hcy) este un aminoacid neproteic ce conține sulf, absent în dieta naturală și un intermediar metabolic în reacții de transmetilare și transsulfurare – reacții importante în creșterea, funcționarea și diferențierea celulară normală [8]. În plasma sanguină Hcy se găsește sub diverse forme: 70% din totalul de homocisteină (tHcy) circulă sub forma legată de proteină prin interacțiuni disulfidice (în principal albumine) [19]; aproximativ 25% se găsesc sub formă de dimeri de homocisteină, iar restul (5%) – legate de alți tioli, inclusiv cisteină, forma de Hcy redusă și cea oxidată [22].

Nivelul de Hcy plasmatică crește cu vârsta, datorită declinului metabolic al Hcy în rinichi. Femeile au un nivel de Hcy mai scăzut decât bărbații, parțial din cauza influenței hormonilor sexuali (estrogen și progesteron) și a menstruației [20].

În condiții fiziologice optime cantitatea de Hcy la nivel celular este reglată pe două căi metabolice alternative: degradare ireversibilă prin transsulfurare sau remetilare cu formare de metionină [3]. Transsulfurarea, care decurge în mod special în ficat și rinichi, constă în condensarea Hcy cu serină din care rezultă cistationină cu participarea enzimei cistationin-β-sintază și a vitaminei B6 în calitate de cofactor. În etapa următoare, cistationin-γ-liaza degradează cistationina în cisteină și α-cetobutirat. Cisteina este oxidată la atomul de sulf cu formare de sulfat anorganic excretat prin căi urinare [3]. Pe de altă parte, cisteina este un precursor al glutationului – antioxidant esențial în detoxifierea xenobioticelor.

În mod alternativ, Hcy este remetilată la metionină folosind donor de gruparea metil-5-metiltetrahidrofolat (5-metilTHF) sau betaină [16]. Pe această cale metabolismul Hcy este strâns conectat la ciclul

Să le examinăm mai detaliat:

1) Jumătate din cantitatea de metionină primită prin aport alimentar este transformată în Hcy [7]. Studiile pe animale sugerează că dieta bogată în metionină în prezența vitaminelor B6, B12 și deficiența de acid folic pot crește riscul aterosclerozei și patologiiilor coronare vasculare, în timp ce dieta bogată în alimente vegetale și fructe menține nivelul Hcy în limite normale [1].

2) Cofactorii derivați din vitaminele complexului B (B2, B6, B9, B12) participă în reacții enzimatice ce reglează metabolismul Hcy. Mai multe studii demonstrează că indivizii cu hiperhomocisteinemie prezintă concentrații inadecvate ale unui sau mai multor cofactori enzimatici [23]. Iar concentrația Hcy este invers proporțională cu concentrația plasmatică a folatului, vitaminei B12 și B6 [10]. Acidul folic (forma solubilă a vitaminei B9) este necesar în dividere celulară și diferențiere, în special în timpul gravidității. Derivații acidului folic sunt donori ai unităților mono-carbonice pentru sinteza purinelor și pirimidinelor componente ale ADN-ului și ARN-ului, iar prin donarea de grupare metal – participă la reglaj epigenetic.

3) Rinichii repezintă site-ul major al metabolismului Hcy posedând cele 3 enzime: MTR, CBS și cistationin- γ -liaza [9]. Disfuncțiile renale suntacompaniate cu creșterea nivelului de tHcy, iar studiile lui *Arnadottir* evidențiază o relație invers proporțională între rata de filtrare glomerulară măsurată și nivelul de tHcy.

4) Anomalii genetice în enzimele metabolismului Hcy pot determina creșterea concentrației de tHcy, iar severitatea modificărilor depinde de site-ul mutației genice [25]. Cel mai acceptat polimorfism asociat cu variabilitatea Hcy este 677C>T în gena MTHFR care substituie Ala în Val în componența enzimei. Kang și colab. au identificat o variantă a enzimei MTHFR caracterizată prin activitate redusă și „termolabilitate” [13]. Activitatea enzimatică în cazul genotipurilor heterozigot CT și homozigot TT se reduce cu 35% și respectiv 70% [25], iar forma termolabilă este un marker genetic al HHcy moderate la subiecții cu genotipul 677TT (3). Totodată, această asociere este observată doar concomitent cu concentrații inadecvate de foliați. Studiile lui *Guenther* (1999) au arătat pe modelul *E.coli* că slăbirea legării FAD este responsabilă de reducerea activității enzimatice, iar rolul protector împotriva pierderii FAD-ului îl joacă chiar foliații [6].

Polimorfismul 1298A>C al genei MTHFR constă în schimbarea Glu cu Ala. Este relevant faptul că nici statutul homozigot, nici cel heterozigot al polimorfismului nu modifică nivelul de Hcy plasmatică [15]. Însă starea de heterozigot compound pentru C677T și A1298C se asociază cu activitate enzimatică redusă, nivel ridicat de Hcy și concentrații plasmatică scăzute de foliați [5].

În polimorfismul 66A>G al genei MTRR izoleucina este substituită cu metionina. Unele studii raportează acest polimorfism drept factor de risc pentru DTN (defecte de tub neural) [21].

Homocisteina și bolile cardiovasculare

Primele evidențe despre potențialele efecte negative ale Hcy asupra peretelui vascular au fost raportate de către McCully în 1969 [18]. La 2 pacienți cu HHcy severă datorate erorilor înnăscute ale metabolismului Hcy au fost depistate leziuni vasculare similare, iar „Teoria Homocisteinei” postulează că Hcy și derivații săi sunt toxice pentru vasele sangvine. Pe de altă parte, rezultatele unor metaanalize ce au cuprins 24100 subiecți arată că terapia de normalizare a nivelului homocisteinei nu reduce riscul infarctului miocardic și cerebral, lucru explicat prin faptul că aceste încercări s-au bazat și pe prescripția de acid folic [17]. Suplinirea terapiei cu foliați este benefică pe o parte, dar efectul antagonist este accelerarea proliferării și inflamării – procese esențiale în formarea plăcii aterosclerotice, în principal datorită rolului metabolismului folatului de a furniza unități mono-carbonice pentru sinteza purinelor și pirimidinelor din structura ADN-ului și ARN-ului [4].

Studii recente descriu 3 mecanisme patologice ce stau la baza complicațiilor vasculare provocate de Hcy: stresul oxidativ, disfuncție endotelială și remodelare vasculară – integrate în „Triada toxică” [4].

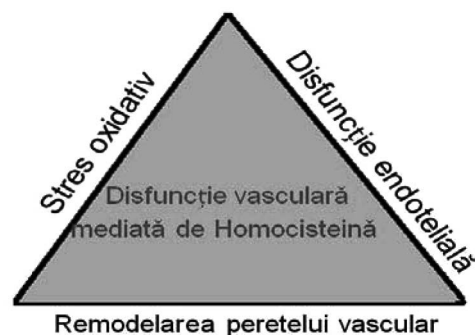


Figura 3. Triada toxică: Mecanismele patologice ce stau la baza bolilor vasculare provocate de homocisteină.

Cercetările sugerează că Hcy atacă în primul rând endoteliul vascular și inițiază o cascadă de complicații vasculare. Observațiile clinice și studiile pe animale au identificat posibilele ținte ale Hcy: EC (celule ale endoteliului), VSMCs (celule musculare), țesuturi conective, trombocite, factori de coagulare, lipide, molecule de transducere a semnalelor prin NO (oxid nitric) [25]. Totuși, nu există o ipoteză unificată ce ar explica modul în care Hcy provoacă afectarea vaselor. Efectele la nivel molecular și celular ale HHcy sunt reflectate în tabelul 1.

Materiale și metode: Grupul de cercetare l-au constituit pacientele Centrului medical cu probleme ale reproducerii, inclusiv avorturi spontane și pierderi de sarcină recurente. ADN-ul genomic a fost extras după kit-uri specializate (GeneJet Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit, *Fermentas*) din leucocitele sângelui periferic. Probele de sânge au fost colectate în tuburi de unică folosință cu EDTA, prin puncție venoasă.

Tabelul 1.

Mecanismele hiperhomocisteinемiei

Efectele moleculare ale HHcy	Efectele celulare ale HHcy
Reducerea produției de NO (oxid nitric)	Disfuncție endotelială
Reducerea cantității de NO disponibil	Afectarea vasorelaxării celulelor endoteliale
Stres oxidativ	Lezarea mitocondriilor
Peroxidarea lipidelor	Proliferarea celulelor musculare netede
Inflamarea	Degradarea matrixului extracelular
Coagularea	Lezarea ADN-ului și ARN-ului
Formarea trombilor	Apoptoza

Pentru testarea genetică a polimorfismelor MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G și MTRR A66G s-au realizat reacțiile PCR/RFLP (reacție de polimerizare în lanț și polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție) cu primeri specifici preluați din articolele din literatura de specialitate [2,27,24]. ADN-ul genomic a fost amplificat utilizând polimeraza Dream Taq („Fermentas”, USA), la termociclul “TProfessional Basic 96” (Biometra, Germania). Condițiile reacției sunt similare pentru toate polimorfismele cu excepția temperaturii de aliniere a primerilor: 60.4°C pentru MTHFR C677T, 61°C pentru MTHFR A1298C, 58.4°C – MTR A2756G, 57.6°C – MTRR A66G, iar condițiile protocolului standard sunt: denaturare inițială la 95°C – 3 minute, 33 cicluri: 94°C – 30 secunde, 57.6 - 61°C – 30 secunde, 72°C – 30 secunde și elongația finală la 72°C – 5 minute.

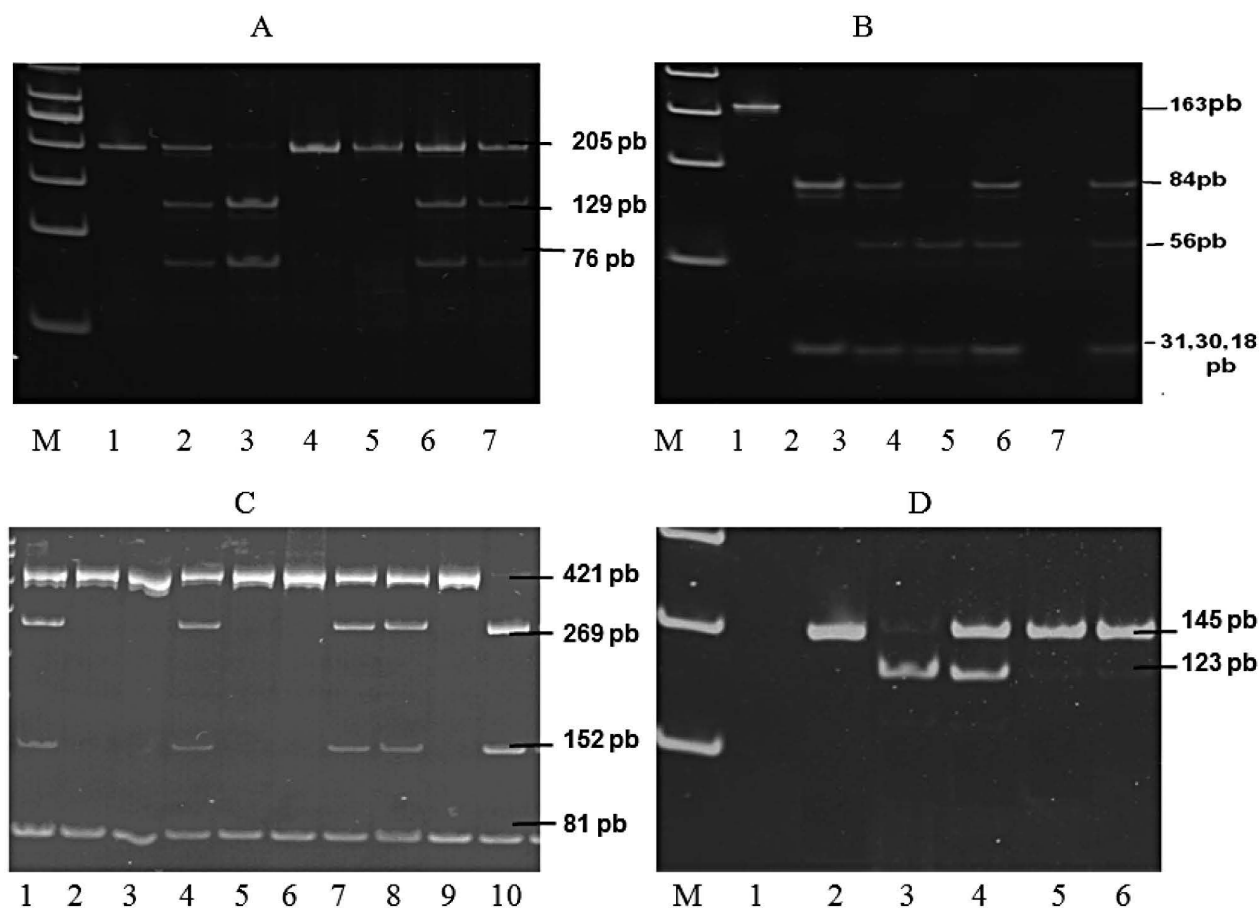


Figura 4. Electroforegrama analizei PCR / RFLP a polimorfismelor genelor ciclului folat:

A) **MTHFR C677T**: M – marker de 50 pb; 1 – amplicon (227 pb); 4 - 8 – homozigot normal (205 pb); 2 – heterozigot (205, 129, 76 pb); 3 – homozigot după mutație (129, 76 pb);

B) **MTHFR A1298C**: M – marker de 50 pb; 1 – amplicon (163 pb); 4 – homozigot normal (56, 31, 30, 18 pb); 3, 5, 7 – heterozigot (84, 56, 31, 30, 18 pb); 2 – homozigot după mutație (84, 31, 30, 18 pb);

C) **MTR A2756G**: 2, 3, 5, 6, 9 – homozigot normal (421, 81 pb); 1, 4, 7, 8 – heterozigot (421, 269, 152, 81 pb); 10 – homozigot după mutație (269, 152, 81 pb);

D) **MTRR A66G**: M – marker de 50 pb; 2 - amplicon (145 pb); 5, 6 – homozigot normal (145 pb); 4 - heterozigot (145, 123, 22 pb); 3 – homozigot după mutație (123, 22 pb).

Ampliconii au fost supuși restricției timp de 3 ore la 37°C cu enzimele de restricție specifice pentru fiecare polimorfism: Hinf I pentru MTHFR C677T, Mbo II pentru MTHFR A1298C, Hae III – MTR A2756G și Nde I – MTRR A66G.

Verificarea produșilor de restricție s-a efectuat prin electroforeză în gel de PAAG (poliacrilamidă) cu concentrația de 7,5% – sub condițiile: 200 V timp de 3 ore. Gelul a fost colorat cu soluție de bromură de etidiu. Iar rezultatele au fost vizualizate la sistemul UV SOLO (Germania). Mărimile fragmentelor sunt reflectate în figura 4.

Rezultate și discuții: Rezultatele genotipării sunt prezentate în diagramele 1 - 4. Pentru evaluarea veridicității rezultatelor obținute au fost utilizate formulele general acceptate din statistica variațională, cu ajutorul

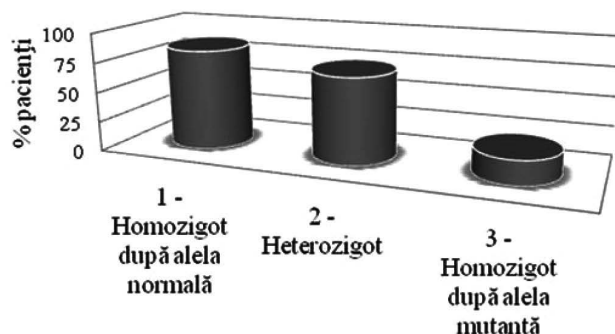
programului SISA. În acest context, au fost calculate frecvențele alelelor și claselor genotipice după formula lui Hardy-Weinberg, iar pentru compararea frecvențelor genotipurilor s-a utilizat criteriul lui Pirson – X^2 .

La compararea repartiției frecvenței genotipurilor observate și celor teoretic așteptate prin testul X^2 nu a fost elucidată deviație statistic semnificativă de la echilibrul Hardy-Weinberg nici pentru un polimorfism studiat: MTHFR C677T ($X^2=0.575$; $p>0.05$); MTHFR A1298C ($X^2=3.766$; $p=0.052$); MTR A2756G ($X^2=2.332$; $p>0.05$); MTRR A66G ($X^2=2.230$; $p>0.05$);

Concluzii.

1) Homocisteina în cantitate mare are efect toxic asupra endoteliului vaselor sangvine stimulând formarea de trombi.

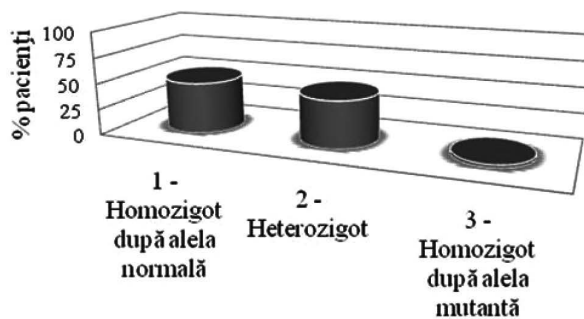
MTHFR C677T (176 pacienți)



	1 - Homozigot după alela normală	2 - Heterozigot	3 - Homozigot după alela mutantă
■ % din nr. total	47.7%	40.9%	11.4%
■ Numărul pacienților	84	72	20

Diagrama 1. Repartiția frecvențelor claselor genotipice după polimorfismul MTHFR C677T

MTHFR A1298C (97 pacienți)



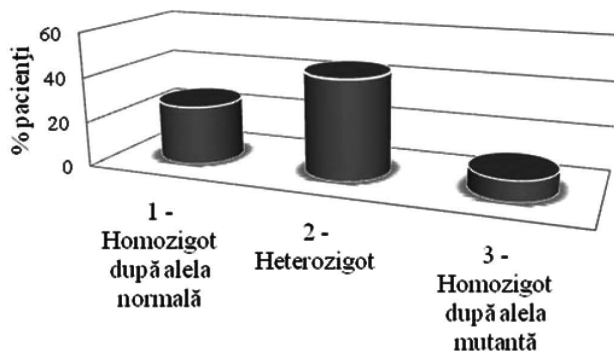
	1 - Homozigot după alela normală	2 - Heterozigot	3 - Homozigot după alela mutantă
■ % din nr. total	50.5%	46.4%	3.1%
■ Numărul pacienților	49	45	3

Diagrama 2. Repartiția frecvențelor claselor genotipice după polimorfismul MTHFR A1298C

2) Hiperhomocisteinemia constituie factor de risc pentru complicațiile sarcinii la diverse perioade, inclusiv preeclampsia, ruperea placentei, restricții de creștere intrauterină și avorturi spontane.

3) Testarea genetică după mutațiile în genele metabolismului homocisteinei și acidului folic permite estimarea riscurilor și prescrierea unui tratament corespunzător.

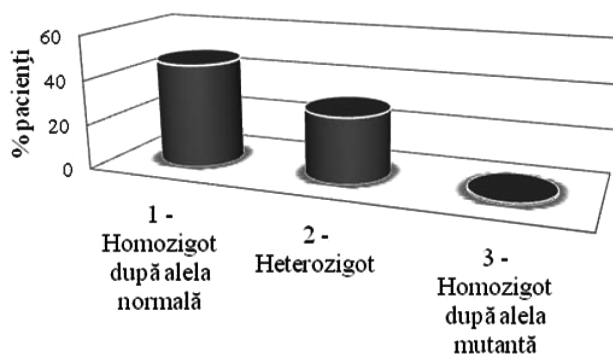
MTRR A66G (79 pacienți)



	1 - Homozigot după alela normală	2 - Heterozigot	3 - Homozigot după alela mutantă
■ % din nr. total	32.9%	55.7%	11.4%
■ Numărul pacienților	26	44	9

Diagrama 3. Repartiția frecvențelor claselor genotipice după polimorfismul MTRR A66G

MTR A2756G (76 pacienți)



	1 - Homozigot după alela normală	2 - Heterozigot	3 - Homozigot după alela mutantă
■ % din nr. total	60.5%	38.2%	1.3%
■ Numărul pacienților	46	29	1

Diagrama 4. Repartiția frecvențelor claselor genotipice după polimorfismul MTR A2756G

Bibliografie.

1. **Appel LJ, Moore TJ et al.**, *A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure.* DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 336: 1117–1124, 1999.

2. **Barbosa PR, Stabler SP.**, *Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for ele-*

vated total homocysteine concentrations in pregnant women. In: *European Journal of Clinical Nutrition* 62, 1010–1021, 2008.

3. **Blom HJ**, *Genetic determinants of hyperhomocystenaemia: the roles of cystathionine beta-synthase and 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductas.* In: *Eur J Pediatr* 159:208-212, 2006

4. **Blom HJ** *Overview of homocysteine and folate*

metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. In: *J Inherit Metab Dis* 34:74-81, 2011

5. **Botto, L. D., and Yanq, Q.** 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies. In: *Am. J. Epidemiol.* 151, 862-877, 2000.

6. **Castro R. et al**, homocysteine metabolism, hyperhomocystenaemia and vascular disease: An overview. In: *J. Inherit Metab. Dis* 29: 3-20, 2006.

7. **Carlsen SM, Fulling I et al.**, Metformin increases total serum homocysteine levels in non-diabetic male patients with coronary heart disease. In: *Scand J Clin Lab Invest* 57: 521-527, 1997.

8. **Eldibany M et al.**, Hyperhomocysteinemia and thrombosis. Overview, In: *Arch Pathol Lab Med*, 131, 2007

9. **Finkelstein JD.** Methionine metabolism in mammals. In: *J Nutr Biochem* 1: 228-237, 1990

10. **Graham IM, O'Callaghan P et al.**, Vitamins, homocysteine and cardiovascular risk. In: *Cardiovasc Drugs Ther* 16: 383-389, 2002.

11. **Jacobsen DW, Gatautis VJ et al.**, Rapid HPLC determination of total homocysteine and other thiols in serum and plasma: sex differences and correlation with cobalamin and folate concentrations in healthy subjects. In: *Clin Chem* 40:873-881, 1994

12. **Kang SS, Wong PW et al.**, Hyperhomocysteinemia as a risk factor for occlusive vascular disease. In: *Ann Rev Nutr* 12: 279-298, 1992.

13. **Kang SS, Zhou J. et al.**, Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. In: *Am J Hum Genet* 43:414-421, 1988.

14. **Leclerc D, Wilson A. et al**, Cloning and mapping of cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3059-3064, 1998

15. **Lievers, K. et al.**, A second common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk. In: *J. Mol. Med.* 79, 522-528, 2001.

16. **Li YN, Gulati S , et al**, Cloning, mapping and RNA analysis of human methionine synthase gene. In: *Hum Mol Gene* 5:1851-1858, 1996.

17. **Marti-Carvajal AJ et al.**, Homocysteine lowering interventions for preventing cardiovascular events. In: *Cochrane Database Syst rev* CD006612, 2009.

18. **McCully KS**, Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. In: *Am J Pathol* 56:111-128, 1969.

19. **Mudd SH, Finkelstein JD, et al.**, Homocysteine and its disulfide derivatives: A suggested consensus terminology. In: *Arterioscler Thromb Vasc. Biol* 20: 1704-1706, 2000

20. **Nygaard O, Vollset S.E. et al.**, Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. In: *JAMA* 274: 1526-1533, 1995.

21. **Ouyang Sh, Li YN et al.**, Association between MTR A2756G and MTRR A66G polymorphisms and maternal risk for neural tube defects: a meta-analysis. In: *Gene* 515. 308-312, 2013.

22. **Refsum H, Ueland PM, Nygaard O, and Vollset SE.** Homocysteine and cardiovascular disease. In: *Annu Rev Med* 49: 31-62, 1998

23. **Robinson K, Mayer EL et al.**, Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. In: *Circulation* 92: 2825-2830, 1995

24. **Rohini R.N., Khanna A. 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, In: *Fertility and Sterility* 99, N. 5, 2013

25. **Steed M, Tyagi S.**, Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia, In: *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 15, Nr.7, 2011

26. **Thomas P, Fenech M.**, Methylenetetrahydrofolate reductase, common polymorphisms and relation to disease, In: *Vitamins and Hormones* 79, 2008.

27. **Калашникова Е.А., Кокаровцева С.Н.** Ассоциация наследственных факторов тромбофилии с невынашиванием беременности у женщин в русской популяции, 2008