



MD 1731 Y 2023.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1731** (13) **Y**  
(51) Int.Cl: *A61B 10/00* (2006.01)  
*C12N 15/00* (2006.01)  
*C12Q 1/6806* (2018.01)  
*C12Q 1/6883* (2018.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE  
DE SCURTĂ DURATĂ**

<b>În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului</b>	
(21) Nr. depozit: s 2022 0089 (22) Data depozit: 2022.11.08	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2023.12.31, BOPI nr. 12/2023
(71) Solicitant: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: TIHAI Olga, MD; SPRINCEAN Mariana, MD; HADJIU Svetlana, MD; REVENCO Ninel, MD	
(73) Titular: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	

(54) **Metodă de stabilire a riscului dezvoltării malformațiilor congenitale cerebrale folat-dependente la copii**

(57) Rezumat:

1  
Invenția se referă la medicină, în special la genetica moleculară și poate fi utilizată pentru stabilirea riscului dezvoltării malformațiilor congenitale cerebrale folat-dependente la copii.

Esența invenției constă în aceea că se prelevează sânge de la mamă și se stabilește prezența mutațiilor în genele ciclului folaiilor, și anume MTHFR677, MTHFR1298, MTR2756, MTRR66 prin reacția de polimerizare în lanț. În cazul în care se

2  
determină prezența de mutație în una din gene, se stabilește un risc scăzut de dezvoltare a patologiei, în cazul în care se determină prezența de mutație în două gene, se stabilește un risc mediu de dezvoltare a patologiei, iar în cazul în care se determină prezența de mutație în trei sau toate genele, se stabilește un risc major de dezvoltare a malformațiilor congenitale cerebrale folat-dependente la copil.

Revendicări: 1

MD 1731 Y 2023.12.31

#### **(54) Method for determining the risk of developing folate-dependent congenital brain malformations in children**

##### **(57) Abstract:**

1  
The invention relates to medicine, in particular to molecular genetics, and can be used for determining the risk of developing folate-dependent congenital brain malformations in children.

Summary of the invention consists in that blood is taken from the mother and the presence of mutations in the folate cycle genes, namely MTHFR677, MTHFR1298, MTR2756, MTRR66, is determined by means of a chain polymerization reaction. If the presence of a

2  
mutation in one of the genes is determined, a low risk of developing pathology is established, if the presence of a mutation in two genes is determined, an average risk of pathology is established, and if the presence of a mutation in three or all genes is determined, a high risk of development of folate-dependent congenital brain malformations in a child is established.

Claims: 1

#### **(54) Метод определения риска развития фолат-зависимых врожденных пороков головного мозга у детей**

##### **(57) Реферат:**

1  
Изобретение относится к медицине, в частности к молекулярной генетике, и может быть использовано для определения риска развития фолат-зависимых врожденных пороков головного мозга у детей.

Сущность изобретения состоит в том, что делают забор крови у матери и устанавливают наличия мутаций в генах фолатного цикла, а именно MTHFR677, MTHFR1298, MTR2756, MTRR66 посредством реакции цепной

2  
полимеризации. В случае если определяют наличие мутации в одном из генов, устанавливают низкий риск развития патологии, в случае если определяют наличия мутации в двух генах, устанавливают средний риск развития патологии, а в случае если определяют наличие мутации в трех или во всех генах, устанавливают большой риск развития фолат-зависимых врожденных пороков головного мозга у ребенка.

П. формулы: 1

**Descriere:**

5 Invenția se referă la medicină, în special la genetica moleculară și poate fi utilizată pentru stabilirea riscului dezvoltării malformațiilor congenitale cerebrale folat-dependente la copii.

Malformațiile congenitale (MC) ale sistemului nervos central (SNC) reprezintă defecte ale tubului neural, cauzate de formarea incompletă a tubului neural în timpul embriogenezei (Wigglesworth J. S. Brain development and the structural basis of perinatal brain damage. *Perinat. Dev. Med.* 2012, vol. 17, p. 3-10). Problema profilaxiei MC este una foarte complexă și actuală la etapa de azi a dezvoltării științei medicale. Relevanța studiului se datorează proporției semnificative a acestor patologii în structura mortalității infantile, perinatale și a dezabilității copilului. Aceasta este determinată de frecvența înaltă a MC și a bolilor ereditare la nou-născuți (Бурлев В. А. Иммунохимическая диагностика пороков развития ЦНС у плода. *Вопросы охраны материнства и детства.* 1983, Т. 28, №2. с. 41-43; Войцехович Б. А., Тесленко Л. Г. К вопросу о распространенности врожденных пороков развития. *Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины.* М., 2000, №4, с. 7-11). Frecvența reală a MC, inclusiv a SNC, rămâne nespecificată, acest lucru se datorează dificultăților de diagnostic și diferitelor abordări ale înregistrării lor. Defectele tubului neural (DTN) ocupă unul din locurile principale printre toate anomaliile congenitale umane detectate (10...30%) (Ю. Е. Вельтищев, П. А. Темин, Ю. М. Белозеров, Е. Д. Белоусова, И. А. Иванова-Смоленская и др., под ред. Ю. Е. Вельтищева, П. А. Темина. *Наследственные болезни нервной системы. Текст.: руководство для врачей,* М., Медицина, 1998, 496 с.; Карлсон Б. *Основы эмбриологии по Пэттену:* пер. с англ. Текст. М., Медицина, в 2-х томах. Т.1, 360 с., Т.2. 390 с.). Cele mai răspândite DTN sunt anencefalia și spina bifida, care anual se înregistrează la 300 de mii de nou-născuți din întreaga lume (Botto L. D., Moore C. A., Khoury M. J., Erickson J. D. Neural tube defects. *N. Engl. J. Med.* 1999, vol. 341. p. 1509-1519).

Potrivit datelor Registrului Național al MC (CSRGM) la nou-născuți din Republica Moldova în perioada 2011...2018 incidența anomaliilor SNC este de 1,92 la 1000 de nou-născuți, dintre care anomaliile SNC ocupă 11% din toate anomaliile congenitale. Astfel, incidența hidrocefaliei este de 0,5 la 1000 de nou-născuți, anencefaliei – de 0,25 la 1000 de nou-născuți, microcefaliei – de 0,16 la 1000 de nou-născuți, spina bifida – de 0,38 la 1000 de nou-născuți (Sprincean M., Halabudenco E., Strătilă R., Secrieru V. et. al. The role of medical-genetic counseling and of prenatal diagnosis in the process of identification of congenital malformations. În: *Archives of the Balcan Medical Union. The official journal of the Balcan Medical Union.* Republica Moldova, 2013, p. 58; Barbova N., Egorov V., Sprincean M., Halabudenco E. Monitoring of congenital anomalies in the population of Republic of Moldova. În: *European Journal of Human Genetics.* Glasgow, Scotland, United Kingdom, 2015, p. 427). Potrivit datelor Registrului Central al Anomaliilor Congenitale (EUROCAT) incidența anomaliilor congenitale ale SNC în perioada 2011...2018 a fost de 1,03 la 1000 de nou-născuți. În lume incidența MC ale SNC este de la 0,17 până la 6,39 la 1000 de nou-născuți. În Europa incidența este de circa 1,16 cazuri la 1000 de nou-născuți, în SUA – constituie de la 0,8 până la 1,4 la 1000 de nou-născuți, în țările în curs de dezvoltare cum ar fi Africa și Asia incidența nașterii copiilor cu MC ale SNC este înaltă și constituie 2...6 la 1000 de nou-născuți (Бурлев В. А. Иммунохимическая диагностика пороков развития ЦНС у плода. *Вопросы охраны материнства и детства.* 1983. Т. 28, №2. с. 41-43).

Este cunoscută metoda de stabilire a malformațiilor congenitale cerebrale la copii prin efectuarea ultrasonografiei. Scopul principal al screening-ului este excluderea patologiei cromozomiale a fătului, cu toate acestea, ca parte a screening-ului din primul trimestru, examinarea cu ultrasunete efectuată de medici experți poate detecta multe malformații majore fetale, inclusiv malformații ale sistemului nervos central [1].

Dezavantajele metodei menționate constau în aceea că aceasta nu este specifică pentru malformații ale sistemului nervos central, este dificil de determinat la dimensiuni mici ale malformației, sunt necesare metode suplimentare de diagnostic.

Este cunoscută metoda de stabilire a riscului de dezvoltare a malformațiilor congenitale cerebrale, care constă în determinarea proteinei serice și anume  $\alpha$ -fetoproteina. În anii 80 s-au pus bazele conceptuale și metodologice ale screening-ului biochimic – determinarea proteinelor serice embrionare. Componenta principală a serului fetal la începutul sarcinii este  $\alpha$ -fetoproteina (AFP), este produsă de sacul vitelin și ficatul fătului, excretată prin urină în lichidul amniotic și intră în sângele mamei prin placentă sau membranele fetale. AFP se determină în sângele mamei de la 5...6 săptămâni, iar nivelul acesteia crește progresiv odată cu creșterea vârstei gestaționale. Este utilizată ca marker tumoral pentru detectarea și diagnosticarea cancerelor de ficat, testicule și ovare, dar și ca marker de monitorizare în sarcină pentru depistarea afecțiunilor de tip anencefalie, spina bifidă, trisomie 21/18 etc. [2].

Mai este cunoscută metoda de stabilire a riscului de dezvoltare a malformațiilor congenitale cerebrale, care constă în determinarea gonadotropinei corionice umane (hCG) în diferite malformații, modificări multidireționale ale nivelului de hCG în hidrocefalie. Modificările markerilor serici sunt caracteristice pentru 90,9% dintre femeile cu malformații congenitale ale sistemului nervos central [3].

5 Dezavantajele metodelor cunoscute constau în aceea că nu sunt eficiente, deoarece nu sunt specifice anume pentru malformațiile congenitale cerebrale, iar dereglarea conținutului markerilor serici ai alfa-fetoproteinei (AFP) și gonadotropinei corionice (hCG) pot fi cauza tumorilor de ficat, testicule și ovare, iar gonadotropina corionică poate fi utilizată în calitate de marker de monitorizare a sarcinii, iar pentru stabilirea unui diagnostic specific de malformație a sistemului nervos central sunt necesare  
10 examinări suplimentare.

Este cunoscută metoda de determinare a predispoziției spre procesele patologice prin analiza polimorfismelor în genele ciclului folatic și oferă posibilitatea de a lua măsuri în timp util prin indicarea terapiei de corecție. În calitate de procese patologice se menționează și dezvoltarea incompletă a tubului neural, anencefalia. Totodată, este menționat faptul că polimorfisme determinabile sunt MTHFR: 677  
15 C>T, MTHFR: 1298 A>C, MTR: 2756 A>, MTRR: 66 A>G [4].

Dezavantajul metodei menționate constă în aceea că se determină predispoziția de dezvoltare a malformațiilor, dar nu se determină riscul pentru o sarcină, care este necesar de a fi întreruptă sau de a păstra sarcina sau prognosticul pentru prezența unei sau mai multor mutații pentru complicațiile posibile, și anume pentru sistemul de medicină prespitalicesc.

20 Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode de stabilire timpurie a riscului de apariție a malformațiilor congenitale cerebrale folat-dependente la copii, și anume pentru determinarea polimorfismului genetic al genelor ciclului folat la mamele copiilor cu malformații congenitale cerebrale (MCC), pentru a efectua un diagnostic prenatal al MCC, care poate calcula rezultatele predictive ale unei sarcini fiziologice la mamele cu risc genetic crescut din anamneza  
25 colectat precedent, care ar putea fi recomandată în practică pentru medicii de familie, neonatologi, pediatri, neurologi pediatri, care gestionează familiile cu risc crescut de dezvoltare a malformațiilor congenitale cerebrale, dar și cei care determină metodele de tratament și supraveghează acești pacienți, totodată pentru optimizarea măsurilor privind profilaxia nașterii copiilor cu astfel de patologii în familiile cu risc crescut la nivelul instituțiilor prespitalicesci.

30 Esența invenției constă în aceea că se prelevează sânge de la mamă și se stabilește prezența mutațiilor în genele ciclului folatilor și anume MTHFR677, MTHFR1298, MTR2756, MTRR66 prin reacția de polimerizare în lanț. În cazul în care se determină prezența de mutație în una din gene, se stabilește un risc scăzut de dezvoltare a patologiei, în cazul în care se determină prezența de mutație în două gene, se stabilește un risc mediu de dezvoltare a patologiei, iar în cazul în care se determină prezența  
35 de mutație în trei sau toate genele, se stabilește un risc major de dezvoltare a malformațiilor congenitale cerebrale folat-dependente la copil.

Rezultatul invenției constă în stabilirea timpurie a riscului de apariție a malformațiilor congenitale cerebrale folat-dependente la copii, totodată optimizarea măsurilor privind profilaxia nașterii copiilor cu astfel de patologii în familiile cu risc crescut utilizate la nivelul instituțiilor prespitalicesci, cu  
40 reducerea nivelului invalidității și incidenței malformațiilor congenitale cerebrale (MCC) printre copii, programarea nașterii unui copil sănătos.

Avantajele metodei de stabilire a riscului dezvoltării malformațiilor congenitale cerebrale folat-dependente sunt:

- 45 - este una din cele mai informative și exacte metode atât în diagnosticul clinic, cât și în cercetările științifice a patologiilor malformative;
- este relativ rapidă pentru un diagnostic și un pronostic cât mai precoce a MCC;
- din punct de vedere financiar este relativ necostisitoare;
- structurile din sistemul de sănătate vor folosi aceste rezultate pentru dezvoltarea tacticilor de profilaxie și management al familiilor cu risc crescut și al gravidelor pentru profilaxia unei MCC la făt;
- 50 - cu ajutorul acestei metode este posibil precizarea riscului relativ de dezvoltare a MCC folat-dependente la alți copii din familie cu copii cu MCC;
- duce la reducerea nivelului invalidității și incidenței MCC printre copii;
- poate fi efectuată programarea unei nașteri a unui copil sănătos în familiile cu risc crescut la nivelul instituțiilor prespitalicesci;
- 55 - planificarea tipului și volumului necesar de îngrijiri medicale ale copiilor cu MCC și ameliorarea reabilitării sociale a familiilor cu astfel de copii.

Metilentetrahidrofolat reductaza (MTHFR), o genă cheie de metabolizare a folatilor, este localizată pe cromozomul 1. Mai multe polimorfisme de o singură nucleotidă (SNP) nesinonime sunt prezente în regiunea codificatoare a genei, pozițiile 677. MTR este format din 5 regiuni importante,

inclusiv legarea homocisteinei, 5-metiltetrahidrofolat (5-metilTHF) – domeniul legare, cap, domenii de legare a cobalaminei și domenii de legare a S-adenosil-metioninei (SAM). Gena MTR este localizată pe cromozomul 1q43. MTR este o enzimă dependentă de vitamina B12 implicat în metabolismul cu un 1 C mediat de folat. Aceasta catalizează metilarea homocisteinei la metionină cu conversie simultană a 5-metil-tetrahidrofolatului (5-metil-THF) în tetrahidrofolat (THF). THF este primordial pentru sinteza nucleotidelor. Metionina este esențială pentru sinteza S-adenosil-metioninei (SAM) și ADN metiltransferazelor (DNMT), care transferă gruparea metil de la SAM la ADN. MTR și MTRR sunt două enzime cheie ale sintezei metioninei prin remetilarea homocisteinei. MTRR catalizează restabilirea metilcobalaminei, într-o formă redusă, ca un cofactor al metionin sintazei, în timpul ciclului său catalitic. Enzima metionin sintaza reductaza (MTRR) joacă un rol cheie în metabolismul homocisteinei dependent de folat și face parte din familia transferazelor de electron. Enzima are 3 situsuri caracteristice care leagă FMN, FAD și NADH. MTRR este responsabil pentru reglarea metionin sintazei (MTR) prin metilare reductivă. Activitatea defectuoasă al acestei enzime catalitice poate duce la niveluri majorate de homocisteină. MTRR este o genă de întreținere și este localizată la cromozomul 5 (5p15.2-p15.3). Malnutriția și malabsorbția de folat și vitamina B12 sau un defect enzimatic moștenit, cum este deficiența de MTHFR, pot duce la hiperhomocisteinemie.

Impactul major al frecvenței acestor stări patologice la copii se explică prin faptul că influența anumitor factori teratogeni și mutageni pe parcursul perioadelor precoce ale ontogenezei generează apariția modificărilor genotipice și fenotipice la copii (Войцехович Б. А., Тесленко Л. Г. К вопросу о распространенности врожденных пороков развития. Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. М., 2000. p. 7-11). În majoritatea cazurilor este posibil de a stabili natura multifactorială a anomaliilor congenitale. În acest sens, rămâne relevantă, căutarea celor mai informativi factori de risc pentru dezvoltarea lor, care fac posibilă prezicerea probabilității acestei patologii și planificarea măsurilor preventive pentru a preîntâmpina nașterea copiilor cu MC cerebrale. Diverse efecte combinate ale multor factori pot fi cauzele principale.

S-a dovedit că o contribuție semnificativă în apariția MCC la copii are starea inițială de sănătate a părinților, efectele adverse ale mediului, infecțiile intrauterine și cauza ereditară (Бурлев В. А. Иммунохимическая диагностика пороков развития ЦНС у плода Текст. В. А. Бурлев. Вопросы охраны материнства и детства. 1983, Т. 28, №2, С. 41-43; Ю. Е. Вельтищев, П. А. Темин, Ю. М. Белозеров, Е. Д. Белоусова, И. А. Иванова-Смоленская и др. Наследственные болезни нервной системы. М. Медицина, 1998, 496 с; Frey L., Hauser W. A. Epidemiology of neural tube defects. Epilepsia. 2003, vol. 44, Suppl 3, p. 4-13).

Un șir de review-uri sistematice, studii clinice și de meta-analiză randomizate au demonstrat o scădere semnificativă a DTN cu circa 70% în cazul administrării suplimentelor cu folat și în perioadele critice ale organogenezei, până și după concepere (Lumley J. et al. Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2007. Issue 4. Art. No.: CD001056. DOI; Blencowe H. et al. Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders// Int. J. Epidemiol. 2010. vol. 39. Suppl. 1, p. 10-21).

Ciclul folat reprezintă procesul de cascadă, controlat de fermeți, care în calitate de cofermenți conțin derivați ai acidului folic. Etapa crucială în acest proces este sinteza metioninei din homocisteină (McPartlin J., Halligan A., Scott J. M., Darling M., Weir D. G. Accelerated folate breakdown in pregnancy. Lancet, 1993, vol. 341, p. 148-149).

Dereglaarea ciclului folatic duce la acumularea homocisteinei în celule și la creșterea nivelului general al homocisteinei în plasmă. Homocisteina are un efect toxic exprimat, aterogen și trombofilic, ce condiționează riscul sporit de dezvoltare a unui șir de procese patologice, anume defecte ale dezvoltării fătului (dezvoltarea incompletă a tubului neural, anencefalia, deformarea scheletului facial) (European Platform on Rare Disease Registration, <https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/en>; Lumley J. et al. Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2007, Issue 4. Art. No.: CD001056. DOI). Acidul folic, având un rol important în ciclul celular, determină închiderea normală a tubului neural și, ca urmare, contribuie la preîntâmpinarea riscului apariției MCC, deoarece deficitul acidului folic poate fi un factor de risc semnificativ în dezvoltarea anomaliilor SNC. Luând în considerare că acționând la metilarea ADN-ului, acidul folic are un rol fundamental în procesele de diviziune celulară, în mod deosebit pentru țesuturile cu diviziune celulară activă. Este important de efectuat o analiză riguroasă a cazurilor nașterii copiilor cu MC inclusiv și prin efectuarea analizei defectelor genice.

Datele prezentate în literatura de specialitate atestă o problemă clinică considerabilă și, adesea un pronostic nefavorabil la copiii născuți cu diverse anomalii sau afecțiuni cerebrale intrauterine. Analizând diferiți factori care conduc la dezvoltarea MC, constatăm necesitatea întreprinderii măsurilor de diminuare a riscului dezvoltării malformațiilor la făt (Prevention of neural tube defects: results of the

Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. Lancet. 1991, vol. 338, p. 131-137; Недзьведь М. К. Врожденные пороки развития центральной нервной системы. Минск, 1990. с.78). Pană în prezent, în Republica Moldova nu a fost efectuată o analiza amplă a factorilor de risc prenatali și identificarea acestora în etiopatogeneza MC cerebrale folat-dependente, începând cu cele mai timpurii stadii ontogenetice de dezvoltare.

În cadrul monitorizării cazurilor de MC înregistrate în Republica Moldova în ultimii ani, au apărut informații cu privire la frecvența și structura malformațiilor în diferite regiuni ale țării, dar rezultatele cercetării prezentate pe această problemă în literatură sunt puține și contradictorii. Nu există suficiente informații cu privire la managementul MC ale SNC, frecvența detectării principalelor sindroame neurologice și rezultatelor examinării instrumentale ale acestor copii. La fel, nu există un singur punct de vedere cu privire la diagnosticarea complexă a defectelor SNC în perioadele prenatală și postnatală. În cazul studierii acestei probleme, cercetătorii atrag o atenție deosebită asupra stării SNC și, mai puțin, asupra volumului și caracterului patologiilor somatice, care sunt strâns legate de patologia de bază. Acest postulat face ca problema studiată să fie actuală din punct de vedere teoretic și practic.

În cadrul studiului s-a efectuat examenul paraclinic de laborator prin metoda reacției de polimerizare în lanț în timp-real (PCR RT) pentru determinarea polimorfismului anumitor gene implicate în sintetizarea acidului folic (genelor ciclului folaților MTHFR677; MTHFR1298; MTR2756; MTRR66) la mame, după aprecierea riscului genetic. Este suficient prelevarea sangelui doar de la mama și nu de la ambii părinți deoarece genele implicate în sintetizarea acidului folic nu se transmit după modul mendelian autozomal-dominant sau autozomal-recesiv când este necesară analiza molecular-genetică atât a mamei, cât și a tatălui, dar se transmit multifactorial (poligenic). Explorările instrumentale non-invasive funcționale vor include: diagnosticul postnatal (evaluarea parametrilor ultrasonografiei cerebrale, electroencefalografiei, tomografiei computerizate cerebrale, rezonanței magnetice nucleare cerebrale). În studiu au fost selectați 140 de copii cu MCC, dintre care 70 de copii cu MCC folat-dependente și 70 de copii cu MCC non-folat-dependente și structurarea particularităților clinico-paraclinice în funcție de vârsta copilului. A fost efectuată studierea manifestărilor clinice și consecințele MC ale SNC la copii. Studiul genetic al anumitor gene implicate în sintetizarea acidului folic la 70 de mame ale copiilor cu MCC folat-dependente și 70 de mame ale copiilor cu MCC non-folat-dependente.

În urma analizei rezultatelor obținute s-a stabilit că la copiii cu MCC folat-dependente s-a determinat mutații la una sau mai multe gene ale ciclului folaților și anume MTHFR677; MTHFR1298; MTR2756; MTRR66 și totodată s-a determinat prezența muțațiilor menționate la mamele lor, iar la mamele la care s-au determinat prezența muțațiilor în una sau mai multe gene ale ciclului folaților s-a stabilit prezența diferitor malformații congenitale ale SNC la copiii lor, și anume în cazul în care s-a determinat prezența de mutații în trei sau toate genele menționate la toți copiii mamelor respective s-a stabilit prezența malformațiilor congenitale ale SNC, iar în cazul în care s-a determinat prezența de mutații în una sau două gene respective s-a stabilit la 50...70% din copii prezența malformațiilor congenitale ale SNC.

Prin urmare, în cazul în care se determină prezența de mutație în una din genele ciclului folaților și anume MTHFR677, MTHFR1298, MTR2756, MTRR66, se stabilește un risc scăzut de dezvoltare a patologiei, în cazul în care se determină prezența de mutație în două gene, se stabilește un risc mediu de dezvoltare, iar în cazul în care se determină prezența de mutație în trei sau toate genele, se stabilește un risc major de dezvoltare a malformațiilor congenitale cerebrale folat-dependente la copil.

Recomandările practice elaborate în baza rezultatelor obținute vor permite evaluarea timpurie și diagnosticarea precoce a MCC folat-dependente. Rezultatele vor fi implementate prin suport metodologic în procesul de evaluare a conduitei copilului cu MCC folat-dependente în activitatea specialiștilor care activează în instituțiile medico-sanitare de profil pediatric (geneticieni, neonatologi, neurologi pediatri, pediatri, neurochirurgi, medici de familie).

#### Exemplu

Gravida C, 27 ani, perioada de sarcină - II-III trimestru, la examenul de ultrasonografie fătul corespunde la 20,4 de săptămâni.

Concluzie ecografică: Sarcină uterină monofetală ce corespunde la 20,4 de săptămâni. Deformarea coloanei vertebrale la nivelul regiunii toracice. Suspecție la MCC. Suspecție de artrogripoză. Stare funcțională fetală normală. S-a luat decizia de a investiga gravida conform metodei revendicate (Tabel).

Tabel

Gena investigată <i>Polimorfismul investigat</i>	Genotip determinat	Genotip normal	Comentarii
Gena MTHFR/ metilentetrahidrofolatreductaza Polimorfism677 C>T (A222V)	T/ T	C/C	Scăderea activității funcționale ale enzimei până la 60% de la medie. Deficitul de MTHFR poate predispune către acțiune teratogenă și mutagenă.
Gena MTHFR/ metilentetrahidrofolatreductaza Polimorfism1298 A>C(E429A)	A/A	A/A	Polimorfizm fără particularități.
Gena MTR/ metionin sintaza B12- dependentă Polimorfism2756 A>G(D919G)	A/G	A/A	Scăderea activității funcționale ale enzimei. Se dezvoltă un grad moderat de hiperhomocisteinemie.
Gena MTRR/ metionin sintaza reductaza Polimorfism66 A>G(I22M)	A/G	A/A	Scăderea activității funcționale ale enzimei. Accentuiază hiperhomocisteinemia, cauzată de polimorfismul 677 C>T a genei MTHFR.

Comentariu: Gena MTHFR/ metilentetrahidrofolatreductaza (polimorfism 677 C>T)

5 Genotipul determinat - T/T, este considerat genotip patologic. Gena MTHFR codifică 5,10 -  
metilentetrahidrofolatreductaza - enzima cheie a ciclului folat, care transformă 5,10 -  
metilentetrahidrofolatreductaza în 5 - metilentetrahidrofolat (catalizatorul necesar pentru reacția de  
10 transformare a homocisteinei în metionină). Dereglarea metabolismului folat afectează funcția ovariană,  
implantarea embrionului, embriogeneza și întregul proces de sarcină (Goh Y. I., Bollano E., Einarson T.  
R. et al. Prenatal multivitamin supplementation and rates of congenital anomalies: a meta-analysis. J.  
Obstet. Gynaecol. Can. 2006, vol. 28, p. 680-689). În plus față de efectul bine stabilit asupra incidenței  
15 defectelor tubului neural, s-au constatat asociații între nivelurile reduse de acid folic și concentrațiile  
crescute de homocisteină, pe de o parte, și avorturile spontane recurente și alte complicații ale sarcinii pe  
de altă parte (Choumenkovitch S. F., Selhub J, Wilson P. W. et al. Folic acid intake from fortification in  
United States exceeds predictions. J. Nutr. 2002, vol. 132, p. 2792-2798). La pacienții supuși  
20 hiperstimulării ovariene și prelevării ovocitelor, s-a constatat că purtătorii mutației MTHFR 677TT au o  
concentrație mai scăzută de estradiol în timpul ovulației și pot fi prelevate mai puține ovocite (Chavarro J.  
E., Rich-Edwards J. W., Rosner B. A. et al. Use of multivitamins, intake of B vitamins, and risk of  
ovulatory infertility. Fertil. Steril. 2008, vol. 89, p. 668-676). La purtătorii genotipului MTHFR 677TT  
care au primit suplimente adecvate, s-a constatat o creștere semnificativă a concentrațiilor de hormon  
25 anti-mulerian (AMH), ceea ce ar putea indica un mecanism compensatoriu (Hecht S., Pavlik R., Lohse P.  
et al. Common 677C->T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects follicular  
estradiol synthesis. Fertil Steril. 2009, vol. 91, p. 56-61). Concentrațiile de AMH la purtătorii homozigoți  
ai genotipului MTHFR 677TT ar putea fi chiar supraestimate, deoarece sunt prelevate cu aproximativ  
30 20% mai puține ovocite comparativ cu indivizii purtători MTHFR 677CC (Pavlik R., Hecht S.,  
Ochsenkühn R. et al. Divergent effects of the 677C>T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate  
reductase (MTHFR) gene on ovarian responsiveness and anti-Müllerian hormone concentrations. Fertil  
Steril. 2011, vol. 95, p. 2257-2262). Acest polimorfism crează riscuri suplimentare pentru trombofilie, de  
asemenea, este asociat cu toxicoză la termen mare a sarcinii, risc de avort spontan, deficiențe de  
dezvoltare a fătului și risc de dezvoltare a diverselor maladii oncologice. Caracteristic pentru purtătorii  
acestui genotip este numărul mare de pierderi de sarcină.

Comentariu: Gena MTHFR/ metilentetrahidrofolatreductaza (polimorfism 1298 A>C).

Genotipul determinat - A/A, este considerat genotip normal, fără particularități.

Comentariu: Gena MTR/ metionin sintaza B12-dependentă (polimorfism determinat).

35 Genotipul determinat - A/G, este considerat genotip patologic. Gena MTR, codifică enzima  
metionin sintaza, responsabilă de metilarea homocisteinei și transformarea ei în metionină. Efectul  
prezenței acestui polimorfism este creșterea moderată a nivelului de homocisteină. Enzima MTR  
(metionin sintaza) este o enzimă intracelulară care catalizează remetilarea homocisteinei pentru a forma  
40 metionina. Intermediarul purtător al grupării metil în această reacție este un derivat al vitaminei B12 -  
metilcobalamina, care acționează ca o coenzimă (Huo Y., Li J., Qin X., Huang Y., Wang X., Gottesman  
R. F., Tang G., Wang B., Chen D., He M., et al. Efficacy of folic acid therapy in primary prevention of

stroke among adults with hypertension in China: The CSPPT randomized clinical trial. *JAMA* 2015, vol. 313, p. 1325-1335). Markerul genetic A2756G (Asp919Gly) este cel mai studiat polimorfism al genei MTR, care se manifestă prin înlocuirea adeninei (A) în poziția 2756 cu guanina (G), ceea ce duce la perturbarea căilor metabolice a transformării homocisteinei și creștere acestuia în plasma sanguină (Barbosa P. R., Stabler S. P., Machado A. L., Braga R. C., Hirata R. D., Hirata M. H., Sampaio-Neto L. F., Allen R. H., Guerra-Shinohara E. M. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2008, vol. 62, p. 1010-1021). Nivelul crescut al homocisteinei plasmatică este considerat, în prezent, ca un factor de risc independent, pentru afecțiunile vasculare periferice, cerebrale și coronariene, pentru evenimentele trombotice, (Czeizel A. E., Dudas I., Vereczky A., Banhidy F. Folate deficiency and folic acid supplementation: The prevention of neural-tube defects and congenital heart defects. *Nutrients* 2013, vol. 5, p. 4760-4775) inclusiv, complicațiile obstetrice, cum ar fi detașarea prematură a unei placentă situate normal, avortul, hipoxia cronică fetală și preeclampsia (Santilli F., Davi G., Patrono C. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase, folate status and atherothrombosis: A mechanistic and clinical perspective. *Vascul Pharmacol* 2015).

Comentariu: Gena MTRR/ metionin sintaza reductaza (polimorfism determinat)

Genotipul determinat - A/G, este considerat genotip patologic. Gena MTRR codifică enzima metionin-sintaza-reductaza, necesară pentru susținerea activității metionin-sintazei prin restabilirea metilării. Scăderea activității funcționale a enzimei este asociată hiperhomocisteinemiei cauzate de polimorfismul 677CT din gena MTHFR. Testarea genetică se efectuează pentru aprecierea predisunerii genetice către următoarele patologii: hiperhomocisteinemia, bolile cardiovasculare, scindarea tubulară neurală (spina bifida), anomalii cromozomiale (sindromul Down) la făt. Frecvența întâlnirii în populație a alelei G la europeni este de 54 %. Genotipul determinat A/G, presupune înlocuirea bazei A (Adeninei) în poziția 66 a genei MTRR cu baza G (Guanina) și este desemnat ca marker genetic A66G. În consecință, se schimbă și proprietățile biochimice ale enzimei, în care are loc înlocuirea izoleucinei cu metionină. Ca rezultat al acestei înlocuiri, funcțional activitatea enzimatică scade, ceea ce duce la un risc crescut de tulburări de dezvoltare a fătului, cum ar fi defectul tubului neural. Polimorfismul 66A> G este asociat cu apariția defectelor tubului neural și dublează riscul de spina bifida (Shaw G. M., Lu W., Zhu H., Yang W., Briggs F. B., Carmichael S. L., Barcellos L. F., Lammer E. J., Finnell R. H. "118 SNPs of folate-related genes and risks of spina bifida and conotruncal heart defects". *BMC Medical Genetics*. June 2009, vol. 10, p. 49). Corelația dintre acest polimorfism și riscul crescut de cancer pulmonar este prezentă în cazul aportului scăzut de folat și al vitaminei B12 ridicate, ceea ce sugerează un mecanism de acțiune independent de vitamina B12 (Shi Q., Zhang Z., Li G., Pillow P. C., Hernandez L. M., Spitz M. R., Wei Q. "Polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase and risk of lung cancer: a case-control analysis" *Pharmacogenetics and Genomics*. August 2005, vol. 15 (8), p. 547-555). Această mutație este, de asemenea, asociată cu un risc crescut de cancer colorectal, leucemie limfoblastică acută, cancer al vezicii urinare, neoplazie intraepitelială cervicală, limfom non-Hodgkin și carcinom cu celule scuamoase esofagiene (Matsuo K., Hamajima N., Hirai T., Kato T., Inoue M., Takezaki T., Tajima K. "Methionine Synthase Reductase Gene A66G Polymorphism is Associated with Risk of Colorectal Cancer". *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2002, vol. 3 (4), p. 353-359). Metilarea homocisteinei la metionină este afectată, în primul rând prin polimorfismul (MTRR): c.66A> G. Creșterea cronică a homocisteinei crește nivelele de S-adenosil-L-homocisteină, inhibând în consecință activitatea metiltransferazei și promovând hipometilarea ADN-ului. Mamele homozigote pentru această mutație (genotipul GG) prezintă un risc mai mare de a avea un copil cu sindrom Down în comparație cu heterozigotele (genotipul GA) (O'Leary V. B., Parle-McDermott A., Molloy A. M., Kirke P. N., Johnson Z., Conley M., Scott J. M., Mills J. L. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome?. *American Journal of Medical Genetics*. January 2002, vol. 107 (2), p. 151-155). Alela mutantă homozigotă promovează hipometilarea ADN și non-disjunția meiotică, crescând riscul de sindrom Down. Acest polimorfism se asociază cu o creștere de risc de 2,5 ori independent și cu o creștere de 4 ori a riscului atunci când este co-exprimită cu mutația 677C> T MTHFR (Hobbs C. A., Sherman S. L., Yi P., Hopkins S. E., Torfs C. P., Hine R. J., Pogribna M., Rozen R., James S. J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *American Journal of Human Genetics*. September 2000, vol. 67(3), p. 623-630). Combinarea acestui polimorfism cu polimorfismul genetic MTR2756A> G ridică și mai mult riscul de sindrom Down (Martínez-Frías M. L., Pérez B., Desviat L. R., Castro M., Leal F., Rodríguez L., Mansilla E., Martínez-Fernández M. L., Bermejo E., Rodríguez-Pinilla E., Prieto D., Ugarte M. Maternal polymorphisms 677C-T and 1298A-C of MTHFR, and 66A-G MTRR genes: is there any relationship between polymorphisms of the folate pathway, maternal homocysteine levels, and the risk for having a child with Down syndrome?. *American Journal of Medical Genetics. Part A*. May 2006, vol. 140 (9), p. 987-997).



În urma investigației s-a determinat prezența mutațiilor în MTHFR677, MTR2756, MTRR66, ceea ce corespunde unui risc major de dezvoltare a malformațiilor congenitale cerebrale folat-dependente la copil, care poate fi utilizate la nivel de instituții prespitalicești.

## **(56) Referințe bibliografice citate în descriere:**

1. Николаидес К. Ультразвуковое исследование в 11-13 недель беременности. Пер. с англ. А. Михайлова, Е. Некрасовой. СПб, Петрополис, 2007, 144 с.
2. Новиков П.В. Принципы организации медико-генетической помощи детям с наследственной патологией. Диагностика и лечение врожденных и наследственных заболеваний у детей. Путеводитель по клинической генетике. М., Триада - X, 2004, с. 489-504
3. Трубникова Л.И. и др. Эпидемиология врожденных пороков развития плода (ВПП) в Ульяновской области. Материалы XII Всерос-сийского науч. форума «Мать и дитя». М., 2011, с. 529-530
4. Analiza polimorfismelor în genele ciclului folatic. 02 Decembrie 2018, [online] Găsit în Internet: <https://www.invitro.md/blog/analise/ciclul-folatilor>.

## **(57) Revendicări:**

Metodă de stabilire a riscului dezvoltării malformațiilor congenitale cerebrale folat-dependente la copii, care constă în aceea că se prelevează sânge de la mamă și se determină prezența mutațiilor în genele ciclului folatilor, și anume MTHFR677, MTHFR1298, MTR2756, MTRR66 prin reacția de polimerizare în lanț, în cazul în care se determină prezența de mutație în una din gene, se stabilește un risc scăzut de dezvoltare a patologiei, în cazul în care se determină prezența de mutație în două gene, se stabilește un risc mediu de dezvoltare a patologiei, iar în cazul în care se determină prezența de mutație în trei sau toate genele, se stabilește un risc major de dezvoltare a malformațiilor congenitale cerebrale folat-dependente la copil.