



UNIVERSITETI KATOLIK
“ZOJA E KËSHILLIT TË MIRË”

FAKULTETI I FARMACISË

DOKTORATË NË

“SHËNDET PUBLIK, DIAGNOZË MOLEKULARE E SËMUNDJEVE
INFEKTIVE DHE FARMAKOVIGJILANCË”

EDICIONI I DYTË

TEMA

*“Vlerësimi i Marrëdhënies ndërmjet Homocisteinës dhe
Inflamacionit Vaskular si dhe Vlerësimi i Rolit Mbrojtës të
Sulfurit të Hidrogjenit H₂S, ndaj Stresit Oksidativ i Shkaktuar nga
Homocisteina”*

UDHËHEQËS SHKENCOR
Prof. Bruno ZAPPACOSTA

KANDIDATI
ELISA DOMI
MATRIKULLA Zo725N070001

VITI AKADEMIK

2021- 2022

Fusha e interesit: Shëndeti Publik

Fjalë kyçe: Homocisteinë, Sulfur hidrogjeni, 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza, Polimorfizma.

Shkurtime:

3-merkaptopiruvat sulfur transferazë (3-MTS)

5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR)

5,10-metiltetrahidrofolat (5,10-MTHF)

Cistationine γ liaza (CSE)

Cisteinë aminotransferazë (CAT)

Cystathionine β sintaza (CBS)

Faktor i rritjes së indit lidhor (CTGF)

Faktori i nekrozës tumorale α (TNF α)

Faktori i transkriptimit bërthamor kappa B (NF-kB)

Hiperhomocisteinemia (Hhcy)

Homocisteinë (Hcy)

Metaloproteinaza e matricës (MMPs)

Metionina sintazë (MS)

Oksid nitrik sintazë endoteliale (eNOS)

Piridoksal -5'- fosfat (PLP)

S-adenozilhomocisteinë (SAH)

S-adenozilmetioninë (SAM)

Sëmundjet kardiovaskulare (CVD)

Superoksid dismutazë (SOD)

Tetrahidrofolat (THF)

Lista e tabelave:

Tabela 2.1a. Performanca e të dhënave.

Tabela 2.1b. Saktësia e analizës.

Tabela 3.1. Karakteristikat e popullsisë pjesëmarrëse.

Tabela 3.2. Vlerat e homocisteinës sipas kategorive të ndryshme.

Tabela 3.3. Përqindja e pacientëve që tregojnë nivele normale të homocisteinës.

Tabela 3.4. Analizë e shumëfishtë e regresionit logjistik të vlerave të homocisteinës në lidhje me parametrat e tjerë.

Tabela 3.5. Frekuenca e gjenotipit dhe frekuenca alelike për polimorfizmin C677T.

Tabela 3.6. Frekuenca e gjenotipit dhe frekuenca alelike për polimorfizmin A1298C.

Tabela 3.7. Frekuenca e gjenotipeve të ndryshme për polimorfizmat C677T dhe A1298C.

Tabela 3.8. Përqendrimet mesatare të homocisteinës bazuar në gjenotipin e dy polimorfizmave.

Lista e figurave

Figura 1.1. Paraqitja skematike e zhvillimit të pllakës aterosklerotike (Pontieri et al., 2005).

Figura 1.2. Cikli Metabolik i Homocisteinës (Domi et al., 2021).

Figura 1.3: Paraqitja skematike e lidhjes midis metabolizmit të homocisteinës dhe prodhimit të H₂S (Testai et al., 2021).

Figura 1.4. Reaksionet e sintezës së H₂S të katalizuara nga enzima CSE: a) α , β -eliminimi i cisteinës; b) β zëvendësimi me kondensimin e dy molekulave të cisteinës; c) β - ose γ -zëvendësimi me kondensim të një molekule cisteine dhe një molekule homocisteine; d) α , β -eliminimi i cisteinës; e) α , γ -eliminimi i homocisteinës; f) γ -zëvendësimi me kondensim të dy molekulave të homocisteinës (Giuffre e Vicente, 2018).

Figura 1.5. Efektet mbrojtëse të H₂S kundër mosfunksionimit endotelial (Citi et al., 2021).

Figura 2.1. Kimia TaqMan.

Figura 3.1. Trendi i niveleve të homocisteinës në gjak me rritjen e numrit të porcioneve të frutave dhe perimeve të konsumuara çdo ditë.

Figura 3.2. Reduktimi i përqendrimit të homocisteinës në gjak me rritjen e aktivitetit fizik javor.

Figura 3.3. Përqindja e pacientëve me nivele normale të homocisteinës bazuar në aktivitetin fizik javor.

Indeksi

HYRJE	2
1.1 Patologjitë kardiovaskulare	2
1.1.1 Ateroskleroza	2
1.2 Homocisteina.....	5
1.2.1 Aspekte historike.....	5
1.2.2 Biokimia	7
1.2.3 Aspektet fiziopatologjikë.....	10
1.2.4 Homocisteina dhe H ₂ S.....	11
1.3 Enzima MTHFR	23
1.3.1 Folatet.....	24
1.3.2 Vitamina B ₁₂	24
1.3.3 Polimorfizmat e enzimës MTHFR	25
QËLLIMI I STUDIMIT	31
MATERIALE DHE METODA	32
2.1 Pjesëmarrësit	32
2.2 Vlerësimi klinik	33
2.3 Marrja, ruajtja dhe dërgimi i kampioneve.....	33
2.4 Dozimi homocisteinës.....	34
2.4.1 Përgatitja e mostrës	34
2.4.2 Kromatografia e lëngshme.....	34
2.4.3 Spektrometria e masës.....	34
2.5 Gjenotipizimi i enzimës MTHFR	36
2.5.1 Ekstraktimi i ADN-së.....	36
2.5.2 Qasjet molekulare për studimin e polimorfizmave të nukleotidit të vetëm (SNP) - Polymerase Chain Reaction (PCR).....	36
2.5.3 Sekuencimi tradicional	37
2.5.4 Real Time PCR	38
2.6 Analiza statistikore	40
REZULTATE DHE DISKUTIME	40
3.1 Homocisteina.....	42

3.2 Polimorfizmat e enzimës MTHFR	48
3.3 Polimorfizmat dhe homocisteina.....	50
3.4 Diskutim.....	52
<i>Bibliografia</i>	57

ABSTRAKT

Sëmundjet kardiovaskulare përfshijnë një grup çrregullimesh ndër të cilat aterosklerozën, dhe një parametër tregues i aterosklerozës është hiperhomocisteinemia (Hhcy). Faktorët që mund të favorizojnë rritjen e niveleve të homocisteinës (Hcy) janë të ndryshëm, midis tyre çrregullimi i enzimës 5-10-metilentetrahidrofolatë reduktazë (MTHFR), moshë dhe dieta ushqimore. Nivelet e Hcy ndikojnë gjithashtu në sintezën e sulfurit të hidrogjenit (H₂S), një gazotransmetues endogjen me veti antiinflatore. Ndaj qëllimi i studimit është vlerësimi indirekt i H₂S duke u nisur nga matja e përqëndrimit në gjak i Hcy. Pas kësaj, gjenotipizimi i MTHFR mund të japë informacione në lidhje me shkaqet e mundshme të rritjes së niveleve të Hcy. Janë 412 gra shqiptare të moshës 19-44 vjeç që kanë marrë pjesë në studim. Analizat treguan se përqëndrimi total i Hcy është 10.32 µmol l⁻¹ dhe grupmosha me vlerat më të larta përfaqësohet nga gratë e moshës 30-39 vjeç.

Rritja e konsumimit të frutave dhe perimeve, sikurse aktiviteti fizik duket se sjellin një reduktim të niveleve të Hcy. Në lidhje me gjenotipizimin e MTHFR, u studiuuan dy polimorfizmat kryesore, C677T dhe A1298C. Për polimorfizmin C677T 49.7% e grave shfaqin gjenotipin CT; ndërsa për polimorfizmin A1298C, 52.4% shfaqin gjenotipin AA. Në mënyrë që të reduktohen nivelet e Hcy dhe të parandalohen kështu sëmundjet kardiovaskulare, përdorimi i dhuruesve të H₂S po bëhet gjithnjë e më interesant.

Fjalë kyçe: Homocisteina; Sulfur Hidrogjeni; enzima 5-10-metilentetrahidrofolatë reduktazë; Polimorfizma
Fusha e Interesit: Shëndeti Publik

ABSTRACT

Cardiovascular disease includes a group of disorders including atherosclerosis. One of the markers related to atherosclerosis is Hyperhomocysteinemia (HHcy). There are several factors that can favor the increase of homocysteine (Hcy) levels, among them alterations of 5-10-methyltetrahydrofolate reductase enzyme (MTHFR), age and nutritional factors. Hcy levels influence also the synthesis of hydrogen sulfide (H₂S), an endogenous gasotransmitter that performs as an anti-inflammatory agent. The aim of the study is to indirectly evaluate the role of H₂S starting from the dosage of Hcy. After that, MTHFR genotyping can provide information about potential causes of elevated Hcy. 412 Albanian women aged 19-44 were the volunteers studied. The analyses showed that the total mean concentration of Hcy is 10.32 µmol l⁻¹ and the age group with the highest levels is represented by women aged 30 to 39 years. It emerged that the increasing consumption of fruits and vegetables and physical activity lead to a reduction of Hcy levels. Regarding the MTHFR genotyping, the two most common polymorphisms, C677T and A1298C, were considered. For polymorphism C677T 49.7% of women have the CT genotype; while for the A1298C polymorphism, 52.4% have the AA genotype. In order to reduce Hcy levels and to prevent the onset of cardiovascular diseases, the use of H₂S donors is becoming increasingly interesting.

Keywords: Homocysteine; Hydrogen sulfide; 5-10-methyltetrahydrofolate reductase enzyme; Polymorphisms.

Issue section: Public health.

HYRJE

1.1 Patologjitë kardiovaskulare

Sëmundjet kardiovaskulare (CVD) përfshijnë një grup çrregullimesh të zemrës dhe enëve të gjakut. Në to bëjnë pjesë ishemitë e zemrës, të tilla si infarkti akut i miokardit dhe angina pectoris, dhe sëmundjet cerebrovaskulare, si për shembull goditjet ishemike dhe hemorragjike. Ato përfaqësojnë shkaqet kryesore të vdekjeve në të gjithë botën dhe faktorët e rrezikut që i karakterizojnë ndahen në faktorë rreziku të pamodifikueshëm (mosha, gjinia dhe familjariteti), dhe faktorë të modifikueshëm që lidhen me stilin e jetës (duhani, alkooli, dieta, jeta sedentare). Këto të fundit shpesh bëhen shkas për shfaqjen e disa sëmundjeve të tjera si diabeti mellitus, obeziteti, dislipidemia, hipertensioni arterial.

Ndikimi i CVD është rritur në mënyrë drastike në 100 vitet e fundit dhe popullata më e prekur është ajo mashkullore, megjithëse ndryshimi qëndron në faktin se te femrat këto sëmundje shfaqen më vonë, kur me menopauzën bie mbrojtja hormonale.

Ateroskleroza është shkaku kryesor i CVD. Procesi aterosklerotik prek, disa në masë më të madhe e disa më të vogël, të gjithë njerëzit, ajo përparon me moshën dhe përparimi varet gjithashtu nga faktorë të tillë si dislipidemia, hipertensioni, obeziteti, diabeti dhe duhani (Sivapalaratnam et al., 2013).

1.1.1 Ateroskleroza

1.1.1a Struktura e artiereve

Sistemi kardiovaskular përbëhet nga zemra, e cila duke u tkurrur në mënyrë ritmike ka funksionin e pompimit të gjakut në të gjithë organizmin dhe nga enët e gjakut të cilat ndahen në: arterie, enë që çojnë gjakun nga zemra në periferi; kapilarët, enët e përbëra nga një mur i hollë ku bëhet shkëmbimi i gazeve, lëndëve ushqyese, hormoneve dhe molekulave të sinjalit ndërmjet indeve dhe gjakut; venat, enët që derdhin gjakun nga kapilarët në zemër.

Përbërësit thelbësorë strukturorë të mureve të enëve janë tre: endoteli, muskuli i lëmuar dhe indi lidhor dhe përqindja e tyre varion sipas llojit të enës që merret në konsideratë.

Arteriet mund të ndahen në tre kategori bazuar në kalibrin e tyre dhe disa karakteristika:

- arteriet me kalibër të madh ose të tipit elastik duke përfshirë aortën dhe degët kryesore të saj;
- arteriet e mesme ose muskulare, si arteriet koronare ose renale;
- arteriet e vogla që kalojnë brenda organeve.

Muri i arterieve është i përbërë nga tre shtresa koncentrike të quajtura veshje: shtresa më e brendshme, e quajtur intime, e përbërë nga një shtresë e vetme qelizash të sheshta, nga një membranë bazale, një shtresë e hollë indi lidhor e quajtur lamina propria dhe nga një shtresë me fibra elastike e quajtur membrana elastike e brendshme; shtresa e mesme, është e përbërë nga qeliza të muskulit të lëmuar të organizuara në mënyrë rrethore rreth enës, fibra elastike dhe kolagjen; në fund shtresa e jashtme, e formuar nga indi lidhor fijor. Trashësia dhe përbërja e secilës shtresë më pas ndryshojnë sipas llojit të enës së gjakut (Gesi et al., 2007).

1.1.1b Formimi i pllakës ateriosklerotike

Me avancimin e moshës, indet vaskulare i nënshtrohen proceseve inflamatore dhe aterioskleroza është një nga faktorët që favorizon më shumë fillimin e saj, veçanërisht në arteriet e kalibrin të mesëm dhe të madh, duke nxitur prodhimin e monociteve, makrofagëve dhe leukociteve T (Turunen et al., 2009). Ateroskleroza është një sëmundje kronike degjenerative e arterieve e karakterizuar nga akumulimi i kolesterolit, nga përbërësit e matricës jashtëqelizore dhe nga përhapja e qelizave të muskulit të lëmuar arterial, me pasojë ngushtimin progresiv të lumenit vaskular (Turunen et al., 2009).

Karakteristika kryesor e sëmundjes, ateroma, konsiston në një pllakë të lokalizuar midis shtresës intime dhe asaj mesatare me një qendër lipidike (që përbëhet nga kolesterol, mbetje qelizore, qeliza shkumozë të ngarkuara me lipide, fibrinë, trombe në fazë të ndryshme dhe proteina të tjera plazmatike); elementet qelizore (qelizat e muskujve të lëmuar, makrofagët dhe leukocitet) dhe indi lidhor (kolagjeni, fije elastike dhe proteoglikanët). Nga jashtë, ateroma është e veshur me një kapak fijor të përbërë nga qeliza të muskujve të lëmuar, pak

leukocite dhe ind lidhor të dendur. Në rastet e rënda, veçanërisht në arteriet më të mëdha, veshja mesatare në bazë i nënshtrohet një procesi atrofik me humbje të komponentit elastik, dobësim të murit dhe zgjerim aneurizmal të enës (Pontieri et al., 2005) (**Figura 1.1**).

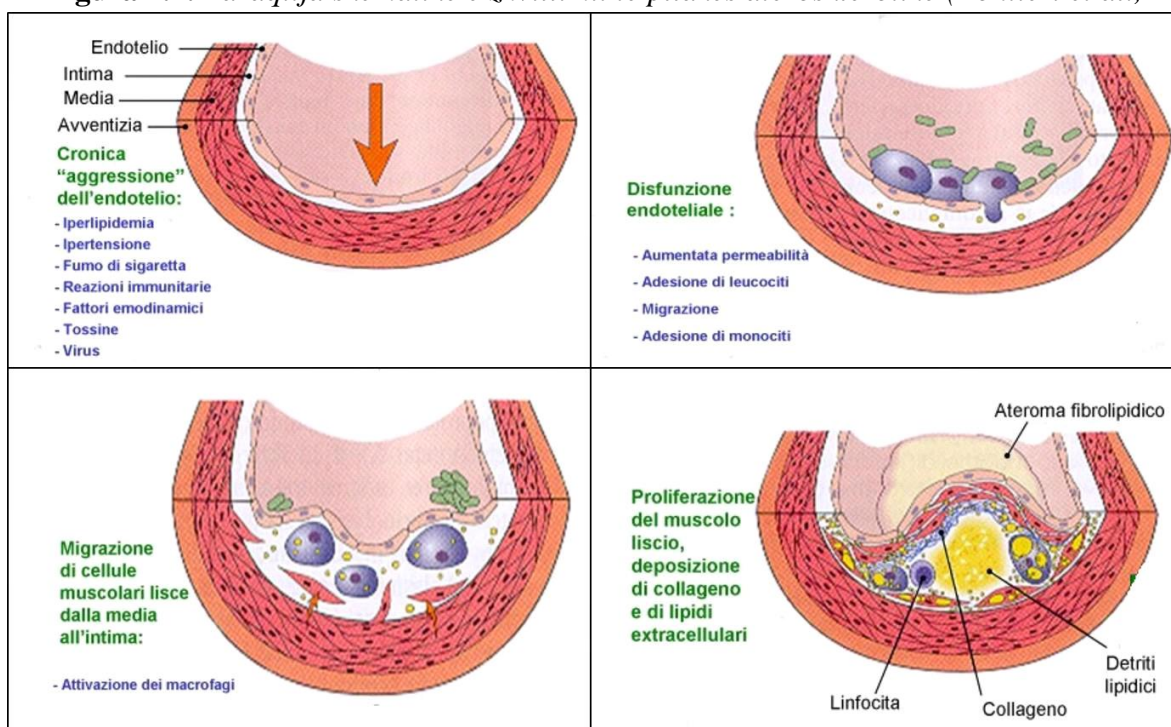
Një nga pasojat kryesore në këtë drejtim është dëmtimi i endotelit. Fillimisht, si rezultat i stimujve inflamatorë, endoteli përpiket të zbatojë mekanizma riparues, por kur këto dështojnë, endoteli bëhet i përshkueshëm nga leukocitet dhe monocitet, të cilat migrojnë dhe lokalizohen në nivelin e veshjes intime ku mund të ndodhin reaksione të ndryshme midis tyre akumulimi i lipoproteinave me peshë të ulët molekulare (LDL) dhe ngjitja e monociteve dhe trombociteve.

Pas ngjitjes, monocitet depërtojnë brenda veshjes intime duke u shndërruar në makrofagë, të cilët duke gëlltitur lipidet shndërrohen në qeliza shkumë, duke kontribuar kështu në evoluimin e dëmtimit. Në të njëjtën kohë, çlirohen faktorët e rritjes dhe citokinat të cilat vazhdojnë të stimulojnë përgjigjen inflamatorë. Shprehja e shumë gjeneve të inflamacionit të përfshirë në procesin aterosklerotik rregullohet nga faktori i transkriptimit bërthamor kappa B (NF-kB) i cili njihet për rolin e tij vendimtar në nxitjen dhe përforcimin e përgjigjes inflamatorë. Aktivizimi i NF-kB shpesh vjen si pasojë e stimulimit të receptorëve të leukociteve të përfshirë në imunitetin e lindur (receptorë të ngjashëm me Toll) dhe shoqërohet me shprehjen e një sërë molekulash inflamatorë si interleukinat (IL) IL-6, IL - 8, faktori i nekrozës tumorale α (TNF α), molekulat e ngjitjes (ICAM-1, VCAM-1, P- dhe E-selektina) dhe metaloproteinazat e matricës (MMPs). Këta ndërmjetës kontribuojnë në kaskadën inflamatorë brenda murit vaskular dhe nxisin migrimin e qelizave të muskujve të lëmuar vaskular duke rimodeluar matricën jashtëqelizore (Migliore e Andreassi, 2012). Përkeqësimi i mëtejshëm i endotelit mund të çojë në nekrozë dhe rikthim të trombociteve të tjera, me rrezikun e plasaritjes së pllakës dhe formimin e mpiksjeve dhe trombeve. Dëmtimi përfundimtar i organit do të varet nga vendndodhja e ateromës dhe aftësia e saj për të bllokuar enët. Pasojat e mundshme mund të jenë gangrena në gjymtyrët e poshtme, iktus në tru dhe infarkt (Migliore e Andreassi, 2012).

Shumë studime kanë treguar se mekanizmat epigjenetikë, duke përfshirë metilimin e ADN-së, janë të përfshirë në rregullimin e gjeneve të përfshira në inflamacion. Në mënyrë të veçantë, metilimi i ADN-së së leukociteve kontribuon në ndryshimin e kaskadës inflamatorë dhe në promovimin e aterosklerozës (Migliore e Andreassi, 2012).

Hiperhomocisteinemia (Hhcy) për të paktën dy dekada është parë si një faktor rreziku i pavarur për aterosklerozën, bazuar në studimet që raportojnë përfshirjen e homocisteinës në përhapjen e qelizave të muskujve të lëmuar të enëve të gjakut, grumbullimin e trombociteve dhe kaskadën koagulative dhe fibrinolizën me ndryshimin pasues të strukturës të endotelit (Castro et al., 2006). Megjithatë, sot për sot do të ishte më mirë të flitej për “marker” i kësaj patologjie.

Figura 1.1. Paraqitja skematike e zhvillimit të pllakës aterosklerotike (Pontieri et al.,



2005).

1.2 Homocisteina

1.2.1 Aspetke historike

Homocisteina (Hcy) është një aminoacid sulfuror, i përshkruar për herë të parë në 1932 nga Du Vigneaud. Hipoteza se nivelet e homocisteinës mund të lidheshin me disa patologji njerëzore u sugjerua më pas në 1962 nga Gerritsen et al. dhe nga Carson et al., i cili përshkroi rastet e para të hiperhomocisteinemisë dhe homocistinurisë tek fëmijët që vuajnë nga sëmundje të rënda vaskulare, si tromboembolizmi pulmonar dhe okluzionet, të ngjashme me ato aterosklerotike të arterieve renale, karotide dhe koronare (Finkelstein, 2000).

Më vonë, në 1965 McCully vuri re se pacientët në moshë pediatrike që kishin një deficit të theksuar të enzimave pergjgjës për metabolizmin e Hcy, shfaqnin dëmtim të mureve vaskulare të arterieve me madhësi mesatare (Finkelstein, 2000). Në vitet 1970, u zhvillua hipoteza sipas së cilës Hhcy mund të përfaqësonte një faktor rreziku të pavarur për dëmtimin e enëve të gjakut dhe mund të vinte si nga faktorët mjedisorë, siç janë mangësitë ushqyese të vitaminës B₁₂ dhe acidit folik, ashtu edhe nga faktorët gjenetikë, si polimorfizmat ose deficitet në enzimën e nevojshme për metabolizmin e tij (Finkelstein, 2000).

Në mënyrë të ngjashme, dhe në të njëjtën kohë, në të njëjtën periudhë historike, u zbulua edhe lidhja midis homocisteinës, acidit folik dhe defekteve të tubit neural.

Në fakt, në vitin 1965 u vu re lidhja midis niveleve të folatit dhe embriopatisë dhe pas vitit 1985 u botuan studime të ndryshme mbi të (Finkelstein, 2000).

Në vitin 1981 Smithells botoi projektin e parë të ndërhyrjes së kontrolluar tek disa gra me shtatzëni të mëparshme të prekura nga defekte të tubit neural. Këtyre grave iu dha një preparat multivitaminë, me përmbajtje 3.6 mg acid folik, një herë në ditë për ≤ 1 muaj para konceptimit. Nga studimi u zbulua se nga 178 lindje vetëm një raportoi defekte të tubit neural, ndërsa në 260 lindjet e nënave që nuk kishin marrë acidin folik, 13 kishin fetuse me defekte të tubit neural (Smithells et al., 1981). Për shkak se projekti i ndërhyrjes Smithells i vitit 1981 nuk ishte i rastësishëm dhe për shkak se shpërndarja gjeografike e nënave të trajtuara dhe jo të trajtuara përfshinte zona me rrezik të lartë dhe të ulët (Kalter, 2000), Këshilli i Kërkimeve Mjekësore në Mbretërinë e Bashkuar (MRC) filloi një kërkim më të gjerë nga 1985 në 1991 mbi rrezikun e përsëritjes së defekteve të tubit neural në 17 qendra në Mbretërinë e Bashkuar dhe 16 vende të tjera (Medical Research Council Vitamin Study Research Group, 1991). Studimi zbuloi se rreziku i defekteve të përsëritura të tubit neural u reduktua me 72% me marrjen e 4 mg acid folik në ditë, në periudhën para konceptimit, në mënyrë të ngjashme me reduktimin e Smithells me 3.6 mg acid folik (Smithells et al., 1981).

Kjo dozë prej 4 mg është ende norma e pranuar për parandalimin e defekteve të vazhdueshme të tubit neural. Në

1992, Czeizel botoi rezultatet e një prove kontrolli random të një integratori multivitaminash kundrejt një suplementi me minerale dhe mikroelemente por pa vitamin, në 4753 gra që kishin planifikuan shtatzëninë e tyre të parë: studimi i Programit Hungarez të Planifikimit Familjar (Czeizel et al., 1992).

Suplementi multivitaminik përmban 12 vitamina, duke përfshirë 0.8 mg acid folik, katër minerale dhe tre oligo elemente. Si rezultat ka pasur 6 raste me fetuse të lindura me defekte të tubit neural në grupin e nënave të trajtuara me suplementin pa permbajtje vitamin (n = 2,052), kundrejt asnjë fetusi me defekte të tubit neural tek grupi i nënave që u trajtuan me suplementin me vitamina (n = 2,014). Botimet më të fundit rekomandojnë marrjen e 0.4 mg acid folik për gratë në moshë riprodhuese, si dozë e mjaftueshme për një reduktim të konsiderueshem prej 40-80% të lindjeve me defekte të tubit neural (Clarke e Bennett, 2014).

1.2.2 Biokimia

Homocisteina është një aminoacid squfuri që nuk është pjesë e përbërjes së proteinave plazmatike. Ajo prodhohet si rezultat i procesit të demetilimit të metioninës, një aminoacid thelbësor që merret me dietën. Prandaj, Hcy mund të cilësohet si një produkt i ndërmjetëm i rrugës metabolike të metioninës.

Metionina, pasi aktivizohet në S-adenozilmetioninë (SAM), vepron si dhurues i grupeve metil ndaj një morie pranuesish si guanidinacetati, bazat purinike të ADN-së dhe ARN-së, neurotransmetuesve, fosfolipideve dhe hormoneve. S-adenozilhomocisteina (SAH), e cila formohet nga transmetilimi i SAM, më pas shndërrohet në Hcy me çlirimin e adenzinës.

Homocisteina pasi është prodhuar mund të shkojë në rrugë të ndryshme.

Duke ndjekur rrugën e trans-sulfurimit, ajo mund të shndërrohet në mënyrë të pakthyeshme në cistationinë nga cistationina β -sintaza, e cila kërkon si ko-faktor piridoksal -5'- fosfat (PLP), forma aktive e vitaminës B₆. Cistationina më pas hidrolizohet në cisteinë nga një enzimë tjetër që përmban B₆ (PLP), γ - cistationazë, duke formuar kështu cisteinë dhe α -ketobutirate. Teprica e cisteinës më pas shkon kundrejt një reaksioni oksidimi, duke formuar taurinë dhe sulfate inorganike, ose eliminohet me urinën (Selhub e Troen, 2016). Në alternativë, në mungesë të metioninës, Hcy mund të rimetillohet në metioninë nëpërmjet një rruge të varur nga folati ose nga betaina. Në rrugën metabolike të varur nga folati,

homocisteina përvetëson grupin metil nga N-5-metiltetrahidrofolati dhe reaksioni katalizohet nga metionina sintazë, e cila nga ana tjetër kërkon veprimin e 5,10-metilentetrahidrofolat reduktuaza (MTHFR). Prandaj një përqendrim i ulët i folatit në gjak çon në një rritje të niveleve të homocisteinës. (Castro et al., 2006; Domi et al., 2021) (**Figura 1.2**).

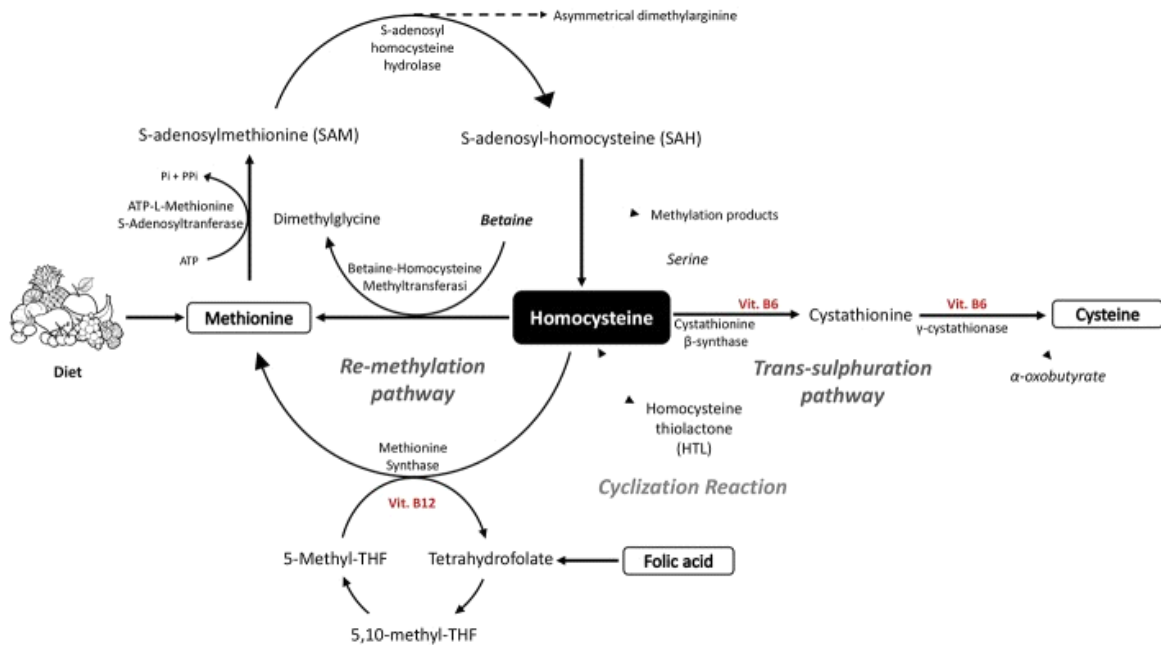


Figura 1.2. *Cikli Metabolik i Homocisteinës (Domi et al., 2021).*

Në rrugën e varur nga betaina, e cila është aktive vetëm në mëlçi, grupi metil dhurohet pikërisht nga betaina dhe reaksioni katalizohet nga betainë-homocisteinë-metiltransferaza (Selhub e Troen, 2016).

Procesi i rimetimit vepron në përqendrime të ulëta të homocisteinës dhe metioninës, ndërsa transulfurimi hyn në lojë për përqendrime më të larta të homocisteinës (Finkelstein, 1986).

Nëse akumulohet në qeliza, homocisteina mund të shndërrohet në homocisteinë-tiolakton, një ester toksik (Jakubowski, 2000).

SAM, falë rolit të tij të dyfishtë, si një frenues alosterik i metilen-tetraidofofolat-reduktazës dhe si aktivizues i cistationinës β- sintetazës, luan, së bashku me një furnizim të mjaftueshëm me dietën të kofaktorëve vitaminik (vitamina B₆, B₁₂ dhe folate) një rol themelor në ruajtjen e

niveleve optimale të homocisteinës. Folati dhe-vitamina B₁₂, duke u përfshirë në dhurimin e grupeve metil në ciklin e metilimit dhe në sintezën e ADN-së dhe ARN-së, janë të përfshirë në rregullimin e shprehjes së gjeneve dhe mungesa e tyre shpesh lidhet me një rritje të niveleve të homocisteinës (Selhub and Miller, 1992).

Hcy është e pranishme në gjak dhe urinë në formë të lirë, në formën e dimerit (homocisteinë-homocisteinë dhe homocisteinë-cistinë) ose e lidhur me proteinat, pra përcaktimi i saj jepet nga vlera totale në plazmë e formave të ndryshme të homocisteinës (Araki and Sako, 1987). Në kushte fiziologjike, përqendrimi total plazmatik i homocisteinës (tHcy) varion midis 5-9 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Vlerat mbi këtë sasi çojnë në gjendjen e njohur si hiperhomocisteinemia. Për vlerat ndërmjet 10-12 $\mu\text{mol l}^{-1}$ kemi një situatë të ndërmjetme; midis 13-30 $\mu\text{mol l}^{-1}$ flasim për hiperhomocisteinemi të moderuar, për vlerat ndërmjet 30-100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ flasim për hiperhomocisteinemi të mesme dhe për vlera më të mëdha se 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ për hiperhomocisteinemi të rëndë (Domi et al., 2021).

Shkaku i hiperhomocisteinemisë

1. FAKTORËT GJENETIKË

- Anomalitë në procesin e transulfurimit për shkak të ndryshimeve në cistationin- β -sintazë: gjeni i së cilësgjendet në krahun e gjatë të kromozomit 21;
- Anomalitë e procesit të rimetilimit për shkak të ndryshimeve të 5-10-metilentetrahidrofolat reduktazës (MTHFR);
- Ndryshimet e enzimës metioninë-sintetazë;
- Defektet e shndërrimit të kobalaminës në metil-kobalaminë.

2. MOSHA / GJINIA

- Rritet me moshën;
- Është më e zakonshme tek meshkujt;
- Probabiliteti rritet tek gratë në periudhën pas menopauzës.

3.FAKTORËT USHQIMORË

- Mungesa e folatit dhe vitaminës B₁₂ (shkaku më i shpeshtë tek të moshuarit);
- Mungesë e vitaminës B₆;
- Konsumimi i tepërt i kafesë dhe alkoolit.

4. PATOLOGJI PAREKZISTUESE

- Zorrëve: (keqabsorbimi i vitaminës B₁₂ dhe folatit);
- Veshkave: (ekskretim i reduktuar për shkak të insuficiencës renale);
- Psoriasis: (për shkak të reduktimit të folatit);
- Leuçemia limfoblastike;
- Hipotiroidizmi;
- Diabeti;
- Hipertensioni esencial.

5. MEDIKAMENTET

- Metotreksat: (ulje e 5-metil-tetrahidrofolatit);
- Nitratet: (antagonizojnë vitaminën B₁₂);
- Estrogjeni: (shkaktojnë mungesën e vitaminës B₆);
- Diuretikët;
- Antikonvulsantët, karbamazepina, izoniazidi dhe fentoina (ndërhyjnë me folatin).

1.2.3 Aspektet fiziopatologjikë

Hiperhomocisteinemia përfaqëson një marker të rëndësishëm të rrezikut kardiovaskular, veçanërisht në lidhje me aterosklerozën, goditjen në tru dhe aneurizmën e aortës (Tinelli et al., 2019). Në fakt, nivelet e larta të homocisteinës nxisin formimin e lezioneve vasculare duke shkaktuar, nëpërmjet rritjes së SAH, mosfunksionim endotelial dhe duke penguar

rigjenerimin e qelizave endoteliale (EC). Për më tepër, pasi të jetë formuar lezioni vaskular, Hcy përshejton përparimin e tij duke stimuluar proliferimin e qelizave të muskulit të lëmuar, dhe duke nxitur prodhimin e faktorit të rritjes së indit lidhor (CTGF). Hcy shkakton ndryshime në indin lidhor në nivelin e pllakës aterosklerotike duke shkaktuar fibrozë, kalcifikim, depozitim të proteoglikaneve dhe dëmtim të fibrave elastike. Është një agjent i fuqishëm pro-koagulant pasi nxit depozitimin e fibrinës dhe luan një rol të rëndësishëm në stresin oksidativ (McCully, 2007). Në fakt, përmes grupit të tij sulfhidril, Hcy mund t'i nënshtrohet vetë-oksidimit dhe të gjenerojë specie reaktive të oksigjenit (ROS) që kanë efekte citotoksike në qelizat vaskulare duke çuar në mosfunktionim endotelial dhe rrjedhimisht në inflamacion vaskular (Chiang et al., 2011). Në fakt, tioli (grupi -SH) i homocisteinës oksidohet me shpejtësi dhe gjatë oksidimit krijohen: radikali hidroksil (OH), anioni superoksid (O_2^-), përgjegjës për dëmtimin e qelizave të muskulit të lëmuar të enëve të gjakut dhe peroksidi i hidrogjenit (H_2O_2), i cili rrit shkallën e fosforilimit të tirozin kinazës me pasojë rritjen e lidhjes së neutrofileve me endotelin dhe ndryshimin e përshkueshmërisë vaskulare (Sibrian-Vasquez et al., 2010).

Roli patogjenetik i Hhcy në sëmundjet vaskulare i atribuohet akumulimit të SAH që shkakton hipermetilimin e ADN-së. Në fakt, është treguar se pacientët me sëmundje kardiovaskulare kanë një gjendje të përgjithshme të ndryshuar të gradës së metilimit të shoqëruar me rritje të niveleve plazmatike të Hcy dhe SAH ndërqelizore (Castro et al., 2003). Efektet kryesore kardiovaskulare që rezultojnë nga nivelet e rritura të Hcy përfshijnë formimin dhe përparimin e pllakës aterosklerotike, ndryshimin e riparimit dhe funksionit endotelial, ndryshimin e metabolizmit të lipideve dhe procesin trombotik (Turunen et al., 2009).

Përveç rolit të tij në patologjitë kardiovaskulare, Hcy përfshihet, sipas studimeve të tjera, në patologji të ndryshme që prekin sistemin nervor si sëmundja e Alzheimerit, sëmundja e Parkinsonit, epilepsia, skleroza e shumëfishtë, goditjet në tru dhe dobësimi i përgjithshëm konjitiv (Djuric et al., 2018). Nivelet e ndryshuara të homocisteinës janë gjetur gjithashtu në kushte të tjera klinike si osteoporoza, sëmundjet reumatike autoimune, diabeti mellitus, diabeti gestacional, aborti dhe kanceri (Domi et al., 2021).

1.2.4 Homocisteina dhe H₂S

Solfuri i hidrogjenit (H₂S) është një gaz transmetues endogjen që rregullon procese të ndryshme fiziologjike, veçanërisht në nivelin vaskular, ku ka një veprim antiinflamator dhe

vazodilatues. Gjenerimi i H₂S është i lidhur ngushtë me metabolizmin e homocisteinës nëpërmjet enzimave cistationine β sintaza (CBS) dhe cistationine γ liazë (CSE) (Yang dhe He, 2019). Specifikisht, H₂S sintetizohet përmes rrugëve të ndryshme enzimatike që përfshijnë CBS, CSE dhe 3-merkaptopiruvate sulfur transferazë (3-MTS). Këto rrugë janë të varura nga piridoksal-5-fosfati dhe substrati i përdorur është L-cisteina (Testai et al., 2021) (**Figura 1.3**). CBS katalizon një reaksion β eliminimi, ndërsa CSE një reaksion α, β eliminimi. Në të dyja rastet substrati është cisteina dhe produktet janë H₂S dhe serina (cisteinë + H₂O → serinë + H₂S) (**Figura 1.4a**). Përveç reaksioneve të eliminimit të CBS dhe CSE, ato katalizojnë reaksionet e β zëvendësimit me kondensimin e dy molekulave të cisteinës (cisteinë + cisteinë → lanthionine + H₂S) (**Figura 1.4b**), dhe β- ose γ zëvendësimet me kondensim të një molekulë cisteine dhe një homocisteine (cisteinë + homocisteinë → cystathionine + H₂S) (**Figura 1.4c**), duke çuar gjithmonë në gjenerimin e H₂S. Për më tepër, si CBS ashtu edhe CSE mund të katalizojnë α, β eliminimin të cisteinës për të prodhuar cisteinë persulfur, e cila nga ana tjetër mund të çojë në prodhimin e H₂S (cisteinë → persulfur i cisteinës + piruvat + NH₃ → H₂S) (Giuffre e Vicente, 2018) (**Figura 1.4d**). CSE gjithashtu mund të prodhojë H₂S duke filluar nga homocisteina përmes një reaksioni të α, γ- eliminimit ose përmes γ zëvendësimit (homocisteinë + H₂O → homoserinë + H₂S → α-ketobutirat + NH₃ / ose homocisteinë + homocisteinë → omolantinë + H₂S) (**Figura 1.4e-f**) (Chiku et al., 2009). 3-MTS gjeneron H₂S duke vepruar bashkë me enzimën cisteinë aminotransferazë (CAT); konkretisht, sinteza ndodh duke filluar nga 3-merkaptopiruvati, i cili nga ana tjetër sintetizohet nga CAT duke filluar nga cisteina në prani të α-ketoglutaratit (Shibuya et al., 2009).

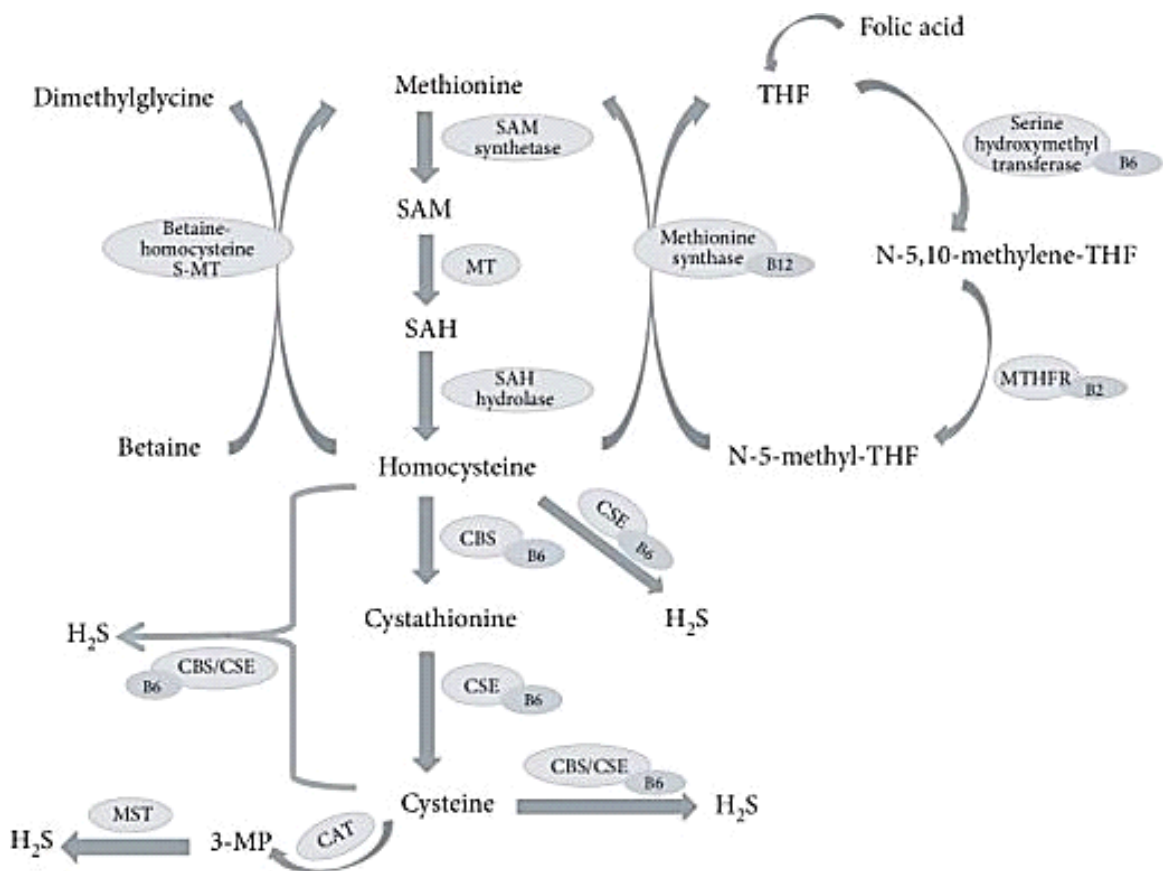
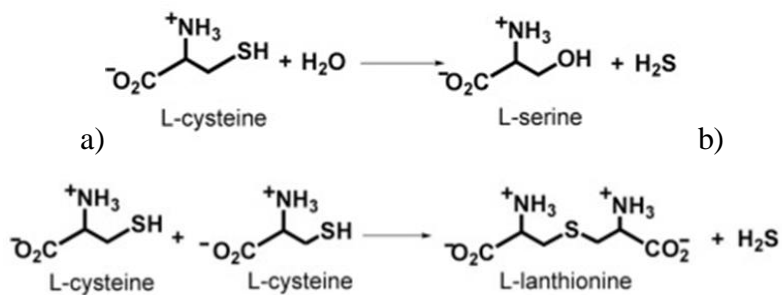


Figura 1.3. Paraqitja skematike e lidhjes midis metabolizmit të homocisteinës dhe prodhimit të H₂S (Testai et al., 2021).



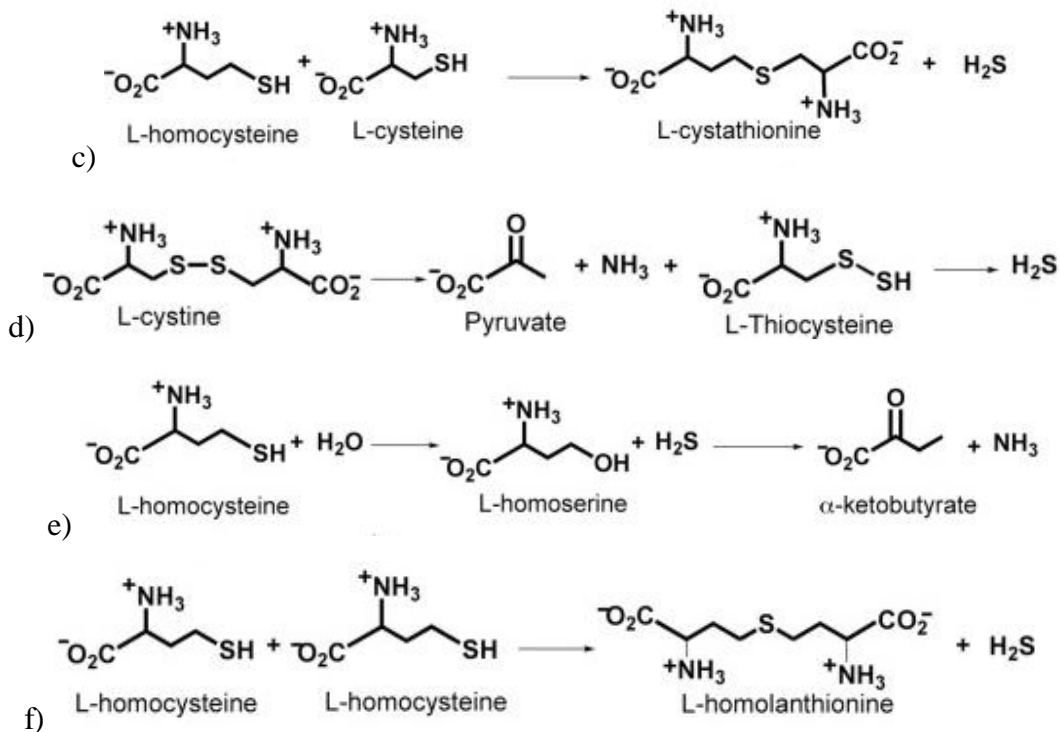


Figura 1.4. Reaksionet e sintezës së H₂S të katalizuara nga enzima CSE: a) α, β-eliminimi i cisteinës; b) β zëvendësimi me kondensimin e dy molekulave të cisteinës; c) β- ose γ-zëvendësimi me kondensim të një molekule cisteine dhe një molekule homocisteine; d) α, β-eliminimi i cisteinës; e) α, γ-eliminimi i homocisteinës; f) γ-zëvendësimi me kondensim të dy molekulave të homocisteinës (Giuffrè e Vicente, 2018).

Këto enzima gjenden në pjesë të ndryshme të trupit, duke përfshirë endotelin vaskular dhe qelizat e muskujve të lëmuar, duke shpjeguar kështu rëndësinë fiziopatologjike të H₂S në sëmundjet kardiovaskulare (Chertok and Kotsyuba, 2012). Nivelet e homocisteinës ndikojnë në sintezën e H₂S. Në fakt, në kushte fiziologjike përqendrimet totale të cisteinës plazmatike janë rreth 250 μmol l⁻¹, dukshëm më e lartë se përqendrimi total i homocisteinës që është rreth 10 μmol l⁻¹ (Yang and He, 2019). Në këto kushte, 70% e H₂S prodhohet duke përdorur cisteinën si substrat përmes enzimave CBS/CSE, ndërsa në rastin e hiperhomocisteinemisë homocisteina zëvendëson cisteinën duke u bërë një burim i rëndësishëm i prodhimit të H₂S dhe rrugët enzimatike më aktive do të jenë ato të α, γ eliminimit dhe të γ zëvendësimit -CSE të katalizuara (Chiku et al., 2009). Është evidentuar gjithashtu se nivelet e larta të homocisteinës janë të lidhura me prodhimin e reduktuar të H₂S që i atribuohet reduktimit të

transkriptimit dhe aktivitetit të enzimave CBS dhe CSE. Represioni transkriptues i induktuar nga homocisteina i enzimës CSE në makrofagë ndodh për shkak të rritjes së shprehjes së metiltransferazës së ADN-së dhe hipermetilimit të ADN-së në rajonin e promotorit CSE (Tang et al., 2011). Është zbuluar gjithashtu se homocisteina tenton të kapë anionin HS^- për të formuar homocisteinë persolfur, i cili redukton efektin kardioprotektiv të H_2S tek kafshët hiperhomocisteinëmike që i nënshtrohen dëmtimit ishemi-riperfuzion (Nakano et al., 2015). Megjithëse ka disa studime në favor të efektit frenues të homocisteinës në prodhimin e H_2S , ka pasur gjithashtu raportime anormale të niveleve të larta të H_2S në prani të hiperhomocisteinemisë. Në të vërtetë, krahasuar me vullnetarët e shëndetshëm, pacientët hiperhomocisteinëmikë me polimorfizëm MTHFR C677T treguan një përmbajtje dukshëm më të lartë të H_2S në trombocitet ose plazmë. Në mënyrë të ngjashme, tek minjtë hiperhomocisteinëmikë që mbanin mutacione të MTHFR ose CBS, niveli i H_2S në retinë u rrit ndjeshëm, krahasuar me minjtë e shëndetshëm (Cui et al., 2017). Por nëse nga njëra anë nivelet e homocisteinës rregullojnë prodhimin e H_2S , nga ana tjetër ato vetë rregullohen nga H_2S . Është vërejtur se injeksioni intraperitoneal i një solucionit të ngopur me H_2S redukton ndjeshëm përqendrimin e homocisteinës plazmatike tek minjtë hiperhomocisteinëmikë të shkaktuar nga injeksioni subkutan i homocisteinës (Chang et al., 2008). Një studim tjetër zbuloi gjithashtu se trajtimi i mioblasteve me donatorë H_2S , si hidrosolfuri i natriumit (NaHS), ul ndjeshëm nivelet e homocisteinës në qeliza, përkundrazi, një prodhim endogjen i reduktuar i H_2S i nxitur nga CSE siRNA lidhet me rritjen e niveleve të homocisteinës (Chang et al., 2008). Në të njëjtën mënyrë, administrimi oral tek minjtë e shëndetshëm i një dhuruesi të ri H_2S , ACS94, rrit përqendrimin e H_2S dhe ul nivelin e homocisteinës në plazmë (Giustarini et al., 2018).

Në një studim të mëtejshëm *in vitro* të kryer në qelizat endoteliale të trurit të miut, u zbulua se NaHS redukton akumulimin e homocisteinës në qelizat e ekspozuara ndaj përqendrimeve të larta të metioninës, duke arritur në përfundimin se H_2S është një frenues i fuqishëm i homocisteinës (Tyagi et al., 2009).

Në një studim të kohëve të fundit mbi kardiomiocitet në lidhje me efektin e homocisteinës dhe H_2S në enzimat CBS dhe CSE u vu re se ekziston një rregullim negativ midis tyre, domethënë nivelet e larta të homocisteinës reduktojnë aktivitetin e enzimës CBS dhe rrisin aktivitetin e CSE, ndërsa H_2S zvogëlon aktivitetin e CSE dhe rrit atë të CBS (Nandi and Mishra, 2017). Efekti rregullator i CSE në CBS u hetua më tej në një model miu

hiperhomocisteinemik me mungesë CBS. Krahasuar me minjtë CBS +/+, CBS +/- shfaq mbishprehje të enzimës CSE në zemër, duke sugjeruar që mungesa e enzimës CBS çon në një rritje të CSE. Studime të mëtejshme mbi mekanizmat e përfshirë tregojnë se mungesa e CBS e shkaktuar nga homocisteina çon në një rritje të aktivitetit të proteinës specifike-1 (SP1), një nxitës i enzimës CSE dhe në një reduktim të shprehjes së miR-133, një mikroRNA target e SP-1. Anasjelltas, H₂S frenon aktivitetin e CSE duke frenuar SP1 dhe duke nxitur miR-133, duke çuar si perfundim në një rritje të CBS (Nandi and Mishra, 2017).

Duke marrë parasysh ndërveprimin midis homocisteinës dhe H₂S dhe dëshmi në lidhje me reduktimin dhe rritjen e prodhimit të H₂S në kushtet e hiperhomocisteinemisë, vlerësimi i raportit homocisteinë/H₂S është me interes më të madh se vlera e përqendrimit absolut të secilit prej tyre.

Në këtë drejtim, janë kryer studime te fëmijët me hipertension, të cilët kanë shfaqur, krahasuar me fëmijët me tension normal, një ulje të ndjeshme të raportit H₂S/homocisteinë plazmatike, për shkak të rritjes së përqendrimit të homocisteinës dhe uljes së niveleve të H₂S. Prandaj, këto rezultate tregojnë një lidhje negative midis presionit sistolik dhe raportit H₂S / homocisteinë (Chen et al., 2007). Në mënyrë të ngjashme, nivelet e reduktuara të H₂S dhe nivelet e rritura të homocisteinës janë të lidhura negativisht me hipertensionin pulmonar të pranishëm në sëmundjet kongjenitale të zemrës, për shkak të zvogëlimit të shprehjes së enzimave MTHFR dhe CSE dhe mungesës së vitaminës B₁₂ (Sun et al., 2014). He et al., gjithashtu vërejtë se pacientët që vuanin nga sëmundja pulmonare obstruktive kronike (BPCO) e lidhur me sëmundjet kardiovaskulare kishin nivele më të larta të H₂S dhe homocisteinës sesa ata që vuanin ekskluzivisht nga BPCO; raporti H₂S/homocisteinë në pacientët me BPCO + CVD ishte dukshëm më i ulët sesa tek pacientët me BPCO dhe ky raport ishte pozitivisht i lidhur me funksionin e mushkërive (He et al., 2017).

Këto studime në përgjithësi mbështesin nocionin e çekuilibrit metabolik të homocisteinës dhe H₂S në patologjitë kardiovaskulare dhe, krahasuar me homocisteinën dhe H₂S të marra individualisht, marrëdhënia midis tyre rezulton të jetë një shënues më i mirë në parashikimin e patologjive kardiovaskulare. .

Hiperhomocisteinemia, siç u përmend më lart, lidhet ndjeshëm me patologjitë kardiovaskulare. Për shembull, në pacientët me sëmundje të arterieve koronare është vërejtur se nivelet e homocisteinës plazmatike përfaqësojnë një parashikues të rëndësishëm të vdekshmërisë kardiovaskulare, dhe ashpërsia e aterosklerozës është e lidhur ngushtë me

nivelet e homocisteinës (Yang e He, 2019). Nga ana tjetër, ka disa studime në favor të efektit pozitiv të H₂S në dëmtimin vaskular të shkaktuar nga hiperhomocisteinemia dhe mekanizmat e përfshirë janë të ndryshëm (**Figura 1.5**) (Possomato-Vieira et al., 2018).

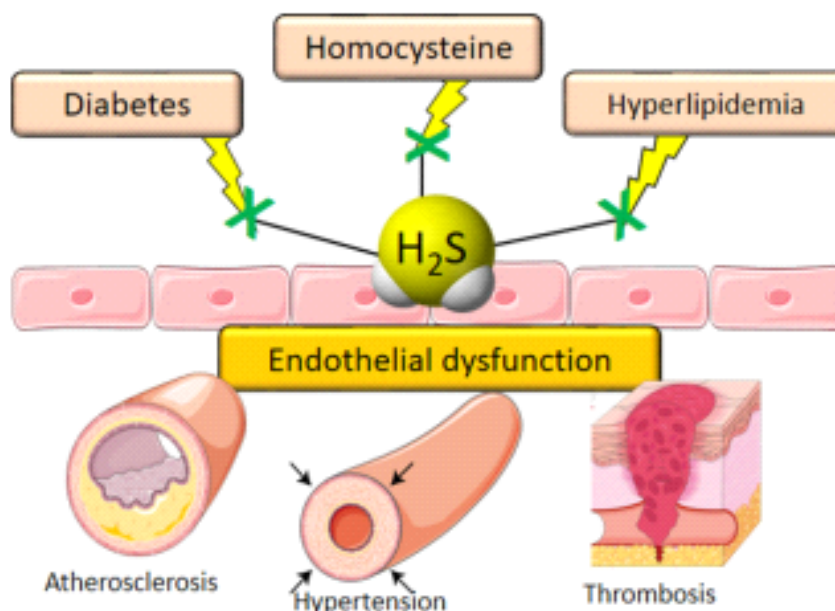


Figura 1.5. Efektet mbrojtëse të H₂S kundër mosfunksionimit endotelial (Citi et al., 2021).

1.2.4a H₂S dhe Rruga e sinjalizimit të oksidit nitrik

Ndër studimet e ndryshme doli se në pacientët hiperhomocisteinëmikë, shndërrimi i homocisteinës në H₂S rrit funksionin renovaskular. Studimi u krye në arteriet renale normale dhe arteriet renale në të cilat u transfektuan gjenet që kodojnë enzimat CBS, CSE dhe 3-MTS. Në prani të përqendrimeve të larta të homocisteinës, nivelet e H₂S të krijuara në arteriet renale të transfektuara janë më të larta dhe shoqërohen nga një rritje në shprehjen e oksidit nitrik sintazë endoteliale (eNOS) (Sen et al., 2012). Mekanizmat me të cilët H₂S e rrit aksin eNOS-NO përfshijnë rritjen e sintezës së eNOS mRNA, stimulimin eNOS nëpërmjet mobilizimit të Ca²⁺ dhe fosforilimit e ndërmjetësuar nga Akt, sulfhidrilimit të drejtpërdrejtë

të eNOS dhe ruajtjen e guanilate ciklazës të tretshme (sGC) në një gjendje NO- të aktivizueshme (Szabo, 2017). Megjithatë, midis studimeve të ndryshme në favor të stimulimit të eNOS nga H₂S, një botim i fundit nga Szijartò ka treguar të kundërtën; duke përdorur minjtë CSE -/- është treguar se nivelet e ulëta të H₂S për shkak të mungesës së enzimës CSE shoqërohen me nivele të larta të NO në arteriet periferike. Ky rezultat i është atribuar mungesës së pastrimit të NO që ndodh përmes ndërveprimit të drejtpërdrejtë midis H₂S dhe NO me formimin pasues të nitroksilit (HNO) (Szijarto et al., 2018). Por nuk është vetëm H₂S që rregullon aktivitetin dhe prodhimin e NO, nga ana tjetër NO ndikon në aktivitetin e H₂S. Në fakt, prodhimi endogjen i H₂S mund të kompensojë një çrregullim të vazodilatimit për shkak të mungesës së NO, ndërsa nivelet e rritura të eNOS/NO kufizojnë prodhimin endogjen të H₂S (Ertuba et al., 2017). Kryqëzimi midis H₂S dhe NO në hiperhomocisteinemi është një temë me interes të konsiderueshëm studimi që do të na lejonte të kuptonim rolin e këtyre dy gazeve në patologjitë vasculare të lidhura me hiperhomocisteineminë.

1.2.4b H₂S dhe roli i stresit oksidativ

Stresi oksidativ është i implikuar fuqishëm në dëmtimin dhe rimodelimin e enëve të gjakut dhe në hiperhomocisteinemi. Homocisteina nxit stresin oksidativ përmes disa mekanizmave, duke përfshirë autooksidimin e homocisteinës. Kur homocisteina lidhet me proteinat plazmatike (në përgjithësi albuminën), ose me tiolet me peshë molekulare të ulët, ose me një molekulë tjetër homocisteine, përmes një ure disulfuri, grupi i lirë sulfhidril vetëoksidohet, duke çuar në prodhimin e peroksidit të hidrogjeni (H₂O₂) dhe lloje të tjera reaktive të oksigjenit, superoksidet dhe radikalet hidroksil (Zhang et al., 2018).

Një mekanizëm tjetër që shkakton dëmtim oksidativ ka të bëjë me çekuilibrin midis enzimeve oksiduese dhe enzimeve antioksiduese (p.sh. aktivizimi i oksidazës NADPH dhe frenimi i superoksid dismutazës (SOD); ose prodhimin i anioneve superoksidge të varur nga NOS (McCully, 2009; Petras et al., 2014).

H₂S pengon stresin oksidativ të shkaktuar nga homocisteina. Studimet *in vitro* të kryera në kulturat qelizore kanë treguar se pararendësi i H₂S, NaHS, pengon prodhimin e specieve reaktive të oksigjenit dhe azotit (ROS / RNS) dhe normalizon nivelet e enzimeve oksiduese në muskujt e lëmuar vasculare dhe qelizat endoteliale të ekspozuara ndaj homocisteinës (Yan

et al., 2006). Studime të mëtejshme u kryen me minjtë të cilët iu nënshtruan një injeksioni intracerebral homocisteine; trajtimi i mëpasshëm me NaHS rriti ndjeshëm funksionin cerebrovaskular dhe ngadalësoi fenomenin e neurodegenerimit. Mbrojtja u shoqërua me frenimin e stresit oksidativ për shkak të reduktimit të niveleve të malonildialdehidit dhe rritjes së niveleve të glutacionit (Kamat et al., 2013). Rezultate të ngjashme u morën te minjtë hiperhomocisteinëmikë që iu nënshtruan administrimit oral të homocisteinës. Rivendosja e niveleve plazmatike të H₂S pas integritit me suplemente shtesë të H₂S çoi në një përmirësim në rimodelimin neurovaskular të induktuar nga homocisteina i shoqëruar nga një reduktim i niveleve të superoksidit dhe nitriteve dhe një rritje në SOD, katalazë dhe glutatione (Nath et al., 2018). Aftësia e H₂S për të nxitur aktivitetin e γ -glutamylcisteinë sintazës, hapin që kufizon prodhimin e glutacionit, dhe për të nxitur transportin e cisteinës, substrati kufizues në prodhimin e glutacionit, mund të shpjegojë rritjen e këtyre antioksidantëve tek minjtë hiperhomocisteinëmikë të trajtuar me NaHS (Kimura and Kimura, 2004).

1.2.4c H₂S dhe efekti tij në mitokondrite

Mitokondritë kontribuojnë në prodhimin e tepërt të ROS të shkaktuara nga homocisteina dhe janë një na target kryesor i H₂S. Në studimet e kryera në qelizat endoteliale të trurit të minjve (bEnd3) është treguar se homocisteina shkaktonte një mbishprehje të N-metil D-aspartat (NMDA-R1), një receptor për homocisteinën, duke rritur metilimin e ADN-së duke çuar në një rritje e shprehjes së NOX-4 dhe një rritje e prodhimit mitokondrial të superoksideve. Trajtimi me NaHS redukton shprehjen e NMDA-R1, ruan integritetin mitokondrial dhe zbut stresin oksidativ mitokondrial të shkaktuar nga homocisteina. Në fakt, duke antagonizuar receptorin NMDA-R1, NaHS mbron integritetin dhe funksionalitetin e qelizave endoteliale duke ruajtur shprehjen e eNOS dhe endotelin-1. Për më tepër, eksperimentet e mëtejshme të kryera duke modifikuar aktivitetin e CSE tregojnë më tej rolin frenues të H₂S endogjen në prodhimin mitokondrial të superoksideve dhe në toksicitetin mitokondrial (Kamat et al., 2015).

Studimet *in vitro* të kryera në mitokondri të izoluar nga endoteli i aortës së minjve hiperhomocisteinëmikë kanë treguar se këtu homocisteina rrit prodhimin e ROS, në veçanti H₂O₂ (Sen et al., 2012).

1.2.4d H₂S dhe efekti i tij në rrjetin endoplazmatik

Përveçse është i prirur ndaj dëmtimit oksidativ, rrjeti endoplazmatik është gjithashtu një prodhues i ROS. Roli i stresit ER dhe ndërlydhja midis stresit ER dhe stresit oksidativ në ndërmjetësimin e mosfunksionimit endotelial është sugjeruar në disa kushte patologjike, duke përfshirë ekspozimin ndaj homocisteinës (Wu et al., 2019). Disa linja studimi sugjerojnë se H₂S mund të parandalojë stresin ER të induktuar nga homocisteina (Majumder et al., 2019). Megjithatë këto rezultate nuk rrjedhin nga studimet e kryera mbi muskujt vaskularë, por mbi muskujt skeletorë dhe kardiomiocitet, ka shumë të ngjarë që vetitë antioksiduese të H₂S të shprehen edhe në nivelin vaskular në kushtet e hiperhomocisteinemisë. Në një studim të fundit, Kabil dhe kolegët e tij demonstuan se stresi ER nxit CSE dhe shkakton frenim të CBS duke u lidhur me CO, një produkt i heme oksigjenazë-1 në përgjigje të stresit ER, duke çuar në akumulimin e homocisteinës dhe në një ulje të cistationinës (Kabil et al., 2016). Meqenëse homocisteina dihet se vepron si një nxitës i stresit të ER, ndryshimi metabolik në aktivitetin e enzimave të rrugës së reagimit ndaj stresit ER dhe rritja pasuese e sintezës së H₂S, mund të veprojnë si një mekanizëm endogjen kardioprotektiv në hiperhomocisteinemi. Stresi i ER kohët e fundit është treguar se ndërmjetëson mosfunksionimin vaskular të shkaktuar nga homocisteina përmes shtypjes së kanaleve të kaliumit të aktivizuara nga kalciumi (KCa) (Sun et al., 2019). Studimet e mëparshme kanë treguar se H₂S mund të rrisë rrymën e kanalit KCa në qelizat vaskulare dhe aktivizimi i kanaleve të KCa përfshihet në vazodilatimin e shkaktuar nga H₂S (Wang et al., 2016).

1.2.4e H₂S dhe roli i tij në dëmtimin vaskular të shkaktuar nga homocisteina: mekanizma të tjerë të mundshëm

Një lidhje tjetër midis homocisteinës dhe H₂S jepet nga receptori i angiotenzinës II të tipit I (AngII / AT1R). Në fakt, H₂S rregullon funksionin vaskular duke frenuar receptorin AngII / AT1R (Liu et al., 2017). Për më tepër, kohët e fundit është vërejtur se ndërveprimi i drejtpërdrejtë midis homocisteinës dhe AT1R rrit dëmtimin vaskular (Li et al., 2018). Duke marrë parasysh provat më të fundit në lidhje me rritjen e shkaktuar nga homocisteina në rrymat Ca²⁺ të tipit T dhe efektin frenues të H₂S në kanalet CaV1.2 të pranishme në qelizat e muskujve të lëmuar vaskulare, modulimi i kanaleve Ca²⁺ të varur nga tensioni përfaqëson një mekanizëm të mëtejshëm të përfshirë në mbrojtje vaskulare e ndërmjetësuar nga H₂S në rast

të hiperhomocisteinemisë (Gaifullina et al., 2019). Megjithatë, këto mekanizma kanë nevojë për studim të mëtejshëm.

1.2.4f H₂S si një agjent terapeutik në mjekësi e sëmundjeve kardiovaskulare dhe strategji që synojnë uljen e niveleve të homocisteinës

Pavarësisht lidhjes midis hiperhomocisteinemisë dhe sëmundjeve kardiovaskulare, provat klinike të rastësishme që synojnë vlerësimin e efektivitetit të trajtimeve të ndryshme për të reduktuar nivelet e homocisteinemisë, si suplementimi me acid folik ose/dhe në përgjithësi me vitamina B, kanë prodhuar rezultate jokonsistente; disa në fakt sugjeruan efikasitetin e tij, pasi vunë re një ngadalësim në përparimin e aterosklerozës dhe iktusit (Liu et al., 2015), ndërsa studime të tjera nuk tregojnë asnjë efekt të dobishëm të këtij suplementi, vetëm minimal, në rrezikun e ngjarjeve të mëdha kardiovaskulare te pacientët me sëmundje kardiovaskulare (Martí-Carvajal et al., 2017). Shkaqet që çojnë në këto rezultate kontradiktore janë të paqarta, megjithatë ato mund të lidhen me nivelin bazë të folatit në plazmë, pavarësisht nëse pacientë të tillë janë me agjentë antitrombocitar ose shfaqin një gjenotip MTHFR C677T. Administrimi i acidit folik dhe vitaminave B është treguar të jetë më pak efektiv në uljen e niveleve të homocisteinës plazmatike në subjektet me një konsum të zakonshëm të lartë të folatit përpara trajtimit (Zeng et al., 2015). Prandaj është sugjeruar që të ndërhyhet me një suplement të acidit folik dhe vitaminës B në rajonet ku ushqimi në përgjithësi nuk është i fortifikuar me folate (Holmes et al., 2011). Në një studim të rastësishëm, Hankey dhe kolegët vëzhguan një ndërveprim midis terapisë antitrombocitare dhe efektit të terapisë për uljen e homocisteinës së acidit folik / vitaminës B në pacientët me goditje në tru ose atak ishemik kalimtar. Ata zbuluan se vitaminat B nuk kishin efekte të rëndësishme vaskulare në pacientët që merrnin ilaçe antitrombocitare, ndërsa pacientët që nuk merrnin ilaçe kundër tromboticeve përfituan ndjeshëm nga plotësimi i vitaminës B (Hankey et al., 2012). Kohët e fundit, China Stroke Primary Prevention Trial vlerësoi variacionin individual në përgjigje të ndërhyrjeve të nevojshme për uljen e niveleve të homocisteinës dhe sugjeroi ndër qasjet modifikimin e efektit për shkak të pranisë së polimorfizmave MTHFR. Në fakt, ata vunë re se krahasuar me gjenotipet MTHFR 677CC dhe CT, pacientët me gjenotipin MTHFR 677TT treguan një kurbë më të theksuar në formë L midis niveleve të homocisteinës dhe të folatit në serum, pasi ato nisin nga vlerat më të ulëta të folatit plazmatik për arsye metabolike. Prandaj, këto kërkojnë një konsum më të madh të

folatit për shkak të homocisteinës së tepërt sesa dy gjenotipet e tjera (Huang et al., 2018). Ndikimi i gjenotipeve MTHFR C677T në efikasitetin e acidit folik dhe vitaminës B₁₂ në uljen e përqendrimeve të homocisteinës u vu re edhe në pacientët me hemodializë (Achour et al., 2016). Një seri eksperimentesh të kryera në një model miu që përmban një transgjen (Tg-I278T), mutacioni më i zakonshëm i gjetur në pacientët me mungesë CBS, tregoi një përgjigje krejtësisht të ndryshme në lidhje me dietën që redukton homocisteinën në krahasim me minjtë e përdorur si kontroll (Kruger e Gupta, 2016), duke ofruar mbështetje më të madhe për konceptin e ndërveprimit gjenetik në trajtimin e sëmundjeve. Për më tepër, edhe variantet e reja të mutuara të enzimës CBS në pacientët hiperhomocisteinëmikë, si c.467T> C; p.Leu156Pro dhe c.808_810del; p.Glu270del, duket se kanë një ndikim në efikasitetin terapeutik të suplementit të nevojshëm për reduktimin e niveleve të homocisteinës (Ibrahim et al., 2018).

Në përgjithësi, pra, të gjitha provat e raportuara tregojnë se nevojiten studime të thelluara, të cilat të marrin parasysh faktorët e lartpërmendur, për të dhënë përgjigje përfundimtare në lidhje me efikasitetin klinik të strategjive të reduktimit të homocisteinës, në mënyrë që të reduktohet incidenca e komplikimeve kardiovaskulare. Për këtë qëllim, në lidhje me sëmundjet kardiovaskulare, dëshmitë në lidhje me sigurinë dhe efikasitetin e terapive që çlirojnë H₂S në modelet e kafshëve vazhdojnë të rriten dhe janë bërë përpjekje për të zhvilluar barna me bazë H₂S për përdorim njerëzor. Për shembull, trajtimi me NaHS, si te minjtë me hipertension spontan, ashtu edhe te minjtë me hipertension pas mbylljes së arterieve renale me dy kapëse, uli ndjeshëm presionin mesatar arterial dhe përmirësoi vazodilatimin (Xiao et al., 20118). Mekanizmat e përfshirë duket se janë aktivizimi i eNOS përmes sinjalizimit PPARδ/PI3K/Akt ose PPARδ/AMPK dhe rikthimi pasues i biodisponibilitetit së NO (Tain et al., 2017). Studime të mëtejshme mbi arteriet renale të pacientëve me hipertension dhe në qelizat endoteliale të venës së kërthizës njerëzore, të nënshtruara ndaj ekspozimit ndaj angiotenzinës II, konfirmuan efektin mbrojtës të NaHS në endotelin dhe në funksionalitetin e eNOS-NO, duke mbështetur përdorimin e mundshëm të barnave H₂S- çliroes si një trajtim i ri i hipertensionit (Xiao et al., 2018). Megjithatë, përdorimi klinik i NaHS duket të jetë jopraktik për shkak të gjysmë-jetës së shkurtër dhe toksicitetit të tij, dhe donatorë të rinj të NaHS me efikasitet më të madh dhe toksicitet të reduktuar kërkohen për të zbatuar terapitë e bazuara në H₂S. Në një artikull të kohëve të fundit, Wallace dhe kolegët prezantuan disa ilaçe që çlirojnë H₂S që kanë përparuar në provat klinike, të tilla si para-medikamenti H₂S SG1002,

një përzierje inorganike (polisoltionat natriumi) që përmban S_8 , Na_2SO_4 , $Na_2S_2O_3$, $Na_2S_3O_6$, $Na_2S_5O_6$ dhe Na_2S_4 për insufiçencë kardiake dhe ATB-346, një medikament anti-inflamator jo-steroidal që rrjedh nga naprokseni, por i shoqëruar me një fraksion që çliron H_2S (Wallace 19 et al., 2018). Zbutja e rimodelimit kardiak dhe ngarkesës së mëvonshme nga SG1002 u demonstrua kohët e fundit në modelin e miut hiperhomocisteinemic CBS +/- (Kar et al., 2019). Zhvillimi i terapisë së bazuar në H_2S do të përfitojë nga teknikat/materialet e reja të afta për të kontrolluar sasinë e H_2S të lëshuar nga medikamenti dhurues.

1.3 Enzima MTHFR

Siç u përmend më parë, ndryshimet në enzimën MTHFR përfaqësojnë një nga faktorët kryesorë të fillimit të hiperhomocisteinemisë. Gjени që kodon enzimën gjendet në krahun e shkurtër të kromozomit 1 (1p36.3) dhe kodon për proteinat dimerike (Goyette et al., 1994). Metilentetrahidrofolati reduktaza është një enzimë kyç i përfshirë në metabolizmin e folatit që ndërmjetëson reduktimin e 5,10-metiltetrahidrofolatit (5,10-MTHF) në 5-MTHF. 5-MTHF është dhurues i grupeve metil dhe përdoret ose për sintezën e prekursorëve të ADN/ARN-së ose për konvertimin e homocisteinës në metioninë, që më pas është e nevojshme për prodhimin e SAM që përfaqëson agjentin kryesor metilues të ADN (Coppedè et al., 2009).

Më pas, metionina sintazë (MS), duke përdorur vitaminën B_{12} (ose kobalaminë) si kofaktor, transferon një grup metil nga 5-MTHF te homocisteinë, duke formuar metioninë dhe tetrahidrofolat (THF). THF nga ana tjetër rikonjugohet në 5.10-MTHF për sintezën e purinave dhe timidilateve. Reaksioni i katalizuar nga MS është i një rëndësie të konsiderueshme pasi zvogëlon nivelet plazmatike të Hcy, potencialisht citotoksike, dhe në të njëjtën kohë ndërmjetëson prodhimin e metioninës, e cila, e aktivizuar ndaj SAM në një reaksion të katalizuar nga metionine adenoziltransferaza (MAT), gjeneron dhurues të grupeve metil të katabolizmit qelizor. Në fakt, SAM përdoret në reaksionet e transmetilimit dhe pasi grupi i tij metil është dhuruar, ai shndërrohet në SAH (Lucock, 2000). SAM është në vetvete një inhibues i fuqishëm i MTHFR. Kur SAM është i pranishëm në përqendrime të larta, MTHFR frenohet, duke rezultuar në reduktimin e 5-metil-THF dhe duke dëmtuar kështu procesin e rimetilimit të homocisteinës. Ndërsa, kur përqendrimi i SAM është i ulët, favorizohet formimi i 5-metil-THF dhe rimetilimi i homocisteinës. Bllokimi i rimetilimit të

homocisteinës çon në ulje të sintezës së metioninës, mungesë të SAM në inde, metilim të çrregullt të ADN-së (Mastroeni et al., 2011).

Prandaj folati dhe vitamina B₁₂ veprojnë si kofaktorë thelbësorë në procesin e rimetilimit të homocisteinës, aq sa një ulje e niveleve të tyre çon në një rritje të përqendrimit të Hcy në plazmë.

1.3.1 Folatet

Acidi folik është një vitaminë e tretshme në ujë që i përket grupit B, që gjendet natyrshëm në varietete të ndryshme ushqimore (Hoxha et al., 2021). Zbulimi i acidit folik (ose vitaminës B₉) daton në vitet 1930, kur Lucy Willis identifikoi një "faktor të ri hematopoietik" në ekstraktet e majave ose të mëlçisë, të aftë për të trajtuar aneminë makrocitare tek gratë shtatzëna (Rosenberg, 2012). Metabolizmi i folatit ndikohet nga faktorë të ndryshëm, veçanërisht nga dieta dhe polimorfizmat e gjeneve që kodojnë enzimën e përfshira në këtë rrugë metabolike. Në plazmë, rreth 2/3 e folatit lidhet me proteinat dhe e gjejmë mbi të gjitha në formën e tij tetrahidrate, N⁵-metiltetrahidrofolat. Ky është një dhurues i grupeve metil dhe përdoret ose për sintezën e prekursorëve të ADN / ARN ose për shndërrimin e homocisteinës në metioninë, e cila nga ana tjetër është e nevojshme për prodhimin e SAM, i cili është agjenti metilues kryesor i ADN-së (Coppedè et al., 2009). Mungesa e folatit është një nga mangësitë më të zakonshme të vitaminave dhe mund të jetë rezultat i dietes joadekuate, nevojave të shtuara, përthithjes dhe metabolizmit të dëmtuar ose marrjes së barnave. Kërkesat për folat rriten gjatë shtatzënisë, gjdhënies dhe prematuritetit. Kjo vitaminë luan një rol të rëndësishëm jo vetëm në sintezën e ADN-së, por edhe në ruajtjen e reaksioneve të metilimit në qeliza. Marrja e pamjaftueshme e folatit shoqërohet me zhvillimin e patologjive të shumta te njerëzit, duke përfshirë sëmundjet vaskulare, defektet e tubit neural, çrregullimet psiqike dhe, sipas disa autorëve, kancerin, megjithëse kjo hipotezë nuk është konfirmuar deri më sot (Zappacosta et al., 2014).

1.3.2 Vitamina B₁₂

Vitamina B₁₂ i referohet një grupi substancash të lidhura kimikisht (*kobalamina*), shumica e të cilave gjenden në mitokondri në formën e adenzil kobalaminës, ndërsa forma mbizotëruese në gjak është metilkobalamina. Konsumohet përmes dietës, veçanërisht mishit,

mëlçisë, peshkut, vezëve, qumështit dhe produkteve të qumështit. Në trupin e njeriut merr pjesë në dy reaksione enzimatike si ko-faktor: në procesin e metilimit të homocisteinës në metioninë dhe në reaksionin e izomerizimit të L-metilmalonil-CoA në suksinil-CoA. Në rastin e parë një mungesë e vitaminës B₁₂ çon në akumulimin e homocisteinës, në rastin e dytë në sintezën e acideve yndyrore jo fiziologjike, që përmbajnë një numër jonormal karbonesh (Metz, 1992).

1.3.3 Polimorfizmat e enzimës MTHFR

Siç u përmend më lart, enzima MTHFR katalizon një reaksion qendror të metabolizmit të folatit, përkatësisht shndërrimin e 5,10-metilentetrahidrofolatit në 5-metiltetrahidrofolat.

Gjenit *MTHFR* mund të kontribuojnë në rritjen e ndjeshmërisë ndaj sëmundjeve kardiovaskulare dhe jo vetëm (Castro et al., 2004).

Gjeni që kodon enzimën MTHFR ndodhet në pozicionin 1p36.3 dhe përbëhet nga 11 ekzone dhe është përgjithësisht 2.2 kb i gjatë (Pandey et al., 2014). Ky gjen ka 14 mutacione të rralla të shoqëruara me mungesë të rëndë enzimatike dhe një mutacion më të zakonshëm, C677T, i lidhur me mungesë të lehtë enzimatike (Liew e Gupta, 2015). Deri në vitin 1995, u identifikuan shtatë mutacione, gjashtë prej të cilave u karakterizuan nga një zëvendësim i vetëm i aminoacideve dhe një nga një mutacion 5' splice. Zëvendësimet homozigote të zbuluara përfshijnë zëvendësimin e pozicionit 764 bp të prolinës në leucinë, pozicionin 692 bp të treoninës në metioninë dhe pozicionin 985 bp të argininës në cisteinë. Mutacionet e tjera heterozigote në nivelin e ekzoneve 1, 5 dhe 6 përfshijnë zëvendësimet në pozicionin 1015 bp të cisteinës në argininë, në pozicionin 167 bp të argininës në acidin glutamik dhe në pozicionin 1081 bp të argininës në cisteinë. Mutacioni i zonës së bashkimit 5 përfshin eliminimin e 59 bp duke shkaktuar heqjen e 19 aminoacideve midis pozicioneve 653 dhe 939 bp (Goyette et al., 1995).

Në vitin 1996, u identifikuan pesë mutacione të reja të gjenit MTHFR, nga të cilat katër janë mutacione missense dhe një mutacion në vendin e splicing 3'. Ky i fundit përfshin një zëvendësim në pranuesin dinukletodie (AG). Mutacionet missense përfshijnë zëvendësimin e glicinës në valinë në pozicionin 458 bp, të leucinës në prolinë në 980 bp, të argininës në prolinë në 164 bp dhe të argininës në cisteinë në 1141 (Goyette et al., 1996).

Megjithatë, dy polimorfizmat më të zakonshme të gjenit *MTHFR* janë C677T dhe A1298A.

Mutacioni i enzimës MTHFR lidhet me rritjen e homocisteinës, veçanërisht në popullatën femërore me një konsum të ulët të folatit (Yamada et al., 2001). Krahasuar me gratë jo shtatzëna, nivelet e homocisteinës në shtatzënitë normale janë inferiore. Këto vlera janë për shkak të hemodilucionit që ndodh për shkak të rritjes së vëllimit të gjakut dhe shkallës së lartë të filtrimit glomerular, përveç faktit që fetusit mund të thithë një pjesë të Hcy gjatë shtatzënisë (Cikot et al., 2001). Niveli i Hcy zvogëlohet në shtatzëninë e hershme, arrin vlerën e tij më të ulët gjatë tremujorit të dytë dhe më pas, rritet në mënyrë të qëndrueshme gjatë shtatzënisë së vonë derisa të arrijë nivelin fillestar të shtatzënisë (Walker et al., 1999). Edhe nëse vlerat e Hcy në një fazë të avancuar të shtatzënisë janë më të ulëta se në periudhën para shtatzënisë, gratë shtatzëna janë më të ndjeshme ndaj ndryshimeve të shkaktuara nga hiperhomocisteinemia. Kjo për shkak se gjendja HHcy favorizon prodhimin e peroksidit të hidrogjenit dhe radikalëve të lirë të superoksidit që shkaktojnë dëmtim oksidativ të qelizave endoteliale, çon në një ulje të gjakut në kapilarë dhe si pasojë reduktimin e qarkullimit të gjakut ndërmjet nënës dhe fetusit (Tsen et al., 2003). Rezultati përfundimtar është një probabilitet i ulët për të çuar shtatzëninë deri në fund. Sipas studimeve të fundit, HHcy është shoqëruar me komplikime të shumta të shtatzënisë, aborte të përsëritura (Ota et al., 2020), preeklampsi (PE) (Laskowska et al., 2013), lindja e parakohshme (Qiu et al., 2018), shkëputja e placentës (Budde et al., 2007), kufizimi i rritjes së fetusit (FGR) (Jiang et al., 2016), dhe diabeti mellitus gestacional (GDM) (Guven et al., 2006). Megjithatë, disa prej këtyre rezultateve nuk kanë të dhëna të besueshme.

1.3.3a Polimorfizmi C677T

Në vitin 1988 Kang et al. përmes një analize enzimatiqe identifikuan në limfocitet e nxjerra nga pacientët që vuanin nga sëmundje kardiovaskulare, praninë e një varianti termolabil të enzimës MTHFR. Ky variant u shoqërua me një aktivitet të reduktuar të enzimës dhe një rritje të niveleve të homocisteinës (Kang et al., 1988). Më vonë, në 1995, Frosst et al. vunë re se ishte një mutacion pikësor që shkaktoi termolabilitetin e enzimës (Frosst et al., 1995). Në mënyrë të veçantë, mutacioni ishte për shkak të zëvendësimit të një citozine me një timinë në nukleotidin 677, e cila në nivelin e aminoacideve rezultoi në një zëvendësim në pozicionin 222 të ekzonit 4, të një alanine me një valinë (Zappacosta et al., 2014). Transmetohet në mënyrë autosomale recesive, pra sëmundja mund të shprehet kur gjenotipi është homozigot, pra i ka të dy alelet e mutuara të gjenit, ndërsa nëse gjenotipi është heterozigot është bartës i shëndetshëm. Prania e këtij polimorfizmi është identifikuar si një faktor rreziku për

zhvillimin e trombozës, sëmundjeve koronare të zemrës, aborteve dhe defekteve në tubin neuril. Frekuenca e gjeneve të mutacionit varet nga përkatësia etnike dhe në Evropë është rreth 3-3,7% dhe përfshin gjendjen e heterozigotitetit në rreth 30-40% të popullsisë dhe homozigotitetit në 10-15%. Frekuenca alelike duket të jetë më e lartë tek italianët dhe hispanikët, ndërsa më e ulët tek afrikano-amerikanët dhe në popullatën e Afrikës Sub-Sahariane (Botto dhe Yang, 2000). Ndër evropianët, aleli homozigot gjendet më së shumti te italianët, ndërsa përqindja më e ulët gjendet tek gjermanët (Liew dhe Gupta, 2014). Pasoja fenotipike e këtij varianti është një ulje e aktivitetit enzimatik të MTHFR e barabartë me 50%, deri në 30% në kushtet e ekspozimit ndaj nxehtësisë. Duke krahasuar aktivitetet enzimatike të enzimës MTHFR *in vitro*, u vu re se varianti heterozigot CT dhe varianti i mutuar TT kanë përkatësisht 65% dhe 30% të aktivitetit enzimatik në krahasim me variantin homozigot CC. Për më tepër, në krahasim me homozigotët CC, heterozigotët CT dhe homozigotët TT kanë 10% dhe 18% nivele më të ulëta të folatit në gjak; individët TT përveç se kanë një përqendrim të reduktuar të vitaminës B₁₂ në plazmën e gjakut, kanë tendencë të rrisin nivelet e homocisteinës (Nazki et al., 2014). Nivelet më të larta të homocisteinës janë për shkak të një aktiviteti të reduktuar të enzimës dhe kjo gjendje mund të kushtëzojë zhvillimin e disa sëmundjeve (Husemoen et al., 2014).

Gjendjet patologjike që lidhen me polimorfizmin C677T

Disa studime meta-analitike kanë vënë re një lidhje midis pranisë së polimorfizmit C677T dhe incidencës së kushteve të ndryshme patologjike, duke përfshirë sëmundjet kardiovaskulare. Në fakt, analiza të ndryshme kanë treguar se ekziston një lidhje midis pranisë së mutacionit MTHFR C677T dhe atij të goditjes hemorragjike dhe goditjes ishemike, veçanërisht në popullatën Kaukaziane dhe Aziatike (Yu et al., 2007) dhe sëmundje koronare të zemrës (Xuan et al., 20119). Në favor të kësaj u vu re se pacientët me sëmundje të arterieve koronare kanë nivele më të larta të homocisteinës, për më tepër gjenotipi MTHFR C677T lidhet me shkallën e ashpërsisë së sëmundjes së arterieve koronare në pacientët me rrezik të lartë për këtë patologji (Nazki et al., 2014). Përkundrazi gjenotipi MTHFR 677CC është në gjendje të sigurojë një furnizim të mirë të grupeve metil të nevojshme për

shndërrimin e homocisteinës në metioninë. Ky mekanizëm favorizon një pastrim të mirë të homocisteinës, si për të minimizuar efektet që rrjedhin nga faktorët ushqimorë, mjedisorë dhe gjenetikë, të cilët përkundrazi predispozojnë akumulimin e homocisteinës (Kluijtmans e Whitehead, 2001). Nga ana tjetër, në 1998 Brattstrom raportoi të kundërtën, duke argumentuar se polimorfizmi C677T çon në një hiperhomocisteinemi të lehtë (Brattstrom et al., 1998). Në favor të këtij vëzhgimi, një studim i vitit 2012 tregon se një rritje e moderuar e niveleve të homocisteinës gjatë gjithë jetës, nuk kishte asnjë efekt ose e shumta kishte efekte minimale në shfaqjen e sëmundjes koronare të zemrës (Clarke et al., 2012).

Një studim i kryer në Izrael mbi popullatën femërore raportoi se prania e mutacionit C677T rezultoi në një rritje të presionit diastolik të gjakut pavarësisht nga nivelet e lipideve në gjak. Në fakt duket se as polimorfizmi dhe as nivelet e homocisteinës nuk janë të lidhura me gjendje hiperlipidemike (Heifetz e Birk, 2014). Një studim i vitit 2014 theksoi gjithashtu lidhjen midis pranisë së polimorfizmit C677T dhe hipertensionit esencial (Cai et al., 2014) dhe një studim meta-analitik nga Yang et al. raportuan të njëjtat rezultate (Yang et al., 2014). Një tjetër patologji që lidhet me praninë e enzimës së mutuar është psoriasis. Psoriasis vulgaris ose psoriasis kronike me pllaka është një sëmundje inflamatore kronike dhe metilimi i ADN-së është thelbësor në mirëmbajtjen e duhur të funksioneve qelizore. Një studim u krye në indet epiteliale nga pacientë psoriatikë dhe të shëndetshëm, duke analizuar shkallën e metilimit të promotorit të gjenit supresor të tumorit SHP-1. Doli se te pacientët me psoriasis demetilimi i promotorit SHP-1 çon në një mbishprehje të izoformës II të këtij promotori, duke hipotezuar kështu se mutacioni i enzimës MTHFR mund të lidhet me psoriasis (Ruchusatsawat et al., 2006). Kjo lidhje u gjet në popullatën kineze (Baiqiu et al., 2009). Në të kundërt, Weger et al, nuk gjetën asnjë lidhje midis polimorfizmit MTHFR C677T dhe psoriazës në popullatën australiane (Weger et al., 2008), si dhe Liew et al, në popullatën malajziane (Liew et al., 2012). Të dhënat aktuale janë kaq kontradiktore saqë nevojiten studime të mëtejshme për të vlerësuar korrelacionin efektiv midis psoriazës dhe polimorfizmit MTHFR C677T. Mungesa e folatit dhe vitaminës B₁₂ e shkaktuar nga polimorfizmi shoqërohet me shfaqjen e çrregullimeve neurologjike dhe psikiatrike. Në fakt, një studim meta-analitik raporton lidhjen midis mutacionit C677T dhe Parkinsonit si në popullatën kaukaziane ashtu edhe në atë aziatike (Wu et al., 2013d). Studime të tjera kanë gjetur gjithashtu një lidhje midis polimorfizmit dhe sëmundjes së Alzheimerit në popullatën aziatike, por jo në popullatën Kaukaziane (Hua et al., 2011).

Ekzistojnë gjithashtu artikuj që theksojnë ndikimin e gjenotipit 677TT në rrezikun e zhvillimit të migrenës, si në popullatën aziatike ashtu edhe në atë kaukaziane (Schurks et al., 2010). Disa prova shkencore kanë vërejtur gjithashtu një korrelacion midis mutacionit C677T dhe çrregullimeve psikiatrike si skizofrenia dhe çrregullimi bipolar në popullatën aziatike dhe afrikane, por jo në popullatën Kaukaziane (Hu et al., 2014).

Një sëmundje tjetër me të cilën duket se ka një lidhje është nefropatia diabetike. Kjo lidhje u vu re në popullatën kaukaziane, arabe dhe kineze me diabet mellitus të tipit 2 (Al-Rubeaan et al., 2013; Yang et al., 2013; Zhang et al., 2014).

Hipoteza e disa studimeve që kanë shoqëruar mungesën e folatit me një incidencë të shtuar të tumoreve është ende e diskutueshme. Mungesa e folatit redukton disponueshmërinë e timidinës, e cila nga ana tjetër çon në një inkorporim të gabuar të vazhdueshëm të uracilit në ADN. Destabilizimi që rezulton i ADN-së mund të çojë në aberacione kromozomale dhe transformime të mundshme malinje (McKinnon e Caldecott, 2007). Për më tepër, metilimi i reduktuar i citozinës në ADN mund të çojë në shprehjen e pro-onkogjeneve dhe transformimeve të mundshme malinje (Choi e Mason, 2002). Sipas këtyre autorëve, polimorfizmi C677T mund të ketë pasoja të drejtpërdrejta në incidencën e kancerit. Konkretisht, lidhjet janë vërejtur me kancerin e gjirit, kancerin e qafës së mitrës, kancerin e gojës, ezofagut dhe stomakut, kancerin e mushkërive, kancerin e prostatës, kancerin kolorektal dhe leuçeminë limfoblastike akute (Liew e Gupta, 2014).

Së fundi, mutacioni C677T duket të jetë i lidhur me infertilitetin dhe abortin e vazhdueshëm (Wei et al., 2012; Cao et al., 2013).

Studimet në popullatat Kaukaziane dhe të Azisë Lindore kanë treguar një lidhje midis polimorfizmit dhe rrezikut të pre-eklampsisë, megjithëse të dhënat janë të pakta për popullatat e tjera. Mutacioni i enzimës MTHFR shoqërohet gjithashtu me rrezikun e shtuar të zhvillimit të sindromës Down, për shkak të ndryshimit të metabolizmit të acidit folik dhe të spina bifida (Wu et al., 2013c; Rai et al., 2014).

Plotësimi i vitaminës B në shtatzëni është thelbësor, veçanërisht në rastet kur të dy prindërit janë homozigotë për polimorfizmin C677T të enzimës MTHFR (Raghubeer e Matsha, 2021). Gjithashtu betaina përdoret shpesh në rast të mungesës së enzimës MTHFR, e cila rrit probabilitetin e bartjes së shtatzënisë deri në fund dhe redukton infertilitetin mashkullor (Froese, 2006).

1.3.3b Polimorfizmi A1298C

Polimorfizmi A1298C i enzimës MTHFR ndodhet në ekzonin 7, ku nukleotidi i adozinës në pozicionin 1298 është zëvendësuar me një citozinë që rezulton në zëvendësimin e acidit glutamik me alaninën në kodonin 429 (Zappacosta et al., 2014). Ky polimorfizëm gjendet në domenin rregullator të enzimës SAM dhe shkakton ndryshime konformacionale brenda enzimës MTHFR që ndryshojnë aktivitetin e saj (Zhang et al., 2018). Rezultati është një reduktim i aktivitetit enzimatik të MTHFR, megjithëse në një masë më të vogël se prania e mutacionit C677T. Reduktimi është më i theksuar te individët homozigotë (CC), të cilët kanë një aktivitet enzimatik të barabartë me 60%, të ndjekur nga individët heterozigotë (AC) dhe në fund nga individët normalë (AA) (Weisberg et al., 1998). Frekuenca alelike e mutacionit A1298C ndryshon sipas përkatësisë etnike: ka një prevalencë midis 7% dhe 12% në popullatën e Amerikës së Veriut dhe Evropës dhe frekuenca më të ulëta në popullatën hispanike (4-5%), kineze (1-4%) dhe në popullatat e tjera aziatike (1-4%) (Botto dhe Yang, 2000). Polimorfizmi A1298C në popullatën e përgjithshme nuk shoqërohet me nivele të larta të homocisteinës, por në pacientët me CVD ai përfaqëson një faktor rreziku për një sasi të tepërt të homocisteinës. Ka disa patologji që lidhen me praninë e këtij mutacioni, duke përfshirë sindromën Down (Rai et al., 2006), skizofreninë (Sazci et al., 2005), defektet e tubit neural (van der Put et al., 1998), çarjen e buzës dhe qiellzës (Jugessur et al., 2003), etj. Ashtu si me mutacionin C677T, janë publikuar raporte kontradiktore në lidhje me polimorfizmin MTHFR si një faktor rreziku për kancerin, duke gjetur pra dhe një lidhjeje pozitive (Wiemels et al., 2001) sikurse një lidhje negative (Sharp et al., 2002) me lloje të ndryshme të kancerit.

QËLLIMI I STUDIMIT

Sëmundjet kardiovaskulare përfshijnë çrregullime të zemrës dhe enëve të gjakut dhe janë shkaktarët kryesorë të vdekjeve kudo në botë.

Ateroskleroza përfaqëson shkakun kryesor në shfaqjen e CVD dhe në veçanti të inflamacionit vaskular. Nga ana tjetër, hiperhomocisteinemia përfaqëson një marker të rëndësishëm të rrezikut kardiovaskular, veçanërisht përsa i përket aterosklerozës, dhe ka një rol të rëndësishëm në stresin oksidativ. Në fakt, homocisteina përmes grupit të saj sulfhidril mund të pësojë vetëoksidim dhe të gjenerojë specie reaktive të oksigjenit me efekte citotoksike në qelizat vaskulare, duke rezultuar në mosfunksionim endotelial dhe rrjedhimisht inflamacion vaskular. Nivelet e homocisteinës ndikojnë në sintezën e H₂S , një gaz transmetues endogjen që rregullon procese të ndryshme fiziologjike, veçanërisht në nivelin vaskular, ku ka një veprim antiinflamator dhe vazodilatues. Në kushte fiziologjike, një pjesë e madhe e H₂S prodhohet duke përdorur cisteinë si substrat nëpërmjet enzimave CBS/CSE, ndërsa në rastin e hiperhomocisteinemisë homocisteina zëvendëson cisteinën, duke u bërë një burim i rëndësishëm i prodhimit të H₂S. Është raportuar gjithashtu se nivelet e larta të homocisteinës mund të shoqërohen me një prodhim të reduktuar të H₂S që i atribuohet reduktimit të transkriptimit dhe aktivitetit të enzimave CBS dhe CSE .

Duke qenë se H₂S ndikohet nga nivelet e homocisteinës ndikohet gjithashtu nga prania e polimorfizmave në enzimën MTHFR, një enzimë kyç në prodhimin e homocisteinës .

Por nëse nga njëra anë nivelet e homocisteinës rregullojnë prodhimin e H₂S , nga ana tjetër ato vetë rregullohen nga H₂S .

Duke u nisur nga këto supozime të mbledhura në literaturë, qëllimi i kërkimit tonë ishte të fillonim nga hapi i parë, duke vlerësuar nivelet e homocisteinës dhe duke vëzhguar se si këto mund të ndryshojnë sipas moshës dhe stilit të jetesës, siç është konsumimi i frutave dhe perimeve, pirja e duhanit dhe aktiviteti fizik. Së dyti, u krye gjenotipizimi i enzimës MTHFR dhe u vu re tendenca e niveleve të homocisteinës në varësi të gjenotipeve të ndryshme të polimorfizmave C677T dhe A1298C. Nga këto analiza, në mënyrë indirekte mund të parashikohet se cila popullatë do të ketë më shumë gjasa të pësojë inflamacion të enëve të gjakut , e për rrjedhojë të zhvillojë sëmundje kardiovaskulare.

KAPITULLI 2

MATERIALE DHE METODA

2.1 Pjesëmarrësit

Nga tetori 2019 deri në mars 2020, janë ftuar të marrin pjesë në studimin në fjalë 500 gra të shëndosha që kanë vizituar klinikën “At Luigi Monti” në Tiranë, një pjesë e të cilave janë përfaqësuar nga studente apo punonjëse të Universitetit “Zoja e Këshillë e Mirë” në Tiranë. Pjesëmarrja ishte 82.4%, kështu që 412 gra pranuan të merrnin pjesë . Studimi u miratua nga Komisioni i Etikës i Universitetit Katolik “Zoja e Këshillit të Mirë” në Tiranë dhe u mor pëlqimi me shkrim nga të gjithë pjesëmarrësit.

Individët e regjistruar në studim duhej të plotësonin një sërë kriteresh:

- ti përkasin gjinisë femërore;
- të jenë nga mosha 18 deri në 44 vjeç;
- të mos jenë shtatzënë ose në çdo rast të mos kenë planifikuar një shtatzëni në 6 muajt në vijim;

- të mos kenë marrë asnjë suplement që përmban acid folik në dy muajt e fundit dhe në përgjithësi të mos kenë përdorur multivitamina në dy muajt e fundit;
- të mos vuajnë nga sëmundje kronike që kërkojnë terapi afatgjata;
- të ndjekin një dietë të shëndetshme.

2.2 Vlerësimi klinik

U mblodhën informacione në lidhje me moshën, grada arsimore, peshën, gjatësinë, vendin e lindjes dhe vendbanimin, pirjen e duhanit, konsumimin e kafesë, konsumimin e frutave dhe perimeve, aktivitetin fizik, sëmundjet shoqëruese dhe barnat e përdorura.

Përsa i përket moshës, individët në shqyrtim u ndanë në tre kategori: nën 30 vjeç, midis 30 dhe 39 dhe midis 40 dhe 44. Një grupim tjetër u krye në bazë të numrit të porcioneve të frutave dhe perimeve të konsumuara çdo ditë: një, dy, tre, katër ose më shumë porcione ditore. Mungojnë rezultatet për 15 persona që nuk dhanë të dhëna për këtë çështje. Të dhënat u grupuan edhe sipas pirjes së duhanit, duke treguar me po dhe jo, jo duhanpirësit që nuk kanë pirë duhan për një kohë të gjatë ose nuk kanë pirë kurrë duhan. 14 janë subjektet që nuk kanë dhënë të dhëna për këtë .

Shtresëzimi i mëtejshëm u krye në bazë të shpeshtësisë së aktivitetit fizik të kryer çdo javë. Megjithatë, 15 subjekte nuk dhanë të dhëna në lidhje me këtë.

2.3 Marrja, ruajtja dhe dërgimi i kampioneve

Mostrat e gjakut janë marrë në periudhën tetor 2019 - mars 2020 në Poliklinikën “At Luigi Monti” në Tiranë. Gjaku venoz i mbledhur, pas një agjërimit gjatë natës, u vendos në një epruvetë pa antikoagulant për analizën e homocisteinës (BD Vacutainer) dhe në një që përmban K3 EDTA (acid etilendiaminotetraacetik me tri kalium) si antikoagulant (BD Vacutainer SST) për gjenotipizimi dhe transportuan menjëherë në laboratorin e së njëjtës Ambulancë për t'u përpunuar. Pas centrifugimit në 1500 g për 10 min. në T ambientit, mostrat e serumit u ndanë dhe u ngrinë në -80 ° C. Mostrat e gjakut me K3 EDTA u ngrinë menjëherë në -80°C në pritje të gjenotipizimit .

Mostrat për analizën e homocisteinës u dërguan me korrier në Laboratorin e Biokimisë dhe Biologjisë Molekulare Klinike të Fondacionit Spitalor Universitar A. Gemelli në Romë (Itali), ndërsa mostrat për gjenotipizimin u dërguan në Laboratorin e Mjekësisë Gjenomike

UILDM të Fondacioni Santa Lucia IRCCS Në Romë.

2.4 Dozimi homocisteinës

Homocisteina u vlerësua me kromatografi të lëngshme duke përdorur kompletin MS2000 ClinMass® Homocysteine në plazma/serum nga RECIPE® Chemicals + Instruments GmbH (Mynih, Gjermani).

Monitorimin e Reaksionit të Përzgjedhur (SRM) duke përdorur d8-homocistinë si standard të brendshëm, i cili reduktohet gjatë përgatitjes së mostrës dhe më pas identifikohet si d4-homocisteinë për kuantifikimin.

2.4.1 Përgatitja e mostrës

Reagentët përfshijnë katër kalibratorë dhe dy kontrolle RECIPE, të cilat mbulonin një gamë përqendrimi nga 0,794 deri në 6,66 ng / mL. Reagentët shtesë ishin një solucion d8-homocistine si një standard i brendshëm për përcaktimin e sasisë dhe një solucion për të reduktuar analitin dhe standardin e brendshëm në format përkatëse të lira.

Një kampion 50 µl i plazmës ose serumit u përzie me 50 µl tretësirë reduktuese dhe 50 µl tretësirë standarde të lëngshme dhe u inkubua në temperaturën e ambientit për 5 minuta. Më pas, 200 µL të tretësirës së precipitimit iu shtuan kampionit të reduktuar, pasuar nga përzierja në vortex, inkubimi për 5 minuta në 4 °C dhe centrifugimi për 5 minuta në 10,000 x g. Supernatanti u transferua në një pjatë ose epruvetë të pastër.

2.4.2 Kromatografia e lëngshme

Kromatografia e lëngshme u krye me elucionin izokratik me 0,55 mL /min duke përdorur fazën e lëvizshme dhe kolonën analitike të ofruar nga RECIPE. Koha totale e ekzekutimit ishte 1.2 minuta. Vëllimi i injektimit ishte 5 µl.

2.4.3 Spektrometria e masës

Analiti dhe standardi i brendshëm u zbuluan nga SRM në një spektrometër masiv katërpolësh trepolësh TQS MICRO (Waters Corporation, Milford, MA) me jonizimin me

elektrospërkatje të nxehtë të funksionuar në modalitetin pozitiv. Dy kalime SRM për secilin analit u përfshinë në metodën e përvetësimit për sasinë dhe konfirmimin, përkatësisht (nga 136,1 m / z në 56,1 m / z dhe nga 136,1 m / z në 90,1 m / z për l homocisteinë; tranzicionet e monitoruara ishin nga 140,1 m/z në 60,1 m/z dhe nga 140,1 m/z në 94,1 m/z për homocisteinën-d4).

Performanca e metodës u vlerësua në aspektin e carryover së linearitetit, saktësisë brenda dhe ndërmjet analizës. Carryover, i llogaritur në termat e raportit të përqindjes midis zonës së pikut të kalibratorit më të lartë dhe një kampioni të pastër të injektuar menjëherë, nuk ishte domethënëse.

Saktësia u vlerësua në termat e koeficientit të përqindjes së variacionit (% CV) duke përdorur kontrolle në dy nivele të ndryshme në përsëritje (**Tabela 2.1a, 2.1b**).

Tabela 2.1a. *Performanca e të dhënave.*

A.	Endogenous,	Added,	Mean ± SD	CV,	Mean
Recovery	μmol l⁻¹	μmol l⁻¹	mesasured,	%	recovery,
			μmol l⁻¹		%
Hcy	8.5	10	18.7 ± 0.99	5.3	100.9
Hcy	8.5	10	26.1 ± 1.43	5.5	91.6

Tabela 2.1b. *Saktësia e analizës.*

B.Precision	
Intraassay (n = 10)	Interassay (n = 10)

	Mean \pm SD, $\mu\text{mol l}^{-1}$	CV, %	Mean \pm SD, $\mu\text{mol l}^{-1}$	CV, %
Hcy	9.6 \pm 0.42	4.4	9.0 \pm 0.30	3.4
Hcy	17.7 \pm 0.91	5.1	17.4 \pm 0.21	1.2

2.5 Gjenotipizimi i enzimës MTHFR

2.5.1 Ekstraktimi i ADN-së

Mostrat e gjakut periferik u nxorën duke përdorur një ekstraktues automatik (MagPurix System, ResNova) në mënyrë që të standardizohej procedura dhe të lehtësohej pastrimi i automatizuar i ADN-së gjenomike. Sistemi i automatizuar përdor teknologjinë e grimcave magnetike për të ndihmuar në purifikimin e acidit nukleik. Nxjerrja e automatizuar nga gjaku periferik përfshin përdorimin e 400 μl materiali fillestar i cili futet drejtpërdrejt në instrument nëpërmjet përdorimit të disa tubave të posaçëm prej 2ml. Të gjithë reagentët (buferi i lizës, grimcat magnetike, buferi i larjes dhe elucionit) dhe i gjithë materiali i nevojshëm për hapin e izolimit futen në instrumentin. Gjatë inicializimit të instrumentit është e mundur të zgjidhet vëllimi përfundimtar i elucionit, i cili në këtë rast është vendosur 200 μl për të përfutur një përqendrim përfundimtar prej rreth 40ng/ μl . Kohëzgjatja e ekstraktimit është rreth 20 minuta dhe në fund të kësaj faze përftohet ADN gjenomike e cilësisë së lartë, gati për t'u përdorur për reaksionet e mëpasshme.

2.5.2 Qasjet molekulare për studimin e polimorfizmave të nukleotidit të vetëm (SNP) - Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR u përdor kryesisht për amplifikimin e polimorfizmave të zgjedhura për kërkimin e gjenotipeve të njohur që do të përdoren për zhvillimin e analizave të mëvonshme të Real Time PCR. Reaksionet e amplifikimit u vendosën për një vëllim përfundimtar prej 25 μl duke përdorur: 10X tampon, MgCl_2 , dNTPs në një përqendrim përfundimtar prej 1.25 mM, primer me një përqendrim përfundimtar prej 10 pmol/ μl , polimerazë TaqGold (5U μl) (Applied

Biosystems, Foster, CA). Përqendrimi i ADN-së së përdorur është 80ng/μl. Së fundi, për të verifikuar amplifikimin e saktë të amplikonëve të përzgjedhur, është përdorur ndarja elektroforetike në xhel agarozë 1,8% me një tension 120 për rreth 15-20 minuta. Pas fazës së amplifikimit të PCR, fragmentet e ADN-së iu nënshtruan sekuencës direkte.

2.5.3 Sekuencimi tradicional

Çdo fragment iu nënshtrua sekuencës së drejtpërdrejtë sipas protokolleve standarde. Purifikimi nevojitet për të eliminuar fragmentet me një varg të vetëm (primer, dNTP dhe produkte të tjera dytësore) të mbetura në tretësirë. Protokollin, me një vëllim përfundimtar prej 30 μl, parashikon purifikimin e 15 μl të produktit të amplifikuar dhe përgatitjen e një përzierjeje me 15 μl vëllim përfundimtar. Përzierja e parë e purifikimit kërkon reagentët e mëposhtëm: fosfatazë alkaline (10,000 U / ml), ekzonukleazë I (20,000 U / ml), bufer 10X dhe dH₂O për të arritur një vëllim përfundimtar prej 15 μl. Purifikimi i parë kërkon një inkubim në 37°C (aktivizimi i enzimave) për rreth një orë (koha e zgjedhur sipas madhësisë së fragmentit) dhe një fazë pasuese në 75°C për 15 sekonda (çaktivizimi enzimatik). Produkti i purifikuar ngarkohet më pas në xhel agarozë 1.8% dhe ndahet me elektroforezë me një tension prej 120 volt. Ky hap është i nevojshëm për të përcaktuar titullin e ADN-së që do të përdoret në hapin tjetër të sekuencimit (sekuenca PCR).

Reaksioni i sekuencimit u zhvillua duke përdorur BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA USA). Reagentët e përdorur janë: BigDye Terminator 3.1, buffer 5X, primer (përpara ose prapa) me një përqendrim përfundimtar 10 pmol/μl dhe në fund shtohen ADN dhe dH₂O për të arritur një vëllim përfundimtar prej 10 μl. Përqendrimi i ADN-së që do të përdoret zgjidhet në varësi të produktit që përfitohet nga purifikimi i parë. Sekuenca e ciklit PCR është: 96 °C 1', 96 °C 10'', 50 °C 5'', 60 °C 4' për 25 cikle. Pas fazës së amplifikimit, përpara se të ngarkohen sekuencat në kapilarin elektroforetik, fragmentet duhet të purifikohen. Metoda e dytë e purifikimit e përdorur është kompleti i purifikimit BigDye X Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA). Protokollin parashikon përdorimin e solucionit BigDye X Terminator (kap terminatorët dhe kripërat e sekuencave jo të inkorporuara) dhe solucionin SAM (përmirëson aktivitetin e tamponit dhe stabilizon produktin e purifikuar). Përzierja e purifikimit përbëhet nga 45μl tretësirë SAM dhe 10μl tampon mostër X Terminator. Në piastrën së pari ngarkohet sekuenca e PCR-së (10μl vëllimi përfundimtar) dhe më pas

përzjerja (vëllimi përfundimtar prej 55 µl). Në fund, pllaka rrotullohet për 45 minuta në një temperaturë të kontrolluar (17 ° C) dhe më pas rrotullohet në 2600 g për 5 minuta. Në fund të kësaj faze, pllaka ngarkohet në ABI PRISM® 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Sekuena e amplifikoneve me interes kryhet nëpërmjet elektroforezës në kapilar. Migrimi i mostrave bëhet në një xhel akrilamid i pajisur me kapilarë me një diametër midis 10 dhe 100 mikron me një gjatësi prej 36 cm. Ngarkimi bëhet automatikisht (elektrokinetik) në fakt kampioni merret direkt nga pllaka dhe transferohet brenda matricës. Efikasiteti i këtij sistemi ngarkimi lejon përdorimin e një sasive minimale të produktit të purifikuar. Një fushë elektrike aplikohet në skajet e kapilarit e cila lejon migrimin e mostrave. Kapilari ka, pranë katodës, një zonë pa mbulesë bakri, e cila ekspozon matricën dhe mostrat ndaj një rreze lazer. Burimi lazer ngacmon ddNTP-të fluoreshente të inkorporuara gjatë reaksionit Sanger. Fluorokromet, kur ngacmohen, lëshojnë një fluoreshencë të regjistruar nga një detektor.

Në fund të ekzekutimit elektroforetik, kompjuteri i lidhur me instrumentin përpunon të dhënat e papërpunuara duke krijuar një elektroferogram të karakterizuar nga maja të ndryshme fluoreshence që lidhen me sekuencën e rajonit të interesit.

2.5.4 Real Time PCR

Real time PCR karakterizohet nga amplifikimi dhe zbulimi i produktit PCR në të njëjtën kohë. Faza e gjenotipizimit u zhvillua duke përdorur kiminë TaqMan®, me përdorimin konsekuent të sondave oligonukleotide plotësuese të sekuencës së referencës dhe përkatësisht të etiketuara me një molekulë fluoreshente (FAM™ ose VIC™). Kimia TaqMAN përfshin përdorimin e sondave që në 5' kanë një molekulë Reporter, të aftë për të çliruar fluoreshencë nëse ngacmohet nga një burim lazer dhe në 3' një molekulë Quencer, të aftë për të përthithur fluoreshencën Reporter nëse ajo mbetet fizikisht afër saj. Prandaj, sondat janë oligonukleotide lineare me 25-28 çifte bazash të shënuara në 5' me Reporterin dhe në 3' me Quencer. Quencer anulon fluoreshencën e reporterit vetëm kur sonda është e paprekur; kur sonda është prerë nga aktiviteti 5'-3' eksonukleaza e polimerazës Taqman, Quencer dhe Reporter ndahen në tretësirë dhe, për rrjedhojë, fluoreshenca çlirohet (**Figura 2.1**).

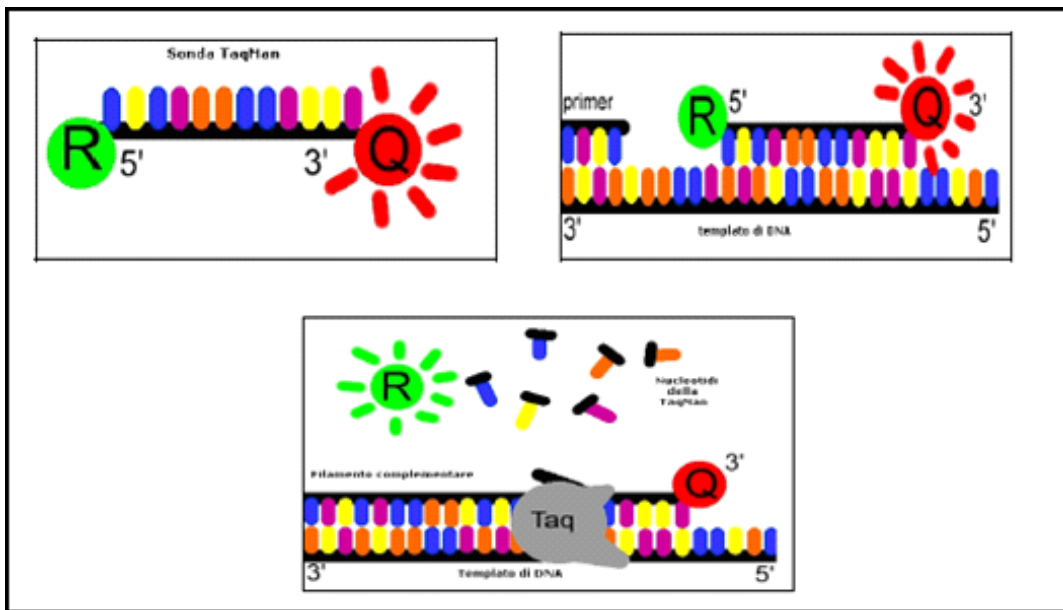


Figura 2.1. Kimia TaqMan.

Një sistem amplifikimi bi-alelik siguron që në të njëjtin reaksion dy sonda të ndryshme secila të etiketuar me një fluorofore (FAM[™] ose VIC[™]), janë plotësuese me një nga alelet e mundshme të SNP në analizë. Gjatë fazës annealing (“pjekjen”) sondat do të hibridizohen në filamentin e tyre specifik. Në fazën e shtrirjes, nga ana tjetër, do të ketë një rritje të fluoreshencës në lidhje me pjekjen e sondave dhe me fluoreshencën e çliruar (gjendja e homozigotitetit të një fluoreshence të çliruar, gjendja e heterozigotitetit dy fluoreshenca të çliruara). Kjo teknikë u krye në instrumentin ABI PRISM 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA) i aftë të funksionojë në të njëjtën kohë si një ciklues termik dhe një fluorometër. Programi përgjegjës për menaxhimin e instrumentit, Sistemi i Zbulimit të Sekuencës (SDS), merr spektrin e emetimit të kampionit për të gjithë kohëzgjatjen e reaksionit PCR dhe konverton variacionin e fluoreshencës së raportuesit në një paraqitje në kohë reale të kinetikës së amplifikimit. Cikli PCR në të cilin vlera e pragut të fluoreshencës raportuese arrihet jo për shkak të një ndryshimi të thjeshtë të "zhurmës së sfondit" të sistemit, por për shkak të një ngjarje specifike të amplifikimit, përcaktohet si cikli i pragut (Ct) i reagimit. Analiza TaqMan® përcakton sasinë e ADN-së së synuar në ciklin e pragut, prandaj, kur reaksioni PCR është në fazën eksponenciale, një kusht thelbësor për kryerjen e një sasive të saktë. Përzierja e reaksionit, me vëllim përfundimtar 12 µl, u përgatit duke përdorur: TaqMan® Universal PCR Master Mix 6 , 25 µl, Analiza e Gjenotipit SNP 0.2 µl , H₂O e

dyfishtë e distiluar në vëllim dhe ADN 40 ng/μl. Cikli i amplifikimit i përdorur është ai i rekomanduar nga protokoli, Applied Biosystems.

2.6 Analiza statistikore

Shpërndarja e gjenotipeve për çdo polimorfizëm u vlerësua si një devijim nga ekuilibri Hardy-Weinberg me χ^2 -test.

Analiza e të dhënave u krijua duke përdorur softuerin R, versioni i sistemit 4.2.0 për Windows © 2009.

KAPITULLI 3

REZULTATE DHE DISKUTIME

Tabela 3.1 tregon karakteristikat e përgjithshme të popullsisë në shqyrtim bazuar në informacionin e dhënë nga pyetësi i plotësuar në momentin e marrjes së kampioneve të gjakut. Në veçanti për sa i përket moshës, pjesëmarrëset u ndanë në tre grupe: nën 30 vjeç, midis 30 dhe 39 vjeç dhe midis 40 dhe 44 vjeç. Në grupin e parë bëjnë pjesë 225 gra (54,6%), midis 30 dhe 39 vjeç 136 gra (33,0%) dhe midis 40 dhe 44 vjeç, në fund, 37 gra (8,9%), 14 gra (3,4%) nuk kanë treguar moshën e tyre. Në përgjithësi, mosha mesatare e grave pjesëmarrëse në studim ishte 28.58 vjeç.

Bazuar në konsumin ditor të frutave dhe perimeve 130 gra (31.5%), kanë deklaruar se konsumojnë një porcion në ditë, 149 gra (36.2%) konsumojnë dy, 96 gra (23.3%) konsumojnë tre porcione, 20 gra (4.8%) konsumojnë katër dhe 2 gra (0.5%) konsumojnë 5 porcione. Në përgjithësi pra mund të themi se 279 individë (70.3%) konsumojnë më pak se tre racione në ditë fruta dhe perime dhe 118 individë (29.7%) konsumojnë tre ose më shumë. 15 gra nuk dhanë të dhëna në lidhje me këtë pyetje.

346 gra pohuan se aktualisht nuk janë duhanpirëse ose nuk kanë pirë kurrë duhan, ndërsa 52 (12,6%) janë duhanpirëse. 14 pjesëmarrëse nuk iu përgjigjën kësaj pyetjeje.

Shtresimi i mëtejshëm u krye në bazë të aktivitetit fizik të kryer çdo javë. 157 gra (38,1%) deklarojnë se kryejnë aktivitet fizik një herë në javë; 128 (31.1%) dy herë, 94 (22.8%) tre herë dhe 18 (4.4%) katër herë në javë. 15 pjesëmarrëse nuk dhanë përgjigje.

Tabela 3.1. Karakteristikat e popullsisë pjesëmarrëse.

		N = 412	%
Gjinia	Femër		
Mosha (vjet) *	<30	225	54.6
	30-39	136	33.0
	40-44	37	8.9
Mosha e mesme	28.58		
Konsumimi i frutave/perimeve (porcione/ditë) **	1	130	31.5
	2	149	36.2
	3	96	23.3
	4	20	4.8
	5	2	0.5
	<3	279	70,27
	≥3	118	29.73

Duhan*	N	346	83.9
	S.	52	12.6
Aktiviteti fizik (në javë) **	1	157	38.1
	2	128	31.1
	3	94	22.8
	4	18	4.4

* 14 mungojnë të dhënat në lidhje me moshën dhe duhanin

** 15 mungojnë të dhënat në lidhje me aktivitetin fizik dhe konsumin e frutave /perimeve.

3.1 Homocisteina

Mesatarja totale gjeometrike e homocisteinës rezultoi 10.32 $\mu\text{mol l}^{-1}$ me një interval besueshmërie 95 % (9.87-10.79).

Tabela 3.2. Vlerat e homocisteinës sipas kategorive të ndryshme.

		Nr.	Homocisteinë ($\mu\text{mol l}^{-1}$)
Mosha (vjet)			Mesatarja (95% CI)
	<30	225	10.42 (9.84-11.03)
	30-39	136	11.07 (10.31-11.89)
	40-44	37	8.49 (7.08-10.21)
Konsumimi i frutave dhe perimeve (porcione/ditë)	1	130	11.27 (10.47-12.12)
	2	149	9,99 (9,35-10,69)
	3	96	10.36 (9.35-11.49)
	4	20	9,23 (7,15-11,91)
	5	2	11.09 (1.74-70.94)

Duhan	Nr.	346	10.51 (10.02-11.03)
	S.	52	9,79 (8,81-10,89)
Aktiviteti fizik	1		10.64 (9.92-11.41)
	2	128	10,77 (9,96-11,64)
	3	94	10.11 (9.22-11.08)
	4	18	9.08 (7.03-11.73)

Veçanërisht, vlera ideale e Hcy ($<10 \text{ mol l}^{-1}$), sipas Dhonukshe-Rutten (Dhonukshe et al., 2007), vërehet në grupin e grave të moshës midis 40 dhe 44 vjeç; në moshën nën 30 vjeç përqendrimi mesatar e homocisteinës është $10,42 \text{ mol l}^{-1}$, tek gratë e moshës 30 dhe 39 vjeç është $11,07 \text{ mol l}^{-1}$.

Për sa i përket nivelit të Hcy në raport me konsumin ditor të frutave dhe perimeve, vlerat më të larta konfirmohen te pjesëmarrëset që konsumojnë një porcion në ditë me një përqendrim mesatar prej $11,27 \mu\text{mol l}^{-1}$. Konsumimi i dy ose tre porcioneve në ditë rezulton në nivele homocisteine përkatësisht $9,99 \mu\text{mol l}^{-1}$ dhe $10,36 \mu\text{mol l}^{-1}$. Rezultate edhe më të mira vërehen te popullata që konsumon katër porcione perimesh në ditë, në këtë rast përqendrimi mesatar i homocisteinës është $9,23 \mu\text{mol l}^{-1}$. Rezultati i përftuar me konsumimin e pesë porcioneve me fruta dhe perime duket anormal. Në këtë rast, në fakt, vlera është e barabartë me $11,09 \mu\text{mol l}^{-1}$. Megjithatë, ky rezultat nuk është i besueshëm pasi janë vetëm dy pjesëmarrëse në këtë rast, një numër i pamjaftueshëm për t'u marrë në konsideratë (**Figura 3.1**).

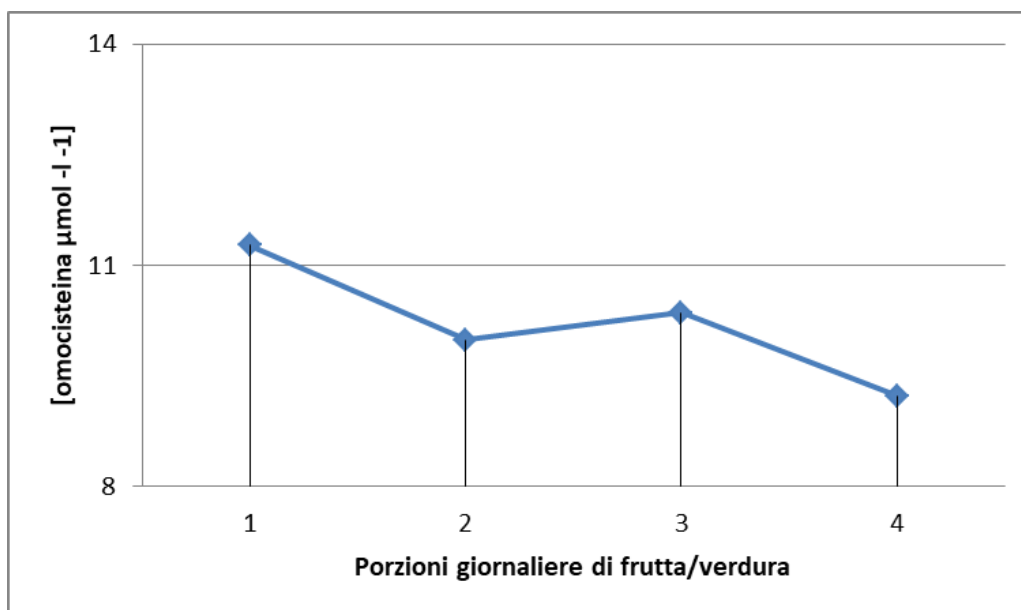


Figura 3.1. Trendi i niveleve të homocisteinës në gjak me rritjen e numrit të porcioneve të frutave dhe perimeve të konsumuara çdo ditë.

Në mënyrë të ngjashme, është vërejtur se aktiviteti fizik gjithashtu duket se kontribuon pozitivisht në uljen e niveleve të homocisteinës. Konkretisht, gratë që ushtrojnë aktivitet fizik vetëm një herë në javë kanë një përqendrim mesatar të homocisteinës në gjak të barabartë me $10.64 \mu\text{mol l}^{-1}$; po aq ata që e praktikojnë dy herë në javë kanë nivele shumë të afërta, të barabarta me $10.77 \mu\text{mol l}^{-1}$. Kur aktiviteti fizik i praktikuar çdo javë rritet në tre herë, nivelet e homocisteinës reduktohen, me vlera mesatare prej $10,11 \mu\text{mol l}^{-1}$. Kjo vlerë u ul më tej në $9,08 \mu\text{mol l}^{-1}$ tek gratë që e ushtrojnë katër herë në javë (**Figura 3.2**).

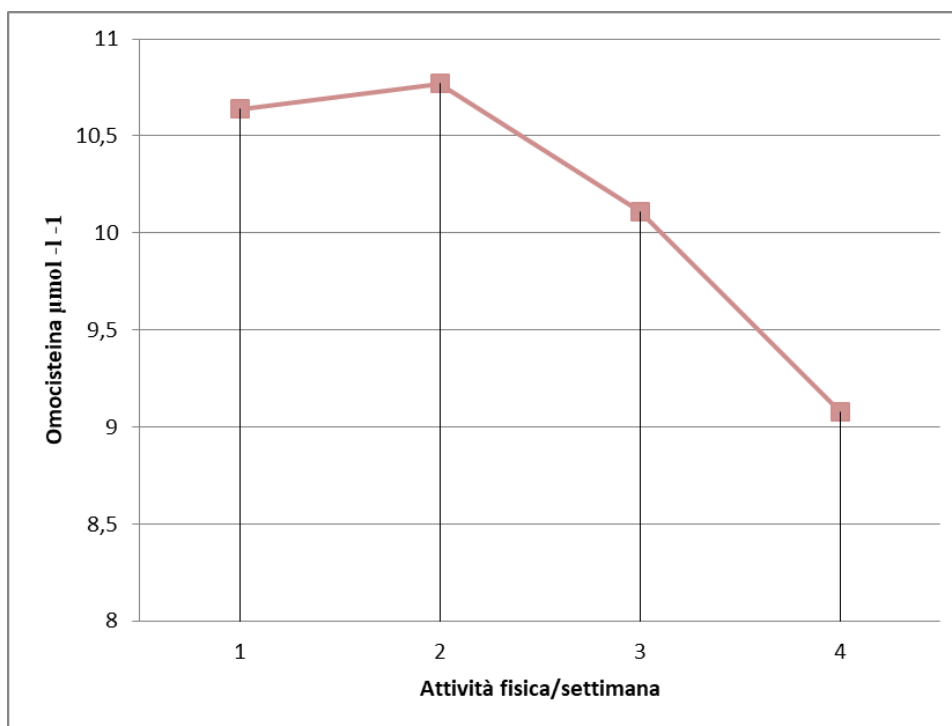


Figura 3.2. Reduktimi i përqendrimit të homocisteinës në gjak me rritjen e aktivitetit fizik javor.

Përsa i përket pirjes së duhanit, studimi zbuloi se duhanpirësit kanë nivele më të ulëta të homocisteinës ($9,79 \mu\text{mol l}^{-1}$) sesa jo duhanpirësit që kanë një nivel brenda kufijve normale të homocisteinës, por pak më të lartë, me një përqendrim mesatar prej $10,51 \mu\text{mol l}^{-1}$.

Tabela 3.3. Përqindja e pacientëve që tregojnë nivele normale të homocisteinës.

		Nr.	Homocisteinë ($<10 \mu\text{mol l}^{-1}$)
			% (95% CI)

TOTAL		412	42.19 (36.58-48.03)
Mosha (vjet)	<30	225	41.06 (33.53-49.03)
	30-39	136	36,73 (27,86-46,61)
	40-44	37	61,54 (42,53-77,57)
Konsumimi i frutave dhe perimeve (porcione/ditë)	1	130	37,66 (27,67-48,82)
	2	149	47,32 (38,32-56,50)
	3	96	38,46 (27,59-50,61)
	4	20	33.33 (15.18-58.29)
	5	2	50.00 (9.45-90.55)
Duhan	N.	346	41,70 (35,58-48,09)
	S.	52	44,44 (29,54-60,42)
Aktiviteti fizik	1	157	41.12 (32.26-50.59)
	2	128	43,95 (34,21-54,19)
	3	94	45.00 (33.09-57.51)
	4	18	38,46 (17,71-64,47) *

* P-vlera = 0,68, vlera nuk është statistikisht e ndryshme nga nivelet e homocisteinës në pacientët që ushtrojnë tre herë në javë.

Tabela 3.3 tregon përqindjen e pjesëmarrseve që kanë një përqendrim normal të homocisteinës, pra $<10 \text{ mol l}^{-1}$.

Nga e gjithë popullata që mori pjesë në studim, 42,19 % kishin nivele ideale të homocisteinës. Është interesante të theksohet se përqindja më e lartë (61.5%) e grave me vlera të Hcy nën 10 mol l^{-1} shfaqet në grupmoshën midis 40 dhe 44 vjeç.

Për sa i përket konsumit të frutave dhe perimeve, shohim se marrja e një porcioni ditor garantonte 37,66 % të pjesëmarrseve nën ekzaminim një nivel të mjaftueshëm të homocisteinës në gjak. Duke shkuar nga një në dy porcione ka një rritje të kësaj përqindje në 47,32% . Më pas, kjo përqindje bie në tre dhe katër porcione, paralelisht me numrin e grave

që bëjnë pjesë në këto grupe (përkatësisht 96 dhe 20).

Së fundi, 50% e subjekteve që konsumojnë 5 porcione në ditë fruta/perime tregojnë nivele adekuate të homocisteinës. Megjithatë, duhet theksuar se të dhënat në këtë rast janë dy, pra jo shumë domethënëse. Gjithashtu në rastin e aktivitetit fizik shohim se me rritjen e frekuencës së tij rritet përqindja e popullatës me nivele homocisteine më të ulët se $10 \mu\text{mol l}^{-1}$. Konkretisht, tek pacientët që kryejnë aktivitet fizik vetëm një herë në javë, 42,12 % shfaqin nivele normale të homocisteinës. Rritja e aktivitetit dy herë në javë pasqyrohet me një përqindje më të lartë të grave me nivele optimale të homocisteinës, e barabartë me 43,95 %. Përveç kësaj, përqindja rritet përsëri në 45% kur pacientët e ushtrojnë tre herë në javë. 38,46% e grave që kryejnë aktivitet fizik katër herë në javë kanë nivele homocisteine nën $10 \mu\text{mol l}^{-1}$. Megjithatë, në këtë rast niveli i rëndësisë së vëzhguar është i barabartë me 0,68, pra vlera në fakt nuk është statistikisht e ndryshme nga pjesëmarrëset që kryenin aktivitet fizik tre herë në javë. Për sa i përket duhanit u vu re se nivelet optimale të homocisteinës shfaqen në 41,70% të jo-duhanpirësve dhe në 44,44% të duhanpirësve.

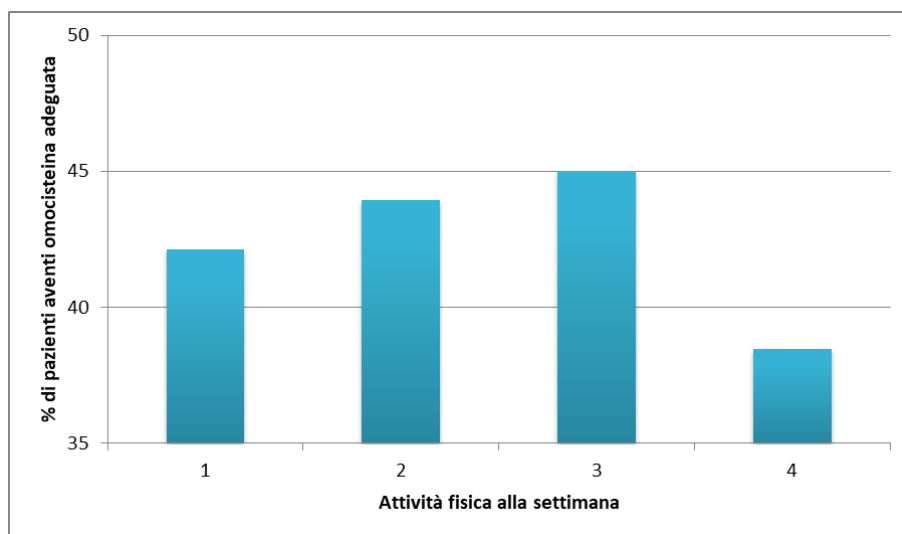


Figura 3.3. Përqindja e pacientëve me nivele normale të homocisteinës bazuar në aktivitetin fizik javor.

Një analizë e regresionit logjistik të shumëfishtë (**Tabela 3.4**) zbuloi se nuk ka dallime domethënëse për nivelet e homocisteinës në gjak krahasuar me parametrat e tjerë.

Tabela 3.4. Analizë e shumëfishtë e regresionit logjistik të vlerave të homocisteinës në lidhje me parametrat e tjerë.

		Homocisteina (<10 μmol l⁻¹) OSE (95% CI)
Mosha (vjet)	<30	1.00
	≥30	1,05 (0,65- 1,70)
Konsumimi i frutave dhe perimeve (porcione/ditë)	1 deri në 2 porcione	1.00
	3 deri në 4 porcione	1.28 (0.75- 2.18)
Duhan	Po	1.00
	Jo	1.12 (0.55- 2.27)
Aktiviteti fizik (në javë)	1 deri në 2 herë	1.00
	3 deri në 4 herë	1,06 (0,62- 1,82)

3.2 Polimorfizmat e enzimës MTHFR

Frekuenca e aleleve C dhe T të polimorfizmit C677T është përkatësisht 0.57 dhe 0.43. Frekuenca e gjenotipit të këtij polimorfizmi të parashikuar nga ekuilibri Hardy-Weinberg është 0.72. (Tabela 3.5).

Frekuenca e aleleve A dhe C të polimorfizmit A1298C, nga ana tjetër, është përkatësisht 0.73

dhe 0.27, në përputhje me frekuencën e gjenotipit të parashikuar nga ekuilibri Hardy-Weinberg prej 0.94. (Tabela 3.6).

Tabela 3.5. Frekuenca e gjenotipit dhe frekuenca alelike për polimorfizmin C677T.

SNP	Genotype	Genotype Counts	Genotype Frequencies	Allele	Allele Counts	Allele Frequencies
rs1801133 G/A (C677T)	CC	134	0.33	C	473	0.57
	CT	205	0.49	T	351	0.43
	TT	73	0.18			
HW $p=0.72$						

Tabela 3.6. Frekuenca e gjenotipit dhe frekuenca alelike për polimorfizmin A1298C.

SNP	Genotype	Genotype Counts	Genotype Frequencies	Allele	Allele Counts	Allele Frequencies
rs1801131 T/G (A1298C)	AA	216	0.52	A	597	0.73
	CA	165	0.40	C	227	0.27
	CC	31	0.08			
HW $p=0.94$						

Tabela 3.7. Frekuenca e gjenotipeve të ndryshme për polimorfizmat C677T dhe A1298C.

Gjenotipet MTHFR C677T	Nr.	%
CC	134	(32.5)
CT	205	(49.7)
TT	73	(17.7)

Gjenotipet MTHFR A1298C		
AA	216	(52.4)
B.C	165	(40.0)
CC	31	(7.5)
Kombinimi i gjenotipeve (677/1298)		
CC / AA	35	(8.5)
CC / AC	68	(16.5)
CC / CC	31	(7.5)
CT / AA	108	(26.2)
CT / AC	97	(23.5)
CT / CC	0	(0)
TT / AA	73	(17.2)
TT / AC	0	(0)
TT / CC	0	(0)

Për sa i përket polimorfizmit C677T, 49,7% e grave kanë gjenotipin CT heterozigot, 32,5% gjenotipin CC dhe në fund 17,7% gjenotipin TT.

Për polimorfizmin A1298C, 52.4% kanë gjenotipin AA; 40.0% kanë gjenotipin AC heterozigot dhe 7.5% kanë gjenotipin CC homozigot.

Nga kombinimi i gjenotipeve të ndryshme të dy polimorfizmave në shqyrtim, doli se kombinimet më të shpeshta janë CT C677T / AA A1298C, i pranishëm në 26,2% të popullsisë nën ekzaminim dhe CT C677T / AC A1298C, i pranishëm në 23,5% të pacientëve. Më pas vijnë kombinimet TT / AA të pranishme në 17.2%, CC C677T / AC A1298C të pranishme në 16.5% të popullsisë në shqyrtim, CC C677T / AA A1298C në 8.5% dhe CC C677T / CC A1298C në 7.5%.

3.3 Polimorfizmat dhe homocisteina

Një analizë e niveleve mesatare të homocisteinës u krye gjithashtu në bazë të gjenotipeve të

ndryshme të dy polimorfizmave për të vëzhguar nëse këto mund të ndryshojnë në ndonjë mënyrë përqendrimit e homocisteinës në gjak.

Për sa i përket polimorfizmit C677T, nivelet më të larta të homocisteinës gjenden në gjenotipin CC (mesatarisht 11,67 $\mu\text{mol l}^{-1}$), i pasuar nga gjenotipi TT (11,10 $\mu\text{mol l}^{-1}$) dhe në fund gjenotipi CT, në të cilin homocisteina ka një përqëndrim mesatar të barabartë me 10,64 $\mu\text{mol l}^{-1}$.

Referuar polimorfizmit A1298C, nivelet më të larta të homocisteinës vërehen në gjenotipin CC (mesatarisht 11.64 $\mu\text{mol l}^{-1}$), pasuar nga gjenotipi AC (11.10 $\mu\text{mol l}^{-1}$) dhe në fund gjenotipi AA, në të cilin vërehet një reduktim të përqëndrimit mesatar të homocisteinës, të barabartë me 10.92 $\mu\text{mol l}^{-1}$.

Nga ana tjetër, duke marrë në konsideratë kombinimet e ndryshme të dy polimorfizmave, kemi nivele homocisteine mesatare më të ulëta, të barabarta me 10,62 $\mu\text{mol l}^{-1}$, në gratë që kanë kombinimin gjenotipik CT C677T / CC (ose AC) A1298C; ndërsa nivelet më të larta ndodhen te pacientet me kombinim gjenotipik CC C677T / CC (ose AC) A1298C, me një vlerë mesatare prej 11.75 $\mu\text{mol l}^{-1}$.

Tabela 3.8. Përqendrimit mesatare të homocisteinës bazuar në gjenotipin e dy polimorfizmave.

Gjenotipet	Homocisteinë ($\mu\text{mol l}^{-1}$)

MTHFR C677T	
CC	11.67 (10.71-12.63)
CT	10.64 (9.99-11.28)
TT	11.10 (10.10-12.11)
MTHFR A1298C	
AA	10.92 (10.32-11.52)
B.C	11.10 (10.33-11.87)
CC	11.64 (9.07- 14.21)
Kombinimi i gjenotipeve (677/1298)	
CC / AA	11.42 (9.63-13.22)
CT / AA	10.66 (9.80- 11.51)
TT / AA	11.10 (10.10- 12.11)
CT / (AC ose CC)	10.62 (9.61-11.63)
CC / (AC ose CC)	11.75 (10.59-12.89)

3.4 Diskutim

Ky studim synonte vlerësimin e lidhjes së mundshme midis niveleve të homocisteinës dhe patologjive vaskulare inflamatore. Roli i homocisteinës si një marker i rrezikut kardiovaskular është vendosur prej vitesh, me referencë të veçantë për aterosklerozën (Tinelli et al., 2019). Në fakt, përqendrimet e larta të homocisteinës duket se favorizojnë formimin e lezioneve vaskulare me pasojë mosfunksionim endotelial. Roli i Hcy në mosfunksionimin

endotelial duket se ndërmjetësohet nga mekanizma të tillë si stresi oksidativ, inflamacioni dhe frenimi i NO sintazës endoteliale (eNOS) (Basu et al., 2014; Tinelli et al., 2019).

Edhe pse nivelet e homocisteinës në gjak janë dukshëm më të larta tek meshkujt sesa tek femrat (Dhonukshe-Rutten RAM 2009), të paktën derisa këto të fundit të arrijnë menopauzën, disa autorë kanë vënë në dukje se edhe femrat më të reja, pra në moshë riprodhuese, të cilat kanë hiperhomocisteinemi, mund të pësojnë sëmundje kardiovaskulare dhe riprodhuese (Verhoef et al., 2000; van den Bosch et al., 2003; Liu et al., 2020; Mishra et al., 2021); këto konsiderata, së bashku me faktin se deri më sot nuk ka të dhëna në lidhje me homocisteinën të marra nga gratë shqiptare, na shtynë të hetojmë nivelet e homocisteinës dhe disa polimorfizma të përfshira në metabolizmin e saj në një grup femrash shqiptare; kësaj iu shtua edhe një kërkim bibliografik që do të na ndihmonte të kornizonim rezultatet që kemi marrë në mënyrë eksperimentale me atë që disponohet në literaturë në lidhje me ndërveprimet e mundshme dhe pasojat që mund të rrjedhin prej tyre në anën klinike, midis H₂S dhe hiperhomocisteinemisë, një temë ende në zhvillim.

Popullata e studiuar përbëhej nga 412 gra vullnetare të shëndetshme, të moshës nga 18 deri në 44 vjeç, të cilat dhanë informacion përmes një pyetësori në lidhje me moshën, mënyrën e jetesës dhe zakonet e të ngrënit.

Përqendrimi mesatar total i homocisteinës është 10,32 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (95% CI 9,87-10,79). Kjo vlerë ishte më e ulët se mesatarja e vlerave evropiane, me përjashtim të dy studimeve të kryera në Itali (Sofi et al., 2008), në të cilat Hcy është më pak se 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$, një vlerë e treguar nga Dhonukshe-Rutten si ideal për parandalimin e sëmundjeve kardiovaskulare. Megjithatë, duhet të kihet parasysh se krahasimi me rezultatet e studimeve të tjera shpesh është i ndërlikuar nga përzgjedhja e popullatës në shqyrtim (gjinia, zakonet e të ngrënit) dhe nga teknikat e analizës së përdorur. Grupmosha me nivelet më të larta të homocisteinës përfaqësohet nga gratë e moshës 30-39 vjeç, me një përqendrim mesatar prej 11,07 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Për sa i përket variacionit të përqendrimeve të homocisteinës në varësi të stilit të jetesës së vullnetareve, u konstatua se një rol interesant luan konsumimi i frutave dhe perimeve. Në fakt, rritja e konsumit çon në uljen e niveleve të homocisteinës: tek gratë që konsumojnë një porcion ditor të frutave dhe perimeve përqendrimi është i barabartë me 11,27 $\mu\text{mol l}^{-1}$, dhe arrin në vlerat 9,23 $\mu\text{mol l}^{-1}$ tek gratë që konsumojnë katër porcione në ditë.

Në mënyrë të ngjashme, u vu re gjithashtu se aktiviteti fizik kontribuon në ruajtjen e vlerave optimale të homocisteinës: gratë që ushtrojnë aktivitet fizik një ose dy herë në javë kanë

përqendrim të homocisteinës në gjak përkatësisht 10.77 dhe 10.64 $\mu\text{mol l}^{-1}$, vlera të cilat janë reduktuar deri në 9,08 $\mu\text{mol l}^{-1}$ tek gratë që praktikojnë deri në katër seanca aktiviteti fizik në javë. Gjithashtu në përqindje doli se përqindja e pjesëmarrësve me nivele adekuatë të homocisteinës rritet me rritjen e aktivitetit fizik.

Në përgjithësi, pra, në popullatën në shqyrtim kemi vërejtur se 42,19% tregojnë vlera “ideale”, pra $<10 \mu\text{mol l}^{-1}$, të homocisteinës, dhe vetëm 12,1% kanë vlera $> 15,0 \mu\text{mol l}^{-1}$. Megjithatë, kemi të bëjmë me një situatë kufitare ose hiperhomocisteinemi e lehtë, e cila mund të ndikohet në mënyrë të favorshme nga ndryshimi i stilit të jetesës dhe të ushqyerit. Është vërtetuar se marrja e vitaminave të grupit B dhe në veçanti të B₆, B₁₂ dhe acidit folik, të pranishme kryesisht në peshk, mish, fruta dhe perime, vezë dhe produkte qumështi, ul ndjeshëm vlerën e homocisteinës plazmatike duke e kthyer në vlerat e rekomanduara (Hoxha et al., 2021).

Ndryshimet në nivelet e Hcy në plazmë mund të varen gjithashtu nga aktiviteti i një enzime kryesore në metabolizmin e folatit, MTHFR. Kjo enzimë është e përfshirë në metabolizmin e folatit dhe ndërmjetëson reduktimin e 5,10-MTHF në 5-MTHF, i përdorur ose për sintezën e prekursorëve të ADN/ARN-së ose për shndërrimin e homocisteinës në metioninë. Ky reaksion është i një rëndësie të konsiderueshme pasi ul nivelet e homocisteinës plazmatike. Si folati ashtu edhe vitamina B₁₂, duke qenë kofaktorë thelbësorë në procesin e rimetilimit të homocisteinës, kanë një rol thelbësor në ruajtjen e niveleve optimale të homocisteinës, aq sa një ulje e niveleve të tyre çon në një rritje të përqendrimit të Hcy në plazmë.

Prandaj, një mutacion i enzimës MTHFR mund të lidhet me akumulimin e homocisteinës, veçanërisht nëse shoqërohet me një mungesë të folatit (Yamada et al., 2001).

Për këtë arsye, krahas dozimit të homocisteinës, u krye gjenotipizimi i enzimës MTHFR për të evidentuar praninë e ndonjë polimorfizmi dhe për të vlerësuar korrelacionin e tyre me vlerat e homocisteinës së përfutur. Dy polimorfizmat më të zakonshëm, C677T dhe A1298C, u konsideruan për gjenotipizimin e enzimës MTHFR. Përsa i përket polimorfizmit C677T, shpërndarja e tij në baza etnike dhe gjeografike është karakteristike: gjenotipi TT, në fakt, është i pranishëm me frekuencë më të madhe në disa rajone si në Kinë, Meksikë dhe Italinë qendrore-jugore, ndërsa frekuenca e tij është veçanërisht e ulët në kontinentin afrikan (Wilcken et al., 2003; Zappacosta et al., 2014). 49,7 % e grave të studiuara për këtë polimorfizëm kanë gjenotipin CT; ndërsa për polimorfizmin A1298C 52.4% kanë gjenotipin AA.

Shpërndarja e gjenotipeve të ndryshme për secilin polimorfizëm u vlerësua për qëllimin e devijimit nga ekuilibri Hardy-Weinberg me testin p^2 . Frekuencat e të dy polimorfizmave janë në përputhje me ato të parashikuara nga ekuilibri Hardy-Weinberg: $p = 0.72$ për C677T dhe $p = 0.94$ për A1298C.

Frekuencat e alelit MTHFR 677T (43%) dhe asaj të alelit MTHFR 1298C (27%) në popullatën tonë janë në përputhje me ato të raportuara nga studime të shumta të kryera në vende të ndryshme (Nefic et al.; 2018).

Analiza e kombinimit të gjenotipeve të ndryshme të dy polimorfizmave në fjalë tregoi se kombinimi më i shpeshtë përfaqësohet nga subjektet heterozigotë për MTHFR C677T dhe homozigotë për alelin 1298A (26.2%). Subjektet heterozigote për lokalizimet 677 dhe 1298 (677CT / 1298AC) ishin 23.5%, gjë që konfirmon rezultatet e marra në vende të tjera si Turqia (21.6 %), Holanda (20.0 %), SHBA (19.0 %) (Sazci et al., 2005). Nuk u gjet asnjë homozigot i dyfishtë 677TT / 1298CC.

Siç u përmend tashmë, MTHFR luan një rol të rëndësishëm në metabolizmin e Hcy dhe, për këtë arsye, ne donim të studionim marrëdhëniet e mundshme midis niveleve të homocisteinës dhe gjenotipeve të ndryshme të dy polimorfizmave, në mënyrë që të vlerësonim se sa këto mund të ndikonin në një farë mënyre në përqendrimin e homocisteinës në gjak. Përsa i përket polimorfizmit C677T, prej kohësh dihet se gjenotipi 677TT shpesh shoqërohet me vlera të hiperhomocisteinemisë, veçanërisht në prani të përqendrimeve të ulëta të folatit; në studimin tonë, nga ana tjetër, u gjetën nivele më të larta të homocisteinës në gjenotipin CC (mesatarisht $11,67 \mu\text{mol l}^{-1}$); ndoshta është e rëndësishme të bëhen disa vëzhgime për të komentuar këtë rezultat: së pari vlerat e Hcy plazmatike të marra nga gratë që morën pjesë në studim nuk ndryshojnë ndjeshëm në gjenotipet e ndryshme (CC: 11.67, CT: 10.64, TT : 11.10), vetëm 34 gra kishin vlera pak $> 15 \mu\text{mol l}^{-1}$; në fakt kemi të bëjmë me një popullsi homogjene, e përbërë vetëm nga gra të reja dhe të shëndetshme, me sa duket pa kushte të veçanta që mund të çojnë në rritjen së përqendrimeve të Hcy; gjithashtu në raste të tjera, një situatë analoge, në dukje paradoksale, ndodhi për polimorfizmin A1298C kur homozigoti i tipit wild type 1298AA kishte vlera më të larta të Hcy sesa gjenotipi i mutuar 1298CC (Zappacosta et al., 2014). Hipoteza më e mundshme që justifikon rezultatin e marrë, duke e konsideruar gabimin tekniko-analitik fare të pamundur, mund të gjendet në llojin e popullsisë së rekrutuar për studim; mundësia e shtrirjes së studimit në një popullsi të përzier (meshkuj/femra), që vijnë nga zona të ndryshme të Shqipërisë (jo vetëm qytete, por edhe zona rurale me zakone të

ndryshme jetese dhe ushqimi) mund të jetë e dobishme për të konfirmuar ose jo hipotezën tonë të popullsisë ose, çfarë është edhe më interesante, për të konfirmuar të dhënat që kemi marrë në këtë studim.

Përsa i përket polimorfizmit A1298C, nivelet më të larta të homocisteinës vërehen në gjenotipin CC (mesatarisht $11,64 \mu\text{mol l}^{-1}$).

Duke qenë se prania e një polimorfizmi është një faktor gjenetik i pamodifikueshëm, kërkimi synon të identifikojë zgjidhje që mund të favorizojnë, kur është e nevojshme, uljen e niveleve të homocisteinës në gjak. Në këtë drejtim, kohët e fundit interes të konsiderueshëm ka fituar H_2S , një gaz transmetues endogjen që rregullon procese të ndryshme fiziologjike, veçanërisht në nivel vaskular, ku ka një veprim antiinflamator dhe vazodilatues. Gjenerimi i H_2S është i lidhur ngushtë me metabolizmin e homocisteinës nëpërmjet enzimave CBS dhe CSE (Yang dhe He, 2019). Në kushte fiziologjike, kur ka përqendrime më të larta të cisteinës (rreth $250 \mu\text{mol l}^{-1}$) se përqendrimet e homocisteinës (rreth $10/12 \mu\text{mol l}^{-1}$), 70% e H_2S prodhohet duke përdorur cisteinë si substrati përmes enzimave CBS/CSE, ndërsa në rast të hiperhomocisteinemisë homocisteina zëvendëson cisteinën duke u bërë burimi kryesor i prodhimit të H_2S (Chiku et al., 2009).

Megjithatë, në studime të tjera është vërejtur se nivelet e larta të homocisteinës shoqërohen me reduktim të prodhimit të H_2S që i atribuohet reduktimit të transkriptimit dhe aktivitetit të enzimave CBS dhe CSE. Pra, ne mund të shohim se si prodhimi i H_2S dhe homocisteinës janë të lidhura ngushtë me njëra-tjetrën.

Për të ulur nivelin e homocisteinës dhe për të parandaluar sa më shumë shfaqjen e sëmundjeve kardiovaskulare, përdorimi i dhuruesve të H_2S po fiton gjithnjë e më shumë interes. Në fakt, falë përpjekjeve intensive që janë zbatuar së fundmi nga kërkimet biomjekësore në këtë fushë, ne e dimë se ka shumë dhurues H_2S dhe kërkimi i molekulave që mund të paraqesin një gjenerim të kënaqshëm fiziologjik H_2S paraqet një sfidë aktuale. Midis molekulave të ndryshme, një pjesë shumë e rëndësishme përfaqësohet nga komponentët e squfurit me origjinë natyrore, në këtë kuptim mund të ishte interesante t'u rekomandohej popullatës femërore në fjalë në përgjithësi, por veçanërisht atyre që shfaqin nivele pak më të larta të homocisteinës, konsumi të Brassicaceae si lakra, brokoli, lulëlakra dhe rukola, të pasura me izotiocianate të njohur si dhurues të sulfurit të hidrogjenit (Martelli et al., 2020).

Këto molekula me origjinë natyrore mund të përfaqësojnë një mjet të dobishëm

farmakologjik për t'u përdorur në terapi, por gjithashtu mund të ofrojnë një template të vlefshëm për sintezën e molekulave të reja të dhuruesve së H₂S me karakteristika të përmirësuara farmakodinamike dhe/ose farmakokinetike për t'u shfrytëzuar në profilaksinë dhe terapinë e sëmundjeve kardiovaskulare - të varura nga homocisteina (Citi et al., 2021).

Bibliografia

- Achour, S., Elmtaoua, D. Zellama et al., (2016). The c677t mthfr genotypes influence the efficacy of b9 and b12 vitamins supplementation to lowering plasma total homocysteine in hemodialysis,"*Journal of Nephrology*, vol. 29, no. 5, pp. 691–698.
- Al-Rubeaan, K., Siddiqui, K., Saeb, A.T., Nazir, N., Al-Naqeb, D. & Al-Qasim, S. (2013). ACE I/D and MTHFR C677T polymorphisms are significantly associated with type 2 diabetes in Arab ethnicity: a meta-analysis. *Gene*, 520, 166e77.
- Araki, A. & Sako, Y.(1987). Determination of free and total homocysteine in human

plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr*, 422, 43-52.

- Baiqiu, W., Songbin, F., Guiyin, Z. & Pu, L. (2000). Study of the relationship between psoriasis and the polymorphic site C677T of methylenetetrahydrofolate reductase. *Chin Med Sci J*, 15, 119e20.
- Banerjee, I., Gupta, V. & Ganesh, S. (2007). Association of gene polymorphism with genetic susceptibility to stroke in Asian populations: a meta-analysis. *J Hum Genet*, 52, 205e19.
- Botto, L. & Yang, Q. (2000). 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J Epidemiol*, 151, 862e77.
- Brattström, L., Wilcken, D.E., Ohrvik, J. & Brudin, L. (1998). Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation*, 98, 2520e6.
- Budde, M.P., de Lange, T.E., Dekker, G.A., Chan, A. & Nguyen, A.M. (2007). Risk factors for placental abruption in a socio-economically disadvantaged region. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 20(9), 687–693.
- Cai, W., Yin, L., Yang, F., Zhang, L. & Cheng J. (2014). Association between Hcy levels and the CBS844 ins68 and MTHFR C677T polymorphisms with essential hypertension. *Biomed Rep*, 2, 861e8.
- Cao, Y., Xu, J., Zhang, Z., Huang, X., Zhang, A., Wang, J., et al. (2013). Association study between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Gene*, 514, 105e11.
- Castro, R., Rivera, I., Blom, H.J. & Jakobs, C. (2006). Homocysteine metabolism, hyperhomocysteinemia and vascular disease: an overview. *Journal of Inherited Metabolic disease*, 29(1), 3-20.
- Castro, R., Rivera, I., Ravasco, P., Camilo, M.E., Jakobs C., Blom H.J. & de Almeida I.I. (2004). 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C/T and 1298A/C mutations are associated with DNA hypomethylation. *Journal of Medical Genetics* 41,(6), 454-458.
- Castro, R., Rivera, I., Struys, E.A., Jansen, E.E., Ravasco, P., Camilo, M.E., et al. (2003). Increased homocysteine and S-adenosylhomocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease. *Clinical Chemistry*, 49(8), 1292-1296.

- Chang, L., Geng, B., Yu, F., et al. (2008). Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats. *Amino Acids*, 34(4), 573–585.
- Chen, L., Ingrid, S., Ding, Y. et al., (2007). Imbalance of endogenous homocysteine and hydrogen sulfide metabolic pathway in essential hypertensive children. *Chinese Medical Journal*, 120, 5, 389–393.
- Chertok, V.M. & Kotsyuba, A.E. (2012). Distribution of h2s synthesis enzymes in the walls of cerebral arteries in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 154(1), 104– 107.
- Chiang, J.K., Sung, M.L., Yu, H.R., Chang, H.I., Kuo, H.C., Tsai, T.C. et al. (2011). Homocysteine induces smooth muscle cell proliferation through differential regulation of cyclins A and D1 expression. *Journal of Cellular Physiology*, 226(4), 1017-1026.
- Chiku, T., Padovani, D., Zhu, W., Singh, S., Vitvitsky, V. & Banerjee, R. (2009). H2s biogenesis by human cystathionine gamma-lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of Hyperhomocysteinemia. *Journal of Biological Chemistry*, 284(17), 11601–11612.
- Choi, S.W. & Mason, J.B. (2002). Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr* 132, 2413Se8S.
- Cikot, R. J. L. M., Steegers-Theunissen, R. P., Thomas, C.M., de Boo, T.M., Merkus, H.M. & Steegers, E.A. (2001). Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. *The British Journal of Nutrition*, vol, 85(1), 49–58, 2001).
- Citi, V., Martelli, A., Gorica, E., Brogi, S., Testai, L. & Calderone, V. (2021), Role of hydrogen sulfide in endothelial dysfunction: Pathophysiology and therapeutic approaches. *Journal of Advanced Research* 27, 99–113.
- Clarke, R. & Bennett, D. (2014). Folate and prevention of neural tube defects – *Editorial, BMJ*. 349 94810.
- Clarke, R., Bennett, D.A., Parish, S., Verhoef, P., Dötsch-Klerk, M., Lathrop, M., et al. (2012). MTHFR Studies Collaborative Group. Homocysteine and coronary heart disease: metaanalysis of MTHFR case-control studies, avoiding publication bias. *PLoS Med*, 9, e1001177.
- Coppedè, F., Migheli, F., Bargagna, S., Siciliano, G., Antonucci, I., Stuppia, L., et al. (2009). Association of maternal polymorphisms in folate metabolizing genes with

chromosome damage and risk of Down syndrome offspring. *Neuroscience letters*, 449(1), 15-19.

- Cui, X., Navneet, S., Wang, J., et al. (2017). Analysis of mthfr, cbs, glutathione, taurine, and hydrogen sulfide levels in retinas of hyperhomocysteinemic mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(4), 1954–1963.
- Djuric, D., Jakovljevic, V., Zivkovic, Z.V. & Srejsovic, I. (2018). Homocysteine and homocysteine-related compounds: an overview of the roles in the pathology of the cardiovascular and nervous systems. *Can J Physiol Pharmacol*, 96(10), 991-1003.
- Domi, E., Hoxha, M., Hoxha, B. & Zappacosta, B. (2021). The Interaction between Arachidonic Acid Metabolism and Homocysteine. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.*, 21(7), 1232-1241.
- Ertuna, E., Loot, A.E., Fleming, I & Yetik-Anacak, G. (2017). The role of enos on the compensatory regulation of vascular tonus by h2s in mouse carotid arteries. *Nitric Oxide*, 69, 45– 50.
- Finkelstein, J.D. & Martin, J. (1986). Methionine metabolism in mammals: adaptation to methionine excess. *J Biol Chem*, 261, 1582-7.
- Finkelstein, J.D. (2000). Homocysteine: A History in Progress. *Nutrition reviews*, 58(7), 193–204.
- Froese, D.S., Huemer, M., Suormala, T., Burda, P., Coelho, D., Guéant, J.L., et al. (2016). Mutation update and review of severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Hum. Mutat*, 37, 427–438.
- Frosst, P., Blom, H.J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C.A., Mattews, R.G., et al. (1995). A candidate gene risk factor for vascular disease: a common mutation at the metylenetetrahydrofolate reductase locus. *Nat Genet* 10, 111-113.
- Gaifullina, A.S., Lazniewska, J., Gerasimova, E.V., et al. (2019). A potential role for t-type calcium channels in homocysteinemia-induced peripheral neuropathy. *Pain*, p. 1
- Gesi, M., Ferrucci, M. & Ghelarducci, I. (2007). Anatomia del corpo umano (Vol. 1) .
- Giuffre, A. & Vicente, J.B. (2018). Hydrogen sulfide biochemistry and interplay with other gaseous mediators in mammalian physiology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2018.

- Giustarini, D., Tazzari, V., Bassanini, I., Rossi, R. & Sparatore, A. (2018). The new h2s-releasing compound acs94 exerts protective effects through the modulation of thiol homeostasis. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33(1), 1392–1404.
- Goyette, P., Christensen, B., Rosenblatt, D. & Rozen, R. (1996). Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR. *Am J Hum Genet*, 59,1268e75.
- Goyette, P., Frosst, P., Rosenblatt D, Rozen R. (1994). Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet*, 56,1052e9.
- Goyette, P., Sumner, J.S., Milos, R. & Duncan, A.M.V., Rosenblatt, D.S., Matthews, R.G. et al. (1994). Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: Isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat. Genet*, 7, 195–200.
- Guven, M.A., Kilinc, M., Batukan, C., Ekerbicer, H.C. & Aksu, T. (2006). Elevated second trimester serum homocysteine levels in women with gestational diabetes mellitus. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 274(6), 333–337.
- Hankey, G. J. Eikelboo. J.W., Yi, G. et al. (2012). Antiplatelet therapy and the effects of b vitamins in patients with previous stroke or transient ischaemic attack: a post-hoc subanalysis of vitatops, a randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*, vol. 11, no. 6, pp. 512–520.
- He, Y., Liu, S., Zhang, Z., et al. (2017). Imbalance of endogenous hydrogen sulfide and homocysteine in chronic obstructive pulmonary disease combined with cardiovascular disease. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 624, 2017.
- Heifetz, E.M. & Birk, R.Z. (2014). MTHFR C677T polymorphism affects normotensive diastolic blood pressure independently of blood lipids. *Am J Hypertens*, ([Epub ahead of print]).
- Holmes, M. V., Newcombe, P., Hubacek, J.A., et al. (2011). Effect modification by population dietary folate on the association between mthfr genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomised trials. *The Lancet*, 378(9791), 584–594.
- Hoxha, B., Hoxha, M., Domi, E., Gervasoni, J., Persichilli, S., Malaj, V & 4 and Zappacosta, B. (2021). Folic Acid and Autism: A Systematic Review of the Current

State of Knowledge. *Cells*. 2021 Aug; 10(8), 1976.

- Hu, C.Y., Qian, Z.Z., Gong, F.F., Lu, S.S., Feng, F., Wu, Y.L., et al. (2014). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism susceptibility to schizophrenia and bipolar disorder: an updated meta-analysis. *J Neural Transm*.
- Hua, Y., Zhao, H., Kong, Y. & Ye, M. (2011). Association between the MTHFR gene and Alzheimer's disease: a meta-analysis. *Int J Neurosci*, 121, 462e71.
- Huang, X., Qin, X., Yang et al. (2018). MTHFR Gene and serum folate interaction on serum homocysteine Lowering. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(3), 679–685.
- Husemoen, L.L.N., Skaaby, T., Jorgensen, T., Thuesen, B.H., Fenger, M., Grarup, N., et al.(2014). MTHFR C677T genotype and cardiovascular risk in a general population without mandatory folic acid fortification *European Journal of Nutrition*, 53(7), 1549-1559.
- Ibrahim, S., Maqbool, S., Azam, M., Iqbal, M.P. & Qamar, R. (2018). Cbs mutations and mtfhr snps causative of hyperhomocysteinemia in pakistani children. *Molecular Biology Reports*, 45(3), pp. 353 –360.
- Jakubowski, H. (2000). Homocysteine thiolactone: metabolic origin and protein homocysteinylolation in humans. *J. Nutr*, 130 (Suppl. 2S), 377S–381S.
- Jiang, H.L., Cao, L.Q. & Chen, H.Y. (2016). Blood folic acid, vitamin B12, and homocysteine levels in pregnant women with fetal growth restriction. *Genetics and Molecular Research*, 15(4).
- Jugessur, A., Wilcox, A.J., Lie, R.T., Murray, J.C., Taylor, J.A., Ulvik, A., et al. (2003). Exploring the effects of methylenetetrahydrofolate reductase gene variants C677T and A1298C on the risk of orofacial clefts in 261 Norwegian case-parent triads. *Am J Epidemiol*, 157, 1083–91.
- Kabil, O., Yadav, V., & Banerjee, R. (2016). Heme-dependent metabolite switching regulates h2s synthesis in response to endoplasmic reticulum (er) stress,” *Journal of Biological Chemistry*, 291,(32), 16418–16423.
- Kalter, H. (2000). Folic acid and human malformations: a summary and evaluation. *Reprod Toxicol*, 14, 463–476.
- Kamat, P. K., Kalani, A., Tyagi, S.C. & Tyagi, N. (2015). Hydrogen sulfide epigenetically attenuates homocysteine-induced mitochondrial toxicity mediated

through nmda receptor in mouse brain endothelial (bend3) cells. *Journal of Cellular Physiology*, 230(2), 378–394

- Kamat, P.K., Kalani, A., Givvimani, S., Sathnur, P.B., Tyagi, S.C. & Tyagi, N. (2013). Hydrogen sulfide attenuates neurodegeneration and neurovascular dysfunction induced by intracerebrally administered homocysteine in mice. *Neuroscience*, 252, 302–319.
- Kang, S.S., Zhou, J., Wong, P.W., Kowalisyn, J. & Strokosch, G. (1988). Intermediate Homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet*, 43, 414-421.
- Kar, S., Shahshahan, H.S., Kambis T, et al. (2019). Hydrogen sulfide ameliorates homocysteine-induced cardiac remodeling and dysfunction. *Frontiers in Physiology*, 10, 598.
- Kimura, Y. & Kimura, H. (2004) Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *The FASEB Journal*, 18 (10), 1165–1167.
- Kluijtmans, L.A. & Whitehead, A.S. (2001). Methylenetetrahydrofolate reductase genotypes and predisposition to atherothrombotic disease. *European heart journal*, 22(4), 294-299.
- Kruger W.D. & Gupta, S. (2016). The effect of dietary modulation of sulfur amino acids on cystathionine β synthase-deficient mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1363,(1,), 80–90.
- Laskowska, M., Laskowska, K., Terbosh, M. & Oleszczuk, J. (2013). A comparison of maternal serum levels of endothelial nitric oxide synthase, asymmetric dimethylarginine, and homocysteine in normal and preeclamptic pregnancies. *Medical Science Monitor*, 19, 430–437.
- Li, T., Yu, B., Liu, Z., et al., (2018). Homocysteine directly interacts and activates the angiotensin II type I receptor to aggravate vascular injury. *Nature Communications*, 9(1).
- Liew, S.C. & Gupta, E.D. (2014). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases, *European Journal of Medical Genetics*.
- Liew, S.C., Das-Gupta, E., Wong, S.F., Lee, N., Safdar, N. & Jamil, A. (2012). Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677 C > T gene

polymorphism and homocysteine levels in psoriasis vulgaris patients from Malaysia: a case-control study. *Nutr J*, 11, 1.

- Liu, S.Y., Duan, X.C., Jin, S., et al. (2017). Hydrogen Sulfide Improves Myocardial Remodeling via Downregulated Angiotensin II/AT1R Pathway in Renovascular Hypertensive Rats. *American Journal of Hypertension*, 30(1), 67–74.
- Liu, X., Shi, M. & Xia, F. (2015). The china stroke secondary prevention trial (csspt) protocol: a double-blinded, randomized, controlled trial of combined folic acid and b vitamins for secondary prevention of stroke. *International Journal of Stroke*, 10,(2), 264–268.
- Lucock, M. (2000). Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Molecular Genetics and Metabolis*, 71, 121-138.
- Martí-Carvajal, A.J., Solà, I., Lathyris, D., Dayer, M. & Cochrane Heart Group. (2017). Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, vol. 8, article CD006612.
- Mastroeni, D., Grover, A., Delvaux, E., Whiteside C., Coleman M D.P. & Rogers J. (2011) Epigenetic mechanisms in Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Aging*, volume 32, issue 7, pages 1161-1180).
- McCully, K.S. (2007). Homocysteine, vitamins, and vascular disease prevention (2007). *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(5), 1563S-1568S.
- McKinnon, P.J. & Caldecott, K.W. (2007). DNA strand break repair and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8, 37e55
- Medical Research Council Vitamin Study Research Group (1991). Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study, *Lancet*. 338 131–137.
- Metz, J. (1992). Cobalamin deficiency and the pathogenesis of nervous system disease. *Annu Rev Nutrition*, 12, 59-79.
- Migliore, L. & Andreassi, M.G. (2012). Epigenetics of Atherosclerosis: current insights and future perspectives.. *Cardiovascular disease; nutritional and therapeutic interventions*, CRC press.
- Nakano, S., Ishii, I., Shinmura, K., et al. (2015). Hyperhomocysteinemia abrogates fasting-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion by limiting bioavailability of hydrogen sulfide anions. *Journal of Molecular Medicine*, 93(8),

879–889.

- Nandi, S.S. & Mishra, P.K. (2017). H₂S and homocysteine control a novel feedback regulation of cystathionine beta synthase and cystathionine gamma lyase in cardiomyocytes. *Scientific Reports*, 7(1), 3639.
- Nath, N., Prasad, H.K. & Kumar, M. (2018). Cerebroprotective effects of hydrogen sulfide in homocysteine-induced neurovascular permeability: Involvement of oxidative stress, arginase, and matrix metalloproteinase-9. *Journal of Cellular Physiology*, 234(3), 3007–3019.
- Nazki, F.H., Sameer, A.S. & Ganaie, B.A. (2014). Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene*, 533(1), 11-20.
- Nefic, H., Mackic-Djurovic, M. & Eminovic, I. (2018). The Frequency of the 677C>T and 1298A>C Polymorphisms in the Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Gene in the Population. *Med Arch*, 72(3), 164-169.
- Ota, K., Takahashi, T., Han, A., Damvaeba, S., Mizunuma, H. & Kwak-Kim, J. (2020). Effects of MTHFR C677T polymorphism on vitamin D, homocysteine and natural killer cell cytotoxicity in women with recurrent pregnancy losses. *Human Reproduction*, 35(6), 1276–1287, 2020.
- Pandey, R.K., Ali A., Singh, A., Gayan, S. & Bajpai, M. (2014). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T variant in Indian children with craniosynostosis: Its role in the pathogenesis, risk of craniosynostosis. *Indian Journal of Human Genetics*, 20(2), 155-159.
- Petras, M., Tatarkova, Z., Kovalska, M. et al. (2014). Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 65(1), 15–23.
- Pontieri, G.M., Russo, M.A. & Frati, L. (2005). *Patologia generale*, tomo II, III edizione Piccin.
- Possomato-Vieira, J.S., Gonçalves-Rizzi, V.H., do Nascimento R.A. et al. (2018). Clinical and experimental evidences of hydrogen sulfide involvement in lead-induced hypertension. *BioMed Research International*, vol. 2018.
- Qiu, X., Gao, F., Qiu, Y. et al. (2018). Association of maternal serum homocysteine concentration levels in late stage of pregnancy with preterm births: a nested case-control study. *The Journal 10 BioMed Research International of Maternal-Fetal &*

Neonatal Medicine, 31(20), 2673–2677.

- Raghubeer, S. & Matsha, T.E. (2021). Methylenetetrahydrofolate (MTHFR), the One-Carbon Cycle, and Cardiovascular Risks. *Nutrients*, 13(12), 4562.
- Rai, A.K., Singh, S., Mehta, S., Kumar, A., Pandey, L.K. & Raman, R. (2006). MTHFR C677T and A1298C polymorphisms are risk factors for Down's syndrome in Indian mothers. *J Hum Genet* 51, 278–83.
- Rai, V., Yadav, U., Kumar, P., Yadav, S.K. & Mishra, P. (2014). Maternal methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and Down syndrome risk: a meta-analysis from 34 studies. *PLoS One*, 9, e108552.
- Ruchusatsawat, K., Wongpiyabovorn, J., Shuangshoti, S., Hirankarn, N. & Mutirangura, A. (2006). SHP-1 promoter 2 methylation in normal epithelial tissues and demethylation in psoriasis. *J Mol Med*. 84, 175e82.
- Sazci, A., Ergul, E., Kaya, G. & Kara, I. (2005). Genotype and allele frequencies of the polymorphic methylenetetrahydrofolate reductase gene in Turkey. *Cell Biochem Funct.*, 23(1), 51-4.
- Sazci, A., Ergul, E., Kucukali, I., Kara, I. & Kaya, G. (2005). Association of the C677T and A1298C polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene with schizophrenia: association is significant in men but not in women. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29(7), 1113–238.
- Schürks, M., Rist, P.M. & Kurth, T. (2010). MTHFR 677C>T and ACE D/I polymorphisms in migraine: a systematic review and meta-analysis. *Headache*, 50, 588e99.
- Selhub, J. & Miller, J.W. (1992). The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am j Clin Nutr*, 55(1), 131-8.
- Selhub, J. & Troen, A.M. (2016). Sulfur amino acids and atherosclerosis: a role for excess dietary methionine. *Ann N Y Acad Sci*, 1363, 18-25.
- Sen, U., Sathnur, P.B., Kundu, S., et al. (2012). Increased endogenous h2s generation by cbs, cse, and 3mst gene therapy improves ex vivo renovascular relaxation in hyperhomocysteinemia. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 303(1), C41–C51.
- Sen, U., Sathnur, P.B., Kundu, S., et al. (2012). Increased endogenous h2s generation

by cbs, cse, and 3mst gene therapy improves ex vivo renovascular relaxation in hyperhomocysteinemia. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 303(1), C41–C51, 2012.

- Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida M., et al. (2009). “3-mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(4), 703–714.
- Sibrian-Vazquez, M., Escobedo, J.O., Lim, S., Samoei, G.K. & Strongin, R.M. (2010). Homocysteamides promote free-radical and oxidative damage to proteins. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 107(2), 551-554.
- Sivapalaratnam, S., Motazacker, M.M., Maiwald, S., Hovingh, G.K., Kastelein, J.J.P., Levi, M. et al. (2011). Genome-Wide Association Studies in Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports* , 13, 225–232.
- Smithells, R.W., Sheppard, S., Schorah, C.J., Seller, M.J., Nevin, N.C., Harris, R. et al. (1981). Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *Arch Dis Child.*, 56, 911–918.
- Sofi, F.; Marcucci, R., Bolli, P. & Giambene, B. (2008). Low vitamin B6 and folic acid levels are associated with retinal vein occlusion independently of homocysteine levels. *Atherosclerosis*, 198(1), 223-7.
- Sun, L., Sun, S., Li, Y., et al. (2014). Potential biomarkers predicting risk of pulmonary hypertension in congenital heart disease: The role of homocysteine and hydrogen sulfide. *Chinese Medical Journal*, 127, 5, 893–899.
- Sun, W.T., Wang, X.C., Novakovic, A., Wang, J., He, G.W. & Yang, Q. (2019). Protection of dilator function of coronary arteries from homocysteine by tetramethylpyrazine: role of ER stress in modulation of BKCa channels. *Vascular Pharmacology*, 113, 27–37.
- Szabo, C. (2017). Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: Mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 312(1), C3– C15.
- Szijártó, I.A., Markó, I., Filipovic, M.R., et al. (2018). Cystathionine γ -Lyase–Produced hydrogen sulfide controls endothelial NO bioavailability and blood pressure. *Hypertension*, 71(6), 1210–1217.

- Tain, Y.L., Hsu C.N., & Lu, P.C.. (2017). Early short-term treatment with exogenous hydrogen sulfide postpones the transition from prehypertension to hypertension in spontaneously hypertensive rat. *Clinical and Experimental Hypertension*, 40(1), 58 – 64.
- Tang, X.Q., Shen, X.T., Huang, Y.E., et al. (2011). Inhibition of endogenous hydrogen sulfide generation is associated with homocysteine-induced neurotoxicity: Role of erk1/2 activation. *Journal of Molecular Neuroscience*, 45(1), 60–67.
- Testai, L., Brancaleone, V., Flori, L., Montanaro, R. & Calderone, V. (2019). Modulation of EndMT by Hydrogen Sulfide in the Prevention of Cardiovascular Fibrosis. *Antioxidants (Basel)*, 10(6), 910.
- Tinelli, C., Di Pino, A., Ficulle, E., Marcelli, S. & Feligioni, M. (2019). Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor and Potential Nutraceutical Target for Certain Pathologies. *Front Nutr*, 24, 6:49.
- Tsen, C.M., Hsieh, C.C., Yen, C.H. & Lau, Y.T. (2003). Homocysteine altered ROS generation and NO accumulation in endothelial cells. *The Chinese Journal of Physiology*,
- Turunen, M.P., Aavik, E. & Yla-Herttuala S. (2009). Epigenetics and atherosclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1790(9), 886-891.
- Tyagi, N., Moshal, K.S., Sen, U., et al. (2009). H₂S protects against methionine-induced oxidative stress in brain endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*, 11(1), 25–33.
- van der Put, N.M., Gabreels, F., Stevens, E.M., Smeitink, J.A., Trijbels, F.J., Eskes, T.K., et al. (1998). A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural tube defects? *Am J Hum Genet*, 62, 1044–51.
- Vasku, V., Bienertova-Vasku, J., Necas, M. & Vasku, A. (2009). MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase) C677T polymorphism and psoriasis. *Clin Exp Med*, 9, 327e31.
- Walker, M.C., Smith, G.N., Perkins, S.L., Keely, E.J. & Garner, P.R. (1999). Changes in homocysteine levels during normal pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 180(3), 660–664
- Wallace, J. L., Vaughan, D., Dicay, M., MacNaughton, de Nucci, G. Hydrogen

sulfure-releasing therapeutics: translation to the clinic". *Antioxidants & Redox Signaling*, 28,(16), 1533–1540..

- Wang, M., Hu, Y., Fan, Y., et al. (2016). Involvement of hydrogen sulfide in endothelium-derived relaxing factor-mediated responses in rat cerebral arteries. *Journal of Vascular Research*, 53(4), 172–185.
- Weger, W., Hofer, A., Stanger, O., Wolf, P., El-Shabrawi, Y., Renner, W., et al. (2008). The methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T gene polymorphism is not associated with chronic plaque psoriasis. *Exp Dermatol*, 17, 748e51.
- Wei, B., Xu, Z., Ruan, J., Zhu, M., Jin, K., Zhou, D., et al. (2012). MTHFR 677C>T and 1298A>C polymorphisms and male infertility risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*, 39, 1997e2002.
- Weisberg, I., Tran, P., Christensen, B., Sibani, S. & Rozen, R. (1998). A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*, 64, 169-172.
- Wu, X., Wang, X., Chan, Y., Jia, S., Luo, Y. & Tang, W. (2013). Folate metabolism gene polymorphisms MTHFR C677T and A1298C and risk for Down syndrome offspring: a metaanalysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 167, 154e9.
- Wu, X., Zhang, L. Miao, Y., et al.,(2019). Homocysteine causes vascular endothelial dysfunction by disrupting endoplasmic reticulum redox homeostasis. *Redox Biology*, 20, 46– 59.
- Wu, Y.L., Ding, X.X., Sun, Y.H., Yang, H.Y. & Sun, L. (2013). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T/A1298C polymorphisms and susceptibility to Parkinson's disease: a meta-analysis. *J Neurol Sci*, 335, 14e21.
- Xiao, L., Dong, J.H., Teng, X. et al. (2018). Hydrogen sulfide improves endothelial dysfunction in hypertension by activating peroxisome proliferator-activated receptor delta/endothelial nitric oxide synthase signaling. *Journal of Hypertension*, 36(3), 651–665.
- Xie, X., Zhang, Z., Wang, X., et al. (2018). Stachydrine protects enos uncoupling and ameliorates endothelial dysfunction induced by homocysteine. *Molecular Medicine*, 24(1), 10.
- Xuan, C., Bai, X.Y., Gao, G., Yang, Q. & He, G.W. (2011). Association between polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and risk of

myocardial infarction: a meta-analysis for 8,140 cases and 10,522 controls. *Arch Med Res*, 42, 677e85.

- Yamada, K., Chen, Z., Rozen, R., & Matthews, R.G. (2001). Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 14853–14858.
- Yan, S.K., Chang, T., Wang, H., Wu, L., Wang, R. & Meng, Q.H. (2006). Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(2), 485–491.
- Yang, K.M., Jia, J., Mao, L.N., Men, C., Tang, K.T., Li, Y.Y., et al. (2014). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism and essential hypertension: a metaanalysis of 10,415 subjects. *Biomed Rep*, 2, 699e708.
- Yang, S., Zhang, J., Feng, C. & Huang, G. (2013). MTHFR 677T variant contributes to diabetic nephropathy risk in Caucasian individuals with type 2 diabetes: a meta-analysis. *Metabolism*, 62, 586e94.
- Yu, H.H., Zhang, W.L. & Shi, J.P. (2007). Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism and susceptibility of ischemic stroke: a metaanalysis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 91, 2060e.
- Zappacosta, B., Graziano, M., Persichilli, S., Di Castelnuovo, A., Mastroiacovo, P. & Iacoviello, L. (2014). 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms: genotype frequency and association with homocysteine and folate levels in middle-southern Italian adults. *Cell Biochemistry and Function*, 32(1), 1–4.
- Zappacosta, B., Mastroiacovo, P., Persichilli, S., Pounis, G., Ruggeri, S., Minucci, A., et al. (2013). Homocysteine Lowering by Folate-Rich Diet or Pharmacological Supplementations in Subjects with Moderate Hyperhomocysteinemia Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Nutrients*, 5, 1531-1543.
- Zeng, R., Xu, C.H., Xu, Y.N., Wang, Y.L. & Wang, M. (2015). The effect of folate fortification on folic acid-based homocysteine-lowering intervention and stroke risk: A meta-analysis. *Public Health Nutrition*, 18(8), 1514–1521.

- Zhang, D., Zhou, Y., Han, L., Ji, H. & Li, J. (2014). The effect of MTHFR C677T polymorphism on type 2 diabetes mellitus with vascular complications in Chinese Han population: a meta-analysis. *Endocr J*, 61, 717e26.
- Zhang, R., Huo, C., Wang, X., Dang, B., Mu, Y. & Wang, Y. (2018). Two Common MTHFR Gene Polymorphisms (C677T and A1298C) and Fetal Congenital Heart Disease Risk: An Updated Meta-Analysis with Trial Sequential Analysis. *Cell Physiol Biochem*, 45(6), 2483-2496.