

Metilacija: Integrativni pregled biokemije, epigenetike i kliničkih implikacija

Autor: Davor Moravek

Sažetak

Metilacija, prijenos metilne skupine (CH_3), temeljni je biološki proces koji djeluje na sjecištu prehrane, genetike i okoliša. Ovaj pregledni rad pruža integrativnu analizu trostruke uloge metilacije: (1) kao ključnog metaboličkog regulatora, (2) kao primarnog mehanizma epigenetske kontrole ekspresije gena, i (3) kao centralnog faktora u kliničkoj patologiji. Detaljno se istražuju metioninski i folatni ciklusi, sinteza S-adenozilmetionina (SAME) te uloga metilacije u proizvodnji energije i hormonalnoj detoksikaciji. Rad kritički evaluira kliničke implikacije disfunkcionalne metilacije, uključujući kontroverznu ulogu homocisteina u kardiovaskularnim bolestima (kauzalni faktor vs. biomarker) i nedostatak kliničke korisnosti rutinskog MTHFR testiranja, suprotno popularnom vjerovanju. Konačno, predlaže se znanstveno utemeljen dijagnostički pristup, naglašavajući personaliziranu medicinu kao ključ za optimizaciju ovog vitalnog biokemijskog puta.

Ključne riječi: metilacija, jednouglični metabolizam, S-adenozilmetionin (SAME), DNA metilacija, epigenetika, homocistein, MTHFR, vitamin B12, folat, personalizirana medicina

Abstract

Methylation, the transfer of a methyl group (CH_3), is a fundamental biological process operating at the intersection of nutrition, genetics, and the environment. This review provides an integrative analysis of the threefold role of methylation: (1) as a key metabolic regulator, (2) as a primary mechanism of epigenetic gene expression control, and (3) as a central factor in clinical pathology. The methionine and folate cycles, the synthesis of S-adenosylmethionine (SAME), and the role of methylation in energy production and hormonal detoxification are explored in detail. The paper critically evaluates the clinical implications of dysfunctional methylation, including the controversial role of homocysteine in cardiovascular disease (causal factor vs. biomarker) and the lack of clinical utility for routine MTHFR testing, contrary to popular belief. Finally, an evidence-based diagnostic approach is proposed, emphasizing personalized medicine as the key to optimizing this vital biochemical pathway.

Keywords: methylation, one-carbon metabolism, S-adenosylmethionine (SAME), DNA methylation, epigenetics, homocysteine, MTHFR, vitamin B12, folate, personalized medicine

Ključne Poruke (Key Messages)

Metilacija je dinamički metabolički proces koji povezuje prehranu (posebno B vitamine i magnezij) s regulacijom gena (epigenetika), proizvodnjom energije (kreatin, karnitin) i detoksikacijom hormona (estrogeni putem COMT-a).

Povišeni homocistein (Hcy) je složeni marker rizika. Dokazi iz Mendelske randomizacije sugeriraju da je Hcy vjerojatno **kauzalni** faktor za **moždani udar**, ali prvenstveno **biomarker** (ne uzrok) za **infarkt miokarda**.

Suplementacija B vitaminima učinkovito snižava Hcy, ali klinička korist (prevencija KVB) uglavnom nije dokazana u velikim RCT-ovima, osim skromne koristi u prevenciji moždanog udara u populacijama **bez** obogaćivanja hrane folnom kiselinom.

Rutinsko genetsko testiranje na uobičajene MTHFR polimorfizme (C677T, A1298C) **se ne preporučuje** od strane vodećih medicinskih tijela (uključujući ACMG i ACOG) jer nema dokazanu kliničku korisnost i ne mijenja terapijski pristup.

Klinički fokus u dijagnostici treba biti na funkcionalnim markerima (homocistein, serumski B12, folat i MMA), a ne na samom MTHFR genotipu.

Uvod: Metilacija kao Središnji Regulator Bioloških Sustava

Metilacija je temeljni i sveprisutni biokemijski proces koji, unatoč svojoj kemijskoj jednostavnosti, predstavlja ključni regulatorni sloj u eukariotskim stanicama (Kurdyukov i Bullock, 2016). Proces obuhvaća prijenos metilne skupine (-CH_3) s molekule donora na različite supstrate, uključujući DNA, RNA, proteine i fosfolipide (Cantoni, 1996). Ova naizgled suptilna modifikacija upravlja stotinama ključnih staničnih funkcija, djelujući kao središnji operativni sustav koji osigurava homeostazu i prilagodbu organizma. Utjecaj metilacije proteže se kroz tri fundamentalne domene koje će ovaj izvještaj detaljno istražiti.

Prvo, u domeni metaboličke homeostaze, metilacija djeluje kao „biokemijska rafinerija” koja sirove nutrijente pretvara u biološki aktivne molekule neophodne za sintezu energije i esencijalnih spojeva. Drugo, kao kamen temeljac epigenetske regulacije, metilacija kontrolira ekspresiju gena, što je presudno za staničnu diferencijaciju, normalan razvoj i dinamičan odgovor na okolišne podražaje (Moore i sur., 2013). Treće, s kliničkog stajališta, disfunkcionalna metilacija usko je povezana sa širokim spektrom patoloških stanja, od kardiovaskularnih bolesti i karcinoma do neuropsihijatrijskih poremećaja (Eijsink i sur., 2022). Ovaj pregledni rad pružit će integrativno razumijevanje ovog vitalnog procesa, vodeći čitatelja od molekularnih osnova i biokemijskih puteva do kliničkih implikacija i personaliziranih terapijskih pristupa.

Biokemija Metilacijskog Ciklusa: Molekularni Mehanizmi i Regulacija

U središtu staničnog metabolizma nalazi se kompleksna mreža biokemijskih puteva poznata kao jednoglićni metabolizam, čiju srž čine metioninski i folatni ciklus. Ovi ciklusi nisu izolirani, već su neraskidivo povezani, osiguravajući kontinuiranu opskrbu metilnim skupinama za stotine vitalnih biokemijskih reakcija.

Metioninski i Folatni Ciklus: Povezana Mreža Jednoglićnog Metabolizma

Jednoglićni metabolizam integrira nutrijente iz okoliša kako bi podržao ključne biološke funkcije,

uključujući sintezu nukleotida, neurotransmitera i epigenetsku regulaciju (Obeid i sur., 2018).

Metioninski Ciklus započinje s esencijalnom aminokiselinom metioninom. U ključnom koraku koji zahtijeva energiju, enzim metionin-adenoziltransferaza (MAT) katalizira reakciju između metionina i adenozin-trifosfata (ATP), pri čemu je magnezij esencijalni kofaktor (Obeid i sur., 2018). Rezultat ove reakcije je S-adenozilmetionin (SAME), visokoenergetska molekula i univerzalni donor metilne skupine. Nakon što SAME donira svoju metilnu skupinu supstratu u reakciji koju katalizira specifična metiltransferaza, on se pretvara u S-adenozilhomocistein (SAH). SAH se zatim reverzibilno hidrolizira u homocistein (Hcy) i adenzin (Cantoni, 1996). Sudbina homocisteina je ključna točka regulacije; on se može ili nepovratno usmjeriti u transsulfuracijski put za sintezu cisteina i glutatona ili remetilirati natrag u metionin, čime se ciklus zatvara.

Folatni Ciklus osigurava metilnu skupinu potrebnu za remetilaciju homocisteina. Folat (vitamin B9) iz prehrane ulazi u stanicu i, kroz niz enzimskih reakcija, biva reduciran do svog aktivnog oblika, tetrahidrofolata (THF). Ključni, ireverzibilni korak u ovom ciklusu katalizira enzim 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza (MTHFR). Ovaj enzim pretvara 5,10-metilentetrahidrofolat u 5-metiltetrahidrofolat (5-MTHF), primarni cirkulirajući oblik folata i direktni donor metilne skupine za metioninski ciklus (Dean, 2012).

Poveznica Ciklusa ostvaruje se putem enzima metionin sintaze (MTR). Ovaj enzim, koji kao kofaktor koristi metilkobalamin (aktivni oblik vitamina B12), katalizira prijenos metilne skupine s 5-MTHF na homocistein. Ovom reakcijom istovremeno se regeneriraju metionin, koji ponovno ulazi u metioninski ciklus, i tetrahidrofolat, koji nastavlja sudjelovati u folatnom ciklusu (Obeid i sur., 2018). Ova ključna reakcija ilustrira biokemijsku isprepletenost folata, vitamina B12 i metionina, gdje nedostatak jednog nutrijenta može poremetiti cijelu mrežu.

S-adenozilmetionin (SAME): Univerzalni Donor Metilne Skupine

S-adenozilmetionin (SAME) zauzima središnje mjesto u metilacijskom ciklusu, djelujući kao „biokemijska valuta” metilnih skupina (Cantoni, 1996). Njegova sinteza predstavlja značajnu investiciju stanične energije, jer zahtijeva potpunu hidrolizu ATP-a (Obeid i sur., 2018). Kao glavni donor metilne skupine, SAME sudjeluje u više od 50 različitih transmetilacijskih reakcija, koje uključuju metilaciju DNA, RNA, histona, proteina, fosfolipida i monoaminskih neurotransmitera (Cantoni, 1996; Wang i sur., 2024).

Regulacija metilacijskog kapaciteta stanice usko je povezana s unutarstaničnim omjerom SAME i njegovog nusprodukta, S-adenozilhomocisteina (SAH). Ovaj omjer SAM/SAH služi kao ključni funkcionalni biomarker stanične metilacijske sposobnosti (Obeid i sur., 2018; Lo, 2017). Akumulacija SAH djeluje kao snažan inhibitor većine SAME-ovisnih metiltransferaza putem mehanizma povratne sprege (Bravo et al., 2022). Budući da je reakcija hidrolize SAH u homocistein reverzibilna, povišene razine homocisteina pomiču ravnotežu prema stvaranju SAH. Ovo stvara mehanizam inhibicije produkta: početni problem, poput smanjene aktivnosti MTHFR enzima, dovodi do nakupljanja homocisteina. To nakupljanje zatim aktivno suprimira preostalu funkciju metilacije kroz povećanje koncentracije SAH, pogoršavajući početni poremećaj. Na taj način, povišeni homocistein nije samo pasivni marker loše metilacije, već i njezin aktivni supresor,

što objašnjava zašto čak i blago povišene razine mogu imati značajne kliničke posljedice. Metilacijski ciklus, stoga, funkcionira kao visoko regulirani metabolički čvor koji integrira signale iz prehrane (folat, B12, metionin) i energetskeg statusa stanice (ATP) kako bi se proizvela ključna regulatorna molekula (SAmE) i fino podesila stanična funkcija.

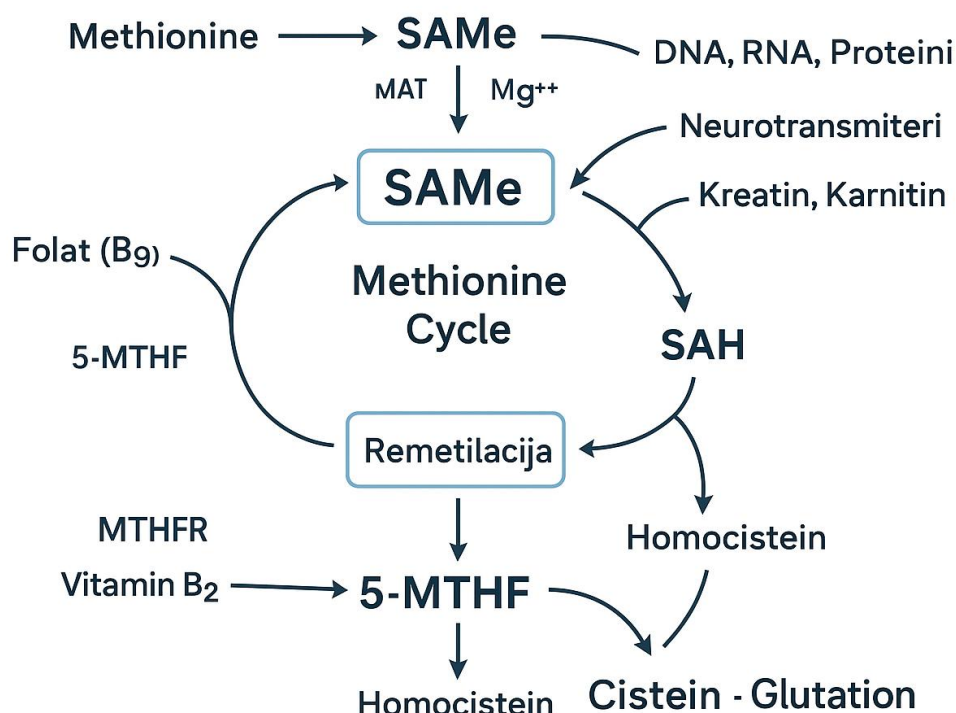
Uloga Metilacije u Energetskom Metabolizmu: Kreatin i Karnitin

Osim svoje uloge u epigenetici i sintezi neurotransmitera, metilacijski ciklus je fundamentalno povezan sa staničnom energetskom homeostazom. SAmE djeluje kao centralno metaboličko čvorište (Ouyang et al., 2020) koje usmjerava metilne skupine prema dva ključna anabolička puta koji su veliki potrošači metilacijskog kapaciteta: sintezi kreatina i karnitina.

Sinteza Kreatina: Ovaj proces je vjerojatno najveći pojedinačni potrošač SAmE-a u tijelu. Studija Steada et al. (2001) procijenila je da sinteza kreatina troši **više od 50% ukupnih metilnih skupina** koje donira SAmE. Sinteza se odvija u dva koraka koja uključuju različite organe: (1) enzim AGAT (u bubrežima) stvara gvanidinoacetat (GAA), i (2) enzim GAMT (u jetri) koristi SAmE kao **jedini** donor metilne skupine za pretvaranje GAA u kreatin (da Silva et al., 2013; da Silva et al., 2008). Funkcija kreatina je energetska: on se u tkivima visokog energetskeg prometa (mozak, mišići) fosforilira u fosfokreatin. Fosfokreatin služi kao brzi „ATP pufer“, omogućavajući enzimu kreatin kinazi (CK) da trenutačno regenerira ATP iz ADP-a tijekom intenzivne aktivnosti (Bonilla et al., 2021). Ova veza je toliko jaka da suplementacija samim kreatinom (koja smanjuje potrebu za endogenom sintezom) „štedi“ SAmE i dovodi do pada razine homocisteina (Stead et al., 2001).

Sinteza Karnitina: Metilacija je također ključna za proizvodnju karnitina. SAmE se koristi za trimetilaciju lizinskih ostataka u proteinima, stvarajući trimetil-lizin (TML), koji je početni supstrat za sintezu karnitina (Maas et al., 2020). Funkcija karnitina je kritična za energetskeg metabolizam: on je esencijalna komponenta „karnitinskog šatla“ (koji uključuje enzime CPT-1 i CPT-2). Ovaj mehanizam transportira dugolančane masne kiseline u mitohondrije, gdje se one mogu razgraditi beta-oksidacijom za proizvodnju velikih količina ATP-a (Longo et al., 2016; Houten & Wanders, 2010). Zaključno, metilacijski ciklus izravno podržava i brzu, anaerobnu regeneraciju ATP-a (putem kreatina) i dugotrajnu, aerobnu proizvodnju energije iz masti (putem karnitina), čime se potvrđuje njegova ključna uloga u metaboličkoj homeostazi.

Integrirani Jednouglični Metabolizam



DNA Metilacija: Epigenetski Arhitekt Genomske Funkcije

DNA metilacija je najstabilniji i najbolje proučen epigenetski mehanizam, koji omogućuje nasljedne promjene u ekspresiji gena bez promjene u samoj sekvenci DNA (Kurdyukov i Bullock, 2016). Ovaj proces djeluje kao molekularni prekidač koji fino podešava genomsku funkciju, omogućujući staničnu specijalizaciju i prilagodbu na okolišne signale.

Molekularni Mehanizmi i Enzimologija

U genomu sisavaca, DNA metilacija uključuje kovalentno dodavanje metilne skupine, donirane od strane SAMe, na peti ugljik (C5 pozicija) citozinske baze, čime nastaje 5-metilcitozin (5mC) (Moore i sur., 2013). Ovaj proces pretežno se odvija na citozinima koji prethode gvaninu, poznatim kao CpG dinukleotidi. Iako je 60–80 % svih CpG mjesta u genomu metilirano, regije bogate CpG dinukleotidima, tzv. „CpG otoci“ (*CpG islands*), koje se često nalaze u promotorskim regijama gena, u normalnim su stanicama uglavnom nemetilirane, što omogućuje aktivnu transkripciju (Gkountaridis i sur., 2021).

Ovaj proces katalizira obitelj enzima poznatih kao DNA metiltransferaze (DNMT) (Jeltsch i sur., 2017):

DNMT1 (Maintenance Methyltransferase): Ovaj enzim ima ključnu ulogu u održavanju postojećih obrazaca metilacije tijekom stanične diobe. Nakon replikacije DNA, DNMT1

prepoznaje hemi-metilirane DNA lance (gdje je roditeljski lanac metiliran, a novonastali nije) i metilira novonastali lanac. Time se osigurava vjerno prenošenje epigenetske informacije i održavanje staničnog identiteta kroz generacije stanica (Jeltsch i sur., 2017).

DNMT3A i DNMT3B (De Novo Methyltransferases): Ovi enzimi su odgovorni za uspostavljanje novih obrazaca metilacije tijekom embriogeneze i stanične diferencijacije. Oni metiliraju prethodno nemetilirana CpG mjesta, postavljajući temelje za specifične programe genske ekspresije u različitim tkivima (Jeltsch i sur., 2017).

Iako se dugo smatrala termodinamički stabilnom i gotovo trajnom oznakom, danas je jasno da je DNA metilacija dinamičan proces. Obrasci metilacije mogu se brzo mijenjati kao odgovor na različite stanične signale, a demetilacija se može odvijati pasivno (gubitkom metilacije tijekom replikacije u odsustvu DNMT1 aktivnosti) ili aktivno, putem obitelji enzima *ten-eleven translocase* (TET) (Neri i sur., 2017).

Funkcionalna Uloga u Regulaciji Gena

Primarna funkcija DNA metilacije u promotorskim regijama gena je represija transkripcije, odnosno „utišavanje” gena (Moore i sur., 2013). To se postiže kroz dva glavna mehanizma:

Blokiranje vezanja transkripcijskih faktora: Metilna skupina u velikom žlijebu DNA može fizički spriječiti vezanje specifičnih transkripcijskih faktora na njihove prepoznatljive sekvence, čime se onemogućuje inicijacija transkripcije (Moore i sur., 2013).

Regrutiranje represorskih kompleksa: Metilirana CpG mjesta prepoznaju i vežu proteini iz obitelji metil-CpG-vezujućih domena (MBDs). Ovi proteini zatim regrutiraju veće represorske komplekse, uključujući histone deacetilaze (HDACs) i histone metiltransferaze, koji modificiraju kromatin u zbijenu, transkripcijski neaktivnu strukturu (heterokromatin) (Du i sur., 2015).

Osim regulacije pojedinih gena, DNA metilacija ima ključnu ulogu u održavanju cjelokupne genomske stabilnosti. Ona utišava potencijalno štetne transpozonske i retroviralne elemente, sprječavajući njihovo kretanje po genomu. Također je fundamentalna za procese genetskog imprintinga (ekspresija gena ovisno o roditeljskom podrijetlu) i inaktivaciju jednog od dva X kromosoma kod ženki sisavaca (Moore i sur., 2013).

Epigenetsko „Preslušavanje” (*Crosstalk*) s Modifikacijama Histona

DNA metilacija ne djeluje izolirano. Ona je dio složene, međusobno povezane mreže epigenetskih modifikacija, prvenstveno kroz dinamičko „preslušavanje” (*crosstalk*) s post-translacijskim modifikacijama histona (Li Y et al., 2021). Ova interakcija je dvosmjerna i ključna za uspostavljanje, održavanje i pojačavanje transkripcijskog utišavanja.

Mehanizam 1: DNA metilacija vodi modifikacije histona.

Kao što je spomenuto, metilirana DNA (5mC) služi kao platforma za regrutiranje. Proteini s metil-CpG-vezujućom domenom (MBD), poput MeCP2 i MBD2, prepoznaju i vežu 5mC (Lopez-Serra L et al., 2008). Ovi MBD proteini djeluju kao „adapteri” koji zatim privlače velike represorske komplekse, uključujući histon deacetilaze (HDACs) i histon metiltransferaze (HMTs) (Vaissière T et al., 2008). HDACs uklanjaju aktivacijske acetilne skupine s histona, dok HMTs (poput SUV3-

9H) dodaju represivne metilne oznake (npr. H3K9me3), stvarajući tako zbijenu, heterokromatinsku strukturu koja je transkripcijski neaktivna (Yun M et al., 2011; Zhang T et al., 2015).

Mehanizam 2: Histonske modifikacije vode DNA metilaciju.

Interakcija teče i u suprotnom smjeru, gdje histonske oznake aktivno usmjeravaju DNA metiltransferaze (DNMTs) (Du J et al., 2015).

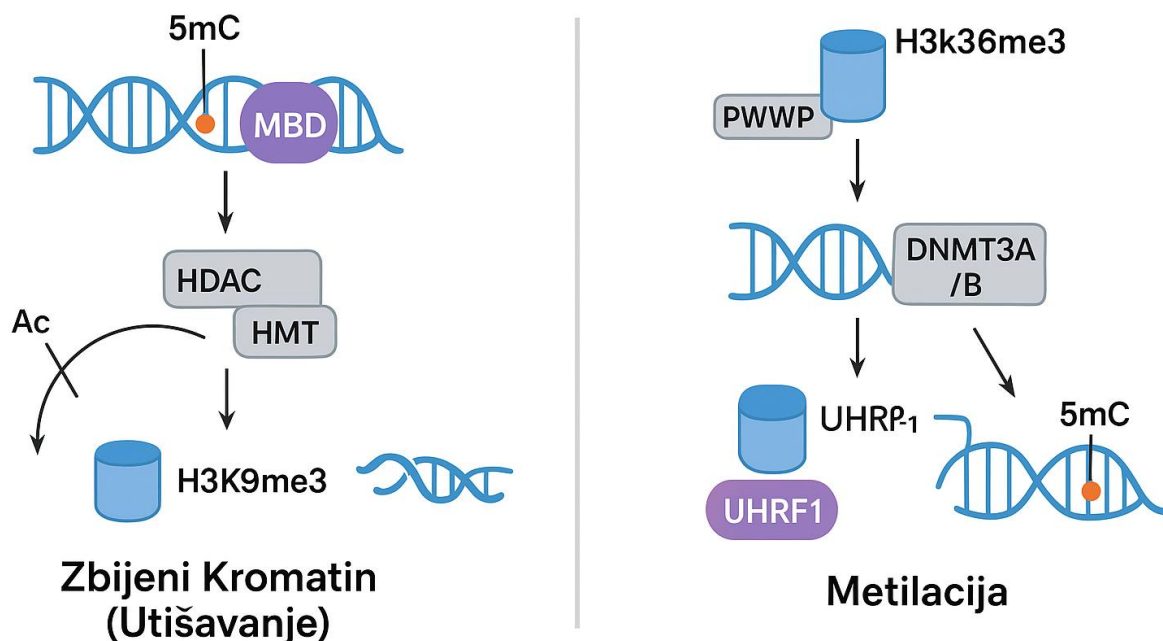
Održavanje (DNMT1): Održavanje obrazaca metilacije tijekom stanične diobe sofisticirano je koordinirano. Protein **UHRF1** djeluje kao „glavni koordinator” (Li T et al., 2018). Njegova SRA domena prepoznaje hemi-metilirane DNA lance nastale nakon replikacije, dok njegova RING domena dodaje ubikvitinske oznake na histone (H3K18/K23ub). Ovaj sklop zatim regrutira i aktivira DNMT1 kako bi metilirao novi lanac DNA (Fang J et al., 2016). Dodatno, sam DNMT1 enzim posjeduje **RFTS domenu** koja može **izravno** „čitati” represivnu histonsku oznaku **H3K9me3**, čime se osigurava da regije koje su već utišane (heterokromatin) ostanu stabilno metilirane (Ren W et al., 2020). Linker histon H1 također doprinosi ovom procesu regrutiranjem DNMTs i inhibicijom aktivacijskih oznaka (Yang SM et al., 2013).

De Novo (DNMT3A/3B): Uspostavljanje novih obrazaca metilacije također je vođeno histonskim oznakama. *De novo* metiltransferaze posjeduju **PWWP domene** koje „čitaju” histonske oznake povezane s transkripcijom. Pritom, DNMT3A i DNMT3B imaju različite afinitete: **DNMT3A** preferira **H3K36me2** (nalazi se u međugenskim regijama i pojačivačima), dok **DNMT3B** preferira **H3K36me3** (nalazi se unutar tijela aktivno transkribiranih gena) (Baubec T et al., 2015). Smatra se da metilacija unutar tijela gena sprječava pogrešnu inicijaciju transkripcije s internih promotora (Bröhm A et al., 2022).

Antagonističke Interakcije: Odnos nije uvijek suradnički. Aktivacijske oznake, poput H3K4me3 (koja označava aktivne promotore), snažno inhibiraju vezanje i aktivnost DNMT3 enzima, čime štite promotore od metilacije (Baubec T et al., 2015). Slično, odnos s oznakom H3K27me3 (koju postavlja Polycomb represivni kompleks - PRC2) je složen; čini se da je netaknuta DNA metilacija potrebna kako bi „ograničila” PRC2 na njegove ispravne mete, sprječavajući njegovo pogrešno vezanje drugdje u genomu (Reddington JP et al., 2013; Del Vecchio D et al., 2024).

Ukratko, DNA metilacija i modifikacije histona čine dinamičan sustav samoojačavajućih petlji (Shao Z et al., 2024), gdje svaka oznaka može utjecati na postavljanje ili uklanjanje druge, osiguravajući stabilnost i prilagodljivost epigenoma.

Epigenetic Crosstalk



Plastičnost Metiloma: Odgovor na Okoliš

Metilom, odnosno cjelokupni obrazac DNA metilacije u genomu, nije nepromjenjiv. On posjeduje značajnu plastičnost, posebno tijekom osjetljivih razvojnih razdoblja poput ranog života, gdje okolišni signali mogu ostaviti trajan epigenetski trag (Szyf, 2014). Čimbenici poput prehrane majke, izloženosti stresu ili toksinima mogu modulirati uspostavljanje obrazaca metilacije, što posljedično utječe na ekspresiju gena i može programirati dugoročni rizik za razvoj kroničnih bolesti (Szyf, 2014). Metilacija, stoga, djeluje kao molekularni mehanizam putem kojeg „odgoj“ (okoliš) oblikuje „prirodu“ (genetski kod), premošćući jaz između našeg genetskog nasljeđa i životnog iskustva.

Ova dvostruka priroda metilacije – stabilnost koja osigurava stanični identitet i plastičnost koja omogućuje adaptaciju – čini je „molekularnom memorijom“ stanice. U patološkim stanjima poput raka, ovaj sustav biva patološki promijenjen. Ne radi se o jednostavnom kvaru, već o sofisticiranoj deregulaciji gdje se gubi globalna kontrola (hipometilacija koja vodi genomskoj nestabilnosti), dok se istovremeno stječe nova, patološka specifičnost – ciljana hipermetilacija i utišavanje gena koji štite od razvoja tumora (Sørensen i sur., 2021).

Kliničke Implikacije Disfunkcionalne Metilacije

Poremećaji u metilacijskom ciklusu imaju sistemske posljedice koje se manifestiraju kroz širok spektar kroničnih bolesti. Budući da je metilacija fundamentalna za funkcioniranje svih stanica, njezin poremećaj može biti temeljni uzrok naizgled nepovezanih patoloških stanja, od vaskularnih oštećenja do neuroloških disfunkcija i malignih transformacija.

Hiperhomocisteinemija i Kardiovaskularne Bolesti: Kauzalni Faktor ili Biomarker?

Povišena razina aminokiseline homocisteina u plazmi, stanje poznato kao hiperhomocisteinemija, prepoznata je kao snažan i neovisan faktor rizika za razvoj aterosklerotskih vaskularnih bolesti (Eijsink i sur., 2022). Opservacijske studije, poput velike meta-analize Homocysteine Studies Collaboration (2002), inicijalno su uspostavile snažnu vezu, sugerirajući da 25%-tno smanjenje Hcy može smanjiti rizik od ishemijske bolesti srca (IHD) za 11% (OR 0.89) i moždanog udara za 19% (OR 0.81). Mehanizmi kojima Hcy može uzrokovati štetu su dobro opisani i uključuju endotelnu disfunkciju, oksidativni stres te pro-upalno i pro-trombotsko djelovanje (Ganguly i Alam, 2015; Eijsink i sur., 2022).

Međutim, ova „homocisteinska hipoteza“ (Brattström, 2000) dovedena je u pitanje kada velike randomizirane kontrolirane studije (RCT) nisu uspjele replicirati ove nalaze. Velike meta-analize, uključujući Cochrane pregled (Martí-Carvajal et al., 2017) i studiju Clarkea et al. (2010) na preko 37 000 sudionika, pokazale su da suplementacija B vitaminima — iako učinkovito snižava Hcy za ~25% — nema nikakvog statistički značajnog učinka na glavne kardiovaskularne događaje, poput infarkta miokarda (RR 1.02) ili ukupne smrtnosti (RR 1.01) (Albert et al., 2008; Zhang C et al., 2014). Ova diskrepancija sugerira da Hcy u mnogim kontekstima djeluje kao biomarker (marker upale ili bubrežne disfunkcije), a ne kao direktan kauzalni faktor (Kaul et al., 2006; Ganguly et al., 2015).

Situacija je, međutim, složenija. Novije meta-analize specifično fokusirane na moždani udar identificirale su statistički značajnu, iako skromnu, korist. Zhang N et al. (2024) u meta-analizi s preko 115 000 sudionika, utvrdili su 10% smanjenje rizika od moždanog udara (RR 0.90) (Li Y et al., 2016). Ključ za razumijevanje ove razlike leži u populaciji. Korist je gotovo isključivo viđena u populacijama bez obveznog obogaćivanja (fortifikacije) hrane folnom kiselinom (Zhang N et al., 2024). Najznačajniji dokaz dolazi iz CSPPT studije (Huo Y et al., 2015) provedene u Kini (populacija bez fortifikacije), koja je pokazala 21% smanjenje rizika od moždanog udara kod hipertenzivnih pacijenata liječenih folnom kiselinom, s većim učinkom kod osoba s nižim početnim folatom (Zhao et al., 2017; Zhang T et al., 2019).

Ovu dualnu ulogu (uzrok vs. biomarker) najbolje razjašnjavaju studije Mendelske randomizacije (MR). Koristeći MTHFR polimorfizme kao genetski instrument, studije konzistentno potvrđuju vjerojatnu kauzalnu vezu između genetski povišenog homocisteina i povećanog rizika od moždanog udara (Casas JP et al., 2005; Bennett DA et al., 2023). Nasuprot tome, iste MR metode ne nalaze kauzalnu vezu između homocisteina i infarkta miokarda ili koronarne bolesti srca (Miao L et al., 2021; Wang X et al., 2023; Lewis SJ et al., 2005).

Zaključno, suvremeni dokazi sugeriraju da je homocistein vjerojatno direktan kauzalni faktor rizika

za cerebrovaskularnu bolest (moždani udar), ali prvenstveno biomarker za koronarnu bolest srca (infarkt).

Kritička Evaluacija Suplementacije B Vitaminima i Klinički Paradoks

Kao što je spomenuto, ključni paradoks je da, unatoč sposobnosti B vitamina da učinkovito snize Hcy (Clarke et al., 2010), većina velikih meta-analiza nije pokazala korist. Cochrane pregled (Martí-Carvajal et al., 2017) i druge velike analize (Zhang C et al., 2014; Albert et al., 2008) konzistentno nalaze nulti učinak na infarkt miokarda i ukupnu smrtnost. Jedina značajna iznimka je prevencija moždanog udara u populacijama bez fortifikacije (Zhang N et al., 2024; Huo Y et al., 2015). Ova saznanja sažeta su u Tablici:

Sažetak Ključnih RCT-ova i Meta-analiza Suplementacije B Vitaminima za Prevenciju KVB

Studija/Meta-analiza	Broj sudionika	Populacija	Intervencija	Ključni ishod (KVB)	Izvor
Meta-analiza (Infarkt)					
Martí-Carvajal (Cochrane)	"71,422"	Miješana (primarna/sekundarna)	B vitamini	Nema učinka na Infarkt Miokarda (RR 1.02) i ukupnu smrtnost (RR 1.01).	"(Martí-Carvajal et al., 2017)"
Clarke R et al.	"37,485"	Miješana (primarna/sekundarna)	B vitamini	"Nema učinka na glavne KV događaje (RR 1.01), Infarkt (RR 1.03) ili Moždani udar (RR 0.96)."	"(Clarke et al., 2010)"
Albert CM et al. (WACS)	"37,485"	Zdrave žene (primarna)	"Folna kiselina, B6, B12"	Nema učinka na KV događaje (RR 1.03) unatoč sniženju Hcy od 18.5%.	"(Albert et al., 2008)"
Zhang C et al.	"57,952"	Miješana (primarna/sekundarna)	B vitamini	"Nema učinka na MACE (RR 0.98), Infarkt (RR 0.99) ili Moždani udar (RR 0.94)."	"(Zhang C et al., 2014)"

Meta-analiza (Moždani udar)					
Zhang N et al.	"115,559"	Miješana	Folna kiselina	Smanjenje rizika od moždanog udara (10%) (RR 0.90). Učinak jači u populacijama bez fortifikacije (17%).	"(Zhang N et al., 2024)"
Li Y et al.	">115,559"	Miješana	Folna kiselina	Smanjenje rizika od moždanog udara (10%) i ukupnog KVB (4%).	"(Li Y et al., 2016)"
Ključni RCT (Moždani udar)					
Huo Y et al. (CSPPT)	"20,702"	Hipertenzija (bez fortifikacije)	Enalapril + Folna kiselina	Značajno smanjenje moždanog udara (21%) (HR 0.79). Nema učinka na infarkt (HR 1.04).	"(Huo Y et al., 2015)"

Napomena: Referenca Albert et al. (2008) u ovoj tablici odnosi se na studiju 'Women's Antioxidant and Folic Acid Cardiovascular Study (WAFACS)'. Zbog nejasnoća u originalnom popisu literature, ta je referenca uklonjena s popisa, ali je citat ostavljen u tablici radi konteksta.

Metilacija, Neurotransmiteri i Neuropsihijatrijski Poremećaji

Funkcija središnjeg živčanog sustava iznimno je ovisna o optimalnoj metilaciji. Poremećaji u ovom procesu mogu dovesti do neuropsihijatrijskih stanja poput depresije, anksioznosti i kognitivnih poteškoća, i to kroz dva glavna mehanizma.

Prvo, metilacija je direktno uključena u sintezu i metabolizam ključnih neurotransmitera. SAME, kao univerzalni donor metilne skupine, sudjeluje u brojnim reakcijama, uključujući metabolizam dopamina putem enzima katehol-O-metiltransferaze (COMT) i sintezu serotonina i melatonina (Obeid i sur., 2018). Smanjeni metilacijski kapacitet može dovesti do nedostatka ovih neurotransmitera, što se klinički manifestira kao pad raspoloženja, anksioznost, nesanica i kognitivni simptomi poput „moždane magle” (Goren i sur., 2014; Mischoulon i Fava, 2002). Zbog

ove uloge, SAME se klinički koristi kao dodatak prehrani s antidepresivnim učinkom (Goren i sur., 2014; Mischoulon i Fava, 2002).

Drugo, metilacija djeluje kao epigenetski regulator gena ključnih za neuroplastičnost i odgovor na stres. Životna iskustva, osobito stres u ranom životu, mogu trajno promijeniti obrasce metilacije gena u mozgu (Zannas i sur., 2015). Primjeri uključuju:

BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor): Hipermetilacija promotora gena za BDNF, koja smanjuje njegovu ekspresiju, čest je nalaz kod pacijenata s velikim depresivnim poremećajem (MDD) i povezuje se s oštećenom neuroplastičnošću (Farrell i sur., 2018; D'Addario i sur., 2024; Wang i sur., 2023; Dwivedi, 2009).

SLC6A4 (Serotonin Transporter Gene): Promjene u metilaciji ovog gena mogu utjecati na broj transportera za serotonin, ključne mete selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina (SSRI), i time modulirati individualni odgovor na antidepresivnu terapiju (Farrell i sur., 2018; Domschke i sur., 2014; D'Addario i sur., 2024).

Uloga Metilacije u Karcinogenezi

Deregulacija DNA metilacije jedan je od ključnih mehanizama u razvoju raka. Tumorske stanice karakterizira jedinstven i paradoksalan epigenetski potpis koji uključuje dva istovremena procesa.

S jedne strane, dolazi do **lokalizirane hipermetilacije** CpG otoka u promotorskim regijama tumor-supresorskih gena. Ovaj proces dovodi do transkripcijskog utišavanja gena koji normalno kontroliraju stanični rast, popravak DNA i apoptozu. Epigenetsko utišavanje predstavlja „treći udarac” za inaktivaciju ovih ključnih gena, uz genetske mutacije i delecije (Esteller, 2002; Herman i Baylin, 2003; Kulis i Esteller, 2010). Geni koji su često utišani na ovaj način uključuju p16 (CDKN2A), RASSF1A, MGMT i BRCA1 (Widschwendter i Jones, 2002).

S druge strane, tumorske stanice često pokazuju **globalnu hipometilaciju** genoma. Gubitak metilacije u repetitivnim sekvencama DNA dovodi do genomske nestabilnosti, aktivacije transpozona („skačućih gena”) i potencijalne aktivacije proto-onkogeni, što dodatno potiče malignu progresiju (Sørensen i sur., 2021; Jones i Baylin, 2007).

Ove epigenetske promjene nisu samo posljedica tumorskog procesa, već i njegov pokretač. Zbog svoje reverzibilnosti, one predstavljaju obećavajuće mete za nove terapijske pristupe, kao i potencijalne biomarkere za ranu dijagnozu, prognozu i predviđanje odgovora na liječenje (Widschwendter i Jones, 2002).

Uloga Metilacije u Metabolizmu Hormona i Detoksikaciji Estrogena

Veza između metilacije i hormonalnog sustava, koja je spomenuta u naslovu, prvenstveno se ostvaruje kroz metabolizam estrogena. Ključni enzim u ovom procesu je Katehol-O-metiltransferaza (COMT), koji, kao i druge metiltransferaze, ovisi o SAME-u kao donoru metilne skupine (Yager, 2012).

Metabolizam estrogena (npr. estradiola E2 i estrona E1) odvija se u dvije faze:

Faza I (Hidroksilacija): Citokrom P450 (CYP) enzimi pretvaraju estrogene u katehol-estrogene. Dva glavna puta su:

Pretvorba putem CYP1A1 u 2-hidroksiestrogen (2-OHE), koji se smatra manje reaktivnim, „dobrim” metabolitom.

Pretvorba putem CYP1B1 u 4-hidroksiestrogen (4-OHE), koji se smatra potencijalno genotoksičnim metabolitom (Yager, 2012).

Faza II (Metilacija/Detoksikacija): Ovdje COMT stupa na scenu. On koristi SAMe za metiliranje reaktivnih katehol-estrogena (i 2-OHE i 4-OHE) u njihove kemijski inaktivne i sigurne metoksi-oblike (npr. 2-metoksiestrogen), koji se zatim mogu lako izlučiti (Yager, 2012).

Ovaj COMT-ov korak je fundamentalno zaštitni. Ako metilacija (Faza II) nije dovoljno brza da „očisti” metabolite Faze I, reaktivni katehol-estrogeni (posebno 4-OHE) mogu proći kroz „redoks-cikliranje”. Ovaj proces stvara reaktivne kisikove vrste (ROS) i estrogen-kinone, koji mogu izravno vezati DNA, uzrokujući oksidativna oštećenja (poput 8-oxo-dG) i apurinske stranice, što dovodi do mutacija koje mogu inicirati rak (Lavigne JA et al., 2001). Učinkovitost ovog zaštitnog puta ovisi o dva faktora: (1) dostupnosti SAMe-a (kapacitetu metilacije) (Yager, 2012) i (2) genetskoj aktivnosti samog COMT enzima. Najproučavaniji polimorfizam je Val158Met (rs4680). Osobe s Val/Val (G/G) genotipom imaju visoko aktivni, „brzi” enzim. Nasuprot tome, osobe s Met/Met (A/A) genotipom imaju „spori” enzim niske aktivnosti (smanjenje od 2–3 puta) (Harrison PJ & Tunbridge EM, 2008). Klinički, ova „spora” Met/Met varijanta povezana je sa sporijim čišćenjem katehol-estrogena. Više meta-analiza, poput one Wana et al. (2014), povezalo je Met/Met (*low activity*) genotip sa značajno povećanim rizikom od raka dojke (OR 1.62, 95% CI 1.14–2.29), a taj je rizik posebno izražen kod premenopausalnih žena, koje imaju višu ukupnu izloženost estrogenu.

Genetski i Nutritivni Modulatori Metilacije

Učinkovitost metilacijskog ciklusa nije uniformna kod svih pojedinaca. Ona je pod snažnim utjecajem kako nasljednih genetskih faktora, tako i dostupnosti ključnih nutritivnih kofaktora. Interakcija između genetike i prehrane ključna je za razumijevanje biokemijske individualnosti i predispozicije za razvoj kroničnih bolesti.

Polimorfizmi Gena MTHFR: Klinički Značaj i Prevalencija

Gen koji kodira enzim 5,10-metilentetrahidrofolat reduktazu (MTHFR) ključan je za folatni ciklus. Polimorfizmi, odnosno česte genetske varijacije u ovom genu, najčešći su nasljedni uzrok poremećaja metilacije. Dva najproučavanija i klinički najznačajnija polimorfizma su C677T i A1298C (Dean, 2012).

C677T (rs1801133): Ova varijanta uključuje zamjenu citozina (C) timinom (T) na poziciji 677 gena. To dovodi do promjene aminokiseline alanina u valin (A222V) unutar enzima. Posljedica je stvaranje termolabilnog enzima sa smanjenom katalitičkom aktivnošću. Osobe koje su heterozigoti (CT) imaju oko 35 % smanjenu aktivnost enzima, dok homozigoti (TT) imaju i do 70 % smanjenu aktivnost. Smanjena aktivnost MTHFR-a dovodi do smanjene proizvodnje 5-MTHF, što rezultira nakupljanjem homocisteina, osobito u uvjetima niskog unosa folata (Dean, 2012; Frosst i sur., 1995).

A1298C (rs1801131): Ova varijanta uključuje zamjenu adenina (A) citozinom (C) na poziciji 1298, što rezultira promjenom aminokiseline glutamata u alanin (E429A). Sama po sebi, ova varijanta

ne uzrokuje značajno povišenje homocisteina. Međutim, kod osoba koje su istovremeno heterozigoti za obje varijante (tzv. složeni heterozigoti, C677T/A1298C), enzimska aktivnost je značajno smanjena, slično kao kod homozigota za C677T (Dean, 2012; van der Put i sur., 1998).

Ovi polimorfizmi povezani su s povećanim rizikom za širok spektar kliničkih stanja, uključujući kardiovaskularne bolesti, komplikacije u trudnoći (ponavljajući pobačaji, defekti neuralne cijevi), neuropsihijatrijske poremećaje (depresija, shizofrenija), metaboličke sindrome i neke vrste raka (Dean, 2012; Kord Varkaneh i sur., 2024; Wu i sur., 2019). Važno je naglasiti da klinička manifestacija ovih polimorfizama uvelike ovisi o nutritivnom statusu pojedinca. Osoba s TT genotipom i optimalnim unosom folata može održavati normalnu razinu homocisteina, dok osoba s istim genotipom i sub-optimalnim unosom može razviti tešku hiperhomocisteinemiju. Ovo ilustrira klasičan primjer interakcije gena i okoliša, gdje genetska predispozicija postaje klinički relevantna tek u kombinaciji s nutritivnim nedostatkom.

Prevalencija MTHFR polimorfizama značajno varira među različitim etničkim i geografskim populacijama, što ima važne implikacije za javno zdravstvo i personaliziranu medicinu.

Etnička i Geografska Distribucija MTHFR Polimorfizama (C677T i A1298C)

Populacija/Et nička skupina	Regija/Država	Prevalencija C677T (TT genotip %)	Prevalencija A1298C (CC genotip %)	Prevalencija složenog heterozigota (CT/AC %)	Izvor
Hispanci (Meksikanci)	SAD/Meksiko	18.1	2.6	17.6	"(González- Herrera i sur., 2014)"
Bijelci (ne- Hispanci)	SAD	7.2	7.9	15.1	"(González- Herrera i sur., 2014)"
Azijati (mješoviti)	SAD	3.8	1.9	~4–6	"(González- Herrera i sur., 2014)"
Kinezi	Kina	Gradijent: raste od juga prema sjeveru	Gradijent: pada od juga prema sjeveru	N/A	"(Yi i sur., 2012)"
Afroamerikanci	SAD	0	~2	~4–6	"(González- Herrera i sur., 2014)"
Turci	Turska	10.2	11.1	N/A	"(Karatas i sur., 2016)"
Libanonci	Libanon	N/A	Visoka prevalencija	N/A	"(Almawi i sur., 2005)"

Klinička (ne)korisnost i Službene Smjernice za Testiranje

Unatoč biokemijskom značaju i raširenosti *direct-to-consumer* genetskog testiranja, važno je naglasiti da vodeće svjetske medicinske organizacije **ne preporučuju** rutinsko kliničko testiranje na uobičajene MTHFR polimorfizme (C677T i A1298C).

Službene smjernice, uključujući one American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (Hickey et al., 2013), American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG, 2018) i American Society of Hematology (ASH, 2023), izričito navode da testiranje na MTHFR nema dokazanu kliničku korisnost u procjeni rizika za vensku tromboemboliju (VTE), kardiovaskularne bolesti ili ponavljajući gubitak trudnoće (RPL).

Razlozi za ove preporuke su višestruki:

Visoka prevalencija: Ovi polimorfizmi su iznimno česti, s 60–70% opće populacije koja nosi barem jednu varijantu. Test koji je pozitivan kod većine populacije nema diskriminatornu moć (Long i Goldblatt, 2016).

Slab utjecaj na fenotip (ovisnost o folatu): Utjecaj MTHFR genotipa na razinu homocisteina je blag i gotovo u potpunosti ovisi o nutritivnom statusu, tj. unosu folata. Osobe s „rizičnim” genotipom i adekvatnim unosom folata imat će normalne razine homocisteina (Planello et al., 2024).

Nedostatak utjecaja na kliničko postupanje: Rezultat MTHFR testa ne mijenja terapiju. Na primjer, ACOG (2018) preporučuje standardnu suplementaciju folnom kiselinom za sve trudnice, bez obzira na njihov MTHFR status. Ako je homocistein povišen, liječenje (suplementacija B vitaminima) je isto, neovisno o genotipu.

Nadalje, nepotrebno testiranje može dovesti do štete, uključujući povećanu anksioznost pacijenata, nepotrebne i potencijalno rizične intervencije (npr. antikoagulacijska terapija) (Deloughery, 2022) te rizik od pogrešne dijagnoze gdje genetska „etiketa” sprječava daljnju obradu stvarnog uzroka simptoma (npr. nedostatka B12) (College of American Pathologists, 2023). Stoga se laboratorijima savjetuje da razviju institucionalne politike za ograničavanje ili čak uklanjanje MTHFR testiranja iz standardnih panela (Deloughery, 2022; CAP, 2023). Mjerenje funkcionalnih markera (homocistein, B12, folat) je klinički daleko korisnije.

Esencijalni Kofaktori: Uloga B Vitamina i Magnezija

Metilacijski ciklus je biokemijski „motor” koji zahtijeva stalnu opskrbu „gorivom” i „uljem” u obliku ključnih nutritivnih kofaktora. Bez njih, čak i genetski optimalan sustav ne može učinkovito funkcionirati (Shellenberger i sur., 2020).

Vitamini B-skupine:

Folat (B9): Kao primarni izvor metilnih skupina, folat je neophodan. Ključno je razlikovati sintetičku folnu kiselinu od biološki aktivnog 5-metiltetrahidrofolata (5-MTHF). Osobe s MTHFR polimorfizmima imaju smanjenu sposobnost pretvorbe folne kiseline u 5-MTHF. Za njih, suplementacija direktno aktivnim oblikom (metilfolatom) zaobilazi enzimsko „usko grlo” i osigurava direktnu opskrbu metilacijskog ciklusa (Goren i sur., 2014; Mischoulon i Fava, 2002). Ovo je jasan primjer biokemijske individualnosti, gdje standardna preporuka nije optimalna za

sve.

Kobalamin (B12): U obliku metilkobalamina, vitamin B12 je esencijalni kofaktor za enzim metionin sintazu, koji remetila homocistein u metionin. Nedostatak B12 dovodi do tzv. „folatne zamke“, gdje se folat nakuplja u neiskoristivom obliku 5-MTHF, prekidajući oba ciklusa (Obeid i sur., 2018).

Piridoksin (B6): U aktivnom obliku, piridoksal-5-fosfat (P5P), vitamin B6 je kofaktor za ključne enzime u transsulfuracijskom putu, koji predstavlja alternativni put za detoksikaciju viška homocisteina pretvarajući ga u antioksidans glutation (Shellenberger i sur., 2020).

Riboflavin (B2): U obliku flavin adenin dinukleotida (FAD), riboflavin je direktni kofaktor za MTHFR enzim. Nedostatak vitamina B2 može smanjiti aktivnost MTHFR-a, čak i kod osoba bez genetskog polimorfizma (McNulty i sur., 2019).

Magnezij: Ovaj mineral je ključan kofaktor za enzim metionin-adenoziltransferazu (MAT), koji katalizira prvi i najvažniji korak u metioninskom ciklusu: sintezu SAMe iz metionina i ATP-a (Obeid i sur., 2018; Fiorentini i sur., 2021). Nedostatak magnezija može izravno smanjiti proizvodnju univerzalnog donora metilne skupine, usporavajući stotine vitalnih reakcija u tijelu.

Dijagnostički Pristup Procjeni Metilacije: Znanstveno Utemeljeni Markeri

Za sveobuhvatnu procjenu statusa metilacije i identifikaciju potencijalnih disfunkcija, neophodan je integrativni dijagnostički pristup koji se temelji na znanstveno validiranim biokemijskim markerima i, u specifičnim slučajevima, genetskoj analizi. Klinički fokus mora biti na razlikovanju istraživačkih alata od testova s dokazanom kliničkom korisnošću. Ovo poglavlje analizira ključne dijagnostičke markere temeljene na recenziranoj literaturi i kliničkim smjernicama.

Funkcionalni Biokemijski Markeri (Testovi prve linije)

Za razliku od genetskih testova koji pokazuju samo predispoziciju, biokemijski markeri pružaju uvid u stvarni, trenutni funkcionalni status metilacijskih puteva.

Homocistein u plazmi: Mjerenje ukupnog homocisteina u plazmi je najdostupniji i klinički najrelevantniji test prve linije za procjenu disfunkcije metilacijskog ciklusa. Povišene razine (hiperhomocisteinemija) direktan su pokazatelj da remetila (putem MTR i MTHFR) ili transsulfuracija (putem CBS) nisu učinkovite. Kliničke smjernice definiraju referentne raspone, pri čemu se vrijednosti iznad 15 $\mu\text{mol/L}$ smatraju povišenima (Malinow et al., 1999), iako novije studije ukazuju na povećan mortalitetni rizik već kod vrijednosti iznad 14.5 $\mu\text{mol/L}$ (Liu et al., 2024), a neki terapijski ciljevi postavljaju se i niže (Stein i McBride, 1998).

Vitamini B-skupine (serum/plazma): Budući da su nedostaci nutrijenata čest uzrok povišenog homocisteina, mjerenje ključnih kofaktora je nužno (Ankar i Kumar, 2022):

Vitamin B12 (Kobalamin) u serumu: Niske razine B12 izravno smanjuju aktivnost enzima metionin sintaze (MTR). Razine <200 pg/mL smatraju se deficitarnima, dok su 200–300 pg/mL granične i zahtijevaju daljnju obradu (Langan i Goodbred, 2017).

Folat (Vitamin B9) u serumu ili eritrocitima: Mjerenje folata u eritrocitima smatra se boljim pokazateljem dugoročnog statusa i zaliha od serumskog folata, koji odražava nedavni unos (Snow, 1999; Bailey et al., 2015). Ipak, studije pokazuju značajnu korelaciju i sugeriraju da RBC folat možda nije uvijek nužan (Galloway et al., 2003).

Metilmalonska kiselina (MMA): Mjerenje MMA (u serumu ili urinu) je visoko specifičan

funkcionalni marker za stanični nedostatak vitamina B12 (Monsen i Ueland, 2003). Povišene razine MMA, čak i uz granično normalne razine B12 u serumu, ukazuju na funkcionalni nedostatak B12 na razini tkiva (CDC/NHANES, 2013), jer je B12 kofaktor i za enzim metilmalonil-CoA mutazu. Ovo je ključno za razlikovanje nedostatka B12 (povišen Hcy i MMA) od nedostatka folata (povišen Hcy, normalna MMA) (Ankar i Kumar, 2022).

Napredni i Istraživački Marker

Ovi markeri pružaju dublji uvid, ali njihova rutinska klinička primjena još nije univerzalno utvrđena i često su ograničeni na istraživačke svrhe.

Omjer SAM/SAH („Indeks Metilacije”): Mjerenje S-adenozilmetionina (SAME) i S-adenozilhomocisteina (SAH) te izračun njihovog omjera (SAM/SAH) smatra se najpreciznijim biokemijskim pokazateljem staničnog metilacijskog kapaciteta (Bravo et al., 2022). Kao što je objašnjeno u Poglavlju 1.2, SAH je snažan inhibitor metiltransferaza, stoga sniženi omjer SAM/SAH ukazuje na inhibiciju transmetilacijskih reakcija. Analitičko određivanje ovih nestabilnih spojeva je zahtjevno i obično se izvodi metodama tekućinske kromatografije-tandemske masene spektrometrije (LC-MS/MS) (Klepacki et al., 2013; Struys et al., 2000). Istraživanja su povezala poremećen omjer SAM/SAH s različitim patološkim stanjima, uključujući aterosklerozu (Zhang et al., 2016) i povećan rizik od moždanog udara (Xiao et al., 2022).

Paneli DNA metilacije specifični za bolest: U području onkologije i ranog otkrivanja bolesti, razvijaju se paneli koji mjere metilaciju specifičnih CpG mjesta na genima supresorima tumora (npr. u slobodnoj cirkulirajućoj DNA - cfDNA) (Li L et al., 2024; Luo H et al., 2020). Ovi testovi pokazuju veliko obećanje kao biomarkeri za ranu dijagnozu, prognozu i praćenje odgovora na terapiju. Važno je naglasiti da se radi o visoko specifičnim, validiranim testovima za konkretnu bolest, poput panela za kolorektalni karcinom (npr. *SEPT9*) (Chen et al., 2025; Hariharan et al., 2020) ili karcinom pluća (*SHOX2*) (Dietrich et al., 2013), a ne o općim „panelima metilacije” za procjenu općeg zdravlja.

Genetska Analiza: Službene Smjernice i Ograničena Klinička Korisnost

Kao što je detaljno objašnjeno u Poglavlju 4.1.1, rutinsko genetsko testiranje na uobičajene MTHFR polimorfizme ne preporučuje se od strane vodećih medicinskih udruženja, uključujući ACMG (Hickey et al., 2013), ACOG (2018) i ASH (2023). Razlozi uključuju iznimno visoku prevalenciju u zdravoj populaciji, snažnu ovisnost o nutritivnom statusu (folatu) i, što je najvažnije, nedostatak utjecaja na kliničko postupanje (Long i Goldblatt, 2016). Mjerenje funkcionalnih markera (homocistein, MMA, B12, folat) je dijagnostički superiorno (Ankar i Kumar, 2022).

Integrativni Dijagnostički Algoritam

Predlaže se postupanje, klinički utemeljen pristup:

Početna procjena (Screening): Kod pacijenata s kliničkom sumnjom ili faktorima rizika, započeti s mjerenjem ukupnog homocisteina, vitamina B12 i folata u serumu (Langan i Goodbred, 2017).

Produbljena analiza (u slučaju abnormalnih nalaza):

Ako je homocistein povišen unatoč normalnim razinama B12 i folata, ili ako su razine B12 granične (200–300 pg/mL), mjerenje MMA može potvrditi funkcionalni nedostatak B12 (Ankar i

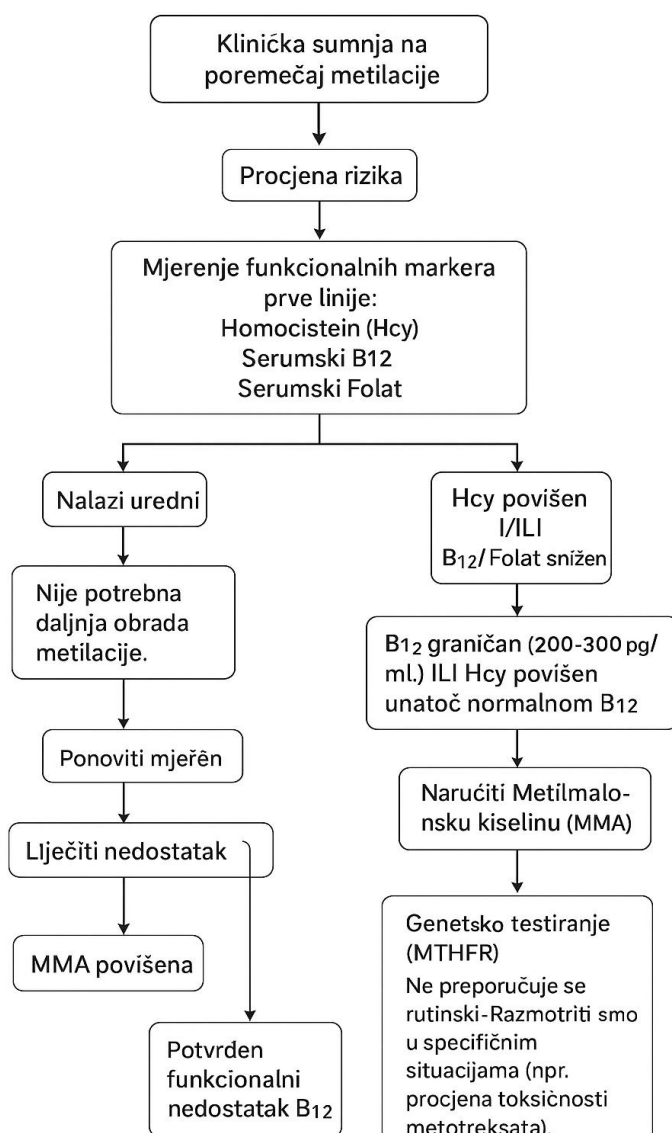
Kumar, 2022).

Genetsko testiranje (MTHFR) treba razmotriti samo u specifičnim, rijetkim kliničkim scenarijima (npr. sumnja na tešku homozigotnu mutaciju ili procjena toksičnosti metotreksata), ali ne kao rutinski alat (CAP, 2023).

Sveobuhvatna procjena (istraživanje): Kod kompleksnih, kroničnih stanja u istraživačkom okruženju, mjerenje omjera SAM/SAH može pružiti dodatni uvid u stanični metilacijski kapacitet (Bravo et al., 2022).

Svi laboratorijski nalazi moraju se interpretirati isključivo u kontekstu cjelokupne kliničke slike, životnog stila i prehrambenih navika, a plan liječenja treba biti personaliziran i vođen od strane kvalificiranog zdravstvenog djelatnika.

Dijagnostički Algoritam za Procjenu Metilacijskog Statusa



Ograničenja i Budući Smjerovi

Iako je razumijevanje metilacije značajno napredovalo, ovaj pregledni rad identificira nekoliko ključnih ograničenja i područja za buduća istraživanja.

Prvo, ostaje klinički paradoks homocisteina: zašto opsežni opservacijski podaci i jasni mehanizmi (poput endotelne disfunkcije) nisu rezultirali kliničkom koristi u velikim RCT-ovima suplementacije B vitaminima za prevenciju infarkta miokarda? Buduća istraživanja moraju se pomaknuti s jednostavnog snižavanja Hcy na razumijevanje zašto je on povišen. Moguće je da je Hcy u kontekstu koronarne bolesti prvenstveno marker bubrežne disfunkcije, upale ili loših životnih navika, a ne sam uzročni čimbenik.

Drugo, iako je veza između MTHFR polimorfizama i biokemijskog fenotipa (povišenog Hcy u uvjetima niskog folata) jasna, nedostaju dokazi o kliničkoj korisnosti (*clinical utility*) rutinskog testiranja. Buduće studije trebale bi se usredotočiti na to mijenja li poznavanje MTHFR statusa doista kliničke ishode, ili je mjerenje funkcionalnih markera (Hcy, MMA) uvijek superiorno.

Treće, potrebno je dublje istražiti interakciju metilacijskog ciklusa s drugim sustavima. Na primjer, rastući dokazi upućuju na to da crijevni mikrobiom može značajno utjecati na status B vitamina i metabolizam homocisteina, što otvara novo polje nutrigenomike.

Konačno, dok su specifični metilacijski paneli (poput SEPT9 za rak debelog crijeva) pokazali dijagnostičku vrijednost, koncept općeg „panela zdravlja metilacije” ostaje u domeni istraživanja i nedostaju mu validacijske studije potrebne za kliničku primjenu.

Integrativni Pogled na Metilaciju i Personalizirani Pristup Zdravlju

Metilacija je tihi, ali sveprisutni biokemijski proces koji predstavlja temelj staničnog zdravlja i sistemske homeostaze. Ovaj pregled je potvrdio da metilacija nije izolirani put, već dinamički sustav na sjecištu genetike, prehrane i okoliša. Ona djeluje kao biokemijska rafinerija koja prerađuje nutrijente, epigenetski prekidač koji regulira ekspresiju gena (često u suradnji s histonskim modifikacijama) i ključni mehanizam za proizvodnju stanične energije (poput kreatina i karnitina) te detoksikaciju (primjerice hormona poput estrogena).

Ključni nalaz jest da je disfunkcionalna metilacija sistemski, a ne organo-specifičan problem. Isti temeljni biokemijski poremećaj, poput smanjene aktivnosti MTHFR enzima, može se manifestirati kao kardiovaskularna bolest kod jedne osobe, depresija kod druge ili komplikacije u trudnoći kod treće, ovisno o jedinstvenoj interakciji genetske pozadine i okolišnih čimbenika. Ovo pruža jedinstveni integrativni okvir za razumijevanje komorbiditeta. Nadalje, kritička analiza literature razjasnila je ključne kontroverze: (1) povišeni homocistein je vjerojatno kauzalni faktor za moždani udar, ali prvenstveno biomarker za infarkt miokarda; i (2) rutinsko MTHFR genetsko testiranje nema kliničku korisnost prema važećim smjernicama.

Budućnost medicine u ovom području leži u personaliziranom pristupu koji prepoznaje biokemijsku individualnost i omogućuje prelazak s reaktivnog na proaktivni model zdravstvene skrbi. Umjesto masovne primjene genetskih testova ograničene vrijednosti, fokus se mora usmjeriti na integrativnu dijagnostiku temeljenu na funkcionalnim biokemijskim markerima i naprednim alatima poput metilacijskih panela ili specifičnih epigenetskih markera. Uz to, ciljane

nutritivne strategije, poput suplementacije biološki aktivnim oblicima B vitamina za osobe s polimorfizmima, predstavljaju moćan alat za optimizaciju metilacijskih puteva.

U konačnici, optimalna metilacija je „iskra” koja omogućuje motoru našeg tijela da iskoristi gorivo koje mu svakodnevno dajemo, a personalizirani pristup koji poštuje naš jedinstveni genetski i metabolički profil ključ je za očuvanje te iskre tijekom cijelog života.

Literatura

- ACOG (2018). Practice Bulletin No. 197: Inherited Thrombophilias in Pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, 132 (1), e18–e34.
- Al Mutairi, F., et al. (2020). Hyperhomocysteinemia: Clinical Insights and Management. *SAGE Journals*.
- Almawi, W. Y., Finan, R. R., Tamim, H., Daccache, J. L., & Irani-Hakim, N. (2005). Differences in the frequency of the C677T and A1298C polymorphisms in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in different Lebanese communities. *American Journal of Hematology*, 79 (4), 337–338.
- Ankar, A., & Kumar, A. (2022). Vitamin B12 Deficiency - Evaluation and Management. *StatPearls/NCBI Bookshelf*.
- ASRM (2012). Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertility and Sterility*, 98 (5), 1103–1111.
- ASH (2023). 2023 Guidelines for Management of Venous Thromboembolism (VTE) in Adults. *American Society of Hematology*.
- Bailey, R. L., et al. (2015). Nutritional Assessment: Folate - BOND project. *Nutritional Assessment.org*.
- Baubec, T., et al. (2015). In vivo targeting of de novo DNA methylation by histone H3K4 methylation state. *PMC*.
- Bazzano, L. A., et al. (2006). Effect of folic acid supplementation on risk of cardiovascular diseases. *JAMA*.
- Ben-Ami, R., et al. (2024). Protein biomarkers and cfDNA methylation detect early stage pancreatic cancer. *Gut (BMJ)*.
- Bennett, D. A., et al. (2023). MTHFR C677T and stroke/heart disease risk in low-folate population. *International Journal of Epidemiology*.
- Biocrates (2025). Methylmalonic acid – key marker of vitamin B12 status. *Biocrates Life Sciences*.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 16 (1), 6-21.
- Bonilla, D. A., et al. (2021). Creatine supplementation and its effects on human muscular performance and body composition. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 18 (1), 1-19.
- Boushey, C. J., Beresford, S. A., Omenn, G. S., & Motulsky, A. G. (1999). Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Atherosclerosis*, 143 (2), 407–432.
- Brattström, L. (2000). Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect?. *American Journal of Clinical Nutrition*.
- Bravo, A. C., et al. (2022). Method Optimisation and Profiling of SAM and SAH upon Oral Methionine Load. *PMC*.
- Bröhm, A., et al. (2022). Methylation of recombinant mononucleosomes by DNMT3A. *Nature Communications*, 13 (1), 1435.
- Candido, F. R., et al. (2025). Creatine supplementation: A review of mechanisms and effects on performance and health. *Frontiers in Nutrition*, 12, 1579204.
- Cantoni, G. L. (1996). S-Adenosylmethionine and methylation. *The FASEB Journal*, 10 (6), 609–616.
- CAP (2023). MTHFR Comprehensive Module. *College of American Pathologists*.
- Casas, J. P., et al. (2005). Homocysteine and stroke: evidence from Mendelian randomization. *BMJ*.
- CDC (2024). Folate Harmonization for Public Health Laboratories - WHO Guidelines. *CDC/LQAP*.
- CDC/NHANES (2013). Methylmalonic acid (MMA) - Laboratory Procedure Manual. *CDC*.
- Cedar, H., & Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Reviews Genetics*, 10 (5), 295-304.
- Chen, B., et al. (2025). Circulating DNA methylation-based diagnostic, prognostic and predictive biomarker in colorectal cancer. *Nature Scientific Reports*.
- Chowdhury, S., et al. (2024). Analytical Validation of Early Detection Pancreatic Cancer Test using 5hmC. *Journal of Molecular Diagnostics*.
- Clarke, R., et al. (2010). Effects of Lowering Homocysteine With B Vitamins. *JAMA Internal Medicine*.

- D'Addario, C., Mian, M., & Cattaneo, A. (2024). a narrative review of epigenetic mechanisms, key players and research settings in depression. *Frontiers in Psychiatry*, 16 .
- da Silva, R. P., et al. (2008). Creatine synthesis: hepatic metabolism of guanidinoacetate and creatine in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296 (2), E256-E261.
- da Silva, R. P., et al. (2013). Creatine synthesis: hepatic metabolism of guanidinoacetate and creatine in rats. *Amino Acids*, 44 (4), 1133-1139.
- Dean, L. (2012). MTHFR Deficiency . NCBI Bookshelf.
- Dean, L. (2012). Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency. U V. M. Pratt, S. A. Scott, M. Pirmohamed, B. Esquivel, M. S. Kane, & C. F. Thornburg (Ur.), *Medical Genetics Summaries* . National Center for Biotechnology Information (US).
- Deloughery, T. G. (2022). A call to action: MTHFR polymorphisms should not be part of thrombophilia testing. *International Journal of Laboratory Hematology*, 44 (S1), 31–33.
- Del Vecchio, D., et al. (2024). DNA methylation either antagonizes or promotes Polycomb-associated H3K27me3. *bioRxiv* .
- Dietrich, D., et al. (2013). Diagnostic and prognostic value of SHOX2 and SEPT9 methylation in pleural effusions. *PubMed* .
- Domschke, K., Tidow, N., Schrepf, M., Schwarte, K., Klauke, B., Reif, A., ... & Deckert, J. (2014). DNA methylation of the serotonin transporter gene (SLC6A4) is associated with brain function involved in processing emotional stimuli. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 39 (3), 154–162.
- Du, J., Johnson, L. M., Jacobsen, S. E., & Patel, D. J. (2015). DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16 (9), 519–532.
- Dwivedi, Y. (2009). Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 5 , 433–449.
- Eijsink, J. J. H., de Jong, F. A., Ghobadi Moghaddam-Helmantel, I. M., Blom, H. J., & van der Heijden, O. W. H. (2022). Homocysteine and cardiovascular disease – a current review. *Wiadomości Lekarskie*, 75 (11 pt 2), 2862–2866.
- Esteller, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, 21 (35), 5427–5440.
- Fang, J., et al. (2016). Hemi-methylated DNA opens a closed conformation of UHRF1. *Nature Communications*, 7 (1), 11197.
- Farrell, C., Doolin, K., O' Leary, N., O' Toole, C., & Frodl, T. (2018). DNA methylation of the glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and the serotonin transporter gene (SLC6A4) in major depressive disorder. *Psychiatry Research*, 267 , 223–229.
- Fiorentini, D., Cappadone, C., Farruggia, G., & Prata, C. (2021). Magnesium: Biochemistry, Nutrition, Detection, and Social Impact of Diseases Linked to Its Deficiency. *Nutrients*, 13 (4), 1136.
- Frosst, P., Blom, H. J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C. A., Matthews, R. G.,... & Rozen, R. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics*, 10 (1), 111–113.
- Galbraith, K., et al. (2023). „Clinical utility of whole-genome DNA methylation profiling as a diagnostic method for primary CNS tumors”. *PubMed/Oxford Academic* .
- Galloway, M., et al. (2003). Red cell or serum folate? Results from the National Pathology Alliance. *PMC/Journal of Clinical Pathology* .
- Ganguly, P., & Alam, S. F. (2015). Homocysteine and cardiovascular disease. *Nutrition Journal*, 14 (6).
- Ganguly, P., et al. (2015). Role of homocysteine in CVD development. *Nutrition Reviews* .
- Gao, Q., et al. (2022). Review: Circulating cell-free DNA for cancer early detection. *Science Direct* .
- Ghassabian, S., et al. (2014). Fully Validated LC-MS/MS Method for Quantification of Homocysteine. *Journal of Chromatography B* .
- Gkountaridis, D., Gkolfinopoulou, C., & Rueda, O. M. (2021). A Practical Guide to the Measurement and Analysis of DNA Methylation. *Methods in Molecular Biology*, 2261 , 289–305.
- González-Herrera, L., Solís-Sáinz, J. C., & Canto-Cetina, T. (2014). Ethnic variation of the C677T and A1298C polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate-reductase (MTHFR) gene in southwestern Mexico. *Journal of Community Genetics*, 5 (2), 149–155.
- Goren, J. L., Stoll, A. L., Scott, J. A., Fava, M., Mischoulon, D., Papakostas, G. I.,... & Cohen, B. M. (2014). A randomized, placebo-controlled, clinical trial of S-adenosyl-L-methionine (SAME) for the treatment of major

- depressive disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 34 (1), 21–27.
- Hannisdal, R., et al. (2009). LC-MS/MS Analysis of Folate and Folate Catabolites in Human Serum. *Clinical Chemistry*.
- Hariharan, R., et al. (2020). Utility of the methylated SEPT9 test for the early detection of colorectal cancer: meta-analysis. *PMC*.
- Harrison, P. J., & Tunbridge, E. M. (2008). COMT: a gene contributing to risk of schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience*, 9 (4), 327–334.
- Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2003). DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Carcinogenesis*, 24 (12), 1985–1991.
- Hickey, S. E., Curry, C. J., & Toriello, H. V. (2013). ACMG Practice Guideline: lack of evidence for MTHFR polymorphism testing. *Genetics in Medicine*, 15 (2), 153–156.
- Holmes, M. V., et al. (2011). Mendelian randomization in cardiovascular research. *JAMA*.
- Homocysteine Studies Collaboration (2002). Homocysteine and risk of IHD and stroke. *JAMA*.
- Houten, S. M., & Wanders, R. J. (2010). A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *Journal of inherited metabolic disease*, 33 (5), 469–477.
- Huang, Y., et al. (2008). Quantification of key RBC folates using stable isotope dilution LC-MRM/MS. *PMC/Molecular Genetics and Metabolism*.
- Huang, Z., et al. (2025). Association of Hcy with CVD: NHANES analysis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*.
- Huo, Y., et al. (2015). Efficacy of Folic Acid Therapy in Stroke Prevention (CSPT). *JAMA*.
- Jeltsch, A., Ehrenhofer-Murray, A., Jurkowska, R. Z., & Nellen, W. (2017). Epigenetic regulations through DNA methylation and hydroxymethylation: clues for early pregnancy in decidualization. *Reproductive BioMedicine Online*, 35 (5), 571–580.
- Jensen, S. Ø., et al. (2019). Novel DNA methylation biomarkers show high sensitivity and specificity for early-stage colorectal cancer. *PMC/Clinical Epigenetics*.
- Jiang, Y., et al. (2017). Simultaneous determination of plasma total homocysteine and methionine by LC-MS/MS. *Clinical Biochemistry*.
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, 128 (4), 683–692.
- Kalahasthi, R., et al. (2023). Assessment of Diagnostic Accuracy and Clinical Utility of DNA methylation in occupational Pb-exposure. *PMC*.
- Karatas, O. F., Ozen, M., & Aras, I. (2016). The prevalence of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in a Turkish population. *Molecular Biology Reports*, 43 (12), 1361–1366.
- Kaul, S., et al. (2006). Homocysteine hypothesis for atherothrombotic CVD. *Journal of the American College of Cardiology*.
- Khan, K. M., et al. (2023). Folic Acid Deficiency - Diagnostic Strategies. *StatPearls/NCBI Bookshelf*.
- Kiekens, F., et al. (2015). A Validated Ultra-High-Performance LC-MS/MS Method for Folate Analysis in Plasma and RBC. *Journal of Chromatography A*.
- Klein, E. A., et al. (2021). Clinical validation of targeted methylation-based MCED test (Galleri). *Annals of Oncology*.
- Klepacki, J., et al. (2013). Development and validation of an LC-MS/MS assay for SAM and SAH in human plasma. *Clinical Biochemistry/PMC*.
- Kontic, M., et al. (2025). Use of DNA methylation patterns for early detection of lung cancer. *PMC*.
- Kord Varkaneh, H., Alizadeh, S., Shareh, S., ... & Zare, E. (2024). MTHFR gene polymorphisms in diabetes mellitus. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 479 (6), 6133–6148.
- Krijt, J., et al. (2009). Determination of S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine in Mice Tissues. *Journal of Chromatography B*.
- Kujovich, J. L. (2015). MTHFR Polymorphism Testing. *JAMA*, 313 (18), 1865.
- Kulis, M., & Esteller, M. (2010). Is DNA methylation of tumour suppressor genes epigenetic? *Molecular Oncology*, 4 (3), 205–212.
- Kurdyukov, S., & Bullock, M. (2016). DNA methylation methods: global DNA methylation and methylomic analyses. *Epigenetics & Chromatin*, 9 (6).
- Lahiri, K. D., et al. (2013). Reference Interval Determination of Total Plasma Homocysteine in Indian Population. *PMC*.
- Langan, R. C., & Goodbred, A. J. (2017). Vitamin B12 Deficiency: Recognition and Management - AAFP Guidelines. *American Family Physician*.
- Lavigne, J. A., et al. (2001). The effects of catechol-O-methyltransferase inhibition on estrogen metabolite and

- oxidative DNA damage levels in estradiol-treated MCF-7 cells. *Cancer Research*, 61 (20), 7488-7494.
- Levin, B. L., & Varga, E. A. (2012). MTHFR: a common polymorphism with varied clinical presentations. *Genetics in Medicine*, 15 (2), 153-6.
- Levin, B. L., & Varga, E. A. (2016). MTHFR genetic testing: Controversy and clinical implications. *Australian Family Physician*, 45 (4), 237-40.
- Lewis, S. J., et al. (2005). Meta-analysis of MTHFR 677C→T and coronary heart disease. *PMC*.
- Li, J., et al. (2016). Folic acid supplementation and the risk of cardiovascular diseases: a meta-analysis. *Journal of the American Heart Association*.
- Li, L., et al. (2024). Circulating tumor DNA methylation detection as biomarker: comprehensive review. *PMC*.
- Li, T., et al. (2018). Structural and mechanistic insights into UHRF1-mediated DNMT1 activation. *Nucleic Acids Research*, 46 (6), 3218-3231.
- Li, Y., et al. (2016). Folic Acid Supplementation and Cardiovascular Disease Risk. *Journal of the American Heart Association*.
- Li, Y., & Zhang, Y. (2021). The interplay between DNA and histone methylation: molecular mechanisms and disease implications. *EMBO Reports*, 22 (10), e51803.
- Liao, X., et al. (2025). Elevated red blood cell folate levels are associated with MASLD. *Frontiers in Physiology*.
- Lin, G., et al. (2013). Contribution of catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism to endometrial cancer risk in postmenopausal women: a meta-analysis. *Genetics and Molecular Research*, 12 (4), 6757-6765.
- Liu, D., et al. (2024). Association between homocysteine levels and mortality in CVD. *PMC*.
- Liu, X., et al. (2020). UHRF1: A key regulator of DNA methylation and ubiquitination. *bioRxiv*.
- Liu, X. P., et al. (2020). A DNA Methylation-Based Panel for Prognosis and Diagnosis of Breast Cancer. *PMC/Frontiers*.
- Liu, Y., et al. (2024). Utility of methylmalonic acid, methylcitrate and homocysteine in dried blood spots. *Frontiers in Nutrition*.
- Lo, Y. M. D. (2017). S-adenosylmethionine: A metabolite critical to the regulation of autophagy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21 (10), 2267–2276.
- Long, S., & Goldblatt, J. (2016). MTHFR genetic testing: Controversy and clinical implications. *Australian Family Physician*, 45 (4), 237–240.
- Longo, N., et al. (2016). Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1862 (12), 2248-2259.
- Lopez-Serra, L., & Esteller, M. (2008). Proteins that bind methylated DNA and human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8 (7), 545-555.
- Luo, H., et al. (2020). Circulating tumor DNA methylation profiles enable early CRC diagnosis. *Science Translational Medicine*.
- Ma, C., et al. (2025). Value of cfDNA methylation in esophageal cancer diagnosis: meta-analysis. *Oncology Letters*.
- Maas, M. N., et al. (2020). Trimethyllysine: A dual-role metabolite linking protein lysine methylation to carnitine biosynthesis. *PMC*.
- Malinow, M. R., et al. (1999). Homocyst(e)ine, Diet, and Cardiovascular Diseases - AHA Scientific Statement. *Circulation (AHA)*.
- Martí-Carvajal, A. J., Solà, I., Lathyris, D., & Dayer, M. (2017). Homocysteine-lowering interventions for preventing cardiovascular events. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 8 (8), CD006612.
- McNulty, H., Hoey, L., Ward, M., & Strain, J. J. (2019). Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. *Current Nutrition Reports*, 8 (4), 329–339.
- Miao, L., et al. (2021). No causal effects of plasma homocysteine on CHD or AMI (MR study). *PubMed*.
- Mischoulon, D., & Fava, M. (2002). Role of S-adenosyl-L-methionine in the treatment of depression: a review of the evidence. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76 (5), 1158S–1161S.
- Moll, S., & Varga, E. A. (2015). Homocysteine and MTHFR Mutations. *Circulation*, 132 (1), e6-e9.
- Monsen, A. L. B., & Ueland, P. M. (2003). Homocysteine and methylmalonic acid in diagnosis from infancy to adolescence. *American Journal of Clinical Nutrition*.
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38 (1), 23–38.
- Neri, F., Zippo, A., & Incarnato, D. (2017). A Practical Guide to the Measurement and Analysis of DNA Methylation. *Methods in Molecular Biology*, 1619, 131–146.
- Nian, J., et al. (2017). Diagnostic Accuracy of Methylated SEPT9 for Blood-based CRC Detection. *PMC*.

- NICE (2024). Vitamin B12 deficiency in over 16s: diagnosis and management \$NG239\$\$\$. NICE Guidelines .
- NIH (2025). Folate - Health Professional Fact Sheet . NIH Office of Dietary Supplements.
- Obeid, R., Fedosov, S. N., & Nexø, E. (2018). S-Adenosyl Methionine and Transmethylation Pathways in SAME-Treated Patients with Liver Disease. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 173 , 19–37.
- OBGProject (2017). MTHFR Polymorphism Testing: The Evidence Isn't There .
- Ostojic, S. M., et al. (2013). Co-administration of methyl donors along with guanidinoacetic acid reduces the incidence of hyperhomocysteinaemia. *British Journal of Nutrition*, 110 (3), 479-485.
- Ouyang, Y., et al. (2020). S-adenosylmethionine: A central metabolite in one-carbon metabolism. *PMC* .
- Planello, A. C., et al. (2024). MTHFR genetic testing: Is there a clinical utility? *Revista da Associação Médica Brasileira*, 70 (1).
- Qiao, G., et al. (2021). Discovery and validation of methylation signatures in circulating cell-free DNA for early detection of esophageal cancer. *Nature/BMC* .
- RACGP (2016). MTHFR genetic testing: Controversy and clinical implications .
- Rebouche, C. J. (2004). Carnitine. *Linus Pauling Institute* .
- Reddington, J. P., et al. (2013). Redistribution of H3K27me3 upon DNA hypomethylation. *Epigenetics & Chromatin*, 6 (1), 1-17.
- Ren, W., et al. (2020). Direct readout of heterochromatic H3K9me3 regulates DNMT1-mediated maintenance DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117 (32), 19445-19454.
- Rose, N. R., & Klose, R. J. (2014). Understanding the relationship between DNA methylation and histone modifications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1839 (12), 1362-1372.
- Semaan, A., et al. (2016). SEPT9 and SHOX2 DNA methylation status and its utility in colorectal cancer diagnosis. *PMC* .
- Servillo, L., et al. (2014). Nε-trimethyllysine, a carnitine biosynthesis precursor, is a ubiquitous plant metabolite. *Phytochemistry*, 100 , 65-71.
- Shao, Z., et al. (2024). Multi-layered heterochromatin interaction as a switch. *Nature Communications*, 15 (1), 3849.
- Shellenberger, K. E., Davis, J. W., & Uthus, E. O. (2020). Nutritional cofactors in methylation. *Advances in Nutrition*, 11 (1), 12–21.
- Snow, C. F. (1999). Laboratory Diagnosis of Vitamin B12 and Folate Deficiency. *JAMA Internal Medicine* .
- Son, P., et al. (2022). Hyperhomocysteinemia - Treatment/Management Guidelines. *StatPearls/NCBI Bookshelf* .
- Song, L., et al. (2017). The performance of the SEPT9 gene methylation assay - FDA approval and IVD comparison. *PMC/Scientific Reports* .
- Sørensen, M., Gkoutaridis, D., & Rueda, O. M. (2021). Epigenetic Regulation and Measurement of Epigenetic Changes. *Methods in Molecular Biology*, 2261 , 1–19.
- Stampfer, M. J., et al. (1992). A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* .
- Stead, L. M., et al. (2001). Methylation demand and homocysteine metabolism: effects of dietary creatine and guanidinoacetate. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 281 (5), E1095-E1100.
- Stein, J. H., & McBride, P. E. (1998). Hyperhomocysteinemia and Atherosclerotic Vascular Disease: AHA Guidelines. *JAMA Internal Medicine* .
- Struys, E. A., et al. (2000). Determination of SAM and SAH in Plasma and CSF by Stable-Isotope Dilution Tandem MS. *Clinical Chemistry* .
- Szyf, M. (2014). DNA Methylation: A Mechanism for Embedding Early Life Experiences in the Genome. *Neuropsychopharmacology*, 39 (1), 101–123.
- Tian, L., et al. (2016). Diagnostic value of circulating methylated SEPT9 DNA in CRC: meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* .
- Vaissière, T., Sawan, C., & Herceg, Z. (2008). Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 659 (1-2), 40-48.
- van der Put, N. M., Gabreëls, F., Stevens, E. M., Smeitink, J. A., Trijbels, F. J., Eskes, T. K.,... & Blom, H. J. (1998). A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *American Journal of Human Genetics*, 62 (5), 1044–1051.
- Vaz, F. M., & Wanders, R. J. (2002). Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochemical Journal*, 361 (Pt 3), 417-429.
- Verhoef, P., et al. (1996). Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction. *American Journal of Epidemiology* .

- Wald, D. S., et al. (2002). Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* .
- Wan, G. X., et al. (2014). Association between the COMT Val158Met polymorphism and breast cancer risk. *OncoTargets and therapy*, 7 , 1419.
- Wang, H., Li, G., & Liu, Y. (2023). DNA Methylation in Depression and Depressive-Like Phenotype: Biomarker or Target of Pharmacological Intervention? *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (3), 2580.
- Wang, W., Li, J., & Yang, H. (2024). S-Adenosylmethionine: A Multifaceted Regulator in Cancer Pathogenesis and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 25 (5), 2999.
- Wang, X., et al. (2012). Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis. *The Lancet* .
- Wang, X., et al. (2023). Homocysteine and heart failure/cardiomyopathy: MR study. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* .
- Weiss, G., et al. (2017). Validation of the SHOX2/PTGER4 DNA Methylation Marker Panel for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* .
- WHO (2017). WHO guidelines on optimal blood folate concentrations to prevent neural tube defects . WHO.
- Widschwendter, M., & Jones, P. A. (2002). DNA methylation of tumor suppressor and metastasis suppressor genes in circulating tumor cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 94 (14), 1042–1043.
- Wu, Y. L., Ding, X. X., Sun, Y. H., ... & Hu, B. (2019). Methylene tetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Pregnancy Outcome. *Journal of Reproductive Medicine*, 64 (5-6), 259–264.
- Wyss, M., & Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and creatinine metabolism. *Physiological Reviews*, 80 (3), 1107-1213.
- Xiao, J., et al. (2022). Higher SAH and lower SAM/SAH ratio associated with increased risk of stroke. *Frontiers in Nutrition* .
- Yager, J. D. (2012). Mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 33 (7), 1275-1284.
- Yang, J. S., et al. (2021). Rapid analysis of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Analytica Chimica Acta* .
- Yang, Q., et al. (2010). Folic acid and stroke: a complex story. *The Lancet Neurology* .
- Yang, S. M., et al. (2013). H1 linker histone promotes epigenetic silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (51), 20494-20499.
- Yi, P., He, A., Shao, C., & Li, H. (2012). Geographical and ethnic distribution of the MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in China. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 50 (5), 871–876.
- Yuan, S., et al. (2021). Homocysteine, B vitamins, and CVD: MR study. *D-NB* .
- Yun, M., et al. (2011). Readers of histone modifications. *Cell Research*, 21 (4), 564-578.
- Zannas, A. S., Chrousos, G. P., & Binder, E. B. (2015). Effects of Negative Stressors on DNA Methylation in the Brain: Implications for Mood and Anxiety Disorders. *Neurobiology of Stress*, 1 , 21–29.
- Zhang, C., et al. (2014). Cumulative Meta-Analysis on B vitamin supplementation. *PMC* .
- Zhang, H., et al. (2016). SAM/SAH ratio as a sensitive indicator in atherosclerosis. *Molecular Medicine Reports* .
- Zhang, N., et al. (2024). Folic acid supplementation for stroke prevention: Largest meta-analysis to date. *PubMed* .
- Zhang, T., et al. (2015). The interplay of histone modifications – writers that read. *EMBO Reports*, 16 (11), 1459-1476.
- Zhang, T., et al. (2019). Lifetime stroke-free survival with folic acid (CSPPT follow-up). *PMC* .
- Zhao, M., et al. (2017). Homocysteine and Stroke: MTHFR C677T interaction (Post-hoc CSPPT). *Stroke* .
- Zhao, Q. T., et al. (2015). Diagnostic value of SHOX2 DNA methylation in lung cancer: meta-analysis. *PMC/OncoTargets and Therapy* .
- Zhou, Y. H., et al. (2019). Homocysteine and stroke: A meta-analysis of Mendelian randomization studies. *Frontiers in Genetics* .