

СОДЕРЖАНИЕ

МЕДИЦИНСКИЕ НАУКИ

Ластовецкая О.Б.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ
ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ MTHFR И MTR У
ЖЕНЩИН С ЭМБРИОНАЛЬНЫМИ ПОТЕРЯМИ..... 3

ПЕДАГОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Григорьев А.Ф., Спербер О.И.

ПРОБЛЕМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ХУДОЖЕСТВЕННО-
ЭСТЕТИЧЕСКИХ ПОТРЕБНОСТЕЙ МЛАДШИХ
ШКОЛЬНИКОВ СРЕДСТВАМИ МУЗЫКАЛЬНОГО
ИСКУССТВА 8

ЮРИДИЧЕСКИЕ НАУКИ

Ильина Е.В.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ ПРЕСТУПЛЕНИЙ,
ПРЕДУСМОТРЕННЫХ СТАТЬЕЙ 186 УК РФ..... 12

Капыш В.П.

РАЗВИТИЕ АДМИНИСТРАТИВНО-ПРАВОВОГО
МЕХАНИЗМА УПРАВЛЕНИЯ ОБЕСПЕЧЕНИЕМ
БЕЗОПАСНОСТЬЮ В УСЛОВИЯХ ЭПИДЕМИИ ИЛИ
ПАНДЕМИИ 13

Куртынов И.В.

ПРОБЛЕМЫ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ
ДОКАЗАТЕЛЬСТВ В ХОДЕ РАСКРЫТИЯ
ПРЕСТУПЛЕНИЙ ЭКОНОМИЧЕСКОЙ
НАПРАВЛЕННОСТИ 18

МЕДИЦИНСКИЕ НАУКИ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ MTHFR И MTR У ЖЕНЩИН С ЭМБРИОНАЛЬНЫМИ ПОТЕРЯМИ

Ластовецкая Оксана Богдановна
аспирант каф. акушерства и гинекологии №2
Национальный медицинский университет им.Н.И.Пирогова
г.Винница, Украина

THE MOLECULAR-GENETIC INVESTIGATION OF THE FREQUENCY OF ALLELES AND GENOTYPES OF POLYMORPHIC VARIANTS MTHFR AND MTR IN WOMEN WITH EMBRYONIC LOSS

Lastovetska Oksana
PhD student of the Department of Obstetrics and Gynecology №2
National Pirogov Memorial Medical University,
Vinnytsya, Ukraine

Аннотация. В статье изложены результаты проспективного клинического исследования частоты аллелей и генотипов полиморфных вариантов MTHFR и MTR у женщин позднего репродуктивного возраста, которые имели эмбриональные потери в анамнезе. Показано, что наличие гомозиготной или гетерозиготной формы мутации гена MTHFR (генотип 677C/T и 677T/T), было чётко ассоциировано с увеличением риска развития эмбриональных потерь у женщин позднего репродуктивного возраста. В зависимости от генетического полиморфизма по MTHFR следует выделять различные пути дезадаптации метаболизма фолатов.

Abstract. The article presents the results of a prospective clinical study for investigation of the frequency of alleles and genotypes of polymorphic variants MTHFR and MTR in women of late reproductive age who had a history of embryonic loss. It has been shown that the presence of a homozygous or heterozygous forms of the MTHFR gene mutation (genotypes 677C / T and 677T / T) were significant associated with an increased risk of embryonic loss in women of late reproductive age. Depending on the genetic polymorphism for MTHFR, different pathways for disorders of folate metabolism should be distinguished.

Ключевые слова: эмбриональные потери, генетический полиморфизм MTHFR C677T, фолиевая кислота.

Key words: embryonic loss, MTHFR C677T genetic polymorphism, folic acid.

Прерывание беременности является итогом синергического действия неблагоприятных эндогенных и экзогенных факторов, нарушающих адаптационные механизмы гестации в организме женщины, в то время как относительный вклад отдельных составляющих может варьировать в конкретной клинической ситуации [6,8]. В свою очередь, каждый выкидыш оставляет дополнительный негативный след на репродуктивное здоровье женщины, ухудшая прогноз результата следующей беременности. Исследование патогенеза ранних репродуктивных потерь позволило обосновать целесообразность использования термина «эмбриональная потеря», а не привычный выкидыш [7].

На данный момент существует большое количество методических пособий, клинических протоколов и приказов по обследованию и ведению беременности у женщин с привычным невынашиванием в анамнезе [6]. Однако в них недостаточно отражена роль нарушения метаболизма фолатов в генезисе ранних потерь беременности. Следует учитывать, что в процессе метаболизма фолатов важную роль играет полиморфизм генов. В организме каждой второй

женщины из-за ограниченной активности ферментов ФК не может полностью превратиться в биологически активную форму - 5-метилтетрагидрофолат (5-MTHF) [2,3]. Профилактика и лечение ранних потерь беременности с учетом полиморфизма генов контролирующих фолатный метаболизм стали целью клинических исследований в последние годы, а определение факторов риска для пациенток позднего репродуктивного возраста и эмбриональными потерями в анамнезе становится критическим для разработки эффективных превентивных мер для предотвращения невынашивания и ВПР плода [1,2,5].

До сих пор существует еще недостаточно перспективных когортных исследований для оценки риска эмбриональных потерь среди женщин позднего репродуктивного возраста с нарушением метаболизма фолатов и ранними потерями беременности в анамнезе. Большинство исследований не проанализировали влияние биологически активной формы фолатов в виде 5-MTHF (метафолина) при изучении риска ранних потерь беременности у пациенток с генетическим полиморфизмом MTHFR C677T [4,10]. Недавние

исследования показали, что метафолин имел преимущества для профилактики невынашивания беременности в раннем сроке гестации сопоставимо с дотацией только синтетической фолиевой кислот в субклинических пациенток с нарушением метаболизма фолатов [2,9].

Противоречивость полученных предварительно результатов клинических исследований относительно взаимосвязи нарушения метаболизма фолатов и эмбриональных потерь, обосновывает необходимость поиска факторов, которые способствуют или препятствуют развитию невынашивания беременности в раннем сроке и формированию перинатальной патологии у пациенток с генетическим полиморфизмом MTHFR 677 и MTR 2756 в ассоциации с эмбриональными потерями, с целью максимальной оптимизации ранней доклинической диагностики и адекватной профилактической терапии в указанной выше категории пациенток.

Учитывая, что большинство манифестированной патологий ассоциированных с беременностью является результатом сочетания эффекта неблагоприятных внешних факторов и индивидуальных особенностей генома, а поиск ассоциаций аллелей и генотипов с заболеваниями - один из путей предикции невынашивания беременности, с целью выявления генетических маркеров, возможно, причастных к развитию эмбриональных потерь, проведено генотипирование двух полиморфизмов генов фолатного цикла.

Материалы и методы исследования. Для оценки роли генного полиморфизма фолатного цикла при эмбриональных потерях нами были проведены молекулярно-генетические исследования в двух группах: основной и контрольной. Основную группу составили 100 женщин позднего репродуктивного возраста с эмбриональными потерями в анамнезе. Контрольная группа представлена 40 женщинами с физиологическим течением беременности добровольно приняли решение об участии в клиническом проспективном исследовании.

Проверка критериев зачисления, а также подписание информированного согласия на участие в исследовании осуществлялись при первом посещении пациентки.

Критерии зачисления пациентов: I триместр беременности; возраст от 35 до 42 лет; одноплодная беременность; отсутствие коморбидной патологии; желание и возможность участвовать в исследовании; этническая однородность.

Материалы для молекулярно-генетического исследования были получены методом буккального соскоба, с помощью одноразовой системы. Для оценки количества выделенной геномной ДНК использовали набор реагентов, предназначенных для контроля взятия материала для метода ПЦР. В исследование принимали не менее 1,0 нг геномной ДНК на реакцию. Анализ генетических полиморфизмов осуществляли коммерческими наборами реагентов методом аллель-специфической полимеразной цепной реакции (ПЦР) в «режиме реального времени» для снятия кривых плавления продуктов амплификации. Исследовались однонуклеотидные замены в ключевых генах, кодирующих синтез ферментов обмена фолиевой кислоты: метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR 677 C>T и метионин-синтазы MTR 2756 A>G, с использованием аллель-специфичных праймеров методом ПЦР в автоматическом режиме программного обеспечения детектирующего амплификатора IQ5 (Bio Rad, USA). Выделение геномной ДНК проводилось методом экспресс-экстракции на основе температурного лизиса.

Обеспечение организма фолиевой кислотой оценивали по ее концентрации в сыворотке крови, которую определяли иммуноферментным методом. Иммуноферментный анализ (ELISA) выполнялся на стриповый иммуноферментном анализаторе «Humareader single» (Германия) при длине волны 450 нм и дифференциальным фильтром 630 нм. Расчеты проводились на основе данных полученных измерением калибровочных растворов, в соответствии с построенной калибровочной кривой. На основе построенной кривой вычисляются значения полученных результатов.

Различия считались статистически достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$. Распределение генотипов соответствовало ожидаемому при равновесии Харди - Вайнберга в основной клинической группе у женщин с эмбриональными потерями и пациенток-волонтеров из контрольной группы для полиморфных локусов генов MTHFR C677T, MTR A2756C.

Анализ, обобщение и разъяснение собственных данных исследования. Нами было установлено, что полиморфизм гена MTHFR C677T достоверно чаще ($p < 0,05$) встречался у женщин, имели анамнестические репродуктивные потери по сравнению с аналогичными показателями женщин из контрольной группы исследования (табл.1).

Таблица 1

Частота аллелей и генотипов полиморфизма генов MTHFR C677T MTR A2756G у женщин с эмбриональными потерями в анамнезе, n = 140, (M ± δ)

Полимор-физм гена	Генотип или аллель	Основная группа, n=100, абс (%)	Контрольная группа, n=40, абс (%)	ОШ (95% ДИ)	P
MTHFR C677T	C/C	30 (30,0)	24 (60,0)	0,29 (0,13-0,61)	0,001
	C/T	42 (42,0)	12 (30,0)	1,91 (0,86-4,25)	0,11
	T/T	28 (28,0)	4 (10,0)	3,50 (1,14-10,74)	0,03
	C	56 (56,0)	34 (85,0)	0,23 (0,09-0,58)	0,002
	T	44 (44,0)	6 (15,0)	4,45 (1,72-11,55)	0,002
MTR A2756G	C/T+T/T	65 (65,0)	14 (35,0)	3,45 (1,60-7,44)	0,002
	A/A	44 (44,0)	18 (45,0)	0,96 (0,46-2,01)	0,91
	A/G	44 (44,0)	20 (50,0)	0,79 (0,38-1,64)	0,52
	G/G	12 (12,0)	2 (5,0)	1,24 (0,25-5,96)	0,80
	A	66 (66,0)	28 (70,0)	0,84 (0,38-1,84)	0,65
	G	34 (34,0)	12 (30,0)	1,20 (0,54-2,66)	0,65
	A/G+G/G	58 (58,0)	22 (55,0)	1,13 (0,54-2,36)	0,75

Наиболее благоприятный гомозиготный генотип C/C чаще определялся у женщин с физиологическим течением беременности ОШ 0,29, 95% ДИ, 0,13-0,61, p = 0,001.

Тогда, как у женщин с эмбриональными потерями в анамнезе превалировал гомозиготный генотип T/T - ОШ 3,50, 95% ДИ, 1,14-10,74, p = 0,03. Частота встречаемости благоприятного аллеля C гена MTHFR 677 была достоверно больше (p = 0,002) у представительниц контрольной группы исследования. У женщин с анамнестическими ранними потерями беременности преобладал аллель T в приведенном выше гене фолатного цикла, ОШ 4,45, 95% ДИ, 1,72-11,55, p = 0,002. Также, хотелось бы отметить, что совокупность генотипов, содержащих полиморфный аллель MTHFR 677T в гомо- и гетерозиготном состоянии (C/T + T/T), достоверно чаще встречался у женщин которые имели эмбриональные потери, ОШ 3,45, 95% ДИ, 1,60-7,44, p = 0,002.

Для гена MTR значительных различий в частоте аллелей 2756 и 2756G в исследуемых группах не выявлено. Статистически значимых различий в частоте генотипов в исследуемых группах также обнаружено не было.

Следующим этапом нашего исследования стало определение содержания фолиевой кислоты (ФК) в сыворотке крови у беременных женщин позднего репродуктивного возраста с анамнестическими эмбриональными потерями, с учетом полиморфизмов гена

метиленetetрагидрофолатредуктазы (MTHFR C677T).

Анализ результатов обследования 60 беременных женщин с анамнестическими эмбриональными потерями, вставших на учет в женской консультации в ранние сроки гестации, показал средний уровень фолиевой кислоты в сыворотке крови $13,83 \pm 7,44$ мкг/л, что было почти в 3 раза выше, чем у женщин до беременности ($4,81 \pm 0,88$ мкг/л). У 30 женщин из контрольной группы показатель фолиевой кислоты в сыворотке крови в раннем сроке беременности составлял $17,1 \pm 1,85$ мкг/л. На основании полученных результатов, с учетом достаточно большой погрешности, нами было выполнено условное разделение обследуемых пациенток на 3 группы: первая группа (n = 23) - женщины, у которых содержание фолиевой кислоты не превышало 10,0 мкг/л; 2-я группа (n = 18) - беременные с содержанием в сыворотке крови фолиевой кислоты в пределах 10,0-20,0 мкг/л; в третьей группе (n = 19) вошли женщины, у которых сывороточный уровень фолиевой кислоты превышал 20,0 мкг/л (табл.2).

При этом статистически достоверное отличие относительно показателей уровня фолиевой кислоты в сыворотке крови у беременных женщин контрольной группы было диагностировано у 42 пациенток с эмбриональными потерями в анамнезе и выявленным нами ранее нарушением метаболизма фолатов (p < 0,05).

Таблица 2

Показатели фолиевой кислоты в сыворотке крови женщин с эмбриональными потерями в анамнезе и нарушением метаболизма фолатов, n = 90, (M ± δ)

Показатель	Первая группа (n=23)	Вторая группа (n=18)	Третья группа (n=19)	До беременности (n=60)	Контрольная группа (n=30)
Фолиевая кислота, мкг/л	$5,22 \pm 1,23^{**}$	$16,13 \pm 2,50^*$	$22,06 \pm 1,50^{**}$	$4,81 \pm 0,88$	$17,1 \pm 1,85^*$

Примечания: * - различия статистически достоверны (p < 0,05) относительно показателя до беременности; ** - различия статистически достоверны (p < 0,05) по пациенток из контрольной группы

Также, хотелось бы отметить, что приведенная выше вероятность была характерна для 23 женщин,

у которых указатель ФК был $5,22 \pm 1,23$ мкг/л и 19 пациенток основной клинической группы с

результатом ФК - $22,06 \pm 1,50$ мкг/л в сыворотке крови.

Результаты нашей научной работы, в целом, соотносятся с данными международных исследований, в которых было установлено, что при гомозиготном варианте полиморфизма гена MTHFR C677T количество репродуктивных потерь в два раза больше по сравнению с носителями гетерозиготного варианта, причем у большинства женщин отмечаются эмбриональные потери. У пациенток с беременностью, осложненной плацентарной недостаточностью, задержкой внутриутробного развития, антенатальной гибелью плода, гипергомоцистеинемия, ассоциированная с гомозиготным вариантом 677 TT, определялась в 22% случаев. Более того, риск повторных репродуктивных потерь отвечал ОШ = 14,0. Кроме того, при гомозиготной мутации гена MTHFR C677T почти в три раза чаще можно говорить о сочетании с АФС [4,5]. В ряде исследований установлено, что полиморфизм C677T гена MTHFR ассоциированный с развитием ПЭ. Примечательно, что вариант полиморфизма гена MTHFR - A1298C показывал ассоциации с развитием тяжелой и умеренной ПЭ (для генотипа CC ОШ = 2,92) [5,10].

Проведенное клиническое исследование Пустотиной А.А. и Ахмедовой А.Е. [2017] подтвердило роль дефицита фолатов в развитии акушерских осложнений: бесплодие, невынашивание беременности, преэклампсии, пороков развития у плода (дефект межжелудочковой перегородки, анэнцефалия и множественные пороки развития). Была установлена связь нарушений в метаболизме фолатного цикла с высокой частотой аномальных гинекологических и акушерских кровотечений у каждой второй женщины с полиморфизмом гена MTHFR были обильные, длительные менструации, в каждой пятой - кровотечение в родах или после аборта и в 86 % - кровотечение во время этой беременности. При этом у большинства обследованных женщин были изменены гематологические показатели в виде тромбоцитопении, анемии и/или гипергомоцистеинемии. Наиболее характерными, встречаются в более половины (54%) женщин с полиморфизмом гена MTHFR и в 86,4% беременных с полиморфизмом MTHFR, были повреждения тромбоцитарного звена гемопоэза - тромбоцитопатия, которая проявлялась снижением количества и увеличением объема тромбоцитов, а также признаками их функциональной недостаточности. В каждой третьей (37%) женщины с полиморфизмом генов ферментов фолатного цикла и в 73,7% беременных с нарушением метаболизма фолиевой кислоты развивалась анемия [2].

Таким образом, анализ полученных результатов позволил выяснить, что гомозиготная и гетерозиготная формы мутации гена MTHFR статистически достоверно связаны с риском невынашивания в раннем сроке беременности. Так же существуют различные пути дезадаптации

метаболизма фолатов у беременных в зависимости от генетического полиморфизма по MTHFR C677T. С учетом показателя распространенности генетических полиморфизмов MTHFR и проблем, связанных с пониженной активностью фермента MTHFR, с целью профилактики и лечения различных патологических состояний, связанных с дефицитом фолатов во время беременности, целесообразно применять витаминно-минеральные комплексы содержащие метафолин у женщин с эмбриональными потерями начиная с преемплации.

Выводы.

1. Наличие гомозиготной или гетерозиготной формы мутации гена MTHFR (генотип 677C/T и 677T/T), четко ассоциировано с увеличением риска развития эмбриональных потерь у женщин позднего репродуктивного возраста.

2. Характерной особенностью фолатного статуса оказалось повышенное содержание фолиевой кислоты в сыворотке крови у 31,7% беременных с функционально-измененными генотипами MTHFR C677T, также достоверное снижение ФК у 38,3% беременных женщин с предыдущими эмбриональными потерями у которых было диагностировано нарушение метаболизма фолатов.

Литература.

1. Бицадзе В.О., Самбутова Н.В., Макацария Н.А., Мищенко А.Л. Фолатдефицитные состояния в акушерской практике и проблема их коррекции" Акушерство, гинекология и репродукция. 2016;10(1):38-48.
2. Пустотина О.А., Ахмедова А.Э. Роль фолатов в развитии осложнений беременности // Здоровье женщины. 2017;1(117):56-61.
3. Третьякова Т.Б., Демченко Н.С. Ассоциация полиморфных маркеров генов метаболизма фолатов с ранними потерями беременности. Акушерство, гинекология и репродукция. 2018;12(1):42-52.
4. Ходжаева З.С., Блинецкая С.Л. Мутация гена MTHFR C677T и синдром репродуктивных потерь / З.С. Ходжаева, С.Л. Блинецкая // Вестник РУДН, серия Медицина. 2009;6:339-343.
5. Castaño E., Piñuñuri R., Hirsch S., Ronco A.M. Folate and pregnancy, current concepts: it is required folic acid supplementation? Rev Chil Pediatr. 2017;88 (2): 199–206.
6. Early pregnancy loss. ACOG Practice Bulletin No. 200. American College of Obstetricians and Gynecologists. Obstet Gynecol 2018;132:e197–207.
7. Green DM, O'Donoghue K. A review of reproductive outcomes of women with two consecutive miscarriages and no living child. J Obstet Gynaecol. 2019;39(6):816-821.
8. Konkov, D.G., Piskun, A.O., Taran, O.A., Kostur, G.V. Specialties of hystomorphometrical changes in placenta of women with early and late preeclampsia. Wiadomości Lekarskie. 2020;73(1):151-55.

9. Lastovetska O.B., Bulavenko O.V., Konkov D.G., Buran V.V. Effectiveness of the preventive use of folic acid and a complex with active folates in women with MTHFR C677T genetic polymorphism who had a history of embryonic loss. *Reproductive endocrinology*. 2020;3(53):55-60.

10. Lintas C. Linking genetics to epigenetics: The role of folate and folate-related pathways in neurodevelopmental disorders. *Clin Genet*. 2019;95(2):241-252.