

# ГЕНЕТИКА МЕТАБОЛИЗМА ФОЛАТОВ



**ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ**

# ГЕНЕТИКА МЕТАБОЛИЗМА ФОЛАТОВ

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НАРУШЕНИЯМИ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА, МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ «ГЕНЕТИКА МЕТАБОЛИЗМА ФОЛАТОВ»



Группа соединений фолатов играет ведущую роль в широком спектре жизненно важных процессов:

- ❖ стимулирует эритропоэз;
- ❖ участвует в синтезе аминокислот, нуклеиновых кислот, пуринов, пиримидинов, витаминов;
- ❖ участвует в обмене холина, гистидина;
- ❖ является важным сопутствующим фактором в метилировании ДНК и РНК\*;
- ❖ способствует регенерации мышечной ткани;
- ❖ влияет на развитие быстрорастущих тканей (кожа, оболочки желудочно-кишечного тракта, костный мозг);
- ❖ выполняет защитную функцию при беременности по отношению к действию на плод тератогенных и повреждающих факторов;
- ❖ способствует нормальному созреванию и функционированию плаценты;
- ❖ оказывает эстрогеноподобное действие, что позволяет снижать прием гормонов при заместительной гормональной терапии.

\* **Метилирование ДНК** — это процесс регуляции экспрессии генов в геноме. Экспрессия во многом зависит от структуры хроматина (ДНК + гистоновые белки): если хроматин конденсирован, то гены находятся в инактивированном состоянии, если хроматин деконденсирован и активен, то это определяет активацию экспрессии генов. В свою очередь динамика состояния хроматина определяется (контролируется) такими обратимыми процессами, как метилирование ДНК и модификация гистонов. Процесс метилирования ДНК поддерживается ферментами из семейства **ДНК-метилтрансфераз**, которые осуществляют перенос метильных (СН<sub>3</sub>–) групп на азотистое основание цитозин в составе ДНК.

В общебиологическом плане феномен метилирования ДНК выполняет защитную функцию, направленную на предохранение организма от чужеродной ДНК и избытка эндогенных повторяющихся последовательностей (например, инактивация путем метилирования вирусной ДНК, попавшей в организм человека или животных).

В нормальных клетках метилирование ДНК в основном имеет место в повторяющихся геномных областях, включая сателлитные ДНК (повторяющиеся участки, не выполняющие регуляторные или кодирующие функции) и паразитирующие элементы. В зрелом организме наблюдается определенный баланс процессов метилирования и деметилирования ДНК.

*Гипометилирование* является характерной чертой процесса старения организма (тотальное гипометилирование генома) и фактором образования опухолевых клеток, поскольку связано с развитием хромосомной нестабильности.

*Гиперметилирование* — чаще локальный процесс, который (если затрагивает промоторный участок гена) приводит к блокированию экспрессии отдельных генов. Критичен в процессе развития опухолей, нейродегенеративных заболеваний, атеросклероза, поскольку часто «выключает» гены — регуляторы белков (например, супрессоров опухолевого роста).

Данные функции реализуются в процессе метаболизма фолатов, который составляет основу фолатного цикла (рис. 1).

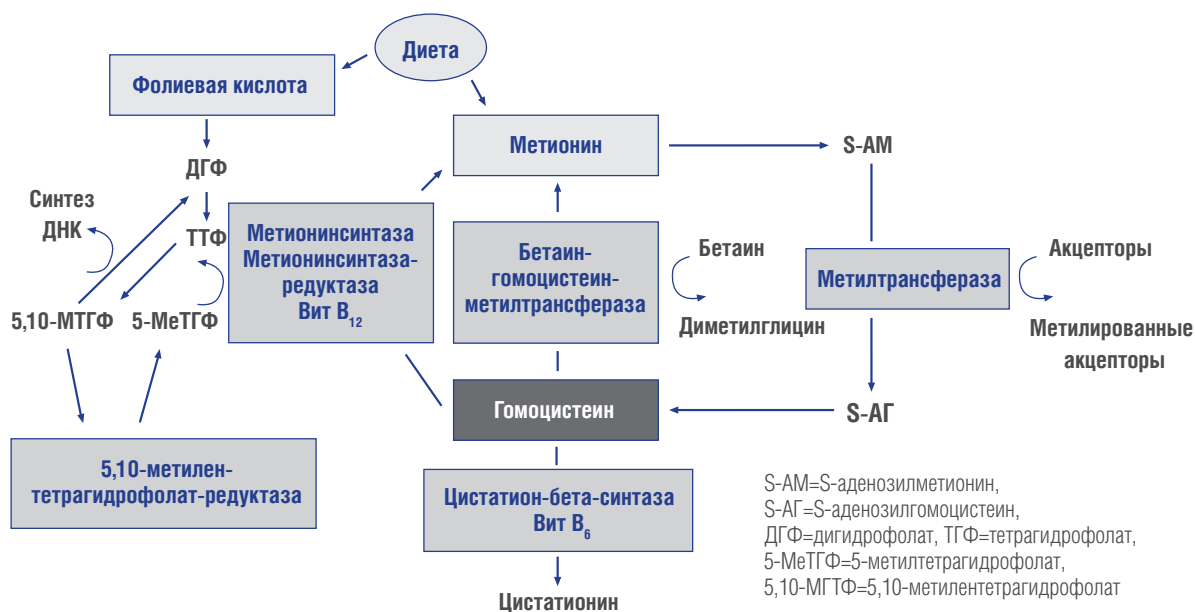


Рис. 1. Фолатный цикл, метаболизм гомоцистеина [7]

**Фолатный цикл** — каскадный процесс превращения фолиевой кислоты в доступное для усваивания организмом производное — 5-метилтетрагидрофолат. Процесс контролируется ферментом **метилентетрагидрофолатредуктазой (MTHFR)**. Обмен фолатов является источником одноуглеродных фрагментов (метильной группы -CH<sub>3</sub>) для жизненно важных клеточных процессов: биосинтеза пуриновых нуклеотидов и превращения уридинмонофосфата в тимидилат; метилирования ДНК и РНК.

С фолатным циклом сопряжен **цикл образования метионина из гомоцистеина**, который происходит при участии витамина В12 и двух ферментов: **метионин-синтазы (MTR)** и **метионин-синтаза-редуктазы (MTRR)**. Метильная группа при восстановлении 5-метилтетрагидрофолата до тетрагидрофолата переносится на витамин В12, который затем отдает ее гомоцистеину, образуя метионин с помощью фермента метионин-синтазы (MTR). Однако в некоторых случаях В12 может окисляться, что приводит к подавлению метионин-синтазы. Для поддержания активности фермента необходимо восстановительное метилирование с помощью фермента метионин-синтаза-редуктазы (MTRR).

Метионин в свою очередь поступает в **цикл метилирования**: под действием метионинаденозилтрансферазы из него образуется S-аденозилметионин (SAM), который используется метилтрансферазами в качестве универсального метильного донора.

Нарушения метаболизма фолатов влияют на стабильность ДНК двумя основными способами. Первый относится к синтезу нуклеотидов *de novo*. Низкий уровень 5,10-метилентетрагидрофолата приводит к подавлению синтеза тимидилата, в результате чего формируется несбалансированный нуклеотидный пул. Это нарушает процессы репарации, приводя к повреждению ДНК. Второй способ относится к продукции SAM. Недостаточный уровень SAM в клетке приводит к недостаточному метилированию ДНК, что вызывает нарушение регуляции генной экспрессии.

Поскольку метаболизм фолатов является важным звеном базовых биологических процессов, то его нарушения, в том числе генетически обусловленные, рассматриваются как фактор высокого риска развития патологических состояний: сердечно-сосудистых заболеваний, онкологических заболеваний, нарушений репродуктивных функций и патологий развития плода.

С точки зрения вклада в развитие ССЗ рассматриваются два процесса, связанные с фолатным циклом: накопление гомоцистеина и нарушение процессов метилирования ДНК.

Основным повреждающим эффектом повышения уровня гомоцистеина является активация атеротромбоза за счет следующих механизмов: повышение уровня фактора свертывания крови III (тканевого тромбопластина); снижение активности протеина С; уменьшение уровня гепаринсульфата; уменьшение уровня тромбомодулина; активация факторов свертывания V и XII; активация адгезии и агрегации тромбоцитов; ингибирование связывания тканевого активатора плазминогена с эндотелиоцитами; развитие дисфункции эндотелия (снижения синтеза NO); апоптоз эндотелиоцитов; провоспалительный, прооксидантный эффекты; модификация липопротеинов низкой плотности. Гомоцистеин в высоких концентрациях конкурирует с SAM за сайты связывания на ДНК-метилтрансферазах и может стать причиной пассивной потери метилирования в реплицирующейся ДНК [29, 32, 34, 37, 52].

Установлено, что у больных с уровнем гомоцистеина >15,3 мкмоль/л риск смерти от всех сердечно-сосудистых причин был выше в 1,7 раза, от инфаркта миокарда — в 3,4 раза, от инсульта — в 4,3 раза, чем у больных с уровнем гомоцистеина не более 10,5 мкмоль/л [25, 47].

Кроме того, гомоцистеин, являясь агонистом глутаматных рецепторов, является частичным агонистом рецепторов глицина. При таких состояниях как инсульт и травма мозга, когда концентрация глицина возрастает, даже незначительные концентрации гомоцистеина начинают оказывать выраженное нейротоксическое воздействие. Токсичным для нервной ткани является и действие свободных радикалов, формирующихся при повышении концентрации гомоцистеина [21, 46, 48, 53].

Особенностью метаболизма гомоцистеина в эндотелиальных клетках является его элиминация только за счет реметилирования, что напрямую зависит от достаточности фолатов в организме и полноценного функционирования фермента MTHFR.

### **Генетика метаболизма фолатов и болезни системы кровообращения**

Роль генетически обусловленных нарушений метаболизма фолатов была доказана для пациентов с ИМ и ишемическим инсультом: в группе пациентов моложе 55 лет наличие полиморфизма MTHFR C667T было ассоциировано с тромботическими событиями (ИМ + ишемический инсульт) (OR 1,41). В метаанализе, включавшем 14 870 пациентов, была показана дозозависимая связь между генотипом MTHFR C667T и риском развития инсульта / транзиторной ишемической атаки (гетерозиготы (генотип MTHFR 667 CT): OR 1,17; гомозиготы (генотип MTHFR 667 TT): OR 1,37). В группе томографически подтвержденного ишемического инсульта была выявлена более сильная ассоциация (гетерозиготы: OR 1,18; гомозиготы: OR 1,48) [33, 35].

На сегодняшний день генетически обусловленное снижение активности ферментов фолатного цикла и цикла метаболизма гомоцистеина в отсутствие коррекции уровня фолатов в организме связывают с риском развития ССЗ именно с точки зрения гипометилирования ДНК.

Изменение уровня метилирования затрагивает гены, связанные с широким спектром патологий, которые составляют сердечно-сосудистый континуум. Гипо- или гиперметилирование этих генов обнаружено в пораженных участках сосудистой стенки и атеросклеротических бляшках по сравнению с неизмененными участками сосудов [9, 10, 13, 16, 60].

Тем не менее следует отметить, что само по себе носительство условно «неблагоприятных» аллельных вариантов генов ферментов фолатного цикла повышает риск ССЗ в случае отсутствия коррекции уровня фолатов в организме. Так, в крупном метаанализе М. Клерк (M. Klerk) (2002) было показано, что носительство полиморфных аллелей MTHFR C667T не влияло на прогноз больных с нормальным уровнем фолиевой кислоты, в то время как при низком фолатном статусе риск основных коронарных событий был повышен на 32% у гетерозиготных носителей и на 44% у гомозиготных носителей аллели 667TT. Аналогичные данные были получены для пациентов в возрасте старше 35 лет со стабильным течением ИБС, среди которых тенденция к повышению ССО была отмечена даже у носителей потенциально благоприятного «дикого» генотипа, имевших сопутствующий дефицит фолиевой кислоты [7].

Регулярный прием фолиевой кислоты (в дозе около 200 мкг/сут) значительно снижает содержание в крови гомоцистеина и сокращает ежегодную смертность от сердечно-сосудистых заболеваний. Вероятность коронарной катастрофы при минимальной концентрации в крови фолатов (менее 6,8 нмоль/л) была выше на 69% по сравнению с группой больных ИБС, в крови которых содержание фолатов превышало 13,6 нмоль/л (OR 1,69) [28].

Наиболее часто генетически обусловленные нарушения фолатного цикла ассоциируются с развитием венозных и артериальных тромбозов, при этом многочисленные исследования свидетельствуют о том, что *изолированные* полиморфизмы гена MTHFR не являются самостоятельной причиной указанных патологических состояний. Эффект наблюдается в случае *сочетанного* генотипа: наличие генетически обусловленных нарушений со стороны системы гемостаза (в первую очередь лейденская мутация и мутация гена протромбина) и полиморфизмов генов фолатного цикла. Последние существенно усиливают негативные фенотипические проявления со стороны факторов системы гемостаза. При этом гипергомоцистеинемию рассматривают как самостоятельный фактор риска ВТЭО (OR 2,5) вне зависимости от генотипа пациента «Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбоэмболических осложнений» (2015) [6, 17, 30].

### **Генетика метаболизма фолатов и репродуктивные проблемы**

Особую актуальность генетические дефекты фолатного цикла имеют с точки зрения развития репродуктивных проблем и пороков развития плода. Ассоциация генетических полиморфизмов ферментов фолатного цикла доказана при осложнениях беременности: фетоплацентарной недостаточности, преэклампсии, преждевременной отслойке нормально расположенной плаценты (ПОНРП), замершей беременности, внутриутробной гибели плода.

Установлено, что при гомозиготном варианте полиморфизма гена MTHFR C677T количество репродуктивных потерь в два раза больше по сравнению с носительницами гетерозиготного варианта, причем у большинства женщин отмечаются потери в I триместре. У пациенток с беременностью, осложненной плацентарной недостаточностью, задержкой внутриутробного развития (ЗВУР), антенатальной гибелью плода, гипергомоцистеинемией, ассоциированная с гомозиготным вариантом 677 TT, определялась в 22% случаев. Более того, риск повторных репродуктивных потерь соответствовал OR = 14. Кроме того, при гомозиготной мутации гена MTHFR C677T почти в три раза чаще имело место сочетание с АФС [1–4].

В ряде исследований установлено, что полиморфизм C677T гена MTHFR ассоциирован с развитием гестоза (для генотипа TT OR = 6,84 — для гестоза легкой степени тяжести и OR = 6,56 — для пациенток со средне-тяжелым и тяжелым гестозом). Примечательно, что второй вариант полиморфизма гена MTHFR – A1298C показал ассоциацию с развитием тяжелого и среднетяжелого гестоза (для генотипа CC OR = 2,92) [1, 11, 12, 17].

Была установлена связь нарушений в метаболизме фолатного цикла с высокой частотой аномальных гинекологических и акушерских кровотечений: у 50% пациенток с полиморфизмом гена MTHFR C677T имелись обильные и/или длительные менструации, у каждой пятой — кровотечение в родах или после аборта, у 86% — кровотечение во время настоящей беременности. При этом у большинства обследованных женщин были изменены гематологические показатели в виде тромбоцитопении, анемии и/или гипергомоцистеинемии. Характерной чертой было повреждение тромбоцитарного звена гемопоэза — тромбоцитопатия, которая обнаруживалась снижением количества и увеличением объема тромбоцитов, а также признаками их функциональной недостаточности. У каждой третьей женщины с полиморфизмом генов ферментов фолатного цикла и у 73,7% беременных с нарушением метаболизма фолиевой кислоты выявлялась анемия [15].

Примечательно, что дефекты генов ферментов фолатного цикла играют роль не только в репродуктивных проблемах у женщин, но и ассоциированы с бесплодием у мужчин, необструктивной азооспермией и олигозооспермией. У мужчин с высоким содержанием анеуплоидных сперматозоидов в эякуляте частота генотипов с полиморфными аллелями генов фолатного цикла в четыре раза выше, чем у мужчин с нарушениями фрагментации ДНК, что свидетельствует о нарушениях нормального расхождения хромосом в оогенезе при наличии генотипов, обуславливающих изменения фолатного обмена. Основную причину нарушения сперматогенеза связывают именно с гипометилированием ряда генов, участвующих в пролиферации и созревании половых клеток. Причем патологические изменения связаны не только с преимущественно гомозиготным носительством полиморфизма MTHFR C677T (аллельный вариант TT), но и генетически обусловленными нарушениями генов ферментов MTR (A2756G) и MTRR (A66G), опосредующих превращение гомоцистеина в метионин [5, 18, 19, 36, 39, 40, 44, 55].

Более того, при исследовании бесплодных супружеских пар было выявлено статистически значимое гомозиготное носительство полиморфных аллелей A2756G гена MTR (аллельный вариант GG) и MTHFR C677T (аллельный вариант TT) одновременно. Приблизительно треть супружеских пар (34%) имели распределение

аллелей, при котором пациент имел гомозиготное носительство полиморфной аллели GG гена MTRR, был гетерозиготой по гену MTHFR C677T (аллельный вариант CT) и являлся гомозиготой с нормальными аллелями A2756 G по гену MTR. В контрольной группе этот показатель составляет всего 7% [14].

Ассоциация фолатного цикла с процессом метилирования ДНК и уровнем гомоцистеина определяет особое внимание к роли генетически обусловленных дефектов ферментов фолатного цикла в пороках развития плода, в первую очередь в нарушении формирования нервной трубки.

Ежегодно частота выявления дефектов нервной трубки (ДНТ) в России составляет 0,45%; смертность вследствие ДНТ — 300 новорожденных (2% от общей детской смертности). Большинство случаев развития ДНТ — результат нарушений закрытия концов нервной трубки или повторного открытия.

Молекулярные механизмы развития ДНТ вследствие дефицита фолатов могут включать недостаточное метилирование (гипометилирование) ДНТ и важнейших метаболитов развивающегося эмбриона и/или нарушения в процессах пролиферации, модификации и апоптоза нервных клеток. Дефицит фолатов в пролиферирующих клетках ведет к разъединению нуклеотидов ДНК, способствует повышению частоты хромосомных aberrаций, нарушению конформации ДНК и расхождению хромосом — отсюда и более высокий риск рождения детей с синдромом Дауна. Кроме того, при наличии мутации MTHFR C677T у плода повышается частота развития не только ДНП, но и аномалий мозга, конечностей, ушей, мочевыделительной системы, а также формирования расщелины верхнего неба и омфалоцеле [8, 15, 26, 50, 58].

При этом вариант полиморфизма гена MTHFR A1298C, который изолированно не отвечает за образование термолабильного фермента (что характерно для полиморфизма MTHFR C677T) и повышение уровня гомоцистеина в крови, в сочетании с полиморфизмом C677T существенно отягощает негативный эффект последнего.

Фолат-дефицитные состояния ассоциированы с ростом уровня гомоцистеина, который, во-первых, сам оказывает на нервную систему как прямое, так и опосредованное действие, а во-вторых, участвует в цикле синтеза метионина и S-аденозилметионина. Снижение их концентраций приводит к развитию неврологических нарушений: расширение желудочков мозга, микрогирия, периваскулярные изменения, демиелинизация и макрофагальная инфильтрация, глиоз и астроцитоз, эпилептические энцефалопатии [23, 42].

Ряд исследований показал, что в крови женщин, использующих оральные контрацептивы, повышена концентрация витамина А и снижены концентрации витамина В12 и фолиевой кислоты. Оральные контрацептивы (ОК), содержащие менее 50 мкг эстрогенов, нарушают кинетику фолатов. Таким образом, риск развития ДНТ и других осложнений беременности, связанных с дефицитом фолатов, витаминов группы В и гипергомоцистеинемией, выше у пациенток, которые забеременели сразу после прекращения длительного приема ОК, особенно при наличии генетических полиморфизмов генов ферментов фолатного цикла и в отсутствие дополнительного приема фолиевой кислоты и витаминов группы В. При этом важно учитывать тот факт, что замыкание нервной трубки происходит на 21–28 день после зачатия, когда женщина еще не знает о беременности и последующий прием указанных выше витаминов уже не может скорректировать ДНТ [27, 51, 59].

Учитывая значимость фолатов с точки зрения репродукции и полноценного внутриутробного развития, в клинических рекомендациях «Выкидыши в ранние сроки беременности: диагностика и тактика ведения» (2016) указано: «Для профилактики дефектов нервной трубки и других пороков развития, которые приводят к ранним самопроизвольным выкидышам, рекомендован прием фолиевой кислоты за два-три менструальных цикла до зачатия и в первые 12 недель беременности в суточной дозе 400 мкг (0,4 мг). Если в анамнезе у женщины в течение предыдущей беременности отмечены дефекты нервной трубки плода, профилактическая доза фолиевой кислоты должна быть увеличена до терапевтической 3–5 мг/сут». В соответствии с Приказом Министерства здравоохранения РФ от 12 ноября 2012 г. № 572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю „акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)“» также рекомендован ежедневный прием 400 мкг фолиевой кислоты на протяжении первого триместра беременности.

Однако, если имеет место скрытый дефицит витамина В12, как правило, вследствие проблем с абсорбцией в кишечнике (мальабсорбция, гельминтозы и прочее), риск развития ДНТ у плода многократно повышается. Для дефицита витамина В12 также характерна мегалобластная анемия, которая подвергается обратному развитию при назначении витамина В12 в суточной дозе 1 мкг. При этом назначение фолатов в такой ситуации может маскировать дефицит В12, поскольку исчезают признаки мегалобластной анемии. Поэтому, пока

не исключена В12-дефицитная анемия, назначение фолиевой кислоты в дозах, превышающих 0,1 мг/сут, не рекомендуется (исключение — беременность и период лактации) [38, 41, 56].

В то же время изолированный дефицит витамина В12 может стать причиной не только развития ДНТ, но и выраженных неврологических нарушений вследствие демиелинизации в центральной и периферической нервной системе. Исследования данной проблемы выявили, что снижение концентрации витамина В12 в материнской сыворотке крови менее 185 пмоль/л связана с 3,5-кратным увеличением риска рождения ребенка с ДНТ [41, 56].

Важно учитывать, что на уровень фолатов в организме оказывают влияние не только эстрогенсодержащие оральные контрацептивы, но и целый ряд других препаратов:

- ❖ анальгетики (длительная терапия);
- ❖ нормотимики (тимоизолептики) — «малые» антиконвульсанты (производные карбамазепина и вальпроевой кислоты);
- ❖ противомаларийные и противотоксоплазмозные препараты (фармакологическая группа вещества пириметамин);
- ❖ сульфаниламиды;
- ❖ антациды (в т. ч. препараты  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ) — во время лечения антациды следует применять спустя 2 ч после приема фолиевой кислоты;
- ❖ противоопухолевые средства — антиметаболиты фолиевой кислоты (метотрексат);
- ❖ диуретики («Триамтерен»);
- ❖ фармакологические группы вещества триметоприм;
- ❖ секвестранты желчных кислот (колестирамин); колестирамин во время лечения следует применять за 4–6 ч до или спустя 1 ч после приема фолиевой кислоты.

Для профилактики гиповитаминоза фолиевой кислоты наиболее предпочтительно сбалансированное питание. Продукты, богатые фолиевой кислотой: зеленые овощи (салат, шпинат), помидоры, морковь, свежая печень, бобовые, свекла, яйца, сыр, орехи, злаки.

Тем не менее при генетически обусловленных дефектах фолатного цикла данной диеты может быть недостаточно для коррекции фолат-дефицитных состояний, что повлечет необходимость назначения препаратов фолиевой кислоты или ее производных. Причем если речь идет о беременных женщинах, то у пациенток с генетическими формами гипергомоцистеинемии прием препарата следует продолжать в течение всего периода гестации [2].

**ВНИМАНИЕ!** При наследственных дефектах генов ферментов фолатного цикла избыток синтетической фолиевой кислоты может еще больше нарушить равновесие и привести к таким же последствиям для плода, как и дефицит этого витамина.

Синтетическая фолиевая кислота биологически не активна и только с помощью фермента МТНFR преобразуется в активный моноглутамат 5-МТГФ. В отличие от пищевых фолатов синтетическая фолиевая кислота даже в неметаболизированном виде может поступать в системный кровоток. Появление неметаболизированной формы в крови происходит уже при суточном потреблении фолиевой кислоты более 200 мкг, что обусловлено ограниченными возможностями ферментативной системы слизистой оболочки кишечника. Поступая в клетки, она блокирует рецепторы и ферменты, с которыми взаимодействуют эндогенные активные фолаты, и, несмотря на достаточный и даже избыточный прием фолиевой кислоты, возникает или еще больше усугубляется функциональный дефицит фолатов [15, 31, 43, 54].

Избыток синтетических фолатов при беременности также ассоциирован с неблагоприятными последствиями для плода. С ним связывают нарушение когнитивных способностей и зрения у новорожденного, ожирение в старшем возрасте. Избыток витаминов группы В, к которым относится фолиевая кислота, может вызывать тяжелые аллергические реакции в организме беременной вплоть до генерализованной токсикодермии [20, 43, 56].

Что касается приема фолиевой кислоты в высоких дозах и длительное время мужчинами и небеременными женщинами, то постоянная передозировка может приводить к снижению активности естественных киллеров (НК-клетки), которые участвуют в противоопухолевом иммунитете, что увеличивает риск возникновения онкопатологии.

Таким образом, для организма опасен не только недостаток фолатов, но и избыток синтетической фолиевой кислоты. Эпидемиологические и клинические исследования позволили установить двунаправленную связь между приемом фолиевой кислоты, уровнем фолатов в крови и онкологическими заболеваниями. Онкологический риск повышается как при дефиците фолатов, так и при передозировке синтетической фолиевой кислоты [22, 24, 45, 49, 57].

#### **Показания к генетическому анализу:**

- ❖ повышенный уровень гомоцистеина в крови (гипергомоцистеинемия);
- ❖ невынашивание беременности, гибель плода;
- ❖ рождение ребенка с изолированными пороками нервной трубки, сердца или урогенитального тракта;
- ❖ плановая подготовка к беременности;
- ❖ наличие ИБС, артериальной гипертензии, атеросклероза или атеротромбоза;
- ❖ тромбоэмболия;
- ❖ антифосфолипидный синдром;
- ❖ семейная предрасположенность к онкологическим заболеваниям;
- ❖ назначение оральных контрацептивов и гормональной заместительной терапии;
- ❖ назначение химиотерапии.

#### **В целом, генетическое тестирование для оценки рисков, связанных с нарушениями метаболизма фолатов, рекомендовано следующими нормативно-методическими документами:**

- Приказ Министерства здравоохранения РФ от 21 февраля 2000 г. № 64 «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований»;
- Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 ноября 2012 г. № 572н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю “акушерство и гинекология (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)”»;
- Приказ Министерства здравоохранения РФ от 20 декабря 2012 г. № 1273н «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при привычном невынашивании беременности»;
- Приказ Министерства здравоохранения РФ от 7 ноября 2012 г. № 588н «Об утверждении стандарта специализированной медицинской помощи при гипоксии плода, недостаточном росте плода, других плацентарных нарушениях»;
- Приказ Министерства здравоохранения РФ от 13 октября 2017 г. № 804н «Об утверждении номенклатуры медицинских услуг» (Списком А раздел 27 — генетические исследования).

#### **Технология анализа генетических полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms — SNPs)**

В случае возникновения замены в нуклеотидной последовательности ДНК возможно обнаружение трех вариантов генотипа: *гомозиготы с исходной последовательностью нуклеотидов, гетерозиготы и гомозиготы с заменой в последовательности нуклеотидов.*

Технология **ПЦР с анализом кривых плавления** дает возможность идентифицировать фрагменты ДНК путем детекции изменений в уровне флуоресценции комплекса *фрагмент–проба* (меченный флуорофором олигонуклеотидный зонд) на этапе его денатурации и последующего построения графика кривой плавления.

#### **Технология включает следующие этапы:**

- ❖ амплификация искомой последовательности ДНК;
- ❖ гибридизация ампликонов с олигонуклеотидами (*пробами*), мечеными флуорофорами;
- ❖ образование *комплементарных* и *частично комплементарных* дуплексов;
- ❖ плавление (денатурация) дуплексов;
- ❖ детекция флуоресценции с последующим построением и анализом кривых плавления.

Для определения нуклеотидной последовательности, образовавшейся в процессе амплификации, используют *метод примыкающих проб (kissing probes или резонансный перенос энергии).*



В его основе лежит использование двух типов олигонуклеотидов (*проб*), гибридизующихся на матрицу при низкой температуре в непосредственной близости друг от друга. Один из олигонуклеотидов метят флуоресцентным донором, другой — акцептором (гасителем). Идентификация нуклеотидной последовательности образца осуществляется в процессе *плавления дуплексов* (результат гибридизации фрагментов ДНК и олигонуклеотидных зондов), которое происходит при последовательном увеличении температуры реакционной смеси.

Преимуществом данного подхода является *использование специфических флуорофоров*, снижающих риск детектирования неспецифических продуктов амплификации, как при использовании интеркалирующих красителей.

**Компания «ДНК-Технология» предлагает уникальную технологию выявления и идентификации SNP методом ПЦР с анализом кривых плавления.**

**Преимуществами данной технологии являются:**

- ❖ **Использование Taq-полимеразы, блокированной специфическими антителами**, на этапе амплификации искомого участка ДНК с праймерами, общими для обоих вариантов последовательности:
  - реализация «горячего старта» без применения парафина;
  - предотвращение неспецифического отжига праймеров;
  - повышение чувствительности комплектов реагентов.
- ❖ Для повышения надежности типирования компания «ДНК-Технология» использует **модификацию метода примыкающих проб**:
  - сиквенс-специфичные типизирующие олигонуклеотиды;
  - одновременная гибридизация с двумя альтернативными типизирующими зондами, мечеными различными флуорофорами, что позволяет определять оба варианта искомой последовательности в одной пробирке в отличие от систем с интеркалирующими красителями, где для определения одного SNP необходимо использовать две пробирки для разделения аллельных вариантов.
- ❖ **Автоматическое генотипирование и интерпретация результатов в режиме реального времени** с использованием специализированного программного обеспечения.
- ❖ **Возможность визуальной интерпретации результатов** за счет определения разницы температур плавления не менее 4–5 °С для аллельных вариантов одного гена.

**Компания «ДНК-Технология» разработала набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями фолатного цикла, методом ПЦР в режиме реального времени («Генетика Метаболизма Фолатов»).**

**Технические характеристики и состав набора реагентов**

Количество тестов в наборе	48 тестов
Формат реагентов	Нераскапанный
Taq-АТ-полимераза	1 пробирка (96 мкл)
ПЦР-буфер	2 пробирки (по 960 мкл)
Масло минеральное	1 флакон (3,84 мл)
Определяемые полиморфизмы	MTHFR: 677 C>T (Ala222Val) — 1 пробирка (960 мкл) MTHFR: 1298 A>C (Glu429Ala) — 1 пробирка (960 мкл) MTR: 2756 A>G (Asp919Gly) — 1 пробирка (960 мкл) MTRR: 66 A>G (Ile22Met) — 1 пробирка (960 мкл)
Материал для анализа	Цельная кровь
Срок годности	6 месяцев
Температура хранения	+2 ... +8 °С -20 °С (для Taq-АТ-полимеразы)

### Технология:

- ПЦР-плавление;
- использование других технологических платформ не допускается.

### Реагенты для выделения ДНК:

- «ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА»;
- «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА».

### Минимальное количество ДНК для анализа:

1,0 нг на амплификационную пробирку, что соответствует  $C_p \leq 32,0$  на канале детекции ВК (Су5).

### Для проведения анализа необходимы следующие расходные материалы и оборудование:

- микропробирки (или микропробирки в стрипах) объемом 0,2 мл для ПЦР-анализа, адаптированные для работы с термоциклером в режиме реального времени;
- штатив и насадка на микроцентрифугу (вортекс) для стрипованного пластика.

### Преимущества использования набора реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями фолатного цикла, методом ПЦР в режиме реального времени:

- технологичность (стандартные методики ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени);
- высокая скорость (для определения генотипа пациента требуется не более суток);
- автоматическая выдача результатов (для приборов серии «ДТ»);
- низкая стоимость анализа;
- высокая чувствительность (технология позволяет достоверно отличать аллельные состояния гена друг от друга);
- одновременная детекция — в одной пробирке определяются два аллельных варианта гена;
- внутренний контроль (ВК) — позволяет оценить количество ДНК в амплификационной пробирке и исключить ошибки генотипирования.

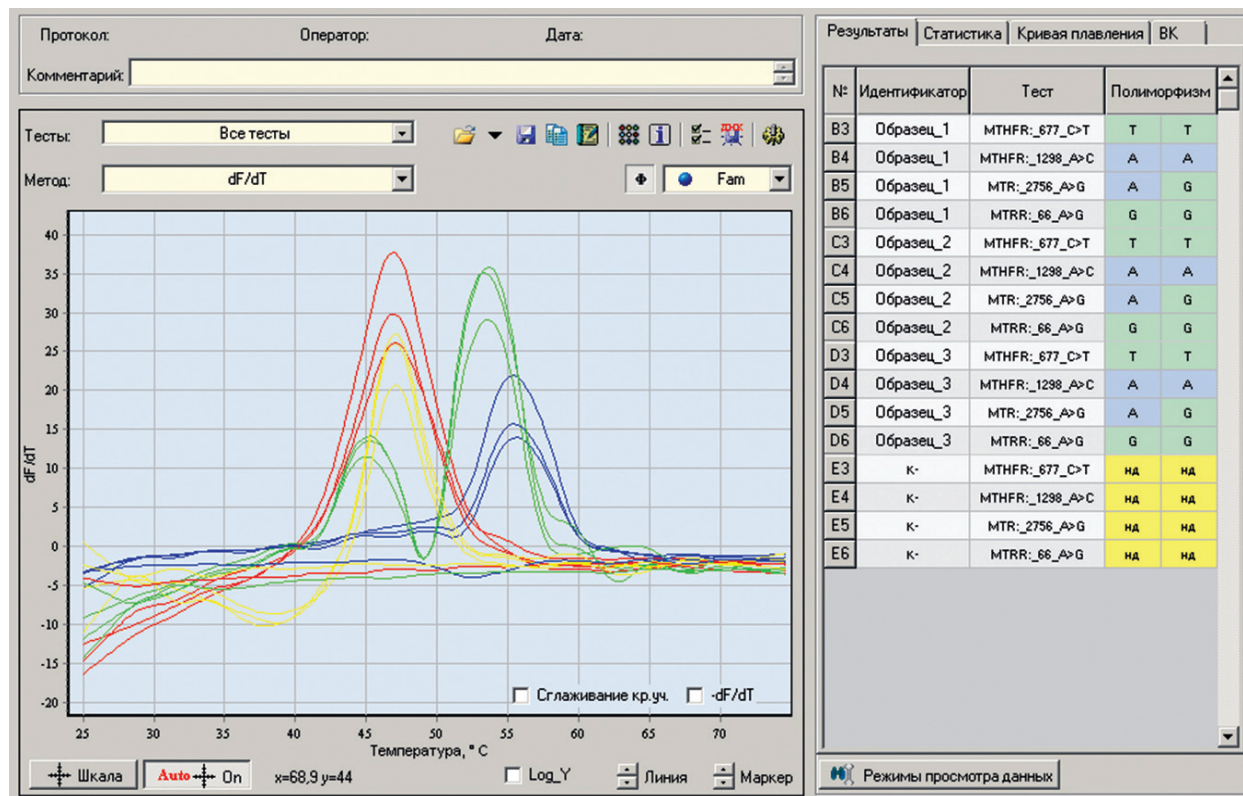
### Оборудование, необходимое для проведения анализа

Набор реагентов предназначен для использования в лабораториях, оснащенных **детектирующими амплификаторами для ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (приборы серии «ДТ» производства ООО «НПО ДНК-Технология»): «ДТлайт», «ДТпрайм» и «ДТ-96» (рис. 2).**



Рис. 2. Приборы производства компании «ДНК-Технология»

Приборы **серии «ДТ»** оснащены специально разработанным русскоязычным программным обеспечением, поддерживающим **автоматическую** обработку данных и выдачу результатов исследования в удобной для интерпретации форме. Уникальные технические характеристики приборов позволяют сократить время амплификации до 1 часа 20 минут, а общее время проведения анализа — до 2 часов 30 минут. Это значительно экономит время исследования и обеспечивает высокую пропускную способность лаборатории.



Кроме того, программа позволяет выдавать результаты в **удобной и наглядной форме** для анализа полученных данных врачами-клиницистами.

№	Наименование исследования	Результаты	
		Генотип	
1	MTHFR:_677_C>T	C	C
2	MTHFR:_1298_A>C	A	C
3	MTR:_2756_A>G	A	A
4	MTRR:_66_A>G	A	A
5	MTHFR:_677_C>T	C	T
6	MTHFR:_1298_A>C	A	C
7	MTR:_2756_A>G	A	A
8	MTRR:_66_A>G	A	A

## **Практические рекомендации при выявлении генетических полиморфизмов, ассоциированных с нарушениями фолатного цикла:**

- ❖ Богатая фолатами диета. Высокий уровень фолиевой кислоты (витамин В9) стабилизирует измененный фермент или способствует активации альтернативных путей реметилирования. Продукты, содержащие фолиевую кислоту: темно-зеленые листовые овощи (шпинат, салат-латук, спаржа), свекла, морковь, брюссельская капуста, брокколи, томатный сок, дрожжи, печень, яичный желток, сыр, дыня, абрикосы, тыква, авокадо, бобы, цельная пшеничная и темная ржаная мука.
- ❖ При обнаружении в генетическом паспорте ребенка полиморфизмов, связанных с дефектами фолатного цикла, имеет большое значение пожизненный запрет на вегетарианскую диету и поддержка ослабленного витаминного обмена.
- ❖ Не рекомендуется злоупотребление кофе (более 5 чашек в день).
- ❖ С осторожностью применять препараты, влияющие на метаболизм фолатов. Уровень фолиевой кислоты в сыворотке крови снижает ряд препаратов: «Аспирин», «Бисептол», противосудорожные средства, эстрогены, контрацептивы и др.
- ❖ При применении КОК целесообразен профилактический прием фолиевой кислоты, витаминов В6 и В12.
- ❖ Периконцепционный (в течение трех месяцев до и первых трех месяцев после наступления беременности) прием 400 мкг фолиевой кислоты ежедневно. Для пациенток, несущих аллель 677Т, может быть рекомендовано до 4 мг/сутки фолиевой кислоты в период подготовки и на протяжении всей беременности. Во время приема фолиевой кислоты может проявляться относительный дефицит витамина В12, поэтому назначение фолиевой кислоты необходимо сочетать с приемом витаминов В12 и В6.
- ❖ Важно обратить внимание врачей на тот факт, что у пациенток с незаподозренной гипергомоцистеинемией стандартная терапия, применяемая в стационарах и направленная на устранение проявлений гестоза, может не только оказаться малоэффективной, но даже ухудшить состояние больной. Это касается таких препаратов как «Метионин», «Эуфиллин», достаточно часто применяемых для лечения гестоза. Прием «Метионина» и «Эуфиллина» достоверно приводит к повышению уровня гомоцистеина крови, что может включить или дополнить каскад патологических реакций, приводящих к развитию генерализованной микроангиопатии и тромбофилических состояний.
- ❖ В I триместре беременности не рекомендованы ингибиторы дигидрофолатредуктазы, блокирующие фолиевую кислоту от преобразования в ее активную форму (например, «Триметоприм», «Сульфасалазин»), и другие антагонисты фолиевой кислоты (например, «Карбамазепин», «Фенитоин», вальпроевая кислота и «Холестирамин»).

### **Дополнительные исследования:**

- определение уровня гомоцистеина;
- определение уровня фолиевой кислоты;
- определение уровня В12 и метилмалоновой кислоты;
- определение активности протеина С.

## Полиморфизмы генов, ассоциированные с нарушениями фолатного цикла

Ген	SNP	Генотипы	Биологические проявления	Возможные клинические риски
<b>MTHFR</b> – метилентетрагидрофолат-редуктаза	<b>677 C&gt;T (Ala222Val)</b>	C/C	<b>Без особенностей</b>	
		C/T	Снижение функциональной активности фермента до 65% от среднего значения. Повышение уровня гомоцистеина плазмы	<ul style="list-style-type: none"> <li>• дополнительный фактор риска тромбозов;</li> <li>• поздний токсикоз беременных;</li> <li>• риск раннего самопроизвольного прерывания беременности;</li> <li>• пороки развития плода;</li> <li>• риск онкологических заболеваний;</li> <li>• гомозиготы TT: привычное невынашивание беременности.</li> </ul>
		T/T	Снижение функциональной активности фермента до 35% от среднего значения. Повышение уровня гомоцистеина плазмы, у гомозигот это повышение выражено в гораздо большей степени, чем у гетерозигот	
	<b>1298 A&gt;C (Gln429Ala)</b>	A/A	<b>Без особенностей</b>	
		A/C	Комбинация гетерозиготности аллелей 677T и 1298C сопровождается не только снижением активности фермента, но и повышением концентрации гомоцистеина в плазме и снижением уровня фолатов	<ul style="list-style-type: none"> <li>• повышенная потребность в фолатах;</li> <li>• пороки развития плода;</li> <li>• при приеме антагонистов фолиевой кислоты в I триместре – повышенный риск пороков развития плода (нервной трубки и сердечно-сосудистой системы);</li> <li>• риск онкологических заболеваний.</li> </ul>
		C/C	Снижение активности MTHFR примерно до 60% от нормы. При беременности может вызывать снижение фолатов в плазме	
<b>MTR</b> – B12 зависимая метионин-синтаза	<b>2756 A&gt;G (Asp919Gly)</b>	A/A	<b>Без особенностей</b>	
		A/G	Гомоцистеинемия, снижение гомоцистеина в плазме в ответ на повышение фолатов в пище	<ul style="list-style-type: none"> <li>• привычное невынашивание беременности;</li> <li>• гипергомоцистеинемия;</li> <li>• риск сердечно-сосудистых заболеваний;</li> <li>• фетоплацентарная недостаточность при дефиците витамина B12;</li> <li>• незаращение костномозгового канала;</li> <li>• синдром Дауна.</li> </ul>
		G/G		
<b>MTRR</b> – метионин-синтаза-редуктаза	<b>66 A&gt;G (Ile22Met)</b>	A/A	<b>Без особенностей</b>	
		A/G	Снижение функциональной активности фермента, гомоцистеинемия, особенно в сочетании с 2756 A>G	<ul style="list-style-type: none"> <li>• увеличение риска развития РМЖ у носителей мутаций гена BRCA;</li> <li>• гипергомоцистеинемия;</li> <li>• риск сердечно-сосудистых заболеваний;</li> <li>• дефекты нервной трубки плода;</li> <li>• ассоциация с низким уровнем содержания B12 в плазме.</li> </ul>
		G/G		

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Атабаева Х. Л. Основные принципы подготовки к беременности и ее ведение у беременных с преэклампсией на фоне выявленной тромбофилии // *Акушерство, гинекология и репродукция*. — 2016. — Т. 10. — № 4. — С. 30–38.
2. Бицадзе В. О. и др. Фолатдефицитные состояния в акушерской практике и проблема их коррекции // *Акушерство, гинекология и репродукция*. — 2016. — Т. 10. — № 1. — С. 38–48.
3. Блинецкая С. Л. Основные наследственные тромбофилии и их роль при привычном невынашивании беременности: автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — М., 2009.
4. Буштырева И. О. и др. Распространенность тромбофилических полиморфизмов у женщин с привычным невынашиванием беременности в анамнезе // *Акушерство, гинекология и репродукция*. — 2015. — Т. 9. — № 2. — С. 13–18.
5. Жилкова Е. С., и др. Анализ полиморфных вариантов генов MTHFR (C677T, A1298C) и MTRR (A66G) у мужчин со сниженной репродуктивной функцией // *Вестник проблем биологии и медицины*. — 2015. — Т. 2. — № 125. — С. 253–258.
6. Киселева А. Н. и др. Роль генетических полиморфизмов, ассоциированных с тромбофилией, протромботическими состояниями и нарушениями фолатного цикла, у женщин с репродуктивными расстройствами // *Тромбоз, гемостаз и реология*. — 2017. — № 2 (70). — С. 52–57.
7. Комаров А.Л., и др. Влияние генетических факторов, ассоциированных с тромбозами, на долгосрочный прогноз больных хронической ишемической болезнью сердца // *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. — 2011. — Т. 7. — № 4. — С. 409–425.
8. Костькина Я. М. Профилактика перинатальной патологии и осложнений беременности у женщин с гипергомоцистеинемией: автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — Новосибирск, 2013.
9. Марков А. В. Профиль метилирования ДНК при атеросклерозе: автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — Томск, 2015.
10. Мирошникова В. В. Роль транспортера ABCG1 и аполипопротеина А-I в формировании предрасположенности к атеросклерозу: автореф. дисс. на соискание ученой степени к.м.н. — СПб., 2014.
11. Момот А. П. Состояние тромботической готовности — возможности современной диагностики и перспективы // *Медицинский алфавит. Современная лаборатория*. — 2013. — № 1. — С. 20–23.
12. Момот А. П. Геморрагические диатезы, тромбозы, тромбофилии // *Сборник научных трудов научно-практической конференции с международным участием «Геморрагические диатезы, тромбозы, тромбофилии»*. — 2014.
13. Назаренко М. С. и др. Статус метилирования генов клеточной пролиферации при атеросклерозе // *Атеросклероз*. — 2013. — № 1. — С. 5–13.
14. Онуфриенко Е. А., Волосовцова Г. И. Полиморфизм генов гемостаза у мужчин и женщин с бесплодием // *Молодой ученый*. — 2010. — № 9. — С. 289–292.
15. Пустотина О. А. Роль фолатов в развитии осложнений беременности. Эффективная фармакотерапия // *Акушерство и гинекология*. — 2014. — № 3 (35). — С. 66–76.
16. Сметнев С. А., Мешков А. Н. Роль пептидных гормонов (адипонектин, лептин, инсулин) в патогенезе атеросклероза // *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. — 2015. — Т. 11. — № 5. — С. 522–528.
17. Трифонова Е. А. и др. Анализ роли наследственной тромбофилии и осложненного течения беременности // *Фундаментальные исследования*. — 2012. — № 10 (часть 2). — С. 337–344.
18. Феськов А. М., и др. Связь морфологических аномалий сперматозоидов с наличием анеуплоидий в их ядрах у мужчин с астено-, олиго- и тератозооспермией // *Цитология и генетика*. — 2013. — Т. 47. — № 2. — С. 66–69.
19. Aarabi M. High-dose folic acid supplementation alters the human sperm methylome and is influenced by the MTHFR C677T polymorphism // *Hum Mol Genet*. — 2015. — Vol. 24. — № 22. — P. 6301–6313.
20. Bodnar L. M., et al. Maternal serum folate species in early pregnancy and risk of preterm birth // *Am J Clin Nutr*. — 2010. — Vol. 92. — № 4. — P. 864–871.
21. Bukharaeva E. Homocysteine aggravates ROS-induced depression of transmitter release from motor nerve terminals: potential mechanism of peripheral impairment in motor neuron diseases associated with hyperhomocysteinemia // *Front Cell Neurosci*. — 2015. — № 9. — P. 391–399.
22. Chen P., et al. Higher dietary folate intake reduces the breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis // *Br J Cancer*. — 2014. — Vol. 110. — № 9. — P. 2327–2338.
23. Choudhury S., Borah A. Activation of NMDA receptor by elevated homocysteine in chronic liver disease contributes to encephalopathy // *Med Hypotheses*. — 2015. — Vol. 85. — № 1. — P. 64–67.
24. Collin S. M., et al. Association of folate-pathway gene polymorphisms with the risk of prostate cancer: a population-based nested case-control study, systematic review, and meta-analysis // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. — 2009. — Vol. 18. — № 9. — P. 2528–2539.
25. Cui R., et al. Serum total homocysteine concentrations and risk of mortality from stroke and coronary heart disease in Japanese: The JACC study // *Atherosclerosis*. — 2008. — Vol. 198. — № 2. — P. 412–418.
26. Czeizel A. E., et al. Folate deficiency and folic acid supplementation: the prevention of neural-tube defects and congenital heart defects // *Nutrients*. — 2013. — Vol. 5. — № 11. — P. 4760–4775.
27. Dante G., et al. Vitamin and mineral needs during the oral contraceptive therapy: a systematic review // *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol*. — 2014. — Vol. 3. — № 1. — P. 1–10.
28. Djuric D., et al. Homocysteine, folic acid and coronary artery disease: possible impact on prognosis and therapy // *Indian J Chest Dis Allied Sci*. — 2008. — Vol. 50. — № 1. — P. 39–48.
29. Durand P., et al. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. // *Lab Invest*. — 2001. — Vol. 81. — № 5. — P. 645–672.
30. Hickey S. E., et al. ACMG Practice Guideline: lack of evidence for MTHFR polymorphism testing // *Genetics in Medicine*. — 2013. — № 15. — P. 153–156.
31. Holm P. I., et al. Modulation of the homocysteine-betaine relationship by methylenetetrahydrofolate reductase 677 C3T genotypes and B-vitamin status in a large-scale epidemiological study // *J Clin Endocr Metab*. — 2007. — № 92. — P. 1535–1541.
32. James S. J., et al. Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology // *J Nutr*. — 2002. — Vol. 132 (8 Suppl). — P. 2361–2366.
33. Joachim E., et al. The methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism (MTHFR c. 677C>T) and elevated plasma homocysteine levels in a U.S. pediatric population with incident thromboembolism. // *Thromb Res*. — 2013. — Vol. 132. — № 2. — P. 170–174.
34. Kangabam N., et al. Serum homocysteine in type 2 diabetes with cardiovascular complications // *J Med Soc*. — 2013. — № 27. — P. 31–35.

35. Kim J., et al. Interplay between 3'-UTR polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and the risk of ischemic stroke // *Sci Rep.* — 2017. — № 7. — P. 12464.
36. Kim S. Y., et al. Association between genetic polymorphisms in folate-related enzyme genes and infertile men with non-obstructive azoospermia // *Syst Biol Reprod Med.* — 2015. — Vol. 61. — № 5. — P. 286–292.
37. Kothekar M. A. Homocysteine in cardiovascular disease: a culprit or an innocent bystander? // *Indian J Med Sci.* — 2007. — Vol. 61. — № 6. — P. 361–371.
38. Krikke G. G., et al. Vitamin B12 and folate status in early pregnancy and cardiometabolic risk factors in the offspring at age 5–6 years: findings from the ABCD multi-ethnic birth cohort // *BJOG.* — 2016. — Vol. 123. — № 3. — P. 384–392.
39. Kurzawski M., et al. Association study of folate-related enzymes (MTHFR, MTR, MTRR) genetic variants with non-obstructive male infertility in a Polish population // *Genet Mol Biol.* — 2015. — Vol. 38. — № 1. — P. 42–47.
40. Liu K., et al. Role of genetic mutations in folate-related enzyme genes on Male Infertility // *Sci Rep.* — 2015. — № 5. — P. 15548.
41. Molloy A. M., et al. Effects of folate and vitamin B12 deficiencies during pregnancy on fetal, infant, and child development // *Food Nutr Bull.* — 2008. — Vol. 29 (2 Suppl). — P. 101–111.
42. Moretti R. Vitamin D, Homocysteine, and Folate in Subcortical Vascular Dementia and Alzheimer Dementia // *Front Aging Neurosci.* — 2017. — № 9. — P. 169.
43. Morris M. S. Circulating unmetabolized folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive test performance in American seniors // *Am J Clin Nutr.* — 2010. — № 91. — P. 1733–1744.
44. Murphy L. E., et al. Folate and vitamin B12 in idiopathic male infertility // *Asian J Androl.* — 2011. — Vol. 13. — № 6. — P. 856–861.
45. Oaks B. M. Folate intake, post-folic acid grain fortification, and pancreatic cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial // *Am J Clin Nutr.* — 2010. — Vol. 91. — № 2. — P. 449–455.
46. Obeid R., Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia // *FEBS Lett.* — 2006. — Vol. 580. — № 13. — P. 2994–3005.
47. Peng H. et al. Elevated homocysteine levels and risk of cardiovascular and all-cause mortality: a meta-analysis of prospective studies // *J Zhejiang Univ Sci B.* — 2015. — Vol. 16. — № 1. — P. 78–86.
48. Poddar R., Paul S. Homocysteine-NMDA receptor-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase leads to neuronal cell death. // *J Neurochem.* — 2009. — Vol. 110. — № 3. — P. 1095–1106.
49. Qin T. Folic acid supplements and colorectal cancer risk: meta-analysis of randomized controlled trials // *Sci Rep.* — 2015. — № 5: 12044.
50. Safi J., et al. Periconceptional Folate Deficiency and Implications in Neural Tube Defects // *Journal of Pregnancy.* — 2012. — № 2012. — P. 1–9.
51. Shere M., et al. Association Between Use of Oral Contraceptives and Folate Status: A Systematic Review and Meta-Analysis // *J Obstet Gynaecol Can.* — 2015. — № 5. — P. 430–438.
52. Stanger O., et al. Vascular dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia. Implications for atherothrombotic disease // *Clin Chem Lab Med.* — 2001. — Vol. 39. — № 8. — P. 725–733.
53. Stanojlović O. Homocysteine, Neurotoxicity and Hyperexcitability // *Advanced Bioactive Compounds Countering the Effects of Radiological, Chemical and Biological Agents.* — 2013. — P. 73–81.
54. Trabetti E. Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk // *J. Appl. Genet.* — 2008. — Vol. 49. — P. 267–282.
55. Tüttelmann F., et al. Gene polymorphisms and male infertility—a meta-analysis and literature review // *Reprod Biomed Online.* — 2007. — Vol. 15. — № 6. — P. 643–58.
56. Van Sande H., et al. Vitamin B12 in pregnancy: Maternal and fetal/neonatal effects // *A review OJOG* — 2013. — № 3. — P. 599–602
57. de Vogel S., et al. Serum folate and vitamin B12 concentrations in relation to prostate cancer risk—a Norwegian population-based nested case-control study of 3000 cases and 3000 controls within the JANUS cohort // *Int J Epidemiol.* — 2013. — Vol. 42. — № 1. — P. 201–210.
58. Wang H. et al. Effectiveness of Folic Acid Fortified Flour for Prevention of Neural Tube Defects in a High Risk Region // *Nutrients.* — 2016. — Vol. 8. — № 3. — P. 152.
59. Wilson S. M., et al. Oral contraceptive use: impact on folate, vitamin B6, and vitamin B12 status // *Nutr Rev.* — 2011. — Vol. 69. — № 10. — P. 572–583.
60. Yamada Y., et al. Identification of hypo- and hypermethylated genes related to atherosclerosis by a genome-wide analysis of DNA methylation // *Int J Mol Med.* — 2014. — Vol. 33. — № 5. — P. 1355–1363.



**Контакты офиса:**

ООО «ДНК-Технология». Адрес: Москва, Варшавское шоссе, д. 125Ж, корп. 6.  
Тел./факс: +7 (495) 640-17-71. [www.dna-technology.ru](http://www.dna-technology.ru), [mail@dna-technology.ru](mailto:mail@dna-technology.ru).

**Служба клиентской поддержки:**

8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный), [hotline@dna-technology.ru](mailto:hotline@dna-technology.ru).