

ISSN 1814-6023 (Print)

ISSN 2524-2350 (Online)

УДК 616.39-039.41:575.174.015.3]-091

<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-2-158-169>

Поступила в редакцию 29.05.2019

Received 29.05.2019

**Т. Н. Гриневич, С. А. Лялик, В. А. Басинский, Т. Т. Штабинская,
К. М. Бутолина, Д. М. Максимов**

Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Республика Беларусь

ОСОБЕННОСТИ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ ПЛАЦЕНТЫ У ЖЕНЩИН С ПРИВЫЧНЫМ НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ СИСТЕМ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ГЕМОСТАЗА

Аннотация. Проведен анализ морфологических характеристик плацентарной ткани у женщин с ранними репродуктивными потерями с привычным невынашиванием беременности (ПНБ) в зависимости от наличия полиморфных вариантов генов металлопротеиназ и гемостаза. Установлено, что у пациенток с ПНБ площадь трофобласта плаценты значительно больше ($p < 0,003$), а площадь ворсин хориона меньше ($p < 0,04$), чем в группе женщин с реализованной репродуктивной функцией. Тромбоз сосудов хориона, некрозы и кальцинаты в плаценте при ПНБ выявлены в 80,0 % ($p = 0,001$), 93,3 % ($p = 0,001$) и 30,0 % ($p = 0,049$) случаев соответственно, что достоверно выше, чем в группе сравнения. У пациенток с ПНБ с генотипом Т/Т полиморфизма 735 С/Т гена *MMP-2* площадь трофобласта значительно ($p < 0,05$) больше, чем с С/С генотипом, достоверно чаще встречаются острое полнокровие ($p = 0,02$) и межворсинчатые кровоизлияния ($p = 0,02$). У пациенток с генотипом С/Т полиморфизма 735 С/Т гена *MMP-2* отек и дистрофические изменения ворсин хориона, некрозы плаценты определяются чаще ($p = 0,02$), чем у женщин с генотипом С/С. У носительниц аллеля Т полиморфизма 735 С/Т гена *MMP-2* в плаценте достоверно чаще встречаются некрозы, чем при генотипе СС; носительство аллеля Т также ассоциируется с большими значениями относительной площади трофобласта и стромально-межворсинчатого соотношения, а также с меньшей величиной соотношения площади межворсинчатого пространства и общей площади.

Ключевые слова: привычное невынашивание беременности, морфометрия, плацента, полиморфизм генов, металлопротеиназы, гемостаз

Для цитирования: Особенности гистологического строения плаценты у женщин с привычным невынашиванием беременности в зависимости от полиморфных вариантов генов систем металлопротеиназ и гемостаза / Т. Н. Гриневич [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. мед. наук. – 2020. – Т. 17, № 2. – С. 158–169. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-2-158-169>

**Tatyana N. Grinevich, Sergey A. Lyalik, Victor A. Basinsky, Tatyana T. Shtabinskaya,
Caroline M. Butolina, Denis M. Maximov**

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

FEATURES OF THE HISTOLOGICAL STRUCTURE OF THE PLACENTA IN WOMEN WITH RECURRENT MISCARRIAGE DEPENDING ON POLYMORPHIC VARIANTS OF THE METALLOPROTEINASE AND HEMOSTASIS SYSTEMS

Abstract. The article is devoted to the analysis of the morphological characteristics of placental tissue in women with early reproductive losses with recurrent miscarriage, depending on the presence of polymorphic variants of metalloproteinases and hemostasis. It was established that in women with recurrent miscarriage, the area of the trophoblast of the placenta is significantly larger ($p < 0.003$), the area of the chorionic villi is smaller ($p < 0.04$) than in the group of women with implemented reproductive function. Thrombosis of the chorionic vessels, necrosis and calcinates in the placenta with PNF were detected in 80.0 % ($p = 0.001$), 93.3 % ($p = 0.001$), and 30.0 % ($p = 0.049$) of cases, respectively, which is significantly higher than in the comparison group. In patients with PNP with the T/T genotype of the 735 C/T polymorphism of the *MMP-2* gene, the trophoblast area is significant ($p < 0.05$) more than with the C/C genotype, acute full-back ($p = 0.02$) and intervillous hemorrhage ($p = 0.02$). In women with the C/T genotype of the polymorphism 735 C/T of the *MMP-2* gene, edema and dystrophic changes in the chorionic villi, placental necrosis are determined more often ($p = 0.02$) than with the C/C genotype. In carriers of the T allele of the polymorphism 735 C/T of the *MMP-2* gene in the placenta, necrosis is significantly more common than in the CC genotype; the carriage of the T allele is also associated with large values of the relative area of the trophoblast and the stromal-intervillous relation, as well as with a smaller value of the ratio of the intervillous space area to the total area of the photograph.

Keywords: recurrent miscarriage, morphometry, placenta, gene polymorphism, metalloproteinases, hemostasis

For citation: Grinevich T. N., Lyalikov S. A., Basinsky V. A., Shtabinskaya T. T., Butolina C. M., Maximov D. M. Features of the histological structure of the placenta in women with recurrent miscarriage depending on polymorphic variants of the metalloproteinase and hemostasis systems. *Vesti Natsyonal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2020, vol. 17, no. 2, pp. 158–169 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2020-17-2-158-169>

Введение. Невынашивание беременности (НБ) является одной из весьма актуальных проблем современного акушерства и гинекологии, что определяется ее социальной и медицинской значимостью [1–3]. Несмотря на значительные успехи акушерско-гинекологической службы, частота встречаемости этой формы патологии остается стабильно высокой и достигает 25 % от общего числа всех клинически выявленных беременностей [4]. В I триместре частота НБ достигает 50–70 %, во II – 18–20, в III – 7–30 %. Максимальное число самопроизвольных аборт (81,1 %) отмечается в I триместре, причем в 38 % случаев – в первые 7–8 недель. Ранний аборт (4–5 недель), на долю которого приходится 8 % от всех беременностей, часто остается нераспознанным [5]. Особое место в НБ отводится проблеме привычной потери плода. Согласно определению Всемирной организации здравоохранения, привычным невынашиванием беременности (ПНБ) считается наличие в анамнезе женщины подряд трех и более самопроизвольных прерываний беременности в сроках до 22 недель [6]. Частота ПНБ в популяции составляет 2 % от числа беременностей [7]. По статистическим данным, только в Гродненской области у женщин ежегодно регистрируется от 600 до 1200 выкидышей [8], что в значительной мере определяет отрицательный прирост населения. В то же время, по данным мировой литературы, при своевременном выявлении причины и коррекции нарушений рождение жизнеспособных детей у женщин с привычным выкидышем достигает 70–97 % [9].

Причины невынашивания чрезвычайно разнообразны [10–13]. Среди них одни являются предрасполагающими, а другие – разрешающими. Первые ведут к прерыванию беременности, вызывая изменения со стороны плодного яйца, вторые нарушают связь плодного яйца с материнским организмом. Несмотря на то что современные диагностические возможности позволяют верифицировать их с большой точностью [14, 15], не всегда удается достичь желаемого результата. В связи с этим необходим поиск новых факторов, отрицательно влияющих на течение беременности в ранние сроки, а также методов их диагностики [10, 16, 17].

Одной из причин развития ПНБ являются наследственные дефекты свертывания крови, или тромбофилии [16, 17]. Генетические формы тромбофилии среди причин ПНБ, по данным авторов, составляют 10–30 % [18, 19]. Уже с самых ранних сроков физиологическая беременность сама по себе является тромбофилическим состоянием, при котором в 5–6 раз повышается риск венозных тромбозов [19]. Наследственные тромбофилические дефекты гемостаза усугубляют физиологическую гиперкоагуляцию во время беременности и нередко активизируют процессы внутрисосудистого тромбогенеза, что в свою очередь приводит к нарушению жизнедеятельности имплантировавшегося плодного яйца, на более поздних сроках беременности – плода, а в последующем – к неблагоприятному исходу беременности [20, 21]. Наличие тех или иных аллельных вариантов генов играет роль своеобразного преморбидного фона, в рамках которого могут развиваться различные гестационные осложнения, включая НБ. Причем носители аллеля, предрасполагающего к тромбофилии, могут вообще не иметь никакой клинической симптоматики заболевания до появления внешних провоцирующих факторов, к числу которых относится и беременность. Поэтому большинство генетических форм тромбофилии клинически проявляются именно в период гестационного процесса, значительно повышая риск развития осложненной беременности.

Анализ структурных изменений последа позволяет установить причины и характер патологии во время беременности, их связь с нарушением развития плода, определить возможный путь нарушений, прогнозировать течение послеродового и раннего неонатального периодов, разработать пути лечения и профилактики при следующей беременности [22–23].

Цель данного исследования – провести анализ морфологических характеристик плацентарной ткани у женщин с ранними репродуктивными потерями с привычным невынашиванием беремен-

ности в зависимости от полиморфных вариантов генов металлопротеиназ (*MMP-2* 735 C/T, *TIMP-2* 418 G/C) и системы гемостаза (фактора V (LEIDEN) 1691 G/A, *PAI-1* 675 4G/5G, *FGF* 455 G/A).

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось на базе учреждения здравоохранения «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи г. Гродно». С целью выполнения поставленных задач обследовано 58 пациенток с ПНБ и ранними репродуктивными потерями (до 12 недель беременности) в анамнезе (основная группа). Морфометрическая оценка проводилась в гистологических препаратах плацентарной ткани, спонтанно прервавшихся или ранее замерших беременностей. Возраст наблюдаемых женщин составил 20–43 года, медиана (Me) – 29,7 года, нижняя квартиль (Q_{25}) – 26,0 года, верхняя квартиль (Q_{75}) – 33,0 года. Критериями включения были ПНБ, т. е. наличие в анамнезе женщины подряд трех и более самопроизвольных прерываний беременности в сроках до 22 недель и наличие информированного согласия на проведение исследования. Всем женщинам этой группы осуществлялось комплексное обследование для установления причин невынашивания: исследовали гормональный и инфекционный статус, проводили ультразвуковое исследование, определяли маркеры антифосфолипидного синдрома.

Критериями невключения в исследование явились: наличие анатомических дефектов матки; наличие генетических и эндокринных нарушений; наличие инфекций, передающихся половым путем; перенесенные в течение двух недель, предшествующих обследованию, острые заболевания или обострения хронической патологии, соматические и гинекологические заболевания, влияющие на репродуктивную функцию.

Контрольную группу составили 36 женщин с тремя и более физиологическими родами в анамнезе без существенных осложнений, не имеющих клинических проявлений повышенного тромбообразования. Контролем служили образцы хориальной ткани, взятые при искусственном аборте. У женщин этой группы был благоприятный акушерский анамнез, отсутствовали самопроизвольные выкидыши и другие акушерские осложнения. Возраст женщин контрольной группы составил от 24 до 48 лет, медиана (Me) – 37,2 года, нижняя квартиль (Q_{25}) – 28,0 года, верхняя квартиль (Q_{75}) – 42,0 года.

Образцы плацентарной ткани величиной 0,5×0,5 см фиксировали в 10 %-ном нейтральном формалине, обезживали в спиртах восходящей концентрации, заливали в парафин, готовили срезы толщиной 5–6 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином [24]. Забор кусочков ткани осуществляли из центральной, парацентральной и краевой частей плаценты, кроме того, один кусочек забирали с хориальной пластинкой, другой – с материнской поверхности.

Для морфометрического исследования использовали компьютерную систему анализа изображений. Телеметрическая установка включала цифровую видеокамеру, совместимый с ней световой микроскоп, персональный компьютер с установленной на его жесткий диск программой Photom131. Определяли площадь поверхности объектов в пикселях и в процентах, результаты измерений автоматически вносили в предварительно созданную таблицу для последующей статистической обработки.

Морфометрическая оценка включала измерение площади следующих структур плацентарной ткани: ворсин, стромы, сосудов, трофобластического эпителия ворсин и интервиллезного пространства.

Алгоритм морфометрической оценки ворсин хориона включал: 1) определение их площади по внешнему контуру эпителиального покрова; 2) измерение общей площади стромы ворсин по внутреннему контуру их эпителиального покрова; 3) расчет площади трофобластического эпителия по разнице площади ворсин и общей площади стромы; 4) измерение площади сосудов по их внешнему контуру.

На основании полученных данных рассчитывали: 1) соотношение площади стромы к общей площади ($S_{str}/S_{общ}$); 2) сосудисто-ворсинчатое соотношение (S_c/S_v); 3) сосудисто-стромальное соотношение (S_c/S_{str}); 4) стромально-ворсинчатое соотношение (S_{str}/S_v); 5) стромально-межворсинчатое соотношение (S_{str}/S_{iv}); 6) сосудисто-межворсинчатое соотношение (S_c/S_{iv}); 7) соотношение площади межворсинчатого пространства к общей площади ($S_{iv}/S_{общ}$).

Патологические изменения плацентарной ткани, такие как острое полнокровие, тромбоз сосудов, отек, склероз, дистрофические изменения и наличие синтициальных почек ворсин хориона, кровоизлияния в межворсинчатом пространстве, некрозы и кальцинаты, оценивали полуколичественно (в баллах от 0 до 3).

Молекулярно-биологическое исследование заключалось в выявлении с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) полиморфизмов генов: коагуляционного фактора V (Лейденская мутация) 1691 G/A, ингибитора активатора плазминогена I типа (*PAI-1* 675 4G/5G), фибриногена (*FGB* 455 G/A) металлопротеиназы (*MMP-2* 735 C/T) и тканевого ингибитора металлопротеиназы (*TIMP-2* 418 G/C).

Геномную ДНК из лейкоцитов цельной крови пациенток с ПНБ и контрольной группы выделяли согласно инструкции производителя в асептических условиях с использованием набора реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК–экспресс–кровь» (НПО «Литех», Россия).

Генетические полиморфизмы в гене коагуляционного фактора V 1691 G/A (Arg506Gln) (Лейденская мутация) исследовали с помощью аллель-специфической ПЦР и последующей детекцией методом горизонтального электрофореза с использованием комплекта реагентов SNP-экспресс производства НПФ «Литех» (Россия) согласно инструкции по применению. С образцом выделенной ДНК параллельно проводили две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Разделение продуктов амплификации осуществляли в 3 %-ном агарозном геле, приготовленном на TAE буфере, методом горизонтального электрофореза. Для визуализации результатов электрофореза использовали систему гель-электрофореза Sub-Cell GT Agarose Gel (Bio-Rad, США), в качестве красителя вносили 1 %-ный раствор бромистого этидия. Фрагменты анализируемой ДНК проявлялись в виде светящихся оранжево-красных полос под УФ-излучением с длиной волны 310 нм. Анализ и документирование гелей осуществляли с помощью системы гель-документирования Gel Doc XR+ Imaging System (Bio-Rad, США).

Для качественного анализа наличия или отсутствия мутации в гене ингибитора активатора плазминогена I типа (*PAI-1*) 675 4G/5G производилась ПЦР SNP-экспресс-SHOT с использованием реагентов фирмы «Литех» (Россия) согласно инструкции. Для работы с комплектом реагентов SNP-экспресс-SHOT использовали следующие каналы: канал HEX/Yellow – Аллель 1 и канал FAM/Green – Аллель 2. Детекцию продуктов амплификации осуществляли с помощью прибора автоматически в каждом цикле амплификации. На основании полученных данных управляющая программа строила кривые накопления флуоресцентного сигнала по заданному для образцов каналу.

Качественный анализ наличия или отсутствия мутации в гене фибриногена (*FGB*) 455 G/A проводили с помощью комплекта реагентов для амплификации SNP-экспресс-PB (НПФ «Литех», Россия). Продукты ПЦР детектировали в режиме реального времени на амплификаторе Rotor-Gene Q5. Анализ осуществляли по кривым накопления фонового сигнала от каждого образца. Для работы с реагентами использовали канал FAM в присутствии красителя SYBR Green I. Детекция продуктов амплификации осуществляли прибором Rotor-Gene Q5 автоматически в каждом цикле амплификации (приблизительное время работы – 1 ч). Результат считался положительным, если значение FAM_{ct} образца составляло менее 27, отрицательным – при его значении более 30. В общем случае неспецифические слабоинтенсивные кривые (амплификация с неспецифических праймеров, праймер-димеры) выходят на 6–10 циклов позже специфических. Для гетерозиготного образца с наследственной мутацией разница циклов выхода кривых накопления флуоресцентного продукта с нормальным и мутантным вариантами находилась в пределах 1–1,5 цикла.

Для выявления исследуемых полиморфизмов в тканях плаценты пациенток с ПНБ и здоровых лиц ДНК выделялась из срезов архивных тканей плаценты, фиксированных в формалине и залитых в парафиновые блоки, с использованием фирменного набора QIAamp® DNA FFPE Tissue (QIAGEN, Германия).

Полиморфные варианты генов *MMP-2* 735 C/T и *TIMP-2* 418 G/C выявляли методом ПЦР с определением длины рестрикционных фрагментов (PCR-RFLP). Для поиска нуклеотидных последовательностей искомым генов использовали банк аннотированных нуклеотидных по-

следовательностей GenBank Национального Центра Биотехнологической Информации США (GenBank NCBI USA) (<http://www.t.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Установлен следующий нуклеотидный состав праймеров (GenBank NCBI, США) (<http://www.t.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>): для выявления полиморфизма *MMP-2* – ATAGGGTAAACCTCCCCACATT-for, и GGTA AAAATGACCCTGAGACCTG-rev; для выявления полиморфизма *TIMP-2* – CGTCTCTTGTGGCTGGTCA-for, CCTTCAGCTCGACTCTGGAG-rev.

Синтез олигонуклеотидов для проведения ПЦР осуществлялся в компании ОДО «Праймтех» (Беларусь). Полученные ПЦР-продукты подвергали рестрикционному анализу с использованием эндонуклеаз Aval (BsoBI) для *TIMP-2* (418 G/C) и HinfI для *MMP-2* (736 C/T) (Jena Bioscience, Великобритания). Для реакции амплификации использовали универсальную готовую реакционную смесь Quick-load Taq 2X Master Mix (ОДО «Праймтех», Беларусь).

Реакционная смесь для ПЦР-амплификации содержала 50 мМ KCl, 1,75 мМ MgCl₂, 0,1 % (масса/объем) Тритон X-100, 0,2 мг/мл BSA и 10 мМ Трис-HCl (pH 8,5), 10 мМ каждого из четырех дНТФ, 1 U Taq ДНК-полимеразы (Promega, США). Температуру отжига для каждого праймера определяли опытным путем.

Реакцию амплификации проводили в объеме 25 мкл, включая объем пробы ДНК – 2 мкл. Для приготовления реакционной смеси в отдельной пробирке из расчета на каждую реакцию смешивали по 1,5 мкл праймеров (прямой и обратный), по 12,5 мкл реакционной смеси Quick-load Taq 2X Master Mix («Праймтех», Беларусь) и по 7,5 мкл дионизированной воды (ddH₂O) (Jena Bioscience, Германия). Далее пробирки помещали в амплификатор-термоциклер 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США) и задавали соответствующую программу амплификации.

Продукт амплификации гена *MMP-2* 736 C/T предварительно денатурировали при 95 °С в течение 5 мин, затем повторяли 35 циклов при 94 °С в течение 45 с, при 62 °С в течение 45 с и при 72 °С в течение 1 мин для полимеразы-опосредованного удлинения затравки с одним последним циклом при 72 °С в течение 10 мин.

Продукт амплификации гена *TIMP-2* 418 G/C предварительно денатурировали при 94° в течение 2 мин, затем повторяли 35 циклов при 94 °С в течение 30 с, при 59 °С в течение 30 с и при 72 °С в течение 30 с для полимеразы-опосредованного удлинения затравки с одним последним циклом при 72 °С в течение 7 мин.

ПЦР-продукты гена *MMP-2* 736 C/T были подвергнуты рестрикционному анализу с использованием фермента рестрикции HinfI, для гена *TIMP-2* 418 G/C – Aval (Jena Bioscience, Германия). Рестрикционный анализ проводили в соответствии с инструкцией изготовителя (Jena Bioscience, Германия). К 15 мкл реакционной смеси, содержащей 2,5 мкл соответствующего 10-кратного буферного раствора, 12 мкл ddH₂O и 0,5 мкл 10 U рестрикционного фермента (Hinf I/Aval), добавляли 10 мкл продукта ПЦР (общий объем 25 мкл). Реакционную смесь инкубировали при 37 °С 3 ч. Реакцию останавливали путем воздействия высокой температуры – 80 °С в течение 20 мин (Hinf I) или 65 °С в течение 20 мин (Aval).

Продукты ферментации подвергали электрофорезу в 2 %-ном агарозном геле, приготовленном на 10-кратном трис-боратном буфере, с окрашиванием бромидом этидия с помощью системы гель-электрофореза Sub-Cell GT Agarose Gel (Bio-Rad, США). Пробы (по 10 мкл) вносили в лунки геля. По окончании электрофореза и окрашивания геля бромистым этидием на основании размеров фрагментов и расстояний их пробега в геле вычисляли размеры исследуемых фрагментов. Для оценки молекулярного веса фрагментов использовали маркеры молекулярного веса ДНК DNA Ladder 20 bp, 50 bp (Jena Bioscience, Германия). Результаты электрофореза визуализировали на трансиллюминаторе Sub-Cell GT Agarose Gel (Bio-Rad, США).

При анализе гена *MMP-2* 736 C/T выявлено три фрагмента длиной 300, 254 и 46 bp, соответствующих разным генотипам. О наличии генотипа C/C в исследуемом образце судили по наличию фрагмента длиной 300 bp. О наличии генотипа C/T в исследуемом образце судили по наличию трех фрагментов длиной 300, 254 и 46 bp. О наличии генотипа T/T в исследуемом образце судили по наличию фрагментов длиной 254 и 46 bp.

При анализе гена *TIMP-2* 418 G/C выявлено четыре фрагмента длиной 253, 230, 51 и 23 bp, соответствующих разным генотипам. О наличии генотипа C/C в исследуемом образце судили

по наличию фрагментов длиной 253 и 51 bp. О наличии генотипа G/C в исследуемом образце судили по наличию четырех фрагментов длиной 253, 230, 51 bp и 23 bp. О наличии генотипа G/G в исследуемом образце судили по наличию фрагментов длиной 230, 51 и 23 bp.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 10.0 (SN AXAR207F394425FA-Q). Результаты статистической обработки представлены в виде величины верхней (Q_{75}) и нижней (Q_{25}) квартилей и медианы (Me) – Me (Q_{25} – Q_{75}).

Результаты и их обсуждение. Сравнительная характеристика гистологического строения трофобласта и ворсин хориона у женщин с ПНБ и женщин без репродуктивных потерь (контрольная группа) представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Морфометрические показатели плацентарной ткани у женщин с ПНБ и у женщин без репродуктивных потерь

Table 1. Morphometric indicators of placental tissue in women with recurrent miscarriage and in women without reproductive loss

Показатель	Женщины с ПНБ	Контрольная группа	<i>p</i>
S ворсин, пикс.	515251,9 (431321,5–540834,5)	782152,6 (539505,0–1065996)	
S ворсин, %	39,4 (31,5–47,4)	40,4 (27,4–53,0)	0,04
S сосудов, %	1,95 (1,18–4,51)	1,56 (0,89–2,91)	
S трофобласта, пикс.	758382,7 (604627,5–910527,0)	154425,1 (130408,5–174700)	
S трофобласта, %	26,7 (22,5–28,2)	6,8 (4,6–9,0)	0,003
$S_{str}/S_{общ}$	0,32 (0,29–0,36)	0,30 (0,20–0,40)	
S_c/S_v	0,06 (0,04–0,10)	0,04 (0,03–0,08)	
S_c/S_{str}	0,08 (0,05–0,14)	0,06 (0,04–0,10)	
$S_{iv}/S_{общ}$	0,35 (0,261–0,41)	0,59 (0,44–0,72)	
S_{tr}/S_{tr}	0,26 (0,11–0,45)	0,23 (0,10–0,36)	
S_{tr}/S_v	0,23 (0,19–0,27)	0,20 (0,18–0,21)	
S_{tr}/S_{iv}	0,31 (0,21–0,52)	0,14 (0,10–0,24)	
S_c/S_{iv}	0,06 (0,03–0,13)	0,03 (0,01–0,05)	

Выявлены различия гистологического строения трофобласта и ворсин хорион у женщин с ПНБ в сравнении с контролем. Так, следует отметить преобладание площади трофобласта ($p < 0,003$) и снижение площади ворсин хориона ($p < 0,04$) в группе пациенток с ПНБ в сравнении с группой женщин без репродуктивных потерь в анамнезе.

При оценке морфологических изменений плацентарной ткани у пациенток с ПНБ острое полнокровие выявлено в 73,3 % случаев; интервиллезные кровоизлияния – в 60,0 %; синцитиальные почки – в 86,7 %; склероз ворсин хориона – в 20,0 %, тромбоз сосудов ворсин хориона – в 80,0 % ($p = 0,001$ по сравнению с контролем); отек и дистрофия ворсин – в 93,3 %; некроз – в 93,3 % ($p = 0,001$ по сравнению с контролем), кальцинаты – в 30,0 % ($p = 0,049$ по сравнению с контролем) случаев.

Острое полнокровие и интервиллезные кровоизлияния свидетельствуют об острых нарушениях маточно-плацентарного кровообращения, что могло явиться причиной спонтанного аборта с острой отслойкой плацентарной ткани в раннем сроке гестации. Тромбоз сосудов ворсин хориона с последующим некрозом, дистрофические изменения и отек ворсин хориона приводят к инволютивно-дистрофическим и воспалительным изменениям, а наличие склеротических изменений может свидетельствовать о нарастающей гипоксии.

Снижение площади ворсин хориона пациенток с ПНБ связано с замещением нормальной плацентарной ткани соединительной в результате ишемического повреждения, а также с отложением большого количества разнокалиберных кальцинатов. В свою очередь увеличение площади трофобласта можно рассматривать как структурное проявление компенсации обменных процессов между матерью и плодом.

При анализе морфологических характеристик плацентарной ткани пациенток с ПНБ и женщин без репродуктивных потерь в зависимости от полиморфных вариантов исследуемых генов в венозной крови и в плаценте (FV Лейден 1691 G/A, PAI-1 675 4G/5G, FGB 455 G/A, MMP-2 735 C/T, TIMP-2 418 G/C) установлено, что большинство ассоциаций отмечается между морфологическими показателями и аллелями полиморфизма 735 C/T гена MMP-2.

Формирование плаценты является инвазивным процессом и неотъемлемо связано с преобразованием базальной мембраны и экстрацеллюлярного матрикса, в котором активное участие принимают матриксные металлопротеиназы. Децидуальные стромальные клетки при контакте с трофобластом экспрессируют очень большое количество MMP-2, оптимизируя инвазивный потенциал. В свою очередь успешная инвазия трофобласта обеспечивает нормальное развитие тканей плаценты и эмбриона. При мутациях гена MMP-2 в терминальных ворсинах происходит снижение содержания коллагена IV типа в базальных мембранах, что, вероятно, может приводить к нарушению формирования фетоплацентарного барьера.

Так, с мутантным гомозиготным генотипом T/T полиморфизма 735 C/T гена MMP-2 площадь трофобласта была достоверно ($p < 0,05$) больше, чем при диком гомозиготным C/C генотипе (рис. 1).

Кроме того, у женщин с ПНБ с мутантным гомозиготным генотипом T/T полиморфизма 735 C/T гена MMP-2 достоверно чаще встречались острое полнокровие ($p = 0,02$) и межворсинчатые кровоизлияния ($p = 0,02$), чем у носителей аллеля C (генотип C/C и C/T) этого гена (рис. 2, 3).

Таким образом, морфологические изменения плаценты, связанные с нарушением маточно-плацентарного кровообращения, чаще встречались у пациенток с ПНБ с мутантным гомозиготным генотипом T/T полиморфизма 735 C/T гена MMP-2, а увеличение площади трофобласта в этой группе женщин, вероятно, является компенсаторной реакцией на повреждение.

Отек и дистрофия ворсин хориона, некрозы достоверно чаще ($p = 0,02$) встречались у женщин с гетерозиготным C/T, чем с гомозиготным диким генотипом C/C полиморфизмом гена MMP-2 (рис. 4, 5).

Таким образом, признаки воспаления чаще встречались у пациенток с ПНБ с гетерозиготным генотипом C/T полиморфизма 735 C/T гена MMP-2.

Морфологическая оценка плацентарной ткани у женщин в зависимости от носительства аллеля полиморфизма 735 C/T гена MMP-2 и их сочетаний в увеличение риска ПНБ представлена в табл. 2.

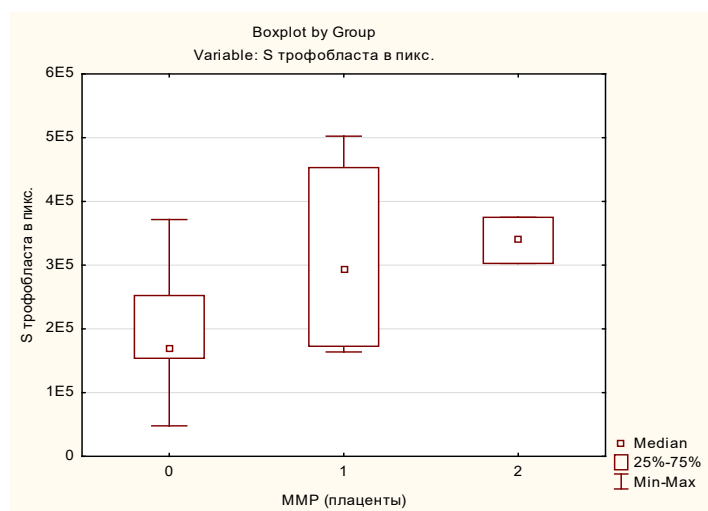


Рис. 1. Площадь трофобласта в зависимости от генотипа полиморфизма 735 C/T гена MMP-2 (0 – C/C, 1 – C/T, 2 – T/T)

Fig. 1. Dependence of trophoblast area on the genotype of polymorphism of the 735 C/T gene of the MMP-2 gene (0 – C/C, 1 – C/T, 2 – T/T)

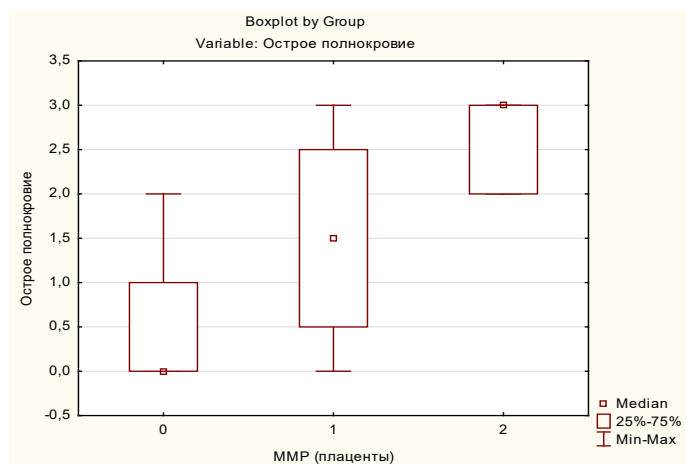


Рис. 2. Наличие острого полнокровия в зависимости от аллелей полиморфных вариантов гена *MMP-2*

Fig. 2. Dependence of the presence of acute plethora on alleles of polymorphic variants of the *MMP-2* gene

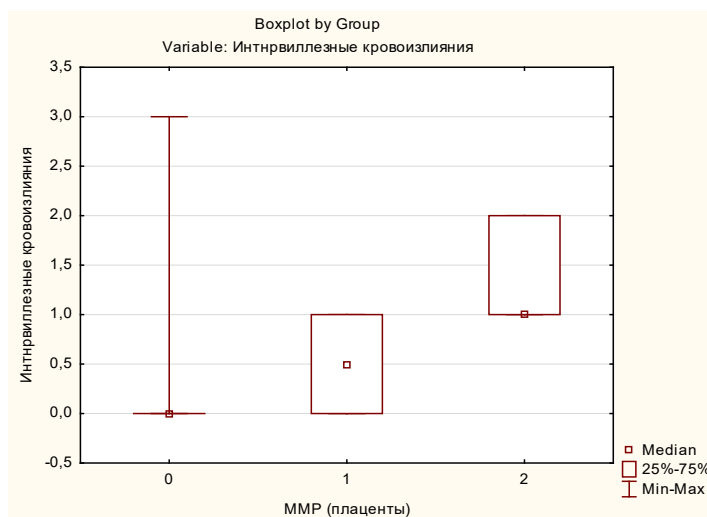


Рис. 3. Наличие межворсинчатых кровоизлияний в зависимости от полиморфных вариантов гена *MMP-2*

Fig. 3. Dependence of the presence of intervillous hemorrhages on polymorphic variants of the *MMP-2* gene

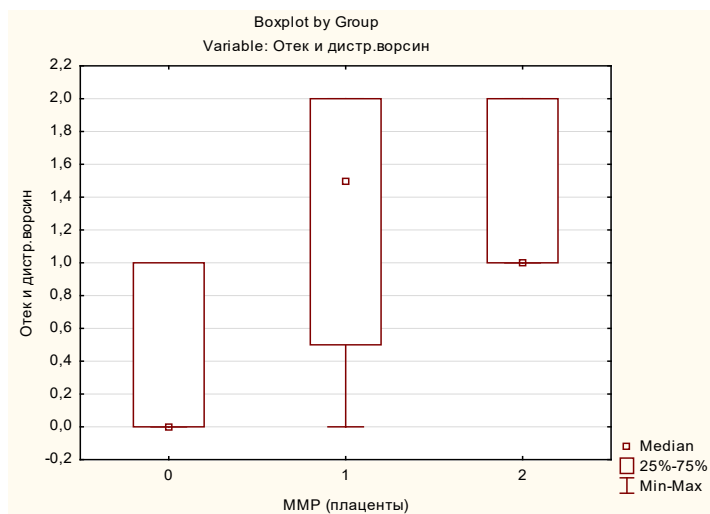
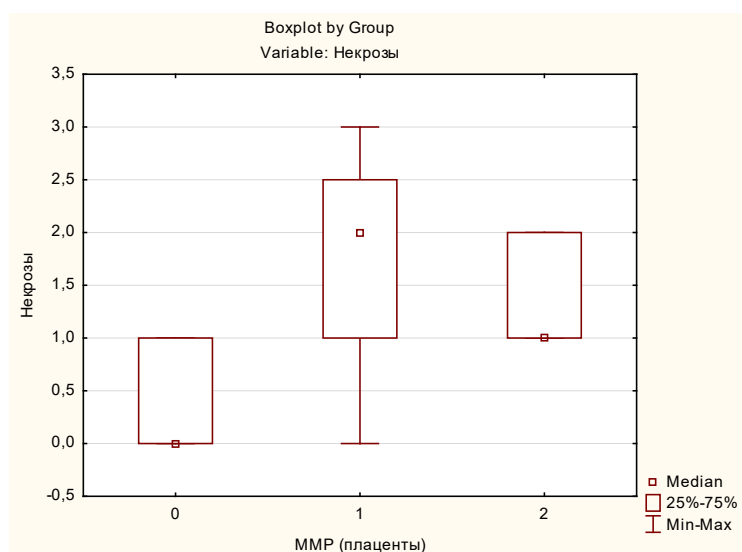


Рис. 4. Наличие отека и дистрофии ворсин хориона в зависимости от полиморфных вариантов гена *MMP-2*

Fig. 4. Dependence of the presence of edema and dystrophy of chorionic villi on polymorphic variants of the *MMP-2* gene

Рис. 5. Наличие некрозов в зависимости от полиморфных вариантов гена *MMP-2*Fig. 5. Dependence of the presence of necrosis on polymorphic variants of the *MMP-2* geneТаблица 2. Морфологическая оценка плацентарной ткани у женщин в зависимости от носительства аллеля полиморфизма (735 C/T) гена *MMP-2*Table 2. Morphological evaluation of placental tissue in women depending on the carriage of the polymorphism allele (735 C/T) of the *MMP-2* gene

Показатель	Аллель С			Аллель Т			<i>p</i>
	Генотип С/С			Генотипы С/Т и Т/Т			
	Me	Q ₂₅	Q ₇₅	Me	Q ₂₅	Q ₇₅	
Тромбоз в межворсинчатом пространстве	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	2,00	0,06
Некрозы	0,00	0,00	1,00	2,00	1,00	2,00	0,01
Кальцинаты	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	–
$S_{\text{ворсин}}$, %	41,16	32,83	49,01	49,68	43,77	55,56	–
$S_{\text{сосудов}}$, %	1,95	1,18	3,23	1,79	0,89	4,51	–
$S_{\text{трофобласта}}$, %	8,00	5,96	9,43	10,81	9,44	12,84	0,03
$S_{\text{прочего}}$, %	2,86	2,58	7,84	2,08	1,85	3,46	–
$S_{\text{стр}}/S_{\text{общ}}$	0,29	0,24	0,37	0,33	0,30	0,39	–
$S_{\text{с}}/S_{\text{в}}$	0,06	0,03	0,08	0,04	0,04	0,10	–
$S_{\text{с}}/S_{\text{стр}}$	0,08	0,04	0,11	0,05	0,05	0,14	–
$S_{\text{iv}}/S_{\text{общ}}$	0,55	0,38	0,67	0,35	0,26	0,41	0,03
$S_{\text{с}}/S_{\text{тр}}$	0,31	0,10	0,38	0,14	0,11	0,42	–
$S_{\text{тр}}/S_{\text{в}}$	0,21	0,19	0,24	0,23	0,19	0,30	–
$S_{\text{тр}}/S_{\text{iv}}$	0,14	0,11	0,24	0,31	0,25	0,52	0,04
$S_{\text{с}}/S_{\text{iv}}$	0,04	0,02	0,05	0,06	0,02	0,13	–

У женщин – носительниц аллеля Т полиморфизма 735 C/T гена *MMP-2* в плаценте отмечалась тенденция к большей частоте тромбозов в межворсинчатом пространстве и достоверно чаще выявлялись некрозы, чем при генотипе С/С (табл. 2). Носительство аллеля Т было ассоциировано также с большими значениями относительной площади трофобласта и стромально-межворсинчатого соотношения, а также с меньшей величиной индекса $S_{\text{iv}}/S_{\text{общ}}$, что подтверждает вклад носительства аллеля Т (мутантный гомозиготный Т/Т и гетерозиготный С/Т генотипы) в увеличение риска ПНБ.

Выводы

1. У женщин с ПНБ площадь трофобласта плаценты значимо больше ($p < 0,003$), а площадь ворсин хориона меньше ($p < 0,04$), чем у представительниц контрольной группы.

2. Тромбоз сосудов хориона, некрозы и кальцинаты в плаценте при ПНБ выявлены в 80,0 % ($p = 0,001$), 93,3 % ($p = 0,001$) и 30,0 % ($p = 0,049$) случаев соответственно, что достоверно выше, чем в группе сравнения.

3. У пациенток с ПНБ с генотипом Т/Т полиморфизма 735 С/Т гена *MMP-2* площадь трофобласта значимо ($p < 0,05$) больше, чем у женщин с С/С генотипом, а также достоверно чаще встречаются острое полнокровие ($p = 0,02$) и межворсинчатые кровоизлияния ($p = 0,02$).

4. В группе пациенток с ПНБ и генотипом С/Т отек и дистрофические изменения ворсин хориона, некрозы плаценты определяются чаще ($p = 0,02$), чем у женщин с генотипом С/С полиморфизма 735 С/Т гена *MMP-2*.

5. У носительниц аллеля Т полиморфизма 735 С/Т гена *MMP-2* в плаценте достоверно чаще, чем при генотипе СС, встречаются некрозы. Носительство аллеля Т ассоциируется с большими значениями относительной площади трофобласта и стромально-межворсинчатого соотношения, а также с меньшей величиной соотношения площади межворсинчатого пространства и общей площади.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № М17-184 от 18.04.2017).

Acknowledgements. This work was financially supported by the Belarusian Republican Foundation for Basic Research (project no. M17-184 of 04/18/2017).

Список использованных источников

1. Acquired and inherited thrombophilia in women with unexplained fetal losses / A. Alonso [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2002. – Vol. 187, N 5. – P. 1337–1342. <https://doi.org/10.1067/mob.2002.126849>
2. Kutteh, W. H. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss / W. H. Kutteh, D. A. Triplett // *Semin. Reprod. Med.* – 2006. – Vol. 24, N 01. – P. 054–066. <https://doi.org/10.1055/s-2006-931801>
3. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a critical appraisal of the literature / I. Krabbendam [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2005. – Vol. 118, N 2. – P. 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2004.07.019>
4. Пересада, О. А. Современные подходы к терапии невынашивания беременности / О. А. Пересада // *Мед. новости.* – 2015. – № 5. – С. 28–30.
5. Руководство по безопасному материнству / В. И. Кулаков [и др.]. – М. : Триада-Х, 1998. – 531 с.
6. Jordaan, D.-J. Thrombophilia screening in pregnancy / D.-J. Jordaan, M. G. Schoon, P. N. Badenhorst // *Obstet. Gynecol. Surv.* – 2005. – Vol. 60, N 6. – P. 394–404. <https://doi.org/10.1097/01.ogx.0000165116.96026.4e>
7. Здравоохранение в Республике Беларусь : офиц. стат. сб. за 2015 г. / Респ. науч.-практ. центр мед. технологий, информатизации, упр. и экономики здравоохранения. – Минск : РНМБ, 2016. – 277 с.
8. Якутовская, С. Л. Невынашивание беременности (этиология, патогенез, диагностика, клиника, лечение): учеб.-метод. пособие / С. Л. Якутовская, В. Л. Силава, Л. В. Вавилова. – Минск : БелМАПО, 2004. – 44 с.
9. Агаджанова, А. А. Современные методы терапии больных с привычным невынашиванием беременности / А. А. Агаджанова // *Рус. мед. журн.* – 2003. – Т. 11, № 1. – С. 3–6.
10. Thrombophilic genes alterations as risk factor for recurrent pregnancy loss / K. J. Farahmand [et al.] // *Mat.-Fet. Neonat. Med.* – 2016. – Vol. 29, N 8. – P. 1269–1273. <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1044431>
11. Rebrikov, D. V. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis / D. V. Rebrikov, D. Yu. Trofimov // *Appl. Biochem. Microb.* – 2006. – Vol. 42, N 5. – P. 455–463. <https://doi.org/10.1134/s0003683806050024>
12. Акушерство: учебник для акушер. отд-ний сред. спец. мед. учеб. заведений / И. А. Алеев [и др.] ; под ред. В. Е. Радзинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 898 с.
13. Pathologic features of the placenta in women with severe pregnancy complications and thrombophilia / A. Many [et al.] // *Obstet. Gynecol.* – 2001. – Vol. 98, N 6. – P. 1041–1044. <https://doi.org/10.1097/00006250-200112000-00010>
14. Сидельникова, В. М. Невынашивание беременности: рук. для практ. врачей / В. М. Сидельникова, Г. Т. Сухих. – М. : Мед. информ. агентство, 2010. – 534 с.
15. Heit, J. A. Thrombophilia: common questions on laboratory assessment and management hematology / J. A. Heit // *Hematology.* – 2007. – Vol. 1. – P. 127–135. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2007.1.127>
16. Sergi, C. Factor V Leiden mutation in women with early recurrent pregnancy loss: a meta-analysis and systematic review of the causal association / C. Sergi, T. Al Jishi, M. Walker // *Arch. Gynecol. Obstet.* – 2015. – Vol. 291, N 3. – P. 671–679. <https://doi.org/10.1007/s00404-014-3443-x>
17. Ren, A. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis / A. Ren, J. Wang // *Fertil. Steril.* – 2006. – Vol. 86, N 6. – P. 1716–1722. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.05.052>
18. Тромбофилия как важнейшее звено патогенеза осложнений беременности / В. О. Бицадзе [и др.] // *Практ. медицина.* – 2012. – Т. 60, № 5. – С. 22–29.

19. Acquired thrombophilia / E. M. Armstrong [et al.] // *J. Pharm. Pract.* – 2014. – Vol. 27, N 3. – P. 234–242. <https://doi.org/10.1177/0897190014530424>
20. Coagulation disorders in pregnancy: acquired and inherited thrombophilias / C. Benedetto [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2010. – Vol. 1205, N 1. – P. 106–117. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05674.x>
21. Belfort, M. A. Placenta accrete / M. A. Belfort // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2010. – Vol. 203, N 5. – P. 430–439. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.09.013>
22. Кравцова, Г. И. Клинико-морфологическое исследование последа: метод. рекомендации / Г. И. Кравцова, С. К. Клецкий. – Минск : Мин. гос. мед. ин-т, 1995. – 52 с.
23. Милованов, А. П. Патология системы мать–плацента–плод: рук. для врачей / А. П. Милованов. – М. : Медицина, 1999. – 446 с.
24. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. – СПб. : СпецЛит, 2010. – 95 с.

References

1. Alonso A., Soto I., Urgellés M. F., Corte J. R., Rodríguez M. J., Pinto C. R. Acquired and inherited thrombophilia in women with unexplained fetal losses. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2002, vol. 187, no. 5, pp. 1337–1342. <https://doi.org/10.1067/mob.2002.126849>
2. Kutteh W. H., Triplett D. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2006, vol. 24, no. 01, pp. 054–066. <https://doi.org/10.1055/s-2006-931801>
3. Krabbendam I., Franx A., Bots M. L., Fijnheer R., Bruinse H. W. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss: a critical appraisal of the literature. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 2005, vol. 118, no. 2, pp. 143–153. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2004.07.019>
4. Peresada O. A. Modern approaches to the treatment of miscarriage. *Meditsinskie novosti* [Medical news], 2015, no. 5, pp. 28–30 (in Russian).
5. Kulakov V. I., Serov V. N., Barashnev Yu. I., Frolova O. G., Antonov A. G. *Safe motherhood guide*. Moscow, Triada-X Publ., 1998. 531 p. (in Russian).
6. Jordaan D.-J., Schoon M. G., Badenhorst P. N. Thrombophilia screening in pregnancy. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 2005, vol. 60, no. 6, pp. 394–404. <https://doi.org/10.1097/01.ogx.0000165116.96026.4e>
7. *Public health in the Republic of Belarus: official statistical compilation for 2015*. Minsk, Republican Scientific Medical Library Publ., 2016. 277 p. (in Russian).
8. Yakutovskaya S. L., Silyava V. L., Vavilova L. V. *Pregnancy miscarriage (etiology, pathogenesis, diagnosis, clinic, treatment)*. Minsk, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education Publ., 2004. 44 p. (in Russian).
9. Agadzhanova A. A. Modern methods of treatment of patients with recurrent miscarriage. *Russkii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal*, 2003, vol. 11, no. 1, pp. 3–6 (in Russian).
10. Farahmand K., Totonchi M., Hashemi M., Sabet F. R., Kalantari H., Gourabi H., Meybodi A. M. Thrombophilic genes alterations as risk factor for recurrent pregnancy loss. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 2015, vol. 29, no. 8, pp. 1269–1273. <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1044431>
11. Rebrikov D. V., Trofimov D. Yu. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2006, vol. 42, no. 5, pp. 455–463. <https://doi.org/10.1134/s0003683806050024>
12. Radzinskii V. E. (ed.). *Obstetrics*. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2008. 898 p. (in Russian).
13. Many A., Schreiber L., Rosner S., Lessing J. B., Eldor A., Kupfermanc M. J. Pathologic features of the placenta in women with severe pregnancy complications and thrombophilia. *Obstetrics and Gynecology*, 2001, vol. 98, no. 6, pp. 1041–1044. <https://doi.org/10.1097/00006250-200112000-00010>
14. Sidel'nikova V. M., Sukhikh G. T. *Miscarriage of pregnancy*. Moscow, Medical News Agency Publ., 2010. 534 p. (in Russian).
15. Heit J. A. Thrombophilia: common questions on laboratory assessment and management hematology. *Hematology*, 2007, vol. 1, pp. 127–135. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2007.1.127>
16. Sergi C., Al Jishi T., Walker M. Factor V Leiden mutation in women with early recurrent pregnancy loss: a meta-analysis and systematic review of the causal association. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2015, vol. 291, no. 3, pp. 671–679. <https://doi.org/10.1007/s00404-014-3443-x>
17. Ren A., Wang J. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 2006, vol. 86, no. 6, pp. 1716–1722. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.05.052>
18. Bitsadze V. O., Makatsariya A. D., Khizroeva D. Kh., Makatsariya N. A., Yashenina E. V. Thrombophilia as the most important link in the pathogenesis of pregnancy complications. *Prakticheskaya meditsina* [Practical medicine], 2012, vol. 5, no. 60, pp. 22–29 (in Russian).
19. Armstrong E. M., Bellone J. M., Hornsby L. B., Treadway S., Phillippe H. M. Acquired thrombophilia. *Journal of Pharmacy Practice*, 2014, vol. 27, no. 3, pp. 234–242. <https://doi.org/10.1177/0897190014530424>
20. Benedetto C., Marozio L., Tavella A. M., Salton L., Grivon S., Giampaolo F. D. Coagulation disorders in pregnancy: acquired and inherited thrombophilias. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010, vol. 1205, no. 1, pp. 106–117. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05674.x>
21. Belfort M. A. Placenta accreta. Publications Committee, Society for Maternal-Fetal Medicine. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2010, vol. 203, no. 5, pp. 430–439. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.09.013>

22. Kravtsova G. I., Kletskii S. K. *Clinical and morphological study of the placenta*. Minsk, Minsk State Medical Institute Publ., 1995. 52 p. (in Russian).

23. Milovanov A. P. *Pathology of the mother–placenta–fetus system: a guide for physicians*. Moscow, Meditsina Publ., 1999. 446 p. (in Russian).

24. Korzhevskii D. E., Gilyarov A. V. *The basics of histological technology*. St. Petersburg, SpetsLit Publ., 2010. 95 p. (in Russian).

Информация об авторах

Гриневиц Татьяна Николаевна – канд. мед. наук, ст. преподаватель. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно, 230015, Республика Беларусь). E-mail: tgrinevich@yandex.by

Ляликов Сергей Александрович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно, 230015, Республика Беларусь). E-mail: lalikov@tut.by

Басинский Виктор Анатольевич – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно, 230015, Республика Беларусь). E-mail: basinsk@gmail.com

Штабинская Татьяна Тадеушевна – канд. мед. наук, доцент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно, 230015, Республика Беларусь). E-mail: shtabik@list.ru

Бутолина Каролина Мирославовна – ассистент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно, 230015, Республика Беларусь). E-mail: patan@grsmu.by

Максимов Денис Максимович – студент. Гродненский государственный медицинский университет (ул. Горького, 80, г. Гродно, 230015, Республика Беларусь). E-mail: tgrinevich@yandex.by

Information about the authors

Tatyana N. Grinevich – Ph. D. (Med.), Senior Lecturer. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: tgrinevich@yandex.by

Sergey A. Lyalikov – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: lalikov@tut.by

Victor A. Basinsky – D. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: basinsk@gmail.com

Tatyana T. Shtabinskaya – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: shtabik@list.ru

Caroline M. Butolina – Assistant. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: patan@grsmu.by

Denis M. Maximov – Student. Grodno State Medical University (80, Gorky Str., 230015, Grodno, Republic of Belarus). E-mail: tgrinevich@yandex.by