

Н.Г. Горovenko*,
С.П. Кир'яченко**,
З.І. Россоха

АСОЦІАЦІЯ ПОЛІМОРФНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ *ACE* ТА *AT2R1* З РОЗВИТКОМ ПЕРИНАТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ У НОВОНАРОДЖЕНИХ

Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика*
Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України**

Ключові слова: поліморфізм,
перинатальна патологія,
новонароджені

Key words: polymorphism, perinatal
pathology, newborns

Резюме. В работе представлены данные по ассоциации полиморфных генотипов *ACE* и *AT2R1* с развитием перинатальной патологии и неонатальных синдромов. Определены генотипы, ассоциированные с неблагоприятным течением неонатального периода, а также генотипы, снижающие риск развития перинатальной патологии. Необходимы дальнейшие исследования для оценки целесообразности использования этих маркеров в клинической практике.

Summary. The paper presents data of the associations of polymorphic *ACE* and *AT2R1* genes variants with the development of perinatal pathology and neonatal syndromes. Genotypes associated with adverse neonatal outcome as well as genotypes which reduce risk of perinatal pathology were identified. Further studies are needed to evaluate the necessity of these markers use in clinical practice.

На сьогодні не викликає сумнівів, що у розвитку хронічних соціально значущих мультифакторних захворювань важливу роль відіграє генетична компонента. Генетична зумовленість у розвитку мультифакторних захворювань та патологічних станів простежується вже у ранніх періодах онтогенезу. Вивчення генетичних маркерів, асоційованих з розвитком перинатальної патології у новонароджених, має велике практичне значення для розробки превентивних заходів та збереження здоров'я малюка у майбутньому. У попередніх роботах нами було встановлено роль поліморфних маркерів генів *TNF-α*, *MTHFR*, *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* глутатіон-S-трансфераз у розвитку тяжкої перинатальної патології та неонатальних синдромів [1,3,4,6,7,11], що дозволило охарактеризувати певні патогенетичні ланки у виникненні та перебігу цих мультифакторних патологічних станів.

Останнім часом увага дослідників спрямовується на аналіз можливого впливу ренін-ангіотензинової системи (РАС) на виникнення неонатальної патології. Від функціональної активності генів РАС залежать складні механізми регуляції кров'яного тиску, підтримання судинного та клітинного гомеостазу, функціональний стан ендотелію та баланс вазоактивних сполук в організмі. В той же час вивченню поліморфних варіантів генів РАС у новонароджених присвячено лише поодинокі роботи [2,10], хоча такий аналіз був би корисним для оцінки порушень цієї гомеостатичної ланки у патогенезі розвитку патологічних станів на ранніх етапах онтогенезу.

Враховуючи синергічну дію генів *ACE* та *AT2R1* та їх вплив на підтримання гомеостатичних процесів [5], метою нашої роботи стало вивчення впливу поліморфних варіантів цих генів на перебіг раннього неонатального періоду та виникнення перинатальної патології новонароджених.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Нами було обстежено 235 новонароджених з тяжкою перинатальною патологією (128 хлопчиків та 107 дівчаток), з них 119 (65 хлопчиків та 54 дівчинки) мали гестаційний вік 28-37 тижнів, а 116 (63 хлопчики та 53 дівчинки) – 38-40 тижнів. Хворі новонароджені перебували на лікуванні у спеціалізованих неонатологічних відділеннях, у яких їм було проведено клініко-лабораторне, інструментальне обстеження та встановлено діагноз. Критерієм виключення була наявність у новонароджених уроджених вад та аномалій розвитку.

Серед 235 новонароджених з тяжкою перинатальною патологією у 201 (85,53%) дитини перебіг раннього неонатального періоду був ускладнений клінічними проявами перинатальної асфіксії та перинатального гіпоксично-ішемічного ушкодження мозку, 151 (64,26%) новонароджений мав респіраторний дистрес-синдром (РДС), 69 (29,36%) – некротичний ентероколіт (НЕК), 84 (35,74%) – неонатальну жовтяницю.

110 клінічно здорових доношених новонароджених (48 хлопчиків та 62 дівчинки) склали групу контролю. Кількість хлопчиків та дівчат у

групах обстежених новонароджених вірогідно не розрізнялася ($p > 0,05$).

Для молекулярно-генетичного дослідження використовували зразки пуповинної та периферійної крові новонароджених, яку забирали у пробірки з ЕДТА в кількості 2,7 мл. Виділення ДНК проводили з використанням комерційного набору «ДНК-сорб-В». Ампліфікація фрагментів гену *ACE* здійснювалась з використанням алель-

специфічної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням праймерів Lechin M. [9] та їх подальшою детекцією в 2 % агарозному гелі. При наявності продукту ампліфікації розміром 490 пар нуклеотидів (інсерційний поліморфізм) генотип новонародженого позначався як *II*, продукту ампліфікації розміром 190 пар нуклеотидів (делеційний поліморфізм) – *DD*, а обох продуктів ампліфікації – *ID* (рис.1).

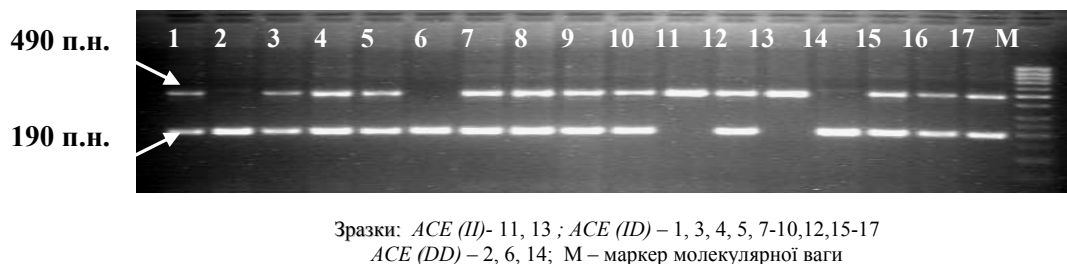


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації при аналізі поліморфізму гену *ACE*

Визначення поліморфного варіанту *A1166C* гену *AT2R1* проводилось також із використанням рестрикційного аналізу продуктів ПЛР. Продукти ампліфікації фрагментів ДНК гену *AT2R1* підлягали гідролітичному розщепленню за допомогою ендонуклеази рестрикції *BstDeI* при наявності сайту рестрикції. Генотип новонарод-

женого визначали в залежності від молекулярної ваги продуктів рестрикційного аналізу: при виявленні нерозщепленого фрагменту 352 пар нуклеотидів (алель *A1166*) генотип новонародженого позначали *AA*, фрагментів 238 і 114 пар нуклеотидів (алель *C1166*) – *CC*, а фрагментів 352, 238 і 114 пар нуклеотидів – *AC* (рис.2)

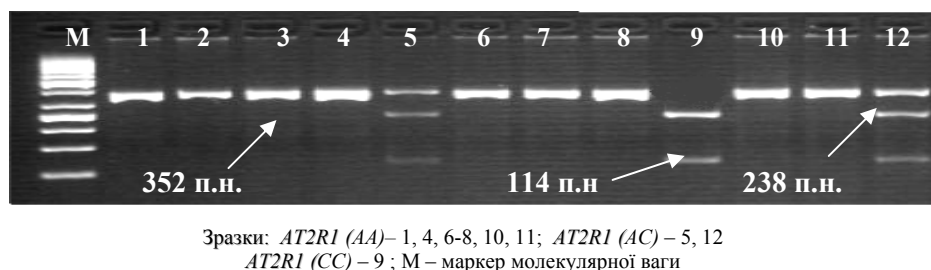


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації при аналізі поліморфізму гену *AT2R1*

Результати дослідження оброблялися за допомогою програми Statistika 6.0. Для визначення вірогідності різниці частот генотипів у порівнюваних групах застосовували критерій χ^2 та відношення шансів Odds Ratio (OR). Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Узагальнені результати нашого дослідження у всіх новонароджених (235 хворих та 110 здорових новонароджених) виявили наступний розподіл поліморфних варіантів досліджуваних генів: по гену *ACE* генотип *DD* становив 24,06%, *ID* – 50,14%, *II* – 25,80%, а по гену *AT2R1* генотип *AA* мав місце у 61,45% дітей, *AC* – у 31,04%, *CC* – у

7,54%. Таким чином, розподіл поліморфних варіантів досліджуваних генів у новонароджених вірогідно не відрізнявся від результатів, отриманих при популяційних дослідженнях серед дорослих представників української популяції [8], а по гену *ACE* повністю відповідав менделівському співвідношенню генотипів.

Дизайном нашого дослідження передбачалося проведення порівняння частот генотипів у хворих та здорових новонароджених за принципом випадок – контроль. Як видно з рисунка 1, при поділі новонароджених на дві групи – хворих з тяжкою перинатальною патологією та клінічно здорових, розподіл поліморфних варіантів досліджуваних генів уже вірогідно відрізнявся.

Отримані результати та їх статистичний аналіз вказують на асоціацію генотипів *DD* ($\chi^2=9,60$, $OR=2,58$ 95% $CI: 1,40-4,76$), *ID* ($\chi^2=6,65$, $OR=1,83$ 95% $CI: 1,15-2,89$) гену *ACE* та генотипу *CC* ($\chi^2=7,58$, $OR=6,14$ 95% $CI: 1,42-26,47$), *AC* ($\chi^2=6,38$, $OR=1,96$ 95% $CI: 1,16-3,31$) гену *AT2R1* з розвитком тяжкої перинатальної

патології у новонароджених (рис.3). У той же час для генотипу *II* гену *ACE* ($\chi^2=35,68$, $OR=0,22$ 95% $CI: 0,13-0,37$) та генотипу *AA* гену *AT2R1* ($\chi^2=15,16$, $OR=0,37$ 95% $CI: 0,22-0,62$) було виявлено протективний ефект до розвитку цієї патології.

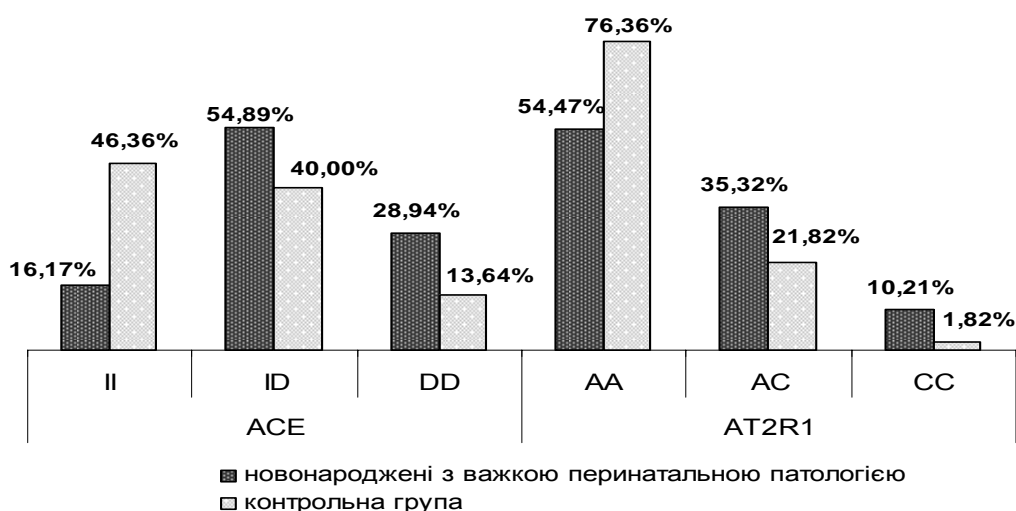


Рис.3. Розподіл частот поліморфних варіантів генів *ACE* та *AT2R1* у новонароджених з тяжкою перинатальною патологією у порівнянні з групою контролю

При аналізі результатів дослідження обстежених нами хворих новонароджених у залежності від терміну гестації не було виявлено вірогідної різниці у розподілі поліморфних варіантів генів *ACE* та *AT2R1* серед доношених та недоношених новонароджених (рис. 4), що дало можливість зробити висновок про відсутність

впливу досліджуваних поліморфних варіантів цих генів на скорочення терміну гестації, тобто недоношеність. Тому при подальшій обробці отриманих результатів нами проводився аналіз ризику розвитку неонатальної патології у новонароджених незалежно від гестаційного віку.

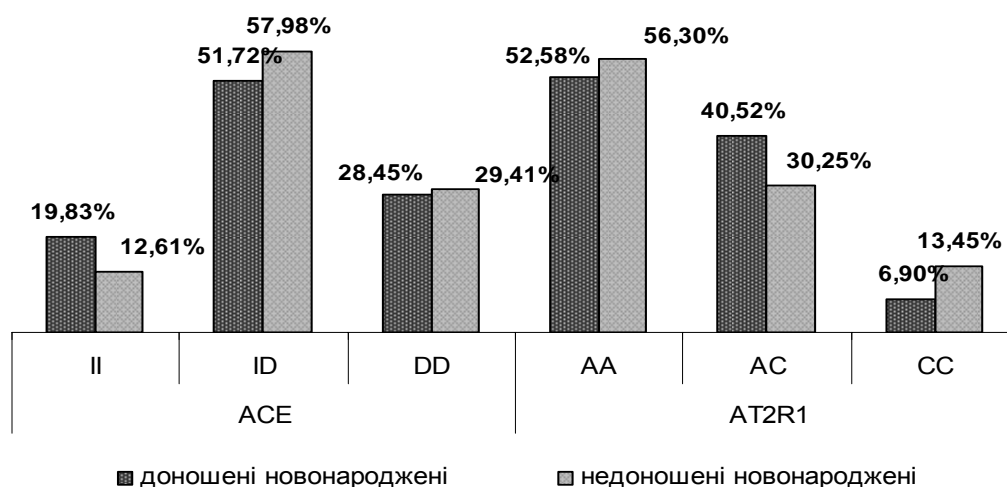


Рис. 4. Розподіл частот поліморфних варіантів генів *ACE* та *AT2R1* серед доношених та недоношених новонароджених з тяжкою перинатальною патологією

На відміну від нашого дослідження, R. Uma зі співавт. (2008) виявили асоціацію генотипу *DD* гену *ACE* з недоношеністю новонароджених, що може бути наслідком того, що переважна більшість обстежених були недоношеними, для яких характерна висока частота перинатальної патології, а також того, що серед доношених не проводився аналіз перебігу раннього неонатального періоду [10]. Отримані нами результати узгоджуються з результатами Богданової та

співавт. щодо асоціації алелю *D* поліморфного локусу гену *ACE* з розвитком РДС та визначенням генотипу *II* цього гену як маркеру стійкості до ураження легень [2].

У таблицях 1 та 2 наведено результати аналізу поліморфних варіантів генів *ACE* та *AT2R1* в обстежених нами хворих новонароджених з НЕК, неонатальною жовтяницею, РДС та у новонароджених групи контролю.

Таблиця 1

Розподіл *I/D* поліморфізму гену *ACE* у хворих з неонатальними синдромами та у клінічно здорових новонароджених

Патологічний стан	Хворі з тяжкою перинатальною патологією			Клінічно здорові новонароджені		Статистичний аналіз			
		n	%	n	%	X ²	OR	95%	p
Некротичний ентероколіт	II	8	11,59	51	46,36	23,2	0,15	0,07-0,35	<0,001
	ID	36	52,17	44	40,00	2,54	1,64	0,89-3,00	>0,05
	DD	25	36,23	15	13,64	12,48	3,6	1,73-7,49	<0,01
Неонатальна жовтяниця	II	6	7,14	51	46,36	20,57	0,09	0,04-0,22	<0,001
	ID	50	59,52	44	40,00	7,27	2,21	1,24-3,94	<0,05
	DD	28	33,33	15	13,64	10,71	3,17	1,56-6,43	<0,01
Респіраторний дистрес-синдром	II	20	13,25	51	46,36	35,25	0,18	0,10-0,32	<0,001
	ID	80	52,98	44	40,00	4,3	1,69	1,03-2,78	>0,05
	DD	51	33,77	15	13,64	13,66	3,23	1,70-6,13	<0,01

Як видно з таблиці 1, в обстежених нами хворих новонароджених виявлено асоціацію генотипу *DD* та *ID* з розвитком неонатальної жовтя-

ниці, генотипу *DD* з розвитком НЕК, РДС. Для генотипу *II* показано протективний ефект до виникнення цих неонатальних синдромів.

Таблиця 2

Розподіл *A1166C* поліморфізму гену *AT2R1* у хворих з неонатальними синдромами та у клінічно здорових новонароджених

Патологічний стан	Хворі з тяжкою перинатальною патологією			Клінічно здорові новонароджені		Статистичний аналіз			
		n	%	n	%	X ²	OR	95%	p
Некротичний ентероколіт	AA	41	59,42	84	76,36	5,78	0,45	0,24-0,87	<0,05
	AC	21	30,43	24	21,82	1,67	1,57	0,79-3,11	>0,05
	CC	7	10,14	2	1,82	6,16	6,10	1,23-30,26	<0,05
Неонатальна жовтяниця	AA	48	57,14	84	76,36	8,09	0,41	0,22-0,76	<0,05
	AC	28	33,33	24	21,82	3,22	1,99	1,05-3,76	>0,05
	CC	8	9,52	2	1,82	5,78	5,68	1,17-27,51	<0,05
Респіраторний дистрес-синдром	AA	90	59,60	84	76,36	8,05	0,46	0,26-0,79	<0,01
	AC	42	27,81	24	21,82	1,21	1,38	0,78-2,46	>0,05
	CC	19	12,58	2	1,82	9,97	7,77	1,77-34,11	<0,01

Результати статистичної обробки одержаних результатів (табл.2) переконливо свідчать про асоціацію генотипу *CC* гену *AT2R1* у новонароджених з розвитком НЕК, неонатальної жовтяниці, РДС, у той час як генотип *AA* вірогідно знижував ризик їх розвитку.

Раніше у новонароджених з тяжкою перинатальною патологією нами досліджувався вплив зазначених поліморфних варіантів генів на розвиток та перебіг перинатального гіпоксичного ушкодження [7] і було встановлено, що ступінь тяжкості перинатального гіпоксичного ушкодження вірогідно залежить від наявності генотипу *DD* або *ID*: у хворих новонароджених з тяжким гіпоксичним ушкодженням була вірогідно підвищена частота генотипу *DD*, а у хворих з помірним - генотипу *ID*. Для поліморфних варіантів гену *AT2R1* було показано, що наявність генотипу *CC* також вірогідно асоційована та збільшує ризик розвитку перинатального гіпоксичного ушкодження, але не впливає на його ступінь. Для генотипу *II* по гену *ACE* та генотипу *AA* по гену *AT2R1* було показано протективний ефект, суттєве зниження ризику розвитку гіпоксичного ушкодження в перинатальному періоді [7], як і для іншої перинатальної патології, що вивчалась у даному дослідженні. Таким чином, очевидно є однонаправленість виявленої нами асоціації генотипу *DD* та/або *ID* по гену *ACE* і генотипу *AA* по гену *AT2R1* з підвищеним ризиком розвитку тяжкої перинатальної патології в цілому та окремих синдромів (РДС, НЕК, неонатальної жовтяниці та перинатального гіпоксичного ушкодження). Для генотипу *II* по гену *ACE* та генотипу *AA* по гену *AT2R1* було показано протективний ефект і суттєве зниження ризику розвитку гіпоксичного ушкодження в перинатальному періоді [7], як і для іншої перинатальної патології, що вивчалась у даному дослідженні.

При проведенні аналізу комбінацій варіантів по генах *ACE* та *AT2R1* нами виявлено лише високовірогідну різницю частоти генотипу *II/AA* ($\chi^2=56,74$, $OR= 0,07$ 95% $CI: 0,04-0,14$). Цей генотип зустрічався значно частіше у клінічно здорових новонароджених (у 50 із 110, або 45,45%) і лише у 13 з 235 дітей (5,52%) з перинатальною патологією. Величина OR свідчить, що шанс мати тяжку перинатальну патологію у 14

разів нижчий у дітей з генотипом *II/AA*, що у порівнянні з результатами аналізу частот цих поліморфних варіантів нарізно вказує на взаємнопідсилюючу роль виявленої нами їх протективної дії.

Таким чином, певні поліморфні варіанти генів *PAC* є важливими патогенетичними чинниками розвитку тяжкої перинатальної патології та неонатальних синдромів та мають прогностичне значення. Впровадження у клінічну практику дослідження *I/D* поліморфізму гену *ACE* та поліморфізму *A1166C* гену *AT2R1* у новонароджених виглядає перспективним, оскільки проведення діагностики на доклінічній стадії сприятиме розробці ефективних заходів запобігання виникненню перинатальної патології і зниження смертності та інвалідизації від цієї тяжкої патології.

ВИСНОВКИ

1. Визначено асоціацію генотипів *DD* та *ID* гену *ACE* та генотипу *CC* гену *AT2R1* з підвищеним ризиком розвитку перинатальної патології та неонатальних синдромів.

2. Доведено вірогідне підвищення резистентності до виникнення захворювань у перинатальному періоді для новонароджених з генотипом *II* гену *ACE* та *AA* генотипом гену *AT2R1*, особливо при їх поєднанні.

3. Не виявлено зв'язку між наявністю певних поліморфних варіантів генів *ACE* та *AT2R1* і скороченням терміну гестації.

4. Необхідні подальші комплексні дослідження для оцінки доцільності використання виявлених маркерів у доклінічній діагностиці неонатальних синдромів та розробці нових методів лікування.

Автори висловлюють щире подяку генеральному директору Гладушу Ю.І. та співробітникам неонатологічних відділень НДСЛ «Охматдит», завідувачу кафедри неонатології НМАПО імені П.Л.Шупика професору Шунько Є.Є. та співробітникам цієї кафедри, співробітникам кафедри педіатрії ВДНЗ «Українська медична стоматологічна академія» (м. Полтава) доцентам Похилько В.І., Ковальовій О.М. за надану можливість і сприяння у проведенні досліджень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аналіз внеску поліморфних варіантів генів *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1* у розвиток критичних станів та органних дисфункцій у недоношених новонароджених новонароджених з низькою масою тіла /

Н.Г. Горовенко, Є.Є. Шунько, З.І. Россоха [та ін.] // Здоровье женщины. – 2010. – №5 (51). – С.180–184.

2. Богданова Р.З. Генетические маркеры дыхательных расстройств у новорождённых / Р.З. Богда-

нова, А.И. Фатыхова, К.В. Данилко // Вопросы практической педиатрии.–2008.–Т.3, №6. – С.12–16.

3. Горovenko Н.Г. Роль поліморфізму G308A гена TNF- α у розвитку перинатальної патології в новонароджених / Н.Г. Горovenko, С.П. Кир'яченко, З.І. Россоха // Здоровье женщины.–2010.–№5(51).– С.180–184.

4. Горovenko Н.Г. Роль спадкових факторів у розвитку перинатальної патології новонароджених / Н.Г. Горovenko, З.І. Россоха, С.В. Подольська // Сучасна педіатрія. – 2007. – Т.14, №1. – С.162–168.

5. Дисфункция эндотелия: связь с полиморфизмом гена рецептора (тип 1) ангиотензина II у больных ишемической болезнью сердца / Л.О. Минускина, Д. А. Затеищikov, О. Ю. Кудряшова [и др.] // Журнал кардиология.–2000.–Т.12, №1. – С. 101–106.

6. Кир'яченко С.П. Молекулярно-генетичні маркери ризику розвитку респіраторного дистрес-синдрому у новонароджених / С.П. Кир'яченко, З.І. Россоха, Н.Г. Горovenko // Збірник наук. праць. – К., Луганськ, 2010. – Вип. 19. – С.220–232.

7. Пат. 47651 Україна, МПК А61В10/00. Спосіб прогнозування ризику розвитку перинатального гіпоксичного ушкодження у новонароджених / Горovenko Н.Г., Кир'яченко С.П., Россоха З.І., Подольська С.В. (Україна). –№200912914; заявл. 14.12.2009; опубл.10.02.2010, Бюл. № 3.

8. Частота поліморфізму генів ангиотензин-перетворювального ферменту (I/D), рецептора ангиотензину II першого типу (a1166c), ендотеліальної NO-синтази (T894G), рецептора PPAR- γ 2 (Pro12Ala), β 1-адренорецептора (Arg389Gly) у хворих на артеріальну гіпертензію у західно-українській популяції (Буковина) / Л.П. Сидорчук, К.М. Амосова, Р.А. Волков [та ін.] // Збірник наукових праць НМАПО імені П.Л. Шупика.– 2009. – Вип.16. – С. 346 – 361.

9. Angiotensin-I converting enzyme genotypes and left ventricular hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy / M. Lechin, M. Quinones, A. Omran [et al.] // Circulation. – 1995. – Vol. 92, N 7. – P. 1808–1812.

10. Correlation of angiotensin converting enzyme activity and the genotypes of the I/D polymorphism in the ACE gene with preterm birth and birth weight / R. Uma, J.S. Forsyth, D.A. Struthers, G.F. Callum // Eur. J. Obstetrics & Gynecology.–2008.–Vol.141, N 1. – P.27–30.

11. The role of RAS genes polymorphism in the development risk of RDS in newborns / N.G. Gorovenko, S.P. Kyryachenko, Z.I. Rossokha [et al.] // Annual congress European Respiratory Society. – Barselona, Spain, 2010.

