



# АСОЦІАЦІЯ ДЕЛЕЦІЙНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА *GSTT2B* ЗІ СКОРОЧЕННЯМ ГЕСТАЦІЙНОГО ВІКУ ТА РОЗВИТКОМ КРИТИЧНИХ СТАНІВ У НОВОНАРОДЖЕНИХ

З.І. Россоха<sup>1</sup>, С.П. Кир'яченко<sup>1</sup>, В.І. Похилько<sup>3</sup>, О.М. Ковальова<sup>3</sup>, Н.Г. Горовенко<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Державна установа «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України»  
<sup>2</sup>Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика  
<sup>3</sup>ВДНЗ «Українська медична стоматологічна академія»

## Резюме

Поширення делеційного поліморфізму гена *GSTT2B* проаналізовано у 228 новонароджених. Виявлено асоціацію генотипу del/del за геном *GSTT2B* зі зростанням ризику розвитку передчасного народження та перинатальної асфіксії і РДС у передчасно народжених дітей. За наявності гетерозиготного варіанта гена *GSTT2B* у новонароджених знижувався ризик передчасного народження та розвитку клінічних проявів перинатальної асфіксії і РДС у ранньому неонатальному періоді.

**Ключові слова:** делеційний варіант, ген *GSTT2B*, критичні стани.

Успіхи у вивченні геному людини посприяли широкому впровадженню молекулярно-генетичних досліджень у різні галузі сучасної клінічної медицини. На сьогодні спостерігається «генетизація» клінічної медицини та поява нових напрямків медичної науки, заснованих на застосуванні нових генетичних технологій, а поява предиктивної медицини в минулому десятиріччі дала

початок новим напрямкам медичної науки. Концептуальна основа предиктивної медицини була пов'язана з уявленням про генетичний поліморфізм [1, 2]. На відміну від мутацій, що можуть викликати патологічні зміни і знижувати життєздатність організму, генетичний поліморфізм не має виразного ефекту у фенотипі. Але вплив поліморфних варіантів генів на структуру і функціональну активність ензимів може мати різний харак-

тер від нейтрального, незначного до суттєвого з повною втратою функції або зниженням функціональної активності. За певних умов зовнішнього середовища або впливу екзогенних чинників такий поліморфізм може сприяти або, навпаки, перешкоджати клінічній маніфестації різноманітних мультифакторних захворювань [2]. Сполучення певних варіантів різних генів, залучених до патогенезу конкретної патології, одержали назву «генних мереж» [1, 3, 4]. Складання «генної мережі» для мультифакторних патологічних станів та захворювань неонатального періоду, ідентифікація головних генів і генів-модифікаторів, аналіз асоціації їх поліморфізму, розробка на цій основі комплексу профілактичних заходів на сьогодні є необхідними для покращення здоров'я новонароджених.

Проведені попередні дослідження генетичної компоненти в розвитку перинатальних захворювань виявили асоціації між делеційними варіантами генів сімейства глутатіон-S-трансфераз (GSTs) та розвитком перинатальної патології в новонароджених. Була доведена роль делеційного поліморфізму генів GSTs, які кодують ферменти антиоксидантного захисту клітинного рівня, у патологічному перебігу раннього неонатального періоду та розвитку критичних станів гіпоксичного генезу в новонароджених [3, 4].

У перших роботах, виконаних на базі Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика (м. Київ) [3, 4], було проаналізовано внесок поширених поліморфних варіантів генів глутатіон-S-трансферази T1 (*GSTT1*) і глутатіон-S-трансферази M1 (*GSTM1*) у розвиток респіраторного дистрес-синдрому (РДС) новонароджених — поширеної мультифакторної патології новонароджених. Було встановлено, що ризик розвитку синдрому збільшується за наявності в новонародженого делеційного поліморфізму гена *GSTT1* і значно підвищується при поєднанні делеційного поліморфізму генів *GSTT1* та *GSTM1*. Також було доведено, що в новонароджених — носіїв нефункціонального (делеційного) алеля гена *GSTT1* у 6,7 разів підвищується ризик

інтранатальної асфіксії. З огляду на результати цих робіт, вивчення внеску інших поширених поліморфних варіантів генів сімейства GST у розвиток РДС є необхідним для відтворення молекулярного профілю вказаного патологічного стану. Відомо, що білкові продукти, які кодуються генами *GSTT1* та *GSTT2*, мають на 55% ідентичну амінокислотну послідовність [5]. Як і *GSTT1*, так і *GSTT2* відіграє значну роль у захисті клітин від токсичних продуктів перекисного окислення ліпідів [6], які є основним джерелом ендогенних ушкоджень ДНК в організмі людини та, у свою чергу, сприяють розвитку різних генетично зумовлених захворювань [7]. Експериментально встановлено, що подвійна делеція у гені *GSTT2B*, який є копією гена *GSTT2*, призводить також і до значного зниження експресії інших генів цієї родини [4], тобто має регуляторну функцію, але, на жаль, механізм даного процесу вивчено недостатньо [8]. Існує гіпотеза, що делеція в гені *GSTT2B* впливає безпосередньо на фланкуючий регіон гена *GSTT2*, що призводить до екстремально низької експресії матричної РНК цього гена і, як наслідок, зниженого синтезу ензиму або його відсутності. У програмі НарМар наведено інформацію про частоту подвійної делеції гена *GSTT2B* в європейській популяції — до 41,6%, в азіатській популяції — до 29,2%. Виходячи з широкої поширеності делеційного поліморфізму гена *GSTT2B* та його значного впливу на продукцію ензиму глутатіон S-трансферази тета-2, доцільно вивчити вплив цього поліморфізму на розвиток РДС та інших неонатальних патологій.

Ізоензимами родини GSTs є цитозольними ферментами, які беруть участь у клітинних механізмах антиоксидантного захисту та знешкодження токсичних субстанцій, ліків, ендогенних метаболітів, що навіть сприяють виникненню резистентності до лікарських препаратів, пестицидів та гербіцидів. Ізоензими *GSTT1* і *GSTT2* на 55% мають однакову амінокислотну послідовність, але вони дещо відрізняються своєю субстратною специфічністю: *GSTT1* активно зв'язує дихлоретан та його похідні, тоді як *GSTT2* проявляє більшу специфічність до знешкодження токсичних



продуктів кисню та перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), які є основним джерелом ендогенних ушкоджень організму людини. Різними дослідниками була встановлена важлива роль родини GSTs у захисті клітин головного мозку від шкідливої дії різноманітних отруйних речовин, таких як поліциклічний ароматичний гідрокарбонат, тютюну та продукти нафтопереробки [11]. Досить докладно вивчено роль гена *GSTT1* у носіїв алейного функціонального варіанта в розвиток резистентності до хіміотерапії пухлин головного мозку [12]. Для ізоензиму *GSTT1* не характерна висока експресія в мозку, як це було визначено для гена *GSTT2*, який бере участь у безпосередньому забезпеченні функціонування головного мозку. Досі їх взаємодія достатньо не вивчена. Але водночас експериментально встановлено значне зниження експресії гена *GSTT2* за наявності одного делеційного алейя гена *GSTT2B* і мінімальна експресія при генотипі *del/del* (подвійній делеції гена). Можливо, це опосередковано впливає на метаболічні процеси в головному мозку в стані асфіксії, яка важче переноситься дітьми з нульовим генотипом (делеційним варіантом) за геном *GSTT2B*. **Метою роботи** було дослідження впливу делеційного поліморфізму гена *GSTT2B* на ризик розвитку респіраторного дистрес-синдрому (РДС) та перинатальної асфіксії в новонароджених.

## Матеріали та методи

Загалом на наявність делеційного поліморфізму гена *GSTT2B* було обстежено 228 новонароджених (разом із групою порівняння), із них 120 передчасно народжених дітей (гестаційний вік — 22-37 тижнів) та 108 доношених новонароджених дітей (гестаційний вік — 38-41 тиждень). Усі передчасно народжені діти та 69 доношених хворих дітей проходили лікування з приводу перинатальної асфіксії та/або РДС у відділеннях інтенсивної терапії новонароджених міського клінічного пологового будинку міста Полтави та міського пологового будинку міста Кременчука. Групу порівняння становили 39 здорових доношених новонародже-

них із пологового будинку міста Полтави. На проведення дослідження було отримано дозвіл Етичного комітету. Батьки всіх дітей надали письмову згоду на участь у дослідженні.

Серед передчасно народжених дітей клінічні ознаки РДС-синдрому було виявлено в 79,10% пацієнтів, а перинатальна асфіксія була діагностована в 42,24% пацієнтів (табл. 1). Серед доношених новонароджених переважали клінічні ознаки перинатальної асфіксії, яка була виявлена в 57,76% пацієнтів та супроводжувалась у 20,9% випадків респіраторним дистресом (табл. 1). Співвідношення хлопчиків та дівчаток серед новонароджених із перинатальною асфіксією та РДС вірогідно не відрізнялось.

**Таблиця 1**

Клінічна характеристика новонароджених з урахуванням гестаційного віку

Групи новонароджених	Хворі на РДС (n=134)	Хворі на перинатальну асфіксію (n=116)	Група порівняння (n=39)
	n/%	n/%	n/%
Доношені	28/20,90	67/57,76	39/100
Передчасно народжені	106/79,10	49/42,24	0/0

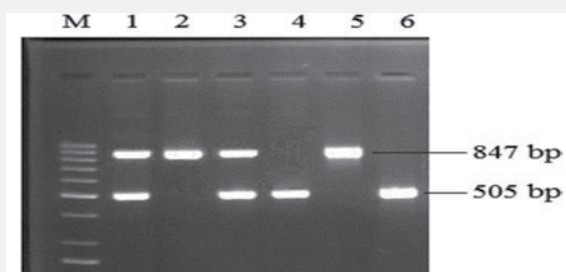
Матеріалом для молекулярно-генетичного дослідження слугувала пуповинна кров новонароджених. Генетичний матеріал із крові виділяли за допомогою комерційного набору (ZymoResearch, США). Ампліфікація специфічних фрагментів ДНК проводилася з використанням комерційного набору для ампліфікації «Dream Taq PCR Master Mix» виробництва Thermo Scientific (США) та алейспецифічних праймерів. Умови ампліфікації та послідовності праймерів були взяті з роботи Zhao Y. зі співавторами [8]. Продукти ампліфікації розподіляли відповідно до молекулярної ваги за допомогою електрофорезу у 2% агарозному гелі із забарвленням бромистим етидієм та подальшою візуалізацією в ультрафіолетовому випромінненні за допомогою системи Vitran.

У результаті полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) синтезувалися фрагменти

**Рисунок 1**

Електрофореграма розподілу продуктів ампліфікації гена *GSTT2B*:

М — маркер молекулярної ваги; 1,3 — гетерозиготні носії делеції (геноти *del/N*); 4,6 — гомозиготи за делецією (генотип *del/del*); 2,5 — гомозиготні носії алельного варіанта (генотип *N/N*)



алельного (функціонального) варіанта гена довжиною 847 пар нуклеотидів (п.н.) та делеційного (нефункціонального) варіанта гена довжиною 505 п.н. Електрофореграму з наявними делеційними та алельними варіантами гена *GSTT2B* наведено на рис. 1.

Отримані результати молекулярно-генетичного дослідження підлягали статистичній обробці програмами MSExcel 2010 (ліцензійний номер K9366093I 2016) та MEDCALC (онлайн-версія: <https://www.medcalc.org>). Для порівняння розподілу частот у двох вибірках використовували критерій  $\chi^2$  та відношення шансів Odds Ratio (OR). Статистично значущими вважали відмінності при  $p < 0,05$ .

**Результати та їх обговорення**

Делеційний поліморфізм гена *GSTT2B* було неодноразово досліджено після його ідентифікації Zhao та співавт. у 2009 році як предиктор розвитку мультифакторних захворювань, зумовлених оксидативним стресом [2]. Більшість згаданих досліджень була побудована за принципом випадок-контроль. У нашому дослідженні (рис. 2), побудованому також за принципом випадок-контроль, частота делеційного поліморфізму гена *GSTT2B* була найменшою в новонароджених групі порівняння та вірогідно відрізнялась від загальної групи хворих новонароджених ( $\chi^2=9,31$ ,  $p < 0,05$ ; OR=3,86 (95% CI: 1,55-9,67)). Гетерозиготний варіант гена *GSTT2B* був вірогідно підвищеним у новонароджених групі порівняння на відміну від хворих новонароджених ( $\chi^2=6,48$ ,  $p < 0,05$ ;

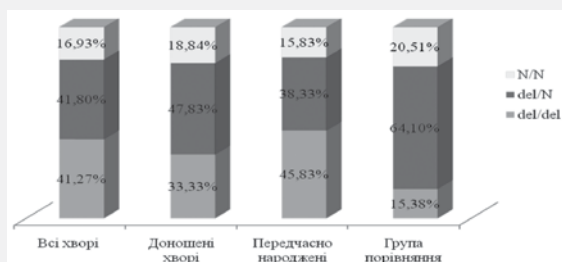
OR=0,4 (95% CI: 0,2-0,82)), для нього було встановлено протективний ефект до розвитку критичних станів новонароджених (рис. 2). Частота поширення генотипу *del/del* була вірогідно підвищеною у хворих доношених ( $\chi^2=4,09$ ,  $p < 0,05$ ; OR=2,75 (95% CI: 1,01-7,5)) та передчасно народжених дітей ( $\chi^2=11,54$ ,  $p < 0,05$ ; OR=4,65 (95% CI: 1,82-11,93)) порівняно з новонародженими групі порівняння. Гетерозиготний варіант делеційного варіанта гена *GSTT2B* був вірогідно підвищеним у групі порівняння на відміну від хворих передчасно народжених дітей ( $\chi^2=7,91$ ,  $p < 0,05$ ; OR=0,35 (95% CI: 0,16-0,74)).

При проведенні порівняльного аналізу залежно від наявних клінічних ознак РДС нами було виявлено вірогідне підвищення частоти поширення генотипу *del/del* ( $\chi^2=9,16$ ,  $p < 0,05$ ; OR=3,95 (95% CI: 1,55-10,06)) серед загальної групи хворих новонароджених (рис. 3). Водночас у новонароджених групі порівняння вірогідно частіше було виявлено генотип *del/N* ( $\chi^2=7,83$ ,  $p < 0,05$ ; OR=0,36 (95% CI: 0,17-0,74)) на відміну від новонароджених із клінічними ознаками РДС.

Проаналізувавши окремо групи доношених та передчасно народжених дітей із клінічними ознаками РДС (рис. 3) на відміну від групи порівняння нами було встановлено, що ризик розвитку РДС асоційований із генотипом *del/del* ( $\chi^2=12,15$ ,  $p < 0,05$ ; OR=4,91 (95% CI: 1,9-12,69)) лише в підгрупі передчасно народжених дітей, тоді як у доношених хворих не було виявлено зв'язку між генотипом *del/del* та зростанням ри-

**Рисунок 2**

Розподіл частот генотипів за делеційним поліморфізмом гена *GSTT2B* серед обстежених новонароджених відділень інтенсивної терапії та групи порівняння



**Рисунок 3**

Розподіл частот генотипів за делеційним поліморфізмом гена *GSTT2B* серед обстежених хворих новонароджених із РДС та групи порівняння

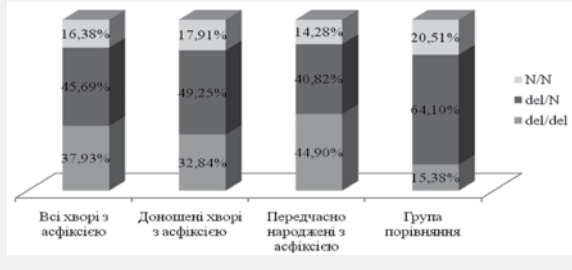


зику розвитку РДС. Також нами було встановлено протективний ефект до розвитку РДС у передчасно народжених дітей із генотипом del/N ( $\chi^2=9,93$ ,  $p<0,05$ ; OR=0,3 (95% CI: 0,14-0,65)), але не виявлено такого ефекту в доношених хворих ( $\chi^2=0,75$ ,  $p>0,05$ ; OR=0,65 (95% CI: 0,24-1,74)). Порівнявши між собою підгрупи доношених та передчасно народжених хворих із РДС виявлено вірогідну різницю за генотипом del/del. Вірогідно частіше генотип del/del траплявся в передчасно народжених дітей ( $\chi^2=6,03$ ,  $p<0,05$ ). Отже, генотип del/del, за результатами нашого дослідження, підвищує ризик розвитку РДС у передчасно народжених дітей.

При проведенні статистичного аналізу встановлено асоціацію між генотипом del/del ( $\chi^2=6,79$ ,  $p<0,05$ ; OR=3,36 (95% CI: 1,3-8,67)) та зростанням ризику розвитку перинатальної асфіксії. Виявлено, що в дітей із перинатальною асфіксією частота подвійної делеції гена *GSTT2B* була вірогідно вищою, ніж у групі порівняння (рис. 4). Поряд із тим, при порівнянні доношених новонароджених, які мали перинатальну асфіксію, з новонародженими групи порівнян-

**Рисунок 4**

Розподіл частот генотипів за делеційним поліморфізмом гена *GSTT2B* серед обстежених хворих новонароджених із перинатальною асфіксією та групи порівняння



ня жодних відмінностей виявлено не було, тоді як у передчасно народжених дітей знайдено зв'язок між наявністю генотипу del/del ( $\chi^2=8,72$ ,  $p<0,05$ ; OR=4,48 (95% CI: 1,59-12,63)) та розвитком перинатальної асфіксії. А наявність гетерозиготного варіанта гена (генотип del/N) у передчасно народжених дітей знижувала ризик розвитку перинатальної асфіксії ( $\chi^2=4,71$ ;  $p<0,05$ , OR=0,39 (95% CI: 0,16-0,92)). У наступній табл. 2 наведено результати аналізу поширення дослідженого варіанта гена залежно від тяжкості перинатальної асфіксії.

Нами встановлено, що делеційний варіант гена *GSTT2B* (табл. 2) вірогідно асоційований зі зростанням ризику розвитку в новонароджених як помірної ( $\chi^2=4,08$ ,  $p<0,05$ ; OR=2,95 (95% CI: 1,01-7,96)), так і тяжкої асфіксії ( $\chi^2=7,01$ ,  $p<0,05$ ; OR=3,65 (95% CI: 1,31-8,93)). За наявності гетерозиготного варіанта гена був вірогідно зниженим ризик розвитку помірної асфіксії ( $\chi^2=4,18$ ,  $p<0,05$ ; OR=0,45 (95% CI: 0,2-0,98)), тоді як асоціації з розвитком тяжкої асфіксії ( $\chi^2=1,94$ ,  $p>0,05$ ; OR=0,53 (95% CI: 0,23-1,3)) визначено не було (табл. 2). Зважаючи на переважний вплив

**Таблиця 2**

Розподіл частот генотипів за делеційним поліморфізмом гена *GSTT2B* серед обстежених хворих новонароджених із перинатальною асфіксією залежно від ступеня її тяжкості та в групі порівняння

Генотипи	Перинатальна асфіксія тяжка (n=43)		Перинатальна асфіксія помірна (n=73)		Група порівняння (n=39)	
	n	%	n	%	n	%
del/del	15	34,88	29	39,73	6	15,38
del/N	21	48,84	32	43,84	25	64,10
N/N	7	16,28	12	16,44	8	20,51

**Таблиця 3**

Розподіл частот генотипів за делеційним поліморфізмом гена *GSTT2B* залежно від гестаційного віку обстежених новонароджених

Генотип	Доношені новонароджені (n=108)		Передчасно народжені діти (n=120)	
	n	%	n	%
del/del	29	26,85	55	45,83
del/N	58	53,70	46	38,33
N/N	21	19,44	19	15,83

генотипу del/del на зростання ризику РДС та перинатальної асфіксії в передчасно народжених дітей, нами було проаналізовано частоту поширення генотипів залежно від гестаційного віку. Частоту розподілу делеційного поліморфізму гена *GSTT2B* серед усіх доношених та передчасно народжених дітей представлено в табл. 3.

Як видно з табл. 3, при проведенні порівняльного аналізу між групою доношених новонароджених та передчасно народжених дітей встановлено вірогідний зв'язок між передчасним народженням та наявністю генотипу del/del ( $\chi^2=8,00$ ,  $p<0,05$ ; OR=2,31 (95% CI: 1,32-4,02)). За наявності генотипу del/N ризик передчасного народження вірогідно знижувався ( $\chi^2=4,81$ ,  $p<0,05$ ; OR=1,87 (95% CI: 1,10-3,16)).

У роботі Bustamante M. зі співавт. було вивчено взаємозв'язок між материнським та фетальним генотипами за поліморфними варіантами генів GSTs та небажаними наслідками вагітності [10]. Було з'ясовано, що саме фетальний генотип за генами *GSTT2B* та *GSTM1* був асоційований із зростанням ризику переривання вагітності та скорочення гестаційного віку новонароджених. За результатами нашої роботи доведено асоціацію делеційного поліморфізму *GSTT2B* зі скороченням гестаційного віку та розвитком перинатальної асфіксії і РДС у передчасно

народжених дітей. Італійськими дослідниками не було доведено впливу делеційного поліморфізму *GSTT2B* на розвиток мультифакторних захворювань, але згадане дослідження виконувалося серед дорослих осіб. Іоріо А. та співавт. у 2015 році було зазначено, що порівняльне дослідження впливу гена *GSTT2B* виконується вперше і тому потребує подальшого аналізу в більшій когорті та в інших національних вибірках [2]. Нами було визначено переконливу асоціацію генотипу del/del за геном *GSTT2B* із передчасним народженням та розвитком перинатальної асфіксії і РДС у передчасно народжених дітей, але необхідний подальший клінічний аналіз для розробки індивідуалізованих схем профілактики та лікування з урахуванням генетичних особливостей пацієнтів.

## Висновки

Виявлено асоціацію генотипу del/del за геном *GSTT2B* зі зростанням ризику розвитку передчасного народження та перинатальної асфіксії й РДС у передчасно народжених дітей. За наявності гетерозиготного варіанта гена *GSTT2B* у новонароджених знижувався ризик передчасного народження та розвитку клінічних проявів перинатальної асфіксії й РДС у ранньому неонатальному періоді.

Надійшла до редакції 25.05.2018 р.



## Список використаної літератури

1. Баранов В.С. Геном человека и гены предрасположенности (Введение в предиктивную медицину) / В.С. Баранов, Е.В. Баранова, Т.Э. Иващенко. — СПб: Интермедика, 2000. — 271 с.
2. Iorio A., Polimanti R., Calandro M., Graziano M.E. Explorative genetic association study of *GSTT2B* copy number variant in complex disease risks // *Ann. Hum. Biol.* — 2015. — P. 1-6. Doi: 10.3109/03014460.2015.1049206.
3. Россоха З.І. Роль генетичних та середовищних факторів у розвитку патологічних станів на ранніх етапах онтогенезу: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 03.00.15 «Генетика» / З.І. Россоха; Науковий центр радіаційної медицини АМН України. — К., 2007. — 26 с.
4. Горовенко Н.Г., Россоха З.І., Подольська С.В. Роль генетичних факторів у розвитку респіраторного дистрес-синдрому новонароджених // *Медичні перспективи.* — 2006. — Т. XI, № 3. — С. 163-170.
5. Tan K.L., Webb G.C., Baker R.T., Board P.G. Molecular cloning of a cDNA and chromosomal localization of a human theta-class glutathione S-transferase gene (*GSTT2*) to chromosome 22 // *Genomics.* — 1995. — Vol. 25. — P. 381-387.
6. Tan K.L. Purification and characterization of a recombinant human Theta-class glutathione transferase (*GSTT2-2*) // *Biochem. J.* — 1996. — Vol. 315. — P. 727-732.
7. Marnett L.J. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage // *Toxicology.* — 2002. — Vol. 181-182. — P. 219-222.
8. Zhao Y., Marotta M., Eichler E.E., Eng C. Linkage disequilibrium between two high-frequency deletion polymorphisms: implications for association studies involving the glutathione-S transferase (*GST*) genes // *PLoS Genetics.* — 2009. — Vol. 5, № 5. — P. e1000472.
9. Coggan M., Whitbread L., Whittington A., Board P. Structure and organization of the human theta-class glutathione S-transferase and D-dopachrome tautomerase gene complex // *Biochem. J.* — 1998. — Vol. 334, № 3. — P. 617-623.
10. Bustamante M., Danileviciute A., Espinosa A., Gonzalez J.R., Subirana I. Influence of fetal glutathione S-transferase copy number variants on adverse reproductive outcomes // *BJOG.* — 2012. — Vol. 119. — P. 1141-1146.
11. Wang S., Chanock S., Tang D., Li Z. Gene-environment interactions on mental development in African American, Dominican, and Caucasian Mothers and Newborns // *Ann. Hum. Genet.* — 2010. — Vol. 74, № 1. — P. 46-56.
12. Diedrich A., Bock H.C., König F., Schulz T.G. Expression of glutathione S-transferase T1 (*GSTT1*) in human brain tumours // *Histol. Histopathol.* — 2006. — Vol. 21, № 11. — P. 1199-1207.

## Association of *GSTT2B* gene deletion polymorphism with gestational age reduction and development of critical conditions in newborns

Z. Rossokha, S. Kyriachenko, V. Pokhylko, O. Kovalova, N. Gorovenko

### Abstract

The distribution of *GSTT2B* gene deletion polymorphism was analyzed in 228 newborns. The association of del/del genotype in *GSTT2B* gene with increased risk of premature birth and perinatal asphyxia, RDS in premature babies has been revealed. The presence of a heterozygous variant in *GSTT2B* gene in newborns was associated with decreased risk of premature birth and development of perinatal asphyxia and RDS clinical manifestations in early neonatal period.

**Keywords:** deletion variant, *GSTT2B* gene, critical states, newborns.