

DOI 10.29254/2077-4214-2017-4-3-141-95-100

УДК 612.6.05-02:616-03688-02:616.831-005.1]-053.32

Артёмова Н. С., Ковальова О. М., Похилько В. І., Цвіренко С. М., Жук Л. А.

## РОЛЬ 4a4b ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНУ eNOS У РОЗВИТКУ ЛЕТАЛЬНИХ НАСЛІДКІВ ПРИ ВАЖКИХ ВНУТРІШНЬО-ШЛУНОЧКОВИХ КРОВОВИЛИВАХ У ПЕРЕДЧАСНО НАРОДЖЕНИХ ДІТЕЙ

ВДНЗ «Українська медична стоматологічна академія» (м. Полтава)

umsakaped@ukr.net

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами:** представлена публікація є фрагментом НДР Державної установи «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології Національної Академії медичних наук України», державний реєстраційний номер: 0117U004538 «Розробити та впровадити систему медико-психологічного супроводу для новонароджених груп ризику з формуванням хронічних захворювань, інвалідності та затримки розвитку».

**Вступ.** Важкі внутрішньо-шлуночкові крововиливи (ВШК) у передчасно народжених дітей є однією з основних педіатричних проблем громадського здоров'я [16,22], так як упродовж останніх 20 років смертність при цьому захворюванні не зменшується, а до 50% немовлят, які вижили, мають когнітивні та розвиткові порушення [13,23,25]. У Полтавській області, починаючи з 2010 року, показники летальності при ВШК серед передчасно народжених дітей, як і загалом в Україні, не знижуються і становлять 20-21% [2]. Низка клінічних досліджень доводить багатофакторність етіології виникнення захворювань у передчасно народжених дітей [18,19], при цьому, все більше з'являється наукових робіт, які доводять вплив на розвиток патології не тільки факторів навколишнього середовища, але й геному людини [1,3].

На сьогодні відомі основні патофізіологічні механізми розвитку ВШК, основними з яких є запалення, порушення коагуляції та ангіогенезу [8,9], тому ми припустили, що саме гени-кандидати, які кодуєть ці механізми, можуть бути факторами ризику розвитку ВШК та його несприятливих наслідків.

Ренін-ангіотензинова система (РАС) приймає важливу участь у регулюванні системного артеріального тиску та об'єму крові, а її генетичні модифікації можуть вплинути на наслідки захворювань неонатального періоду у передчасно народжених немовлят. У попередніх дослідженнях було повідомлено про можливий зв'язок між поліморфізмом ангіотензин-перетворюючого ферменту (АСЕ), рецептором ангіотензину 1 типу (AGTR1) та ризиком розвитку бронхо-легеневої дисплазії [5,24], ретинопатії [18], синдрому артеріальної гіпотензії [1], асфіксії новонародженого [3]. Літературні джерела свідчать про

сприятливий вплив окису азоту (NO) на ріст та захист судин у передчасно народжених дітей [4], що підтверджується даними про зв'язок між активністю генів ендотеліальної NO-синтази (eNOS) та ризиком розвитку ВШК у цій популяції [14], тобто судинні дії eNOS можуть бути критичними у запобіганні крововиливів у мозок, який розвивається.

На підставі цих міркувань, ми висунули гіпотезу, що на виникнення важких ВШК, а також їх несприятливих наслідків, може впливати поліморфізм у генах, які кодуєть фермент eNOS та білки ренін-ангіотензинової системи (AGTR1, ACE).

**Мета дослідження:** підтвердити гіпотезу, що розвиток важких ВШК, а також їх несприятливих наслідків, у передчасно народжених дітей, пов'язаний з поліморфізмом генів eNOS, AGTR1 та ACE.

**Об'єкт і методи дослідження.** Проведено проспективне дослідження, в яке включено 97 передчасно народжених дітей (хлопчиків – 54 [55,67%], дівчаток – 43 [44,33%]), які лікувалися в акушерських та дитячих лікувальних установах Полтавської області упродовж 2012-2015 рр. Критеріями відбору дітей до групи дослідження стали: гестаційний вік менше за 34 тижнів, маса тіла при народженні менше 2000 г. Факторами виключення стали: наявність вроджених аномалій розвитку, маса новонародженого більше 2000 г при народженні, підтверджена TORCH-інфекція, діти, народжені від багатоплідної вагітності, з яких одна дитина померла. У подальшому, для доведення ролі поліморфних варіантів генів PАС на розвиток летальних випадків, діти з ВШК важкого ступеня були розподілені на 2 групи: у першу групу включено немовлят, які вижили, а у другу групу – немовлят, перебіг захворювання у яких завершився летальним наслідком. Клінічні та демографічні дані дітей, включених у дослідження, представлені у **таблиці 1**.

Діагностика ВШК відбувалась шляхом проведення новонародженим нейросонографії. Огляд відбувався щонайменше три рази за період перебування у стаціонарі. Стадії ВШК виставлялися за класифікацією Papile [12]. У групу дітей з важкими ВШК віднесено немовлят з III-IV ст.

Метою нашого дослідження було оцінити вплив на розвиток летальних випадків таких факторів:

маси тіла (г) та гестаційного віку (тижні) при народженні, статі, типу пологів (вагінальні або шляхом операції кесаревого розтину), антенатальної стероїдної терапії, оцінки за шкалою Апгар на 5 хв. (бали), асфіксії (рН <7,0 у пуповинній крові та оцінка за шкалою Апгар ≤6 балів на 10 хв.), проведення інфузійної терапії в перші 7 днів життя кристалоїдами (болюс 10-15 мл/кг) та/чи кристалоїдами для лікування артеріальної гіпотензії, проведення штучної вентиляції легень та її тривалість, введення сурфактант-замісних препаратів, інших супутніх захворювань (респіраторного дистрес синдрому, сепсису, некротизуючого ентероколіту).

Таблиця 1.

**Демографічні та клінічні характеристики немовлят, включених у дослідження, M+m; n (%)**

Показники	n=97
Маса тіла при народженні (г)	1320,8±54,68
Гестаційний вік (тижн.)	29,07±0,34
Кесарев розтин	58 (59,8)
Антенатальні стероїди	37 (38,14)
Стать чоловіча	54 (55,67)
Оцінка за Апгар на 5 хвилині (бали)	6,1±0,13
Сурфактант-замісні препарати	41 (42,27)
Штучна вентиляція легень	43 (44,3)
Респіраторний дистрес синдром III-IV ст.	36 (37,11)
Сепсис	25 (25,77)
ВШК	58 (59,79)
Некротизуючий ентероколіт	5 (5,38)

Матеріалом для проведення лабораторних досліджень слугувала кров (0,25 мл) новонароджених, яку брали на 1-3 добу життя. Для визначення поліморфних варіантів генів *ACE*, *AGT2R1* та *eNOS* проводили полімеразну ланцюгову реакцію з подальшим рестрикційним аналізом продуктів реакції ампліфікації. Детекцію проводили в агарозному гелі, ампліфікацію виділеної ДНК – у реакційній суміші за M. Arand. Продукти ампліфікації ділянок генів підлягали гідролітичному розщепленню за допомогою ендонуклеази рестрикції *Afw261*. Ампліфіковані фрагменти розподіляли з використанням горизонтального електрофорезу в 1,5% агарозному гелі із забарвленням бромистим етидієм.

Для ідентифікації достовірних факторів ризику використовували покроковий логістичний регресійний аналіз. На першому етапі встановлено фактори ризику, які з достовірністю  $p < 0,1$  асоціювалися з летальними наслідками. На наступному етапі поступово виключено фактори ризику, які при множинному логістичному регресійному аналізі не асоціювалися з летальними наслідками у передчасно народжених дітей з важкими ВШК ( $p > 0,05$ ). Для кожного з потенційних факторів ризику визначено відношення шансів та 95% довірчий інтервал (ВШ; 95% ДІ). Розподіл генотипу порівнювали між групами за допомогою аналізу  $\chi^2$ . Обчислення статистичних величин проводилось за допомогою ліцензійного пакету програми STATA 11.

**Результати дослідження.** Серед передчасно народжених дітей включених у дослідження у 25 (43,86%) немовлят діагностовано сепсис, у 36 (37,11%) – респіраторний дистрес синдром (РДС), у 58 (59,79%) немовлят – важкі ВШК, у 5 (5,38%) немовлят – некротизуючий ентероколіт (НЕК). Тридцять чотири (35,05%) новонароджених з діагнозом важкі ВШК померли.

Вивчення розподілу поліморфних генотипів генів *PAC* в обстежених немовлят залежно від наявності або відсутності ВШК не виявило достовірних відмінностей (табл. 2). Генетичну модель ID+DD гену *ACE* виявлено у 84,62% немовлят без ВШК та у 77,59% дітей з важкими ВШК; генетичну модель AC+CC *ACE* гену – у 59,26% та 50,0% новонароджених, а генетичну модель ab+bb гену *eNOS* – у 28,21% та 34,48% обстежуваних, відповідно.

Таблиця 2.

**Розподіл поліморфних генотипів генів eNOS та ренін-ангіотензинової системи в обстежених немовлят з або без важких ВШК, n (%)**

Ген	Генотип	Діти без ВШК n=39	Діти з ВШК III-IV ст. n=58	p
ACE	II	6 (15,38)	13 (22,41)	0,392
	ID+DD	33 (84,62)	45 (77,59)	
AGTR1	AA	11 (40,74)	29 (50,0)	0,426
	AC+CC	16 (59,26)	29 (50,0)	
eNOS	bb	28 (71,79)	38 (65,52)	0,516
	ab+bb	11 (28,21)	20 (34,48)	

Вивчення розподілу поліморфних генотипів генів *eNOS* та ренін-ангіотензинової системи у обстежених немовлят з важкими ВШК засвідчив відсутність достовірних відмінностей у частоті генетичної моделі ID+DD гену *ACE* (83,3% та 73,53%,  $p=0,378$ ) та генетичної моделі AC+CC гену *AGTR1* (37,5% та 58,82%,  $p=0,110$ ) між дітьми, які вижили та дітьми, які померли. Натомість, різниця між частотою генетичної моделі ab+aa гену *eNOS* серед дітей двох груп виявилася на межі статистичної значущості (табл. 3). Так, домінуюча модель ab+aa гену *eNOS* частіше виявлялась серед дітей, які померли, ніж серед дітей, які вижили (44,12% та 20,83%,  $p=0,058$ ). Ми припускаємо, що зв'язок на межі статистичної значущості між генетичною моделлю 4aa+4ab *eNOS* гену та несприятливими наслідками у пацієнтів з ВШК при простому логістичному регресійному аналізі пояснюється багатофакторністю захворювання та наявністю у обстежених дітей супутньої патології (сепсису, НЕК, РДС), яка асоціюється переважно з малим гестаційним віком [11].

Тому ми проаналізували асоціації між вказаним поліморфізмом та розвитком летальних випадків у передчасно народжених дітей з ВШК шляхом множинного регресійного логістичного аналізу з корекцією дії інших факторів.

Аналіз акушерського, анте/інтранатального анамнезу матері не виявив достовірних чинників, які асоціювалися з летальними наслідками. Дослідження показало, що при простому логістичному

Таблиця 3.

**Розподіл поліморфних генотипів генів eNOS та ренін-ангіотензинової системи в обстежених немовлят з важкими ВШК, які вижили та які померли, n (%)**

Ген	Генотип	Діти з ВШК III-IV ст., які вижили, n=24	Діти з ВШК III-IV ст., які померли, n=34	p
ACE	II	4 (16,67)	9 (26,47)	0,378
	ID+DD	20 (83,33)	25 (73,53)	
AGTR1	AA	15 (62,5)	14 (41,18)	0,110
	AC+CC	9 (37,5)	20 (58,82)	
eNOS	bb	19 (79,17)	19 (55,88)	0,058
	ab+aa	5 (20,83)	15 (44,12)	

регресійному аналізі з летальними випадками достовірно асоціювалися: васа тіла при народженні, гестаційний вік, знижений артеріальний тиск на 1 добу життя, РДС III-IV ст., сепсис та генетична модель 4aa+4ab&4bb eNOS-гену (табл. 4). При множинному логістичному регресійному аналізі достовірними факторами ризику виявились менші маса тіла та гестаційний вік при народженні, важкий РДС та генотип модель 4aa+4ab eNOS гену. Тобто ab+bb генетична модель eNOS-гену є незалежним предиктором збільшення ризиків розвитку летальних наслідків у новонароджених з важкими ВШК, навіть після корекції дії ваги тіла та гестаційного віку при народженні.

**Обговорення.** Внутрішньошлуночкові крововиливи є серйозною патологією для передчасно народжених дітей, основними патогенетичними механізмами якого є ламкість судин гермінального матріксу та порушення продукції спинномозкової рідини [9,10]. Причини підвищеної проникливості та ламкості судин вже добре відомі і полягають у: прискореній проліферації ендотелію, пов'язаної з високим рівнем ендотеліального фактору росту судин та ангіопоетину-2; зниженні експресії трансформуючого фактора росту-β, порівняно з іншими ділянками мозку, які стимулюються гіпоксією [6]; високої метаболічної активності [9,10]; низькому рівні фібрoneктину в базальній мембрані [21] та у зменшенні експресії гліального фібрилярного кислотного протеїну (glial fibrillary acidic protein) в астроцитах [7]. У регуляції продукції ліквору бере участь низка вазоактивних речовин, включаючи й оксид азоту [28]. Розлади синтезу NO можуть бути результатом генетично обумовлених порушень активності eNOS. Вважається, що в присутності поліморфних варіантів гену, його ферментна активність може бути порушена [4].

У нашому дослідженні ми оцінили можливий зв'язок між поліморфізмом генів eNOS, AGTR1,

ACE та розвитком найчастішого ускладнення, яке виникає серед передчасно народжених немовлят, а саме: важких ВШК та їх несприятливих наслідків. Наші дані демонструють, що наявність a алелі 4a4b поліморфізму eNOS гену є незалежним предиктором підвищеного ризику летальних випадків у передчасно народжених немовлят.

Ми не спостерігали достовірних зв'язків між поліморфізмом генів eNOS, AGTR1, ACE та ризиком виникнення важких ВШК, які могли б підтвердити, що генетична модель 4aa+4ab eNOS-гену є фактором ризику розвитку важких ВШК. У той же час, Vannemreddy P. та ін., досліджуючи інші поліморфізми вказаного гену виявив, що серед носіїв C алелі (TC + CC) гену eNOS rs2070744 достовірно частіше виникали ВШК, ніж серед пацієнтів групи контролю і, що цей генотип є значним фактором ризику розвитку цієї патології [21]. У більш пізньому дослідженні, проведеному Poggi C. та ін., не підтверджено достовірного впливу поліморфізму генів eNOS -786T> C на розвиток ВШК [17]. Що стосується генотипу GT eNOS 894G> T, то у роботі D. Szpecht показано, що

Таблиця 4.

**Асоціації між факторами ризику та летальними наслідками у передчасно народжених дітей з важкими ВШК при простому та множинному логістичному регресійному аналізі**

Фактори ризику	Простий логістичний регресійний аналіз		Множинний логістичний регресійний аналіз	
	ВШ (95% ДІ)	p	ВШ (95% ДІ)	p
Маса тіла при народженні (г)	0,99 (0,994-0,997)	0,000	0,99 (0,996-0,999)	0,023
Гестаційний вік (тижні)	0,53 (0,41-0,68)	0,000	0,72 (0,54-0,96)	0,028
Мінімальний діастолічний АТ на 1 добу (мм рт. ст.)	0,87 (0,81-0,94)	0,001	0,93 (0,86-1,01)	0,133
РДС III-IV ст. (так, ні)	8,5 (2,29-31,62)	0,001	11,3 (2,02-63,03)	0,006
Сепсис (так, ні)	3,1 (1,03-9,3)	0,043	2,8 (0,72-10,84)	0,137
Генетична модель 4aa+4ab eNOS гену (так, ні)	2,1 (0,89-5,19)	0,086	6,05 (1,08-33,79)	0,040

діти з цим генотипом, народжені до 29 тижня вагітності, мають в 3,4 рази вищий ризик розвитку ВШК [27].

На сьогодні добре відомі патофізіологічні механізми NO, які можуть захищати головний мозок передчасно народжених дітей від ураження, а при дефіциті цієї важливої молекули, навпаки, створювати умови, що сприяють пошкодженню головного мозку і, насамперед, його найбільш чутливої до гіпоксії зони – гермінального матріксу [26]. Так, оксид азоту відіграє центральну роль у регуляції місцевого артеріального тиску, сприяє мозковій вазодилатації [15], що забезпечує адекватний кровообіг через тканини; протидіє речовинам (ендотеліну 1, ангіотензину II), що спричиняють сильний вазоконстрикцію; пригнічує агрегацію та адгезію тромбоцитів шляхом

зменшення продукції ендотелієм фактору активації тромбоцитів (PAF), а також захищає стінки судин, інгібуючи окислення ліпідів та інактивуючи вільні радикали кисню [4].

Враховуючи вирішальну роль NO у сприянні ангіогенезу протягом антенатального/неонатального періоду [27], можна обґрунтовано припустити, що носії а алелі 4ab поліморфізму eNOS гену мають підвищені ризики розвитку летальних наслідків через зменшення синтезу ендотеліального NO, який, у свою чергу, погіршує зростання та формування судин не тільки у головному мозку, а й у легенях, тим самим пояснюючи результати нашого дослідження щодо достовірного впливу РДС III-IV ст. на розвиток летальних наслідків у немовлят з ВШК. Доведено,

що у формуванні РДС також вагому роль відіграє порушення ангіо- та альвеологенезу [20].

**Висновки.** ab+bb поліморфізм eNOS гену є незалежним предиктором збільшення ризиків розвитку летальних наслідків у передчасно народжених немовлят з важкими ВШК.

**Перспективи подальших досліджень.** Майбутні дослідження поліморфізму в генах, пов'язаних із судинами та кровоотоком у головному мозку, можуть надати цінну інформацію щодо патогенетичних механізмів, які лежать в основі розвитку несприятливих наслідків при ВШК, для розроблення заходів з попередження їх розвитку та контролю за перебігом захворювання.

### Література

1. Analiz assotsyatsiy mezhdu polymorfyzmom gena angyotenzyn-prevrashchaiushchego fermenta y razvytyem arterialnoi hypotenzyy u prezhdevremenno rozhdennykh detei s bakteryalnymy ynfektsiyamy ranneho neonatalnogo peryoda / V.Y. Pokhylko, E.M. Kovaleva, Iu.Y. Cherniavskaia [i dr.] // GEORGIAN MEDICAL. – 2015. – S. 60.
2. Динамика частоты yнtrавентрыкуляриных кровозлыяниy y ykh yskhodov sredey prezhdevremenno rozhdennykh detei Poltavskoi oblasti za 2007-2016 hh / E.A. Kaliuzhka, N.S. Artemova, N.Y. Hasiuk [et al.] // Wiadomości Lekarskie. – 2017. – T. LXX, № 3 (I). – S. 493-499.
3. Korobka O.V. Asotsiatsii mizh polymorfizmom genu eNOS ta perebigom asfiksii u novonarodzhennykh / O.V. Korobka // Aktualni problemy suchasnoi medytsyny. – 2015. – № 1 (49). – S. 119-124.
4. A novel truncated form of eNOS associates with altered vascular function / E. Galluccio, L. Cassina, I. Russo [et al.] // Cardiovasc. Res. – 2014. – № 101. – P. 492-502.
5. ACE gene deletion/deletion polymorphism may be a protective factor for respiratory distress in preterm infants / E. Sivasli, M. Yurdakuc, E. Babaoglu [et al.] // Turk. J. Pediatr. – 2007. – № 49. – P. 69-74.
6. Angiogenic inhibition reduces germinal matrix hemorrhage / P. Ballabh, H. Xu, F. Hu [et al.] // Nat. Med. – 2007. – № 13. – P. 477-485.
7. Astrocyte end-feet in germinal matrix, cerebral cortex, and white matter in developing infants / N. El-Khoury, A. Braun, F. Hu [et al.] // Pediatr. Res. – 2006. – Vol. 59, № 5. – P. 673-679.
8. Baier R.J. Genetics of perinatal brain injury in the preterm infant / R.J. Baier // Front Biosci. – 2006. – № 11. – P. 1371-1387.
9. Ballabh P. Intraventricular hemorrhage in premature infants: mechanism of disease / P. Ballabh // Pediatr. Res. – 2010. – Vol. 67, № 1. – P. 1-8.
10. Ballabh P. Pathogenesis and Prevention of Intraventricular Hemorrhage / P. Ballabh // Clinics in Perinatology. – 2014. – Vol. 41, № 1. – P. 47-67.
11. Bassan H. Intracranial hemorrhage in the preterm infant: understanding it, preventing it / H. Bassan // Clin. Perinatol. – 2009. – Vol. 36, № 4. – P. 737-762.
12. Benders M.J. Neuroimaging of white matter injury, intraventricular and cerebellar hemorrhage / M.J. Benders, K.J. Kersbergen, L.S. de Vries // Clin Perinatol. – 2014. – Vol. 41, № 1. – P. 69-82.
13. Confidence in the prediction of neurodevelopmental outcome by cranial ultrasound and MRI in preterm infants / P. Nongena, A. Ederies, D.V. Azzopardi, A.D. Edwards // Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. – 2010. – Vol. 95, № 6. – P. 388-390.
14. Dani C. Inhaled nitric oxide for the treatment of preterm infants with respiratory distress syndrome / C. Dani, G. Bertini // Neonatology. – 2008. – Vol. 94, № 2. – P. 87-95.
15. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism (-786T->C) and increased risk of angiographic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage / N.U. Ko, P. Rajendran, H. Kim [et al.] // Stroke. – 2008. – Vol. 39, № 4. – P. 1103-1108.
16. Executive and memory function in adolescents born very preterm / T.M. Luu, L. Ment, W. Allan [et al.] // Pediatrics. – 2011. – Vol. 127, № 3. – P. 639-646.
17. Genetic contributions to the development of complications in preterm newborns / C. Poggi, B. Giusti, E. Gozzini [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, № 7. – P. 1-13.
18. Genetic contributions to the development of retinopathy of prematurity / S. Mohamed, K. Schaa, M.E. Cooper [et al.] // Pediatr. Res. – 2009. – Vol. 65, № 2. – P. 193-197.
19. Hallman M. Premature birth and diseases in premature infants: common genetic background? / M. Hallman // J. Matern. Fetal. Neonatal. Med. – 2012. – Vol. 25, № 1. – P. 21-24.
20. Is an endothelial nitric oxide synthase gene mutation a risk factor in the origin of intraventricular hemorrhage? / P. Vannemreddy, C. Notarianni, K. Yanamandra [et al.] // J. Neurosurg. Focus. – 2010. – Vol. 28, № 1. – P. 11.
21. Mao Y. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process / Y. Mao, J.E. Schwarzbauer // Matrix Biol. – 2005. – Vol. 24, № 6. – P. 389-399.
22. Neonatal head ultrasound abnormalities in preterm infants and adolescent psychiatric disorders / A.H. Whitaker, J.F. Feldman, J.M. Lorenz [et al.] // Arch. Gen. Psychiatry. – 2011. – Vol. 68. – P. 742-752.
23. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network / B.J. Stoll, N.I. Hansen, E.F. Bell [et al.] // Pediatrics. – 2010. – Vol. 126, № 3. – P. 443-456.

24. Polymorphisms in the Renin-Angiotensin system and outcome of very-low-birthweight infants / J. Spiegler, A. Gilhaus, I.R. Konig [et al.] // Neonatology. – 2010. – Vol. 97, № 1. – P. 10-14.
25. Predictors of cerebral palsy in very preterm infants: the EPIPAGE prospective population-based cohort study / G. Beaino, B. Khoshnood, M. Kaminski [et al.] // Dev. Med. Child Neurol. – 2010. – Vol. 52, № 6. – P. 119-125.
26. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and induction of vascular endothelial growth factor in a rat neonatal stroke model / D. Mu, X. Jiang, R.A. Sheldon [et al.] // Neurobiol. Dis. – 2003. – Vol. 14, № 3. – P. 524-534.
27. Role of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 polymorphism genes with the pathogenesis of intraventricular hemorrhage in preterm infants / D. Szpecht, J. Gadzinowski, A. Seremak-Mrozikiewicz [et al.] // Sci. Rep. – 2017. – № 7. – P. 42541.
28. Toda N. Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances / N. Toda, K. Ayajiki, T. Okamura // Pharmacol. Rev. – 2009. – Vol. 61. – P. 62-97.

### **РОЛЬ 4a4b ПОЛИМОРФІЗМУ ГЕНУ eNOS У РОЗВИТКУ ЛЕТАЛЬНИХ НАСЛІДКІВ ПРИ ВАЖКИХ ВНУТРІШНЬО-ШЛУНОЧКОВИХ КРОВОВИЛИВАХ У ПЕРЕДЧАСНО НАРОДЖЕНИХ ДІТЕЙ**

**Артьомова Н. С., Ковальова О. М., Похилько В. І., Цвіренко С. М., Жук Л. А.**

**Резюме.** Важкі внутрішньо шлуночкові крововиливи у передчасно народжених дітей є однією з основних педіатричних проблем громадського здоров'я, так як смертність при цьому захворюванні упродовж останніх 20 років не зменшується, а до 50% немовлят, які вижили, мають когнітивні та рухові порушення. Зважаючи на відомі нині патогенетичні механізми розвитку захворювання, основними з яких є запалення, порушення коагуляції та судинні фактори, ми припустили, що саме поліморфізм у генах, що кодують фермент eNOS та ренін-ангіотензинову систему (AGTR1, АПФ) можуть впливати на розвиток важких ВШК та виникнення летальних наслідків.

**Мета.** Підтвердити гіпотезу, що розвиток важких ВШК, а також летальних випадків, у передчасно народжених дітей пов'язаний з поліморфізмом генів eNOS, AGTR1 та ACE

**Об'єкт і методи.** Проведене проспективне дослідження, в яке включено 97 передчасно народжених дітей (середні значення гестаційного віку 29,07 $\pm$ 0,34 тижнів; ваги при народженні 1320,8 $\pm$ 54,68), які лікувались у лікувальних закладах Полтавської області упродовж 2012-2015 рр. Вивчали розподіл серед обстежених дітей генотипів I/D ACE-гену, A/C AGTR1-гену та 4a4b eNOS-гену. Для доведення зв'язку між виникненням летальних випадків при важких ВШК у передчасно народжених дітей та дією клінічних та генетичних факторів ризику використовували простий та множинний логістичний регресійний аналіз.

**Результати дослідження.** Розподіл генотипів eNOS, AGTR1, ACE генів серед немовлят з ВШК та без ВШК достовірно не відрізнявся. Отримано достовірні асоціації між розвитком летальних випадків у передчасно народжених дітей з важкими ВШК та генетичною моделлю ab+bb eNOS-гену після корекції дії маси тіла, гестаційного віку при народженні, важкого респіраторного дистрес синдрому та сепсису (ВШ 6,05; 95% ДІ 1,08-33,79; p=0,040).

**Висновок.** ab+bb поліморфізм eNOS-гену є незалежним предиктором збільшення ризиків розвитку летальних наслідків у передчасно народжених дітей з важкими ВШК.

**Ключові слова:** передчасно народжені, важкі внутрішньо-шлуночкові крововиливи, летальні наслідки, поліморфізм генів eNOS, AGTR1, ACE.

### **РОЛЬ 4a4b ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА eNOS В РАЗВИТИИ ЛЕТАЛЬНЫХ СЛУЧАЕВ ПРИ ТЯЖЕЛЫХ ВНУТРИ-ЖЕЛУДОЧКОВЫХ КРОВОИЗЛИЯНИЯХ У ПРЕЖДЕВРЕМЕННО РОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ**

**Артемова Н. С., Ковалева А. М., Похилько В. И., Цвиренко С. М., Жук Л. А.**

**Резюме.** Тяжелые внутри-желудочковые кровоизлияния у преждевременно рожденных детей являются одной из основных педиатрических проблем общественного здоровья, так как смертность при этом заболевании в течение последних 20 лет не уменьшается, а до 50% выживших младенцев имеют когнитивные и двигательные нарушения. Несмотря на известные ныне патогенетические механизмы развития заболевания, основными из которых являются воспаление, нарушение коагуляции и сосудистые факторы, мы предположили, что именно полиморфизм в генах, кодирующих фермент eNOS и ренин-ангиотензиновую систему (AGTR1, АПФ) могут влиять на развитие тяжелых ВЖК и возникновения летальных исходов.

**Цель.** Подтвердить гипотезу, что развитие тяжелых ВЖК, а также летальных случаев у недоношенных детей связано с полиморфизмом генов eNOS, AGTR1 и ACE.

**Объект и методы.** Проведено проспективное исследование, в которое включено 97 преждевременно рожденных детей (средние значения гестационного возраста 29,07 $\pm$ 0,34 недель, вес при рождении 1320,8  $\pm$  54,68 г.), которые лечились в лечебных учреждениях Полтавской области на протяжении 2013-2015 гг. Изучено распределение среди обследованных детей генотипов I/D ACE-гена, A/C AGTR1-гена и 4a4b eNOS гена. Для доказательства связи между возникновением летальных случаев при тяжелых ВЖК у преждевременно рожденных детей и действием клинических и генетических факторов риска использовали простой и множественный логистический регрессионный анализ.

**Результаты исследования.** Распределение генотипов eNOS, AGTR1, ACE генов среди младенцев с ВЖК и без ВЖК достоверно не отличалось. Получены достоверные ассоциации между развитием леталь-

ных исходов у преждевременно рожденных детей с тяжелыми ВЖК и генетической моделью ab+bb eNOS-гена после коррекции действия веса, гестационного возраста при рождении, тяжелого респираторного дистресс синдрома и сепсиса (ОШ 6,05; 95% ДИ 1,08-33,79; p=0,040).

**Вывод.** ab+bb полиморфизм eNOS гена является независимым предиктором повышения рисков развития летальных исходов у преждевременно рожденных детей с тяжелыми ВЖК.

**Ключевые слова:** преждевременно рожденные дети, тяжелые внутри-желудочковые кровоизлияния, летальный исход, полиморфизм генов, eNOS, AGTR1, ACE.

### THE ROLE OF 4a4b POLYMORPHISM OF THE eNOS GENE IN THE DEVELOPMENT OF LETHAL OUTCOMES OF SEVERE INTRAVENTRICULAR HAEMORRHAGE IN PRETERM INFANTS

Artyomova N. S., Kovalova O. M., Pokhylko V. I., Tsvirenko S. M., Zhuk L. A.

**Abstract.** Severe intraventricular haemorrhage in preterm infants are one of the main paediatric public health problems, since mortality in this disease in the last 20 years is not decreasing, and up to 50% of the surviving infants have cognitive and developmental disorders. Taking into account the currently known pathogenetic mechanisms of the disease development, the main of which are inflammation, coagulation disorders and vascular factors, we hypothesized that it is polymorphism in the enzymes encoding the enzyme of eNOS and renin-angiotensin system (AGTR1, ACE), that may affect the development of severe IVH and occurrence of lethal outcomes.

*The aim of the research* is to confirm the hypothesis that the development of severe IVH, as well as lethal outcomes in preterm infants is associated with the polymorphism of the genes eNOS, AGTR1, and ACE.

*Object and methods.* The prospective study was conducted, which included 97 preterm infants (average gestational age  $29.07 \pm 0.34$  weeks; birth weight  $1320.8 \pm 54.68$ ) who were treated at the medical institutions of Poltava region during 2012-2015. The distribution of I/D genotypes of ACE gene polymorphism, A/C polymorphism of AGTR1 gene and 4a4b polymorphism of eNOS gene among the examined children was studied. Intraventricular haemorrhages were diagnosed according to Papil's criteria. The material for conducting laboratory studies was blood (0.25 ml) of newborns, which was taken on the first day of life. To determine the polymorphic variants of the ACE, AGT2R1 and eNOS genes, polymerase chain reaction was performed followed by the restriction analysis of amplification reaction products.

A simple and multiple logistic regression analysis was used to establish the relationship between the occurrence of severe IVH and lethal outcomes in preterm infants and the effect of clinical and genetic risk factors.

*Research results.* The distribution of polymorphic genotypes of eNOS, AGTR1, ACE genes in infants with and without IVH did not significantly differ. The genetic model of the ID + DD of ACE gene was found in 84.62% of infants without IVH and in 77.59% of infants with severe IVH; the genetic model of AC + CC of ACE gene in 59.26% and 50.0% of infants, and the genetic model ab + bb of eNOS gene in 28.21% and 34.48% of infants, respectively.

The study of the distribution of polymorphic genotypes of renin-angiotensin system genes in the examined survivors with severe IVH and those who died showed a lack of significant differences in the frequency of genetic model of ID + DD of ACE gene (83.3% and 73.53%,  $p = 0.378$ ), the genetic model of AS + SS of AGTR1 gene (37.5% and 58.82%,  $p = 0.110$ ), and on the verge of statistical significance, the frequency of the genetic model ab + aa of eNOS gene (20.83 + 44.12  $p = 0.058$ ).

Relevant associations were found between the development of lethal outcomes preterm infants with severe IVH and the genetic model of ab + bb of eNOS gene (OR 6.05 (95% CI 1.08-33.79;  $p = 0.040$ ) with birth weight (OR 0,99 (95% CI 0.996-0.999),  $p = 0.023$ ), gestational age (OR 0.72 (95% CI 0.54-0.96),  $p = 0.028$ ) and severe RDS (OR 11.3 (95% CI 2.02-63.03),  $p = 0.006$ ).

*Conclusion.* ab+bb polymorphism of eNOS gene is an independent predictor of the increased risk of developing lethal outcomes in preterm infants with severe IVH.

**Keywords:** preterm infants, severe intraventricular haemorrhage, lethal outcomes, polymorphism of genes eNOS, AGTR1, ACE.

Рецензент – проф. Крючко Т. О.  
Стаття надійшла 14.11.2017 року