

Роль полиморфизмов генов антиоксидантной активности в формировании инвалидирующей патологии центральной нервной системы у недоношенных новорожденных

О.А. Савченко, Е.Б. Павлинова, Н.А. Полянская, И.А. Киришина, Е.И. Курмашева, А.А. Губич

ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России, Омск, Россия

The role of polymorphism of antioxidative activity genes in the formation of disabling pathology of the central nervous system in preterm newborns

O.A. Savchenko, E.B. Pavlinova, N.A. Polyanskaya, I.A. Kirshina, E.I. Kurmasheva, A.A. Gubich

Omsk State Medical University of Ministry of Healthcare of Russia, Omsk, Russia

Исследование направлено на установление роли полиморфизма генов, кодирующих антиоксидантные ферменты в развитии патологии центральной нервной системы (ЦНС) у глубоконедоношенных новорожденных. У 72 обследованных новорожденных определили общую антиоксидантную способность крови и аллельный полиморфизм генов *SOD2* и *GCLC*. Установлено, что наличие генотипа С/Т полиморфизма С60Т гена *SOD2* у глубоконедоношенных новорожденных является фактором риска ишемического поражения ЦНС. Полученные результаты расширяют понимание роли антиоксидантного механизма в защите ЦНС глубоконедоношенных детей и представляют предмет дальнейшего изучения.

Ключевые слова: глубоконедоношенные новорожденные, ишемическое поражение ЦНС, полиморфизм генов антиоксидантной защиты, *SOD2*, *GCLC*, полиморфизм С60Т гена *SOD2*.

Для цитирования: Савченко О.А., Павлинова Е.Б., Полянская Н.А., Киришина И.А., Курмашева Е.И., Губич А.А. Роль полиморфизмов генов антиоксидантной активности в формировании инвалидирующей патологии центральной нервной системы у недоношенных новорожденных. Рос вестн перинатол и педиатр 2020; 65:(5): 42–46. DOI: 10.21508/1027-4065-2020-65-5-42-46

The study aims to establish the role of polymorphism of genes encoding antioxidant enzymes in the development of CNS pathology in extremely premature newborns. In 72 examined newborns we determined the total antioxidant ability and allelic polymorphism of the *sod2* and *GCLC* genes. During the work carried out, we were able to identify that the existence of the C/T genotype of C60T polymorphism of the *sod 2* gene in extremely premature newborns is a risk factor for the development of ischemic CNS injury. The findings broaden the understanding of the role of the antioxidant mechanism in protecting the CNS of extremely premature newborns and are the subject of further studies.

Key words: extremely premature newborns, ischemic CNS injury, polymorphism of antioxidant protection genes, *SOD2*, *GCLC*, polymorphism of C60T of the *SOD2* gene.

For citation: Savchenko O.A., Pavlinova E.B., Polyanskaya N.A., Kirshina I.A., Kurmasheva E.I., Gubich A.A. The role of polymorphism of antioxidative activity genes in the formation of disabling pathology of the central nervous system in preterm newborns. Ros Vestn Perinatol i Peditr 2020; 65:(5): 42–46 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2020-65-5-42-46

В настоящее время окислительный стресс рассматривается как один из важнейших факторов в патогенезе многих патологических процессов, протекающих у плода и новорожденного, в частности тяжелых гипоксически-ишемических поражений центральной нервной системы (ЦНС), таких как перивентрикулярная лейкомаляция и внутрижелудочковое кровоизлияние тяжелой степени. В ряде исследований показано, что активность антиоксидантов — супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы — повышается после 20-й недели

внутриутробного развития, поэтому группу высокого риска развития окислительного стресса составляют глубоконедоношенные дети. У детей данной категории дефицит антиоксидантов при рождении обусловлен дефицитом их эндогенной продукции наряду с прекращением поступления от матери через плаценту [1].

Последнее десятилетие отмечено интенсивным развитием биомедицинских исследований в области геномики, молекулярных основ патогенеза различных болезней. Гены, кодирующие ферменты антиок-

© Коллектив авторов, 2020

Адрес для корреспонденции: Савченко Ольга Анатольевна — к.м.н., асс. кафедры госпитальной педиатрии Омского государственного медицинского университета, ORCID: 0000-0003-2035-5653.
e-mail: olgasav1978@mail.ru

Павлинова Елена Борисовна — д.м.н., доц., зав. кафедрой госпитальной педиатрии Омского государственного медицинского университета, ORCID: 0000-0002-6444-1871

Полянская Наталья Александровна — к.м.н., доцент кафедры госпитальной педиатрии Омского государственного медицинского университета
Адрес: 644043, Омск, ул. Куйбышева 77 ORCID: 0000-0002-8555-8761

Киришина Ирина Алексеевна — к.м.н., асс. кафедры госпитальной педиатрии Омского государственного медицинского университета, ORCID: 0000-0002-3081-4676.

Курмашева Екатерина Игоревна — асп., асс. кафедры госпитальной педиатрии Омского государственного медицинского университета, ORCID: 0000-0003-2086-9013.

Губич Анастасия Андреевна — асп., асс. кафедры госпитальной педиатрии Омского государственного медицинского университета, ORCID: 0000-0002-5446-2126.

644099 Омск, ул. Ленина, д. 12

сидантной системы, могут рассматриваться в качестве генов-кандидатов при изучении генетической предрасположенности к тяжелому поражению ЦНС. Одно из перспективных направлений — изучение однонуклеотидных замен в генах антиоксидантных ферментов [2].

O.D. Saugstad и соавт. [3] впервые выдвинули гипотезу, согласно которой заболевания неонатального периода по этиологии и патогенезу принадлежат к когорте «кислородно-радикальных болезней». В 2012 г. В. Giusti и соавт. [4] обследовали группу недоношенных новорожденных со сроком гестации менее 28 нед. Уменьшение риска возникновения перивентрикулярной лейкомаляции было связано с полиморфизмом rs2536512 гена внеклеточной супероксиддисмутазы (*SOD3*), а полиморфизм rs8192287 гена *SOD3* показал себя как защитный фактор, предотвращающий внутрижелудочковое кровоизлияние. Кроме того, была установлена прямая корреляция между повышением уровня фермента *SOD2* и риском развития перивентрикулярной лейкомаляции [4]. Позднее данная теория нашла свое подтверждение в исследовании M.L. Tataranno и соавт. [5], которые установили связь специфических маркеров окислительного стресса в плазме новорожденных с перинатальным поражением головного мозга. Такого рода исследования позволяют выявить глубоконедоношенных детей с высоким риском развития заболеваний ЦНС, что необходимо для разработки персонализированных превентивных терапевтических стратегий и прогнозирования исходов.

Цель исследования: установить роль полиморфизма генов, кодирующих антиоксидантные ферменты (глутамилцистеинлигазу, манганин-супероксиддисмутазу), в развитии патологии ЦНС у глубоконедоношенных новорожденных.

Характеристика детей и методы исследования

В ретроспективное когортное контролируемое исследование были включены 72 глубоконедоношенных новорожденных. Нами проведен анализ историй болезни и заполнение разработанных индивидуальных карт, которые включали данные из историй болезни (форма №0033/у) новорожденных, получивших лечение на втором этапе выхаживания в БУЗОО «Клинический родильный дом №1» (г. Омск). Все дети были распределены по группам в зависимости от нозологии: 1-я группа — новорожденные с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС ($n=36$), 2-я группа — здоровые новорожденные ($n=36$).

У 72 обследованных новорожденных определили общую антиоксидантную способность в образцах плазмы крови методом иммуноферментного анализа. Использовали тест-систему «Общий антиоксидантный статус» (ImAnOx (Tas/Tac) Kit. Immundiagnostik; Германия). Кровь забирали в асептических условиях

однократно из центральной или периферической вены в объеме 1 мл.

В группах новорожденных определяли аллельный полиморфизм 4 генетических маркеров:

- полиморфизм T58C гена *SOD2*, в котором тимин в позиции 58 (3-й экзон) замещен на цитозин, что приводит к изменению аминокислоты изолейцина на треонин в синтезируемом ферменте и способствует снижению его активности [6];
- полиморфизм C60T гена *SOD2*, в котором цитозин в позиции 60 (3-й экзон) замещен на тимин, что приводит к замене аминокислоты лейцина на фенилаланин и изменению уровня фермента [6];
- полиморфизм C47T гена *SOD2* с заменой цитозина на тимин в позиции 47 (2-й экзон); в результате в транслируемом белке аланин замещается валином, что приводит к накоплению супероксида в матриксе и большей выраженности окислительных повреждений митохондриальной ДНК [7];
- полиморфизм C129T гена каталитической субъединицы глутаматцистеинлигазы *GCLC* (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit), который заключается в точечной замене в позиции 129 цитозина на тимин [8].

Обследуемым пациентам выполнено молекулярно-генетическое исследование лейкоцитов периферической крови. Образцы геномной ДНК выделяли из лейкоцитарной фракции с использованием комплекса реагентов «SNP-экспресс» («Литех», Москва).

Статистическая обработка. На начальном этапе статистической обработки полученных данных осуществляли формирование базы данных с использованием программы Microsoft Excel. На основании сформированной базы данных проводили проверку, сортировку и кодирование (шифровка) полученной информации. Для статистического анализа использовали пакет прикладных программ Statistica.

Проверку статистических гипотез осуществляли путем выявления различий между сравниваемыми группами с применением теста Вальда—Вольфовица, U-критерия Манна—Уитни (сравнение двух независимых переменных). При всех статистических расчетах критический уровень ошибки p принимали равным 0,05.

Сравнение групп по бинарному признаку или сравнение относительных частот внутри одной группы или в двух независимых группах проводили при помощи построения четырехпольных таблиц абсолютных частот согласно проверке нулевой статистической гипотезы о равенстве относительных частот в двух популяциях с использованием точного двустороннего критерия Фишера, критерия χ^2 . Если абсолютные частоты в четырехпольных таблицах сопряженности составляли менее 10, то использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность.

Результаты

В исследование вошли 72 новорожденных, из которых 4 двойни, 32 мальчика и 40 девочек. Гестационный возраст детей составил 28 [25; 30] нед, масса тела при рождении — 1100 [910; 1380] г.

Дети в сравниваемых группах были сопоставимы по полу: в 1-й и 2-й группах 17 [47,2%] и 15 девочек [41,7%] соответственно. Срок гестации — 29 [27; 30] и 30 [28; 31] нед соответственно. Группы были сопоставимы по гестационному возрасту детей ($U=3,4185$; $p=0,012$). Средняя масса тела при рождении новорожденных 1-й группы — $1139,3 \pm 254,8$ г; у детей 2-й группы — $1149,8 \pm 261$ ($t=3,8164$; $p=0,08$) г.

Результаты определения общей антиоксидантной способности крови в группах новорожденных представлены на рисунке в виде графиков, на которых отрезки соединяют точки, соответствующие интервалу значений этого показателя у числа исследуемых новорожденных. Для оценки возможности выявления различий значений антиоксидантной способности крови в исследуемых группах был вычислен коэффициент корреляции, который составил между новорожденными с поражением ЦНС и здоровыми 0,58. Уровень тесноты связи 0,58 является средним, но достаточно малым для того, чтобы производить поиск статистически значимых различий антиоксидантной способности крови в исследуемых группах.

Генетическое обследование новорожденных дало следующие результаты (см. таблицу). Частота генотипов Т/Т, С/Т, С/С по полиморфизму С47Т гена *sod2* у новорожденных 1-й группы с гипоксически-ише-

Таблица. Распределение полиморфизмов генов *GCLC* и *sod2* в группах новорожденных

Table. Distribution of *GCLC* and *sod2* polymorphisms in the newborns' groups

Полиморфизм	Генотип	Частота генотипа, абс. (%)	
		1-я группа, n=36	2-я группа, n=36
<i>GCLC</i> 129C/T	129 CC	22 (61,1)	24 (66,7)
	129 TT	0	1 (3,5)
	129 CT	14 (38,9)	11 (29,8)
<i>SOD2</i> 58T/C	58 TT	36 (100,0)	36 (100,0)
	58 CC	0	0
	58 TC	0	0
<i>SOD2</i> 60C/T	60 CC	28 (77,8)	35 (96,5)
	60 TT	0	0
	60 CT*	8 (22,2)	1 (3,5)
<i>SOD2</i> 47C/T	47 CC	12 (33,3)	12 (33,3)
	47 CT	14 (38,9)	11 (31,6)
	47 TT	10 (27,8)	13 (35,1)

Примечание. * — различия между 1-й и 2-й группами статистически значимы (критерий χ^2).

мическим поражением ЦНС и у здоровых детей 2-й группы не различалась ($\chi^2=0,43$; $p=0,8$). При анализе полиморфизма Т58С гена *sod2* у всех новорожденных как 1-й, так и 2-й групп был выявлен генотип Т/Т ($\chi^2=0,86$; $p=0,83$). Сравнение частоты полиморфизма С60Т гена *sod2* в группах новорожденных показало статистические различия: генотип С/Т у новорожденных 1-й группы встречался чаще (22,2%), чем в группе здоровых (3,5%; $\chi^2=4,21$; $p=0,02$). Не установлено ассоциаций вариантов С/С, С/Т, Т/Т полиморфизма С129Т гена *GCLC* с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС у новорожденных исследуемых групп ($\chi^2=1,12$; $p=0,56$).

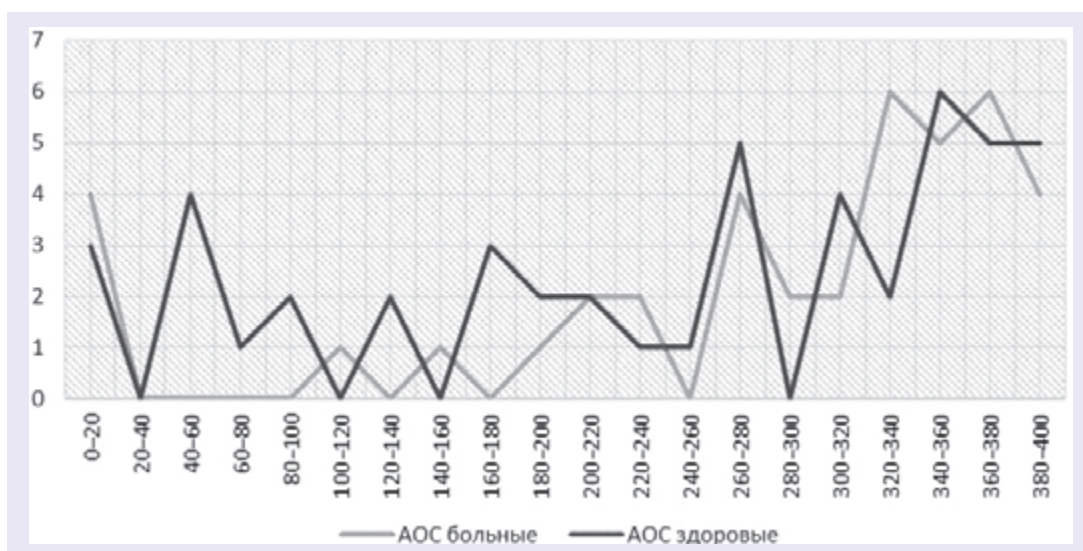


Рисунок. Распределение значений антиоксидантной способности (АОС) крови у новорожденных исследуемых групп, ммоль/л.

Ось ординат — число детей, ось абсцисс — значения АОС.

Figure. Distribution of blood antioxidant capacity range in newborns of study groups, mmol/L.
the y-axis — number of children, the abscissa — values of the blood antioxidant capacity.

Обсуждение

Дефицит антиоксидантов у глубоконедоношенных детей обусловлен недостаточностью эндогенной продукции, что влечет за собой угрозу развития окислительного стресса [9]. Резкий дисбаланс между окислительными и антиоксидантными системами у глубоконедоношенных детей отмечается в первые 72 ч жизни [10]. Схемы терапии с включением препаратов с антиоксидантным механизмом действия у глубоконедоношенных новорожденных с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС (препарат цитофлавин производства ООО «НТФФ ПОЛИСАН», Санкт-Петербург, витамин Е и А, мелатонин, сульфат магния и т.д.) — необходимая терапевтическая стратегия лечения детей данной категории [11–13].

В последнее время все больше данных литературы свидетельствует о том, что именно полиморфизм единичных нуклеотидов за счет формирования специфических аллелей генов вносит важный вклад в особенности развития защитных реакций. Полиморфизм генов антиоксидантной защиты широко исследован у взрослого населения и был связан

с риском возникновения онкологических, нейродегенеративных, эндокринных и офтальмологических заболеваний [14]. Исследования полиморфизма генов антиоксидантной защиты в группе глубоконедоношенных новорожденных малочисленны [15, 16]. В ходе проведенной нами работы удалось выявить наличие полиморфного варианта гена *SOD2* магниевого супероксиддисмутазы (manganese superoxide dismutase) у глубоконедоношенных новорожденных, имеющих риск ишемического поражения ЦНС — часто встречался генотип С/Т полиморфизма С60Т гена *SOD2*. Однако различий по антиоксидантной способности крови между группами здоровых новорожденных и новорожденных с гипоксически-ишемическим поражением ЦНС установить не удалось, что, возможно, связано с малой выборкой.

Заключение

Результаты, полученные в ходе данного исследования, расширяют понимание роли антиоксидантного механизма в защите ЦНС глубоконедоношенных детей и служат основанием для дальнейших исследований полиморфизма генов антиоксидантной защиты.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Кирьяков К.С., Хатагова Р.Б., Тризна Е.В., Зеленина З.А., Яковлев А.В., Петрова Н.А. Коррекция кислотно-основного состояния при гипоксически-ишемическом поражении головного мозга у новорожденных. *Российский вестник перинатологии и педиатрии* 2018; 63(1): 40–45. [Kiriakov K.S., Khatagova R.B., Trizna E.V., Zelenina Z.A., Yakovlev A.V., Petrova N.A. Correction of the acid-base balance in the presence of the hypoxic-ischemic brain damage in newborns. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Peditrii* (Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics) 2018; 63(1): 40–45. (in Russ.)] DOI: 10.21508/1027-4065-2018-63-1-40-45
2. Perez M., Saugstad O.D., Robbins M.E., Saugstad O.D. Oxygen radical disease in the newborn, revisited: Oxidative stress and disease in the newborn period. *Free Radic Biol Med* 2019; 142: 61–72. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.035
3. Saugstad O.D. The oxygen radical disease in neonatology. *Indian J Pediatr* 1989; 56(5): 585–593.
4. Giusti B., Vestri A., Poggi C., Magi A., Pasquini E., Abbate R. Genetic polymorphisms of antioxidant enzymes as risk factors for oxidative stress-associated complications in preterm infants. *Free Radic Res* 2012; 46: 1130–1139. DOI: 10.3109/10715762.2012.692787
5. Tataranno M.L., Perrone S., Longini M., Buonocore G. New antioxidant drugs for neonatal brain injury. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 20: 1–13. DOI: 10.1155/2015/108251
6. Miao L., Clair D.K.St. Regulation of superoxide dismutase genes: implications in diseases. *Free Radic Biol Med* 2009; 47(4): 344–356. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018
7. Bastaki M., Huen K., Manzanillo P., Chande N., Chen C., Balmes J.R. Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16: 279–286. DOI: 10.1097/01.fpc.0000199498.08725.9c
8. Koide S., Kugiyama K., Sugiyama S., Nakamura S., Fukushima H., Honda O. Association of polymorphism in glutamate-cysteine ligase catalytic subunit gene with coronary vasomotor dysfunction and myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 539–545. DOI: 10.1016/s0735-1097(02)02866-8
9. Shah M.R., Wedgwood S., Czech L., Kim G.A., Lakshminrusimha S., Schumacker P.T. Cyclic stretch induces inducible nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase in pulmonary artery smooth muscle cells. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 4334–4348. DOI: 10.3390/ijms14024334
10. Aceti A., Beghetti I., Martini S., Faldella G., Corvaglia L. Oxidative Stress and Necrotizing Enterocolitis: Pathogenetic Mechanisms, Opportunities for Intervention, and Role of Human Milk. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 7397659. DOI: 10.1155/2018/7397659
11. Рогаткин С.О., Володин Н.Н., Дегтярева М.Г., Гребенникова О.В., Маргания М.Ш., Серова Н.Д. Современные подходы к комплексной терапии перинатальных поражений ЦНС у новорожденных. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова* 2011; 1: 27–32. [Rogatkin S.O., Volodin N.N., Degtyareva M.G. Grebennikova O.V., Margania M.Sh., Serova N.D. Current approaches to cerebroprotective treatment of premature newborns in reanimation and intensive care departments. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova* 2011; 1: 27–32. (in Russ.)]
12. Савченко О.А., Павлинова Е.Б., Мингаирова А.Г., Власенко Н.Ю., Полянская Н.А., Киришина И.А. Оценка эффективности комплексной терапии перинатальных заболеваний у новорожденных с экстремально низкой массой тела. *Антибиотики и химиотерапия* 2019; 64(1): 3–8. [Savchenko O.A., Pavlinova E.B., Mingairova A.G., Vlasenko N.Yu., Polyanskaya N.A., Kirshina I.A. Efficacy Evaluation of Complex Therapy of Perinatal Diseases in Extremely Low Birth Weight Infants. *Antibiotics and chemotherapy* 2019; 64(1): 3–8. (in Russ.)]

13. Afolayan A.J., Eis A., Teng R., Bakhutashvili I., Kaul S., Davis J.M. Decreases in manganese superoxide dismutase expression and activity contribute to oxidative stress in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 303(10): 870–879. DOI: 10.1152/ajplung.00098.2012
14. Daiber A., Steven S., Weber A., Shuvaev V.V., Muzykantov V.R., Laher I. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br J Pharmacol* 2017; 174: 1591–1619. DOI: 10.1111/bph.13517
15. Karagianni P., Rallis D., Fidani L., Porpodis M., Kalinderi K., Tsakalidis C. Glutathion-S-Transferase P1 polymorphisms association with bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *J Hippokratia* 2013; 17(4): 363–367.
16. Павлинова Е.Б., Генне Н.А. Полиморфизм генов антиоксидантных ферментов и формирование бронхолегочной дисплазии у недоношенных детей новорожденных. *Доктор.Ру* 2012; 77(9): 14–20. [Pavlinova E.B., Geppe N.A. Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants: Role of Polymorphism in Antioxidant Enzyme Genes. *Doctor ru* 2012; 77(9): 14–20. (in Russ.)]

Поступила: 24.08.20

Received on: 2020.08.24

Конфликт интересов:

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов.

Conflict of interest:

The authors of this article confirmed the lack of conflict of interest.