

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ РОЗВИТКУ КРИТИЧНИХ СТАНІВ У НОВОНАРОДЖЕНИХ

С.П. Кир'яченко

*Національна медична академія післядипломної освіти
імені П.Л. Шупика (Київ)*

*Референс-центр з молекулярної діагностики
МОЗ України (Київ)*

Вступ

В клінічній медицині на сьогодні існують складнощі з оцінкою стану новонароджених та прогнозом розвитку у них критичних станів у ранньому неонатальному періоді. Прогрес у розробці генетичних технологій та сучасні аспекти проведення досліджень щодо з'ясування ролі генетичної компоненти у розвитку мультифакторних захворювань і патологічних станів вимагають застосування нових методів статистичного аналізу для визначення міжгенної взаємодії. Параметричні статистичні методи, які традиційно продовжують використовуватися більшістю авторів у своїх дослідженнях, мають певні обмеження та не дозволяють чітко охарактеризувати генетичні ефекти та міжгенну взаємодію і оцінити їх вплив на ризик розвитку захворювання вцілому.

Використання програми мультифакторної просторової редукції (Multifactor-Dimensionality Reduction, MDR), нового непараметричного методу статистики, дозволяє виділити головні, незалежні та спільні ефекти впливу поліморфізму генів та побудувати модель з найбільшим потенціалом передбачення при проведенні дослідження за принципом випадок-контроль [6-9]. У попередніх наших роботах було визначено роль поліморфних варіантів генів *ACE*, *AT2R1*, *TNF- α* , *MTHFR* у розвитку критичних станів у новонароджених [1-5].

Метою даної роботи стала оцінка ролі міжгенної взаємодії у розвитку критичних станів у новонароджених.

Матеріал і методи дослідження

До проведення дослідження було залучено 345 новонароджених. Основну групу склали 128 новонароджених чоловічої статі та 107 дітей жіночої статі з важкою перинатальною патологією, яких було госпіталізовано у спеціалізовані відділення патології новонароджених УДСЛ "ОХМАТДИТ" із пологових будинків м. Києва на 3-5 добу після народження.

Серед 235 новонароджених з важкою перинатальною патологією у 201 дитини (85,53%) перебіг раннього неонатального періода був ускладнений клінічними проявами перинатальної асфіксії та перинатального гіпоксично-ішемічного ушкодження мозку, 151 новонароджений (64,26%) мав респіраторний дистрес-синдром (РДС), 69 (29,36%) - некротичний ентероколіт (НЕК), 84 (35,74%) - неонатальну жовтяницю, 83 (35,32%) - дихальну та 17 (7,23%) ниркову недостатність, внутрішньолункові крововиливи діагностовані у 7 (2,98%), 32 новонароджених (13,62%) мали перивентрикулярну лейкомаляцію, 30 дітей (12,77%) - набряк головного мозку (НГМ), а 50 новонароджених (21,27%) - затримку внутрішньоутробного розвитку (ЗВУР). Для новонароджених даної групи були характерними ураження декількох органів та систем, з поєднанням декількох неонатальних синдромів та органною недостатністю.

У групу контролю було відібрано 110 клінічно-здорових доношених новонароджених (48 дітей чоловічої статі та 62 дитини жіночої статі), народжених у термінових, фізіологічних пологах, що не мали клінічних симптомів перинатальних захворювань і яких було виписано додому на 3-5 добу, із Київського обласного центру охорони здоров'я матері і дитини.

Для оцінки ролі поліморфних варіантів *I/D*, *A1166C*, *G308A*, *C677T* генів *ACE*, *AT2R1*, *TNF- α* , *MTHFR* та з'ясування міжгенної взаємодії у розвитку критичних станів у новонароджених нами було використано методи логістичної регресії (програма SPSS_17) та програма MDR_2.0 (MDR_2.0)[6-9].

Отримані результати та їх обговорення

На першому етапі нашого статистичного аналізу при проведенні цієї роботи нами було використано метод логістичної

регресії для підтвердження ролі поліморфних варіантів *I/D*, *A1166C*, *G308A*, *C677T* генів *ACE*, *AT2R1*, *TNF- α* , *MTHFR* у розвитку критичних станів у новонароджених (табл.1). Попередній аналіз з'ясування ролі досліджуваних поліморфних варіантів проводився нами шляхом обчислення показників χ^2 , відношення шансів (OR) з довірчими інтервалами з використанням програми Statistica 6. Представлені нами в табл.1 результати не відрізняються від отриманих та проаналізованих стандартними статистичними методами раніше для окремих поліморфізмів досліджуваних генів [1-5].

Таблиця 1

Результати логістичної регресії

Поліморфізм	B	S.E.	Df	Sig.	Exp(B)	95%CI.for EXP(B)	
						Lower	Upper
<i>ACE(ID)</i>	0,967	0,307	1	0,002	2,630	1,440	4,805
<i>ACE(DD)</i>	1,018	0,403	1	0,011	2,768	1,257	6,096
<i>AT2R1(AC)</i>	0,816	0,294	1	0,005	2,262	1,272	4,021
<i>AT2R1(CC)</i>	1,981	0,768	1	0,010	7,250	1,610	32,645
<i>TNFα(AG)</i>	0,916	0,291	1	0,002	2,498	1,412	4,420
<i>TNFα(AA)</i>	1,750	0,783	1	0,025	5,756	1,240	26,710
<i>MTHFR(CT)</i>	0,572	0,274	1	0,037	1,772	1,035	3,034
<i>MTHFR(TT)</i>	1,057	0,562	1	0,060	2,877	0,956	8,654

Примітка: B - коефіцієнт регресії, S.E.- стандартна помилка, Exp(B) - відношення шансів, 95% C.I.for EXP(B) - довірчий інтервал, df - ступінь свободи.

Як видно з табл.1 для генотипів *ID*, *DD* гена *ACE*; *AC*, *CC* гена *AT2R1*; *AG*, *AA* гена *TNF- α* ; *CT* гена *MTHFR* встановлено асоціацію з розвитком критичних станів у новонароджених.

На другому етапі, нами було побудовано предиктивну модель для визначення головних, незалежних та спільних ефектів досліджуваних генів. Керуючись нашою гіпотезою щодо патогенезу критичних станів та продемонстрованими результатами щодо ролі цих генів, ми залучили до предиктивної моделі всі досліджені гени.

Прогностичний потенціал був найвищим-0,7253, при залученні до моделі трьох генів - *ACE*, *TNF- α* , *AT2R1*, а при залученні чотирьох генів, враховуючи *MTHFR*, він складав - 0,6950 (табл.2), тобто був нижчим. Однак, враховуючи отримані нами

результати та існуючі відомості про роль гена *MTHFR* у нормальному перебігу внутрішньоутробного розвитку та особливості метаболічних процесів у новонароджених, нами було включено його до предиктивної моделі.

Таблиця 2

Моделі міжгенної взаємодії у розвитку критичних станів у новонароджених за допомогою програми MDR 2.0. в режимі всебічного пошуку (exhaustive search)

Комбінації генів у моделі (найбільш значущі 2х,3х, 4х компонентні комбінації поліморфізмів)	Точність моделі, що тестується (testing balancing accuracy) %	Перехресна перевірка узгодженості (Cross-Validation Consistency)	Тест перестановки (Permutation test)
<i>ACE</i>	61,53	5/10	p<0,05
<i>ACE/AT2R1</i>	65,34	8/10	p<0,01
<i>ACE/TNF-α/AT2R1</i>	72,53	10/10	p<0,001
<i>ACE/TNF-α/MTHFR/AT2R1</i>	69,50	10/10	p<0,001

Як видно з табл.2., коефіцієнт перехресної перевірки був найвищим та визначив статистичну вірогідність для найкращих моделей, якими стали трьох- та чотирьох-компонентна модель. Було показано 100% відтворюваність (10 із 10) та високу точність передбачення для цих моделей ризику розвитку критичних станів у новонароджених.

Побудована нами модель дозволила оцінити вплив міжгенної взаємодії на розвиток перинатальної патології (рис.1). Високий показник ентропії було визначено для гена *TNF- α* - 6,08% який, відповідно до зображення мав негативний взаємозв'язок з іншими генами (синій та зелений кольори).

Подібний негативний взаємозв'язок був виявлений також для гена *MTHFR*, який дав найнижчий показник ентропії- 2,82%, тобто в запропонованій моделі визначалася значимість кожного гена, як поодиноці так і в сукупності з іншими.

Нами визначено, що ген *ACE* (показник ентропії, якого склав 7,49%) має найбільш вагомий вплив на розвиток перинатальної патології, в той час як ген *AT2R1* (ентропія = 4,02%) посилював цей вплив на 4,35% при синергічній взаємодії (червоний колір) (рис.1).

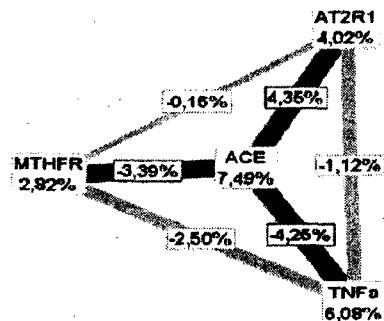


Рис.1. Дендрограма міжгенної взаємодії.

У програмі MDR-2.0_beta_7 також було побудовано графічну модель взаємодії комбінацій досліджуваних генотипів (рис.2) для оцінки їх взаємного впливу на розвиток критичних станів у новонароджених.

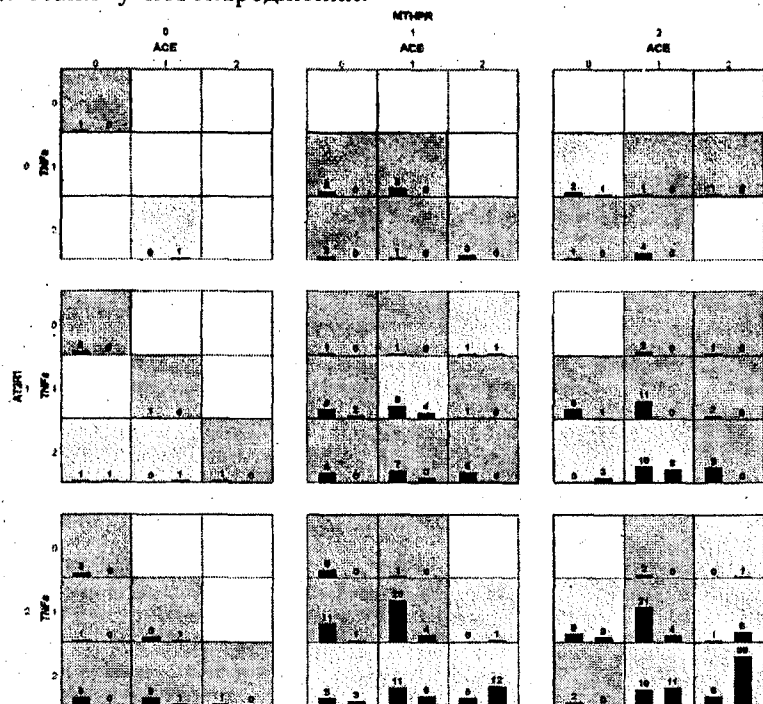


Рис. 2. Графічна модель оцінки ризику розвитку критичних станів у новонароджених в залежності від комбінації генотипів.

Як видно з рис.2, серед обстежених новонароджених передбачалося отримати 81 комбінацію генотипів чотирьох досліджуваних генів, але 25 комбінацій виявлено не було взагалі (білий колір). Значимими виявилися 56 комбінацій генотипів, у 40 з них було визначено підвищений ризик розвитку патології (темно-сірий колір), у 16- низький ризик (світло-сірий колір). Прогностичний потенціал моделі для комбінації чотирьох генотипів складав за результатами програми MDR - 69,50%, а процент відповідності при оцінці результатів прогнозу, що протиставлялися передбаченим у моделі склав 76,25% (61 генотип із 81 зустрічалося в групах відповідно до класифікації, хворий або здоровий, а 20 генотипів зустрічалося в обох групах). Такий самий відсоток передбачених показників належності до групи хворих або здорових отримали на основі статистичної моделі, розрахованої програмою SPSS_17.0 (табл.3).

Таблиця 3

Класифікаційна таблиця показників належності новонароджених до груп

Observed (показник, що спостерігається)		Predicted (спрогнозовано)		
		Class		Percentage Correct (процентний показник точності передбачення)
		control	case	
Class (група)	Control (здорові)	59	51	53,6
	Case (хворі)	31	204	86,8
Overall Percentage (сумарний показник)		процентний		76,2

У таблиці 3 наведено оцінку належності обстежених новонароджених до груп хворих або здорових, показано, що із 110 здорових новонароджених 51 було класифіковано як хворі, а із 235 хворих - 31 як здорові. Сумарний процентний показник точності передбачення прогнозів для хворих та здорових склав 76,2%. Отже, при проведенні статистичного аналізу нами було визначено предиктивну модель з 100% відтворюваністю та високою точністю передбачення. Отримані результати показали, що досліджувані нами гени вірогідно пов'язані з розвитком критичних станів у новонароджених. Головний ефект у розвитку критичних станів із досліджених нами генів належить I/D пол-

іморфізму гена *ACE*, для якого показано синергічну взаємодію з *A1166C* поліморфізмом гена *AT2R1*. Для поліморфізму *G308A* гена *TNF-α* та *C677T* гена *MTHFR* показано незалежні ефекти на розвиток критичних станів у новонароджених.

Висновки

1. Отримана нами предиктивна модель показала високу передбачувальну цінність для оцінки розвитку критичних станів у новонароджених.

2. Доведено, що досліджені гени задіяні у окремі ланки патогенезу критичних станів, в той час як гени *ACE* та *AT2R1*, діють як синергісти, які контролюють ренін-ангіотензинову систему.

3. Подальші дослідження із залученням генів, задіяних у регуляцію ренін-ангіотензинової системи, продукції цитокінів та відповідних за метаболізм фолієвої кислоти є перспективними для побудови нової предиктивної моделі з найвищою передбачувальною цінністю та її застосування в практичній медицині.

Література

1. Горovenko Н.Г. Изучение ассоциации полиморфных вариантов генов *ACE (I/D)*, *AT2R1 (A1166C)*, *TNF-α (G308A)*, *MTHFR (C677T)* и их комбинаций с риском развития перинатальной патологии и сокращением сроков гестации / Н.Г. Горovenko, С.П. Кир'яченко, З.І. Россоха // *Biopolymers and Cell*. -2011.-Vol. 27., №3.-P.206-213.
2. 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.-С.180-184.
3. Горovenko Н.Г. Асоціація поліморфного варіанту *677TT* гену метилентетрагідрофолатредуктази зі скороченням терміну гестації та розвитком перинатальної патології новонароджених / Н.Г. Горovenko, С.П. Кир'яченко, З.І. Россоха // *Журнал педіатрія, акушерство та гінекологія*.-2010.-Т.72., №6.-С.15-20.
4. Горovenko Н.Г. Асоціація поліморфних варіантів генів *ACE* та *AT2R1* з розвитком перинатальної патології у новонароджених / Н.Г. Горovenko, С.П. Кир'яченко, З.І. Россоха // *Медичні перспективи*.-2010.-Т.XV., №4.-С.28-33.

5. Горovenko Н.Г. Изучение ассоциации полиморфных вариантов генов *ACE (I/D)*, *AT2R1 (A1166C)*, *TNF-α (G308A)*, *MTHFR (C677T)* и их комбинаций с риском развития перинатальной патологии и сокращением сроков гестации / Н.Г. Горovenko, С.П. Кир'яченко, З.І. Россоха // *Biopolymers and cell*.-2011.-Т.72., № 6.-С.15-20.

6. Chung Y. Odds ratio based multifactor-dimensionality reduction method for detecting gene-gene interactions (*Genetics and population analysis*) / Y. Chung, S.Y. Lee, C. Robert // *BIOINFORMATICS*. -2007. -Vol. 23, №.1-P. 71-76.

7. Power of multifactor dimensionality reduction and penalized logistic regression for detecting gene-gene interaction in a case-control study / H. He, W.S. Oetting, M.J. Brott, S. Basu // *BMC Medical Genetics*. - 2009. - Vol.10. -P. 127.

8. Comparison of information-theoretic to statistical methods for gene-gene interactions in the presence of genetic heterogeneity / L.Sucheston, P.Chanda, A.Zhang [e.a.] // *BMC Genomics*. - 2010. - Vol.11. - P.487.

9. Multilocus analysis of atopy in Korean children using multifactor-dimensionality reduction / H.W Park, E.S.Shin, J.E. Lee [e.a.] // *Thorax*. - 2007. - Vol.62. - P.265-269.

Резюме

Кир'яченко С.П. Молекулярно-генетичні аспекти розвитку критичних станів у новонароджених.

Роль генетичних факторів у розвитку та перебігу критичних станів у новонароджених була вивчена, але представлені в літературі дані мають розрізнений характер. Комплексної оцінки впливу поліморфних варіантів генів та ген-генної взаємодії у новонароджених раніше не проводилося. Нами була виявлена асоціація генотипів *ID*, *DD* гена *ACE*; *AC*, *CC* гена *AT2R1*; *AG*, *AA* гена *TNF-α*; *CT* гена *MTHFR* з розвитком критичних станів у новонароджених та побудована прогностична модель з високим потенціалом передбачення 76,2%. Встановлено, що досліджені нами гени задіяні в різні ланки патогенезу критичних станів, оскільки для них не виявлено ген-генного взаємозв'язку, за виключенням генів *ACE* та *AT2R1*, для яких показано синергічну взаємодію.

Ключові слова: генетичний поліморфізм, новонароджені, мультифакторна просторова редукція

Резюме

Кир'яченко С.П. Молекулярно-генетические аспекты развития критических состояний у новорожденных.

Роль генетических факторов в развитии и течении критических состояний у новорожденных была изучена, однако представленные в литературе данные имеют разрозненный характер. Комплексной оценки влияния полиморфных вариантов генов и ген-генного взаимодействия у новорожденных ранее не проводилось. Нами была выявлена ассоциация генотипов ID, DD гена ACE; AC, CC гена AT2R1; AG, AA гена TNF- α ; CT гена MTHFR с развитием критических состояний у новорожденных и построена прогностическая модель с потенциалом предикции 76,2%. Установлено, что исследованные нами гены задействованы в различные звенья патогенеза критических состояний, поскольку для них не выявлено взаимосвязи, за исключением генов ACE и AT2R1, для которых показано синергичное взаимодействие.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, новорожденные, мультифакторная пространственная редукция

Summary

Kuryachenko S.P. *Molecular-genetical aspects of critical state in the newborns.*

The role of genetic factors in the development and course of the critical states in the newborns has been studied, but presented data are scattered. Comprehensive assessment of gene polymorphic variants impact and gene-gene interaction in the newborns has not been previously investigated. We have identified the association of ID, DD genotype in ACE gene, AC, CC genotype in AT2R1 gene; AG, AA genotype in TNF- α gene; CT genotype in MTHFR gene with the development of critical states in the newborns. We have constructed the prognostic model with 76.2% predictiv values. It is established that the investigated genes are involved in various links in the pathogenesis of critical states, as they found no relationship, except for the ACE and AT2R1 genes, which showed the synergistic interaction.

Key words: genetic polymorphism, newborns, multifactorial dimensional reduction

Рецензент: д.біол.н., проф. Б.П. Романюк

УДК 575.224.055.4.812

ОСОБЛИВОСТІ МУТАЦІЙНИХ ПРОЦЕСІВ У ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* УКРАЇНИ

І.В.Кунда-Пронь, І.А.Козерецька

Дрогобицький державний педагогічний університет імені І.Я.Франка (Трускавець)

ННЦ "Інститут біології", Київський національний університет імені Тараса Шевченка (Київ)

Вступ

Відомо, що природні популяції організмів, які розмножуються статевим шляхом, гетерозиготні за багатьма мутаціями. Історично та в силу певних особливостей життєвого циклу *Drosophila melanogaster* є об'єктом для вивчення різних генетичних показників. Дослідження змін генофонду природних популяцій *D. melanogaster* із різних за географічним розташуванням територій було розпочате ще у 30-ті роки минулого століття Р.Л.Берг [1] та продовжено іншими видатними генетиками [2, 3, 4]. У результаті проведеної тоді значної роботи в природних популяціях *D. melanogaster* на території колишнього Радянського Союзу було показано, що мутаційний процес у цих угрупованнях характеризувався хвилеподібним зростанням частоти мутацій у різні періоди [2]. Такі явища отримали назву " моди на мутації" [2, 3, 4, 5, 6].

На території України вивчення генофонду природних популяцій *D. melanogaster* проводилось протягом багатьох років різними вченими [5, 7, 8]. Проте, з 1991 року такі спостереження систематично не проводилися. Продовження аналогічних досліджень викликає велике зацікавлення, оскільки дають можливість спостерігати за генетичними процесами в їх динаміці. З 2005 року такі дослідження були відновлені. Дослідження природних популяцій *D. melanogaster* України протягом 2005-2009 років продемонстрували, що всі популяції, які були залучені до аналізу, не характеризувалися подіями типу " мутаційного спалаху" [9, 10].