

©В. В. Синенко

ГБУЗ «Одесский национальный медицинский университет»

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У ДЕТЕЙ, РОЖДЕННЫХ БЛАГОДАРЯ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫМ РЕПРОДУКТИВНЫМ ТЕХНОЛОГИЯМ

Цель исследования – изучить эффективность и оценить возможности использования генетических методов исследования ферментов, отвечающих за антиоксидантную защиту у детей, рожденных благодаря вспомогательным репродуктивным технологиям (ВРТ), а также определить возможное влияние выявленных нарушений на состояние здоровья детей данной группы.

Материалы и методы. В исследовании принимали участие 45 детей основной группы, рожденных благодаря ВРТ, и 20 детей контрольной группы, рожденных после спонтанной беременности. Для оценки состояния антиоксидантной системы исследовали гены, детерминирующие активность важнейших ферментов этой системы: SOD-2 (супероксиддисмутазы), находящейся непосредственно в митохондриях, и CAT (каталазы). Также представлялось целесообразным оценить состояние HIF (гипоксически-индуцированного фактора).

Результаты исследования и их обсуждение. У детей, рожденных благодаря ВРТ, достоверно чаще наблюдали гетерозиготные мутации фрагментов ДНК, отвечающих за функциональное состояние SOD-2 ($\chi^2=4,68$; $p=0,030$), и гетерозиготные и гомозиготные мутации в отношении CAT ($\chi^2=3,85$; $p=0,049$). Мутации, отвечающие за функционирование CAT, SOD-2, являются прогностически неблагоприятными факторами, предикторами более частого развития респираторных заболеваний, задержки физического развития.

Выводы. Применение генетических исследований, направленных на изучение функции каталазы и супероксиддисмутазы у детей, рожденных благодаря ВРТ, показало их эффективность и целесообразность для дальнейшего изучения состояния здоровья.

Ключевые слова: дети; вспомогательные репродуктивные технологии; генетические исследования; мутация; каталаза; супероксиддисмутазы; гипоксически-индуцированный фактор.

ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В ДІТЕЙ, НАРОДЖЕНИХ ЗАВДЯКИ ДОПОМІЖНИМ РЕПРОДУКТИВНИМ ТЕХНОЛОГІЯМ

Мета дослідження – вивчити ефективність і оцінити можливості використання генетичних методів дослідження ферментів, які відповідають за антиоксидантний захист у дітей, народжених завдяки допоміжним репродуктивним технологіям (ДРТ), а також визначити можливий вплив виявлених порушень на стан здоров'я дітей даної групи.

Матеріали та методи. У дослідженні брали участь 45 дітей основної групи, народжених завдяки ДРТ, і 20 дітей контрольної групи, народжених після спонтанної вагітності. Для оцінки стану антиоксидантної системи досліджували гени, що детермінують активність найважливіших ферментів цієї системи: SOD-2 (супероксиддисмутазу), яка міститься безпосередньо в мітохондріях, і CAT (каталазу). Також було доцільним оцінити стан HIF (гіпоксично-індукованого фактора).

Результати дослідження та їх обговорення. У дітей, народжених завдяки ДРТ, достовірно частіше спостерігали гетерозиготні мутації фрагментів ДНК, що відповідають за функціональний стан SOD-2 ($\chi^2=4,68$; $p=0,030$), і гетерозиготні й гомозиготні мутації щодо CAT ($\chi^2=3,85$; $p=0,049$). Мутації, які відповідають за функціонування CAT, SOD-2, є прогностично несприятливими факторами, предикторами більш частого розвитку респіраторних захворювань, затримки фізичного розвитку.

Висновки. Застосування генетичних досліджень, спрямованих на вивчення функції каталази і супероксиддисмутазу у дітей, народжених завдяки ДРТ, показало їх ефективність і доцільність для подальшого вивчення стану здоров'я дітей даної групи.

Ключові слова: діти; допоміжні репродуктивні технології; генетичні дослідження; мутация; каталаза; супероксиддисмутазу; гіпоксично-індукований фактор.

GENETIC MARKERS OF ANTIOXIDANT PROTECTION IN CHILDREN BORN AFTER ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES

The aim of the study – to examine the effectiveness and evaluate the possibilities of using genetic methods for studying enzymes responsible for antioxidant protection in children born after ART. And also to determine the possible impact of the findings on the health status of this group of children.

Materials and Methods. The research analyses the examination of 45 children of the main group, born after assisted reproductive technologies (ART) and 20 children of the control group – born after spontaneous pregnancy (SP). To assess the state of the antioxidant system (AOS), genes that determine the activity of the most important AOS enzymes: SOD-2 (superoxide dismutase) located directly in the mitochondria, and CAT (Catalase). We also thought it appropriate to evaluate the state of HIF (hypoxic-induced factor).

Results and Discussion. In children born after ART, heterozygous mutations of DNA fragments responsible for the functional state of SOD-2 ($\chi^2 = 4.68$, $p = 0.030$) and heterozygous and homogeneous mutations in the ratio of CAT ($\chi^2 = 3.85$, $p = 0.049$) were observed more often. Mutations responsible for the functioning of CAT, SOD-2 are prognostically unfavorable factors, predictors of more frequent development of respiratory diseases, delay in physical development.

Conclusions. The use of genetic studies aimed at studying the function of catalase and superoxide dismutase in children born after ART was effective and useful for further study of the state of health.

Key words: children; assisted reproductive technologies; genetic studies; mutation; catalase; superoxide dismutase; hypoxic-induced factor.

ВСТУПЛЕНИЕ. Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) в последнее время становятся все более востребованными, в связи с чем все чаще в практике педиатра встречаются дети, рожденные благодаря экстракорпоральному оплодотворению (ЭКО). На данный момент существует много работ, описывающих здоровье таких детей. В основном это антропометрические показатели, которые не отличаются от данных детей, рожденных естественным путем (ЕП). Также встречаются исследования заболеваемости, где данные разных исследователей противоречивы. Наиболее часто встречаются исследования врожденных пороков развития, которые показывают большую частоту их возникновения у детей, рожденных благодаря ВРТ, чем у детей, зачатых ЕП. В то же время в меньшей степени изучены генетические факторы патологических процессов, которые могут привести к различным неблагоприятным последствиям. Данные исследования начали проводить последние пять лет методом предимплантационной генетической диагностики (ПГД) с целью обеспечения рождения генетически здорового ребенка. Т. Richard et al. исследовали эмбрионы на разных стадиях развития – от момента трансвагинальной пункции до 5 дня и учитывали аномалии развития 21 хромосомы [5]. Метод генетического скрининга ПГД позволяет исключить вероятность рождения ребенка, имеющего грубые аномалии развития, но, к сожалению, не исключает полностью возможности развития других патологических состояний, таких, как влияние метилирования ДНК на физическое и психическое развитие ЭКО-детей [1, 7], мутация гена, отвечающего за протромбин [4], или β -талассемия [6].

В настоящее время уделяют значительное внимание нарушениям в энергетическом обмене у детей, рожденных благодаря ВРТ. Имеются работы, рассматривающие генетические дефекты митохондриального состава клетки, вследствие которых при нарушении функции митохондрий возникает патология энергетического обмена в клетках с момента оплодотворения [8]. N. Kimura et al. в своей работе указывают на то, что эмбрионы со 2-го дня жизни в стрессовой ситуации подвержены значительному риску при наличии патологических изменений в структуре SOD-2 гена [2]. K. Komatsu et al. в своем исследовании указывают на взаимосвязь активности перекисного окисления липидов и мутации SOD-2 фрагмента ДНК [3].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ – изучить эффективность и оценить возможности использования генетических методов исследования ферментов, отвечающих за антиоксидантную защиту у детей, рожденных благодаря ВРТ, а также определить возможное влияние выявленных нарушений на состояние здоровья детей данной группы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В исследовании принимали участие 45 детей основной группы, рожденных благодаря ВРТ, и 20 детей контрольной группы, рожденных после спонтанной беременности (СБ). Для оценки состояния антиоксидантной системы исследовали гены, де-

терминирующие активность важнейших ферментов этой системы: SOD-2 (супероксиддисмутаза), находящейся непосредственно в митохондриях, и САТ (каталаза). Также представлялось целесообразным оценить состояние HIF (гипоксически-индуцированного фактора) – транскрипционного фактора, обеспечивающего повышение экспрессии VEGF (факторов роста эндотелия сосудов) и рецепторов VEGF в ответ на уменьшение содержания кислорода (гипоксию), участвующего в анаэробном метаболизме, регулирующего выработку кислорода АТФ с помощью окислительного фосфорилирования, принимающего участие в ангиогенезе (кроме этого, HIF-1 изменяет экспрессию генов, контролирующих транспорт глюкозы и гликолиз, что обеспечивает адаптацию клеток к условиям гипоксии). Материал для генетического исследования забирался при помощи буккального соскоба.

Для проведения данных исследований использовали полимеразную цепную реакцию генов, отвечающих за функцию этих ферментов. При этом были получены такие варианты ответов: ген не имеет мутации, присутствует гетерозиготная или гомозиготная мутация. При наличии данных лабораторных исследований был проведен сравнительный анализ влияния патологических мутаций на развитие и состояние здоровья детей.

Полученные результаты обрабатывали с помощью параметрических и непараметрических методов с вычислением среднего арифметического значения, стандартного отклонения. Для оценки соответствия распределения генотипов ожидаемым значениям использовали критерий Пирсона (χ^2), при отсутствии нормального распределения – Манна–Уитни. Проводили расчеты величины относительного риска (RR) и отношения шансов (OR). Силу ассоциаций оценивали по показателям этиологической (ЕФ, при $RR \geq 1$) или превентивной (ПФ, при $RR < 1$) фракции. Разницу считали достоверной при $p < 0,05$.

Статистическую обработку материалов проводили с применением пакета программ «EXCEL for windows», «STATISTICA 7.0 for windows».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

При проведении исследования HIF были получены результаты, свидетельствующие о патологических изменениях в структуре дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) у 13 детей ((28,8±6,8) %), из которых гетерозиготные нарушения наблюдали в 11 детей ((24,4±6,4) %), гомозиготные – у 2 детей ((4,4±3,1) %). При исследовании фрагмента ДНК, отвечающего за функцию SOD-2, были обнаружены гетерозиготные нарушения в геномной структуре 13 детей ((28,9±6,8) %). При исследовании генетических нарушений в отношении САТ было обнаружено патологическое строение участка ДНК, отвечающего за данный фермент, в 23 случаях ((51,1±7,5) %), из которых гетерозиготные составили 19 ((42,2±7,4) %) и гомозиготные – 4 ((8,9±4,2) %). При генетическом исследовании детей контрольной группы гетерозиготные нарушения в отношении SOD-2 наблюдали у одного ребен-

ка ((5±4,9) %), гомозиготные – также у одного ((5±4,9) %). При исследовании нарушений строения фрагмента ДНК, отвечающего за CAT, гомозиготные нарушения составили (5±4,9) %, гетерозиготные нарушения наблюдали у 4 детей ((20,0±8,9) %).

В группе детей, рожденных благодаря ВРТ, с недостаточной массой тела родилось 2 ребенка, один из них – с экстремально низкой массой тела 980 г. У этого ребенка наблюдали гетерозиготные нарушения генов SOD-2 и CAT. При изучении антенатального периода развития у 2 детей с гомозиготными мутациями CAT была угроза прерывания беременности с отслойкой плаценты.

У детей с гомозиготной мутацией CAT и гетерозиготной мутацией HIF среди заболеваний отмечали часто возникающие ОРВИ, ангину, острые бронхиты, стоматит.

Результаты исследования маркеров риска снижения антиоксидантной защиты у детей, рожденных благодаря ВРТ, отражены в таблице.

Согласно данным, приведенным в таблице, гомозиготные и гетерозиготные нарушения фрагмента ДНК, отвечающего за HIF, достоверно не отличаются у детей, рожденных благодаря ВРТ и СБ. В то же время достоверные отличия отмечали при исследовании гена, отвечающего за функцию SOD-2, где гетерозиготные мутации в группе детей, рожденных с помощью ВРТ, значительно выше, чем в группе сравнения ($\chi^2=4,68$, $p=0,030$). Полученные данные показали, что гомозиготные и гетерозиготные мутации CAT в группе детей, рожденных благодаря ВРТ, значительно выше, чем в группе сравнения ($\chi^2=3,85$, $p=0,049$). Таким образом, представляется возможным считать гомозиготные и гетерозиготные мутации в генах, отвечающих за функционирование CAT, SOD-2, прогностически неблагоприятными факторами, предикторами более частого развития респираторных заболеваний, задержки развития. Данная категория детей требует постоянного тщательного наблюдения, контроля развития.

Таблица. Маркеры риска снижения антиоксидантной защиты у детей, рожденных благодаря ВРТ, и их прогностическая ценность

Иммуногенетический маркер	RR	EF	PF	OR, 95 % CI	df=1 χ^2 (p)
Генотип HIF:					
CC	1,29	0,23	–	2,01[0,76–5,31]	1,61/0,205
CT	0,54	–	0,26	0,39[0,14–1,06]	2,75/0,097
TT	–	–	–	–	0,92/0,338
CT + TT	0,64	–	0,14	0,49[0,19–1,30]	1,61/0,205
Генотип SOD-2:					
TT	0,79	–	0,16	0,27[0,11–0,70]	2,78/0,095
TC	5,78	0,83	–	7,72[0,96–61,87]	4,68/0,030
CC	–	–	–	–	2,29/0,131
TC + CC	2,89	0,65	–	3,66[0,77–17,28]	2,78/0,095
Генотип CAT:					
CC	0,65	–	0,06	0,32[0,13–0,75]	3,85/0,049
CT	2,11	0,05	–	2,92[0,89–9,55]	2,99/0,084
TT	1,78	0,44	–	1,85[0,19–17,19]	0,29/0,587
CT + TT	2,04	0,51	–	3,14[1,04–9,44]	3,85/0,049

ВЫВОДЫ. У детей, рожденных благодаря ВРТ, достоверно чаще наблюдают гетерозиготные мутации фрагментов ДНК, отвечающих за функциональное состояние SOD-2 ($\chi^2=4,68$; $p=0,030$), и гетерозиготные и гомозиготные мутации в отношении CAT ($\chi^2=3,85$; $p=0,049$). Мутации, отвечающие за функционирование CAT, SOD-2, являются прогностически неблагоприятными факторами, предикторами более частого развития респираторных заболеваний, задержки физического развития. Данная категория детей требует постоянного тщательного наблюдения, контроля развития.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ. Данная работа показала необходимость дальнейшего

изучения антиоксидантной защиты у детей, рожденных благодаря ВРТ. В процессе исследования выявлены специфические изменения со стороны ферментативной активности каталазы и супероксиддисмутазы. Перспективной дальнейших исследований будет изучение данных генетического исследования с биохимическими и цитологическими показателями энергетического обмена в клетках. Более углубленные исследования дадут больше информации о состоянии здоровья детей, рожденных с помощью ВРТ, а также возможность разработать алгоритмы диагностических и профилактических мероприятий для улучшения состояния здоровья данной категории детей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neonatal follow-up of 995 consecutively born children after embryo biopsy for PGD / S. Desmyttere, M. De Rycke, C. Staessen [et al.] // Human Reproduction. – 2012. – Vol. 27, No.1. – P. 288–293.
2. Kimura N. Intrinsic oxidative stress causes either 2-cell arrest or cell death depending on developmental stage of the embryos

from SOD1-deficient mice / N. Kimura, S. Tsunoda, Y. Iuchi // Molecular Human Reproduction. – 2010. – Vol. 16. – P. 441–451.
3. Komatsu K. Mitochondrial membrane potential in 2-cell stage embryos correlates with the success of preimplantation development / K. Komatsu, A. Iwase, M. Mawatari [et al.] // Reproduction. – 2014. – Vol. 147. – P. 627–638.

4. Factor V Leiden and prothrombin gene G20210A mutation and in vitro fertilization: prospective cohort study / G. Ricci, P. Bogatti, L. Fischer-Tamaro [et al.] // *Human Reproduction*. – 2011. – Vol. 26, No.11. – P. 3068–3077.

5. Delivery of a chromosomally normal child from an oocyte with reciprocal aneuploid polar bodies / Richard T. Scott Jr, Nathan R. Treff, John Stevens [et al.] // *Assist. Reprod. Genet.* – 2012. – Vol. 29. – P. 533–537.

6. Preimplantation diagnosis for β -thalassemia combined with HLA matching: first “savior sibling” is born after embryo selection in Brazil / Rita C. S. Figueira, Amanda S. Setti, Sylvia

S. Cortezzi [et al.] // *Assist. Reprod. Genet.* – 2012. – Vol. 29. – P. 1305–1309.

7. Ruiz-Sanz J. I. Ala16Val SOD2 polymorphism is associated with higher pregnancy rates in vitro fertilization cycles / J. I. Ruiz-Sanz, I. Aurrekoetxea, R. Matorras, M. B. Ruiz-Larrea // *Fertil Steril.* – 2011. – Vol. 95(5). – P. 1601–1605.

8. Study of DNA methylation patterns of imprinted genes in children born after assisted reproductive technologies reveals no imprinting errors: A pilot study / H-Y. Zheng, X-Y Shi, L-L. Wang [et al.] // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2011. – Vol. 2. – P. 751–755.

REFERENCES

1. Desmyttere, S., De Rycke, M., Staessen, C., Liebaers, I., De Schrijver, F., & Verpoest, W. (2012). Neonatal follow-up of 995 consecutively born children after embryo biopsy for PGD. *Human Reproduction*, 1, (27), 288-293.

2. Kimura, N., Tsunoda, S., & Iuchi, Y. (2010). Intrinsic oxidative stress causes either 2-cell arrest or cell death depending on developmental stage of the embryos from SOD1-deficient mice. *Molecular Human Reproduction*, (16), 441-451.

3. Komatsu, K., Iwase, A., Mawatari, M., Wang, J., Yamashita, M., & Kikkawa, F. (2014). Mitochondrial membrane potential in 2-cell stage embryos correlates with the success of preimplantation development. *Reproduction*, 1, (147), 627-638.

4. Ricci, G., Bogatti, P., Fischer-Tamaro, L.E., Giolo, E., Luppi, S., & Montico, M. (2011). Factor V Leiden and prothrombin gene G20210A mutation and in vitro fertilization: prospective cohort study. *Human Reproduction*, 11, (26), 3068-3077.

5. Richard, T., Scott, Jr., Nathan, R., Treff, Stevens, John, Giolo, E., Luppi, S., & Montico, M. (2012). Delivery of a

chromosomally normal child from an oocyte with reciprocal aneuploid polar bodies. *Assist Reprod Genet*, 29, 533–537.

6. Rita, C., Figueira, S., Setti, S., Amanda, Cortezzi, S., Sylvia, D. Martinhago, Ciro, P. Daniela, A., & Braga, F. (2012). Assumpto Iaconelli Jr. Preimplantation diagnosis for β -thalassemia combined with HLA matching: first “savior sibling” is born after embryo selection in Brazil. *Assist. Reprod. Genet.*, 29, 1305-1309.

7. Ruiz-Sanz, J.I., Aurrekoetxea, I., Matorras, R., & Ruiz-Larrea, M.B. (2011). Ala16Val SOD2 polymorphism is associated with higher pregnancy rates in in vitro fertilization cycles. *Fertil. Steril.*, 5, (95), 1601-1605.

8. Zheng, H-Y., Shi, X-Y, Wang, L-L., Wu, Ya-Qin, Chen, Shi-Ling, Zhang, & Lin (2011). Study of DNA methylation patterns of imprinted genes in children born after assisted reproductive technologies reveals no imprinting errors: A pilot study. *Experimental and Therapeutic Medicine*, (2), 751-755.

Отримано 27.01.17