

UDC: 616-053.32:[612.6.05+612.015.33+612.13]-  
02:616-055.26./-056.52  
DOI: 10.24061/2413-4260.XIII.3.49.2023.6

**О. М. Ковальова, Ю. І. Чернявська,  
В. І. Похилько, О. Є. Акімов,  
А. В. Слюсарєва**

Полтавський державний медичний університет  
(м. Полтава, Україна)

## ВПЛИВ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНУ ENOS ТА ПОКАЗНИКІВ ОБМІНУ ОКСИДУ АЗОТУ НА НЕОНАТАЛЬНІ НАСЛІДКИ У ПЕРЕДЧАСНО НАРОДЖЕНИХ ДІТЕЙ ВІД МАТЕРІВ З МЕТАБОЛІЧНИМ СИНДРОМОМ

### Резюме

Метаболічний синдром розглядається як кластер порушень, які безпосередньо сприяють розвитку серцево-судинних захворювань і характеризуються хронічним системним запаленням. Численні епідеміологічні дані свідчать про те, що несприятливе внутрішньоутробне середовище, спричинене особливостями нутритивного статусу або плацентарною недостатністю у жінки з метаболічним синдромом, може «програмувати» сприйнятливості плода до подальшого розвитку серцево-судинних та метаболічних захворювань, має вплив на когнітивний і поведінковий розвиток. Оксид азоту (NO) відіграє вирішальну роль у патогенезі компонентів метаболічного синдрому. Діти, народжені передчасно, мають високу частоту пошкоджень мозку, що може призвести до моторних, когнітивних, поведінкових, соціальних, сенсорних розладів.

**Мета і завдання дослідження.** Вивчення впливу поліморфізму гену eNOS та показників обміну оксиду азоту на неонатальні наслідки у передчасно народжених дітей від матерів з метаболічним синдромом.

**Матеріал та методи дослідження.** Було проведено дослідження, до якого увійшли 100 передчасно народжених дітей. Для досягнення мети було сформовано дві групи: основну (n=34), до якої увійшли передчасно народжені діти (вага при народженні 2145,29±148,19 г та гестаційним віком 33,18±0,55 тижнів) від матерів з метаболічним синдромом, та групу порівняння (n=66), до якої увійшли передчасно народжені діти (вага при народженні 2295,99±101,45 та ГВ 34,03±0,45 тижн.) від матерів без метаболічного синдрому. Дітям було проведено генетичне дослідження – визначення поліморфізму гену eNOS, а також рівня нітритів, нітратів та нітрозотіолів сечі.

Рішенням комісії з біоетики № 217 від 12.06.2023 підтверджено, що матеріали наукової роботи відповідають Правилам гуманного поводження з пацієнтами.

Використовували традиційні методи параметричної та непараметричної статистики. Для аналізу якісних ознак, що виражалися в основному у відсотках, були застосовані непараметричні методи. За допомогою методів параметричної статистики здійснювались перевірка нормальності розподілу кількісних ознак з використанням критерію Колмогорова-Смірнова. Статистична обробка отриманих результатів проводилася за допомогою пакета прикладних програм EXCEL-2003® і STATA версії 11 для Windows (StataCorp, Texas, США).

Робота виконана у межах НДР кафедри педіатрії № 1 та неонатології Полтавського державного медичного університету «Розробити клініко-лабораторні критерії, методи прогнозування та запобігання метаболічних порушень у дітей раннього віку» (державний реєстраційний номер 0120U102856).

**Результати дослідження.** Найпоширенішими захворюваннями серед немовлят обстежених груп виявились наслідки внутрішньоутробної гіпоксії (44,1%) та дихальна недостатність, що потребувала штучної вентиляції легень (50,0%), хоча достовірних відмінностей у поширеності цих станів знайдено не було. Ми ідентифікували наявність достовірних асоціацій між наслідками внутрішньоутробної гіпоксії та рівнем нітратів (ВШ 1,19; 95% ДІ 1,01-1,40; p=0,042), нітрозотіолів (ВШ 1,19; 95% ДІ 0,99-1,42; p=0,050) та поліморфним генотипом 4aa/ab гену eNOS (ВШ 0,28; 95% ДІ 0,12-0,67; p=0,004). Аналіз системної гемодинаміки виявив відсутність достовірних відмінностей у базових показниках передчасно народжених немовлят з наслідками внутрішньоутробної гіпоксії та без неї, але ми звернули увагу на наявність зв'язку з погодинним діурезом на третю добу.

Для остаточного з'ясування комплексного впливу показників нітратного обміну на розвиток внутрішньоутробної гіпоксії та прогнозування розвитку наслідків даного стану у передчасно народжених дітей в регресійну прогностичну модель включено такі показники: рівень нітратів, нітритів, генотип 4aa/4ab та погодинний діурез на третю доби життя. Як свідчать результати досліджень, існує прямий достовірний зв'язок з нітратами та зворотний з нітритами, генотипом 4aa/4ab та погодинним діурезом. Дана прогностична модель має високі операційні характеристики – площа під ROC кривою становить 0,8168.

Деякі механізми впливу метаболічного синдрому у матерів на розвиток відповідних порушень у новонароджених відомі, і серед них порушення синтезу оксиду азоту, ендотеліальна дисфункція, окислювальний стрес. У нашому дослідженні наслідки внутрішньоутробної гіпоксії достовірно асоціювались зі збільшенням концентрації нітратів у сечі, зменшенням нітритів і відсутністю генотипу 4aa/ab, який пов'язаний зі зменшенням виділенням оксиду азоту. Є свідчення про те, що оксид азоту може мати як захисну, так і шкідливу дію залежно від таких факторів, як ізоформа синтази оксиду азоту і час впливу гіпоксії.

**Висновки.** У передчасно народжених дітей від матерів з метаболічним синдромом підвищення рівня нітратів сечі та відсутність генотипу eNOS 4aa/ab збільшує шанси мати наслідки внутрішньоутробної гіпоксії.

**Ключові слова:** передчасно народжені діти; матері з метаболічним синдромом; ген eNOS; метаболізм оксиду азоту; системна гемодинаміка; захворюваність.

### Вступ

Метаболічний синдром (МС) розглядається як кластер порушень, які безпосередньо сприяють розвитку серцево-судинних захворювань і характеризуються

хронічним системним запаленням. Численні епідеміологічні дані свідчать про те, що несприятливе внутрішньоутробне середовище, спричинене особливостями нутритивного статусу або плацентарною недостатністю

у жінки з МС, може «програмувати» сприйнятливність плода до подальшого розвитку серцево-судинних та метаболічних захворювань, має вплив на когнітивний і поведінковий розвиток [1, 2]. Вагітні жінки з МС мають підвищений ризик еклампсії, передчасних пологів та інших ускладнень [3-5].

Оксид азоту (NO) відіграє вирішальну роль у патогенезі компонентів МС і бере участь у різних мітохондріальних сигнальних шляхах, які контролюють клітинне дихання та апоптоз. Діти, народжені передчасно, мають високу частоту пошкоджень мозку, що може призвести до моторних, когнітивних, поведінкових, соціальних, сенсорних розладів. Збільшення кількості дітей, які виживають, незважаючи на низький гестаційний вік, супроводжується підвищенням неоптимальних результатів розвитку нервової системи [6]. Серед найпоширеніших факторів, що викликають ураження нервової системи у перинатальному періоді, є гіпоксія, як наслідок несприятливого перебігу вагітності та пологів [7]. Частота несприятливих неврологічних наслідків різна: до 17% передчасно народжених дітей мають серйозні аномалії, а серед немовлят з надзвичайно низькою вагою при народженні тільки у 42% відхилення у розвитку можуть бути визначені як помірні [8]. Більшість патологічних явищ, що лежать в основі гіпоксичних уражень є результатом порушення мозкового кровообігу та транспорту кисню до мозку. Проте патофізіологічні наслідки гіпоксично-ішемічного «інсульту» (саме такий термін використовується в більшості зарубіжних джерел) є комплексними та поступово розгортаються протягом певного періоду, що ускладнює медичним працівникам визначення своєчасних та адекватних варіантів лікування [9]. Все частіше з'являються публікації про енергетичний дефіцит на рівні нейронів у немовлят з асфіксією та гіпоксично-ішемічною енцефалопатією [10]. У даний час можливості своєчасної діагностики та лікування передчасно народжених дітей з гіпоксичними ураженнями центральної нервової системи обмежені. Багато досліджень вказують на мітохондріальну дисфункцію та активацію аутофагії [11].

При пошуку методів ранньої діагностики наслідків внутрішньоутробної гіпоксії (ВУГ) у передчасно народжених дітей ми звернули увагу на показники нітратного обміну. NO є одним з універсальних регуляторів фізіологічних функцій організму широкого спектру дії. Найбільш детально вивчено судинорозширювальну дію NO, пов'язану з впливом цГМФ на зниження концентрації  $Ca^{2+}$  в цитозолі м'язових клітин і підвищення  $Na^+$ . Також спостерігається вплив NO на кальцієві транспортні системи мітохондрій, що при дисбалансі швидко призводить до дефіциту енергії та активації процесів вільнорадикального окислення. Надлишок NO, який може вироблятися індукбельна NOS (iNOS), навпаки, відіграє ключову роль у пошкодженні нейронів, порушуючи функцію мітохондрій і сприяючи накопиченню мітохондріального субстрату [12].

NO є кінцевим продуктом перетворення L-аргініну конститутивними та неконститутивними ізоформами NOS. На сьогоднішній день відомо 3 ізоформи NOS: нейрональна, або нейральна (nNOS), ендотеліальна

(eNOS) та індукбельна (iNOS). nNOS і eNOS є конституційними типами ферментів і забезпечують синтез оксиду азоту в нормальних умовах; iNOS активується у відповідь на патогенні подразники та виробляє значно вищі рівні NO, відіграючи важливу роль у запаленні тканин і захисті організму [13]. Зміни експресії різних ізоформ NOS, відсутність або гіперпродукція NO призводять до дисбалансу активних форм азоту та кисню. Основними ланками перетворення NO є нітрозилування білків з утворенням S-нітрозотіолів, окислення NO до NO<sub>2</sub>- і NO<sub>3</sub>-. Нітрозотіоли є однією з форм осадження NO і важливим його джерелом у фізіологічних умовах. Отже, клітинний вміст NO залежить від активності NO-синтаз, активності нітри- і нітратредуктаз і наявності достатнього пулу депонованого NO. Є дослідження, які показують, що NO виробляється у більших внутрішньосудинних кількостях у новонароджених, ніж у дорослих [14]. Зниження рівня нітратів і нітритів внаслідок дефіциту NO потенційно свідчить про ішемію судин і вазоспазм [15]. Ендотеліальна дисфункція, що проявляється втратою нейроваскулярних протективних функцій NO, може суттєво сприяти розвитку когнітивних розладів [16].

**Мета і завдання дослідження.** Вивчення впливу поліморфізму гену eNOS та показників обміну оксиду азоту на неонатальні наслідки у передчасно народжених дітей від матерів з метаболічним синдромом.

#### Матеріал та методи дослідження

Було проведено дослідження, до якого увійшли 100 передчасно народжених дітей. Для досягнення мети було сформовано дві групи: основну (n=34), в яку увійшли передчасно народжені діти (вага при народженні 2145,29±148,19 г та ГВ 33,18±0,55 тижнів) від матерів з МС, та групу порівняння (n=66), в яку увійшли передчасно народжені діти (вага при народженні 2295,99±101,45 г та ГВ 34,03±0,45 тижнів) від матерів без МС.

Критеріями виключення були наявність вроджених вад розвитку, генетична патологія, відмова батьків від участі в дослідженні. Передчасно народжені немовлята, яких було включено у дослідження, виходжувалися та лікувалися у лікарняних закладах Полтавської області. Результати клінічного обстеження, показників гемодинаміки (ЧСС, АТ), рівня діурезу на 1 та 3 добу життя фіксувалися у медичній карті стаціонарного хворого. Неонатальними наслідками обрано стани, в патогенезі розвитку яких важливу роль грає судинний компонент, зокрема дихальну недостатність (ДН), що потребувала застосування штучної вентиляції легень (ШВЛ), внутрішньосудинної крововиливи (ВШК), ранні наслідки внутрішньоутробної або інтранатальної гіпоксії (наслідки ВУГ) та харчову інтолерантність.

Всім дітям було проведено генетичне дослідження – визначення поліморфізму rs61722009 гену eNOS з метою врахування можливих генетично детермінованих коливань концентрації NO. У повторі 27 bp інтрона 4 гена eNOS ідентифіковано два алелі, більший з яких, eNOS-4b, має 5 з 27 bp тандемних повторів (GAAGTCTAGACCTGCTGC(A/G)GGGGTGAG),

а менший, eNOS-4a, має чотири повторення і знижує синтез оксиду азоту [17].

Матеріалом для проведення дослідження була периферична кров новонароджених. Забір крові проводили в об'ємі 0,25 мл. Після отримання зразків їх зберігали при температурі  $-20^{\circ}\text{C}$  до проведення дослідження. Виділення зразків ДНК з отриманого матеріалу проводили за допомогою комерційного набору реактивів «Quick-DNAUniversalKit», потім проводили молекулярно-генетичне дослідження методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Об'єктом біохімічного дослідження була сеча. Визначення концентрації низькомолекулярних нітрозотіолів проводили шляхом розрахунку різниці концентрації нітритів ( $\text{NO}_2^-$ ) до та після окиснення нітрозотіолових комплексів (S-NO) до нітритів розчином хлориду ртуті ( $\text{HgCl}_2$ ). Для дослідження брали аліквоту сечі об'ємом 0,2 мл [18]. Концентрацію нітритів визначали шляхом визначення вмісту діазосполук, що утворюються в реакції з сульфаниловою кислотою, а потім проводили реакцію з  $\alpha$ -нафтиламином (реактив Грісса-Ілосвая), в результаті чого утворювалися червоні похідні (азобарвники) [19]. Концентрацію нітратів визначали за збільшенням концентрації нітритів після відновлення нітратів до нітритів сірчистим гідразином. Для визначення концентрації нітратів і нітритів використовували аліквоти сечі по 0,2 мл.

Рішенням комісії з біоетики № 217 від 12.06.2023 матеріали наукової роботи відповідають Правилам гуманного поводження з пацієнтами відповідно до вимог Токійської декларації Всесвітньої медичної асоціації, Міжнародних рекомендацій Гельсінкі. Декларація прав людини, Конвенція Ради Європи про права людини та біомедицину, Закони України, накази МОЗ України та вимоги Кодексу етики лікаря в Україні.

Використовували традиційні методи параметричної та непараметричної статистики; для аналізу якісних ознак, що виражалися в основному у відсотках, були застосовані непараметричні методи. За допомогою методів параметричної статистики здійснювались: перевірка нормальності розподілу кількісних ознак з використанням критерію Колмогорова-Смірнова.

При нормальному розподілі даних використовували основні статистичні характеристики, а саме: середнє значення (M) для визначення центральної тенденції; стандартну похибку середнього значення (m) для точності оцінки середньої, довірчий інтервал (ДІ) – для

визначення 95% інтервалу середньої. Перевірка гіпотез щодо рівності генеральних середніх проводилась з використанням two sample t-test.

При ненормальному розподілі центральну тенденцію визначали за допомогою медіани (Me) та квартилі (Q).

Порівняння відносних, або виражених у відсотках, величин здійснювалося за допомогою критерію  $\chi^2$  (хі-квадрат), порівняння кількісних показників з ненормальним розподіленням при непов'язаних вибірках – за допомогою критерію Wilcoxon rank-sum test.

Для доведення зв'язку між окремими показниками застосовували простий та множинний логістичний регресійний аналіз, розраховували відношення шансів (ВШ), прогностичні коефіцієнти ( $\beta$ ) їх довірчі інтервали. Після ідентифікації достовірних факторів ризику розроблялись прогностичні моделі за допомогою множинного логістичного аналізу з подальшим оцінюванням операційних характеристик зазначених моделей та виявлення з них моделі з найбільшим коефіцієнтом С (площею під ROC-кривою) за допомогою пакету прикладних програм STATA 14.0.

Статистична обробка отриманих результатів проводилась за допомогою пакета прикладних програм EXCEL-2003® і STATA версії 11 для Windows (StataCorp, Техас, США).

Робота виконана у межах НДР кафедри педіатрії № 1 та неонатології Полтавського державного медичного університету «Розробити клініко-лабораторні критерії, методи прогнозування та запобігання метаболічних порушень у дітей раннього віку» (державний реєстраційний номер 0120U102856).

### Результати дослідження та їх обговорення

Немовлята від матерів з МС достовірно частіше, ніж немовлята від матерів без МС, народжувалися шляхом кесарського розтину (КР) – 44,1 проти 10,6%,  $p=0,0002$ . Нами не отримано достовірних відмінностей між групами у кількості досліджуваних неонатальних станів, зокрема, наслідків ВУГ, ДН, що потребувала застосування ШВЛ, ВШК та харчової інтолерантності (табл. 1). Найпоширенішими захворюваннями серед немовлят обстежених груп виявились наслідки ВУГ та ДН, що потребувала ШВЛ. Саме внутрішньоутробна гіпоксія плода в більшій кількості випадків спричиняла проведення операції КР.

Таблиця 1

Неонатальні наслідки та показники обміну оксиду азоту в дітей обстежених груп

Показники	Основна група, n=34	Група порівняння, n=66	p
ДН, що потребувала ШВЛ, n (%)	17 (50,0)	23 (34,8)	0,143
Харчова інтолерантність, n (%)	4 (11,8)	6 (9,1)	0,317
ВШК, n (%)	4 (11,8)	13 (19,7)	0,673
Наслідки внутрішньоутробної гіпоксії (P 20.9), n (%)	15 (44,1)	35 (53,1)	0,398
Нітрати (нмоль/л), Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	3,95 (2,12-5,78)	4,86 (2,43-6,08)	0,587
Нітрити (нмоль/л), Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	1,22 (0,91-2,13)	1,52 (0,92-2,73)	0,418
Нітрозотіоли (мкмоль/л), Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	2,89 (2,61-4,70)	2,82 (2,61-5,7)	0,950
Генотип 4aa/4ab, n (%)	13 (38,2)	23 (34,8)	0,738

Примітка: ГВ – гестаційний вік, ДН – дихальна недостатність, ШВЛ – штучна вентиляція легень, ВШК – внутрішньошлункові крововиливи

Дослідження **обміну оксиду азоту** обміну показало відсутність достовірних відмінностей у рівнях нітритів, нітратів та нітрозотіолів між досліджуваними групами немовлят, які народились від матерів з наявним або відсутнім МС. Також не виявлено відмінностей у розподілу дітей в групах залежно від 4aa/ab гену *eNOS*. Отже, наявність МС матері не впливає на нітратний обмін передчасно народжених дітей відразу після їх народження.

За даними численних досліджень наявність МС у матері спричиняє внутрішньоутробну гіпоксію плода [7], яка є показаннями для проведення операції кесаревого розтину, що, в свою чергу, погіршую адаптацію немовлят до позаутробного життя після народження. Тому ми дослідили наявність зв'язку між неонатальними наслідками та показниками **обміну оксиду азоту**

за рівнем (нітратів, нітритів та нітрозотіолів) у передчасно народжених немовлят.

Ми виявили наявність достовірних асоціацій між наслідками ВУГ та рівнем нітратів, нітрозотіолів та поліморфним генотипом 4aa/ab гену *eNOS* (табл. 2). Що стосується інших неонатальних станів, то достовірного зв'язку між ними та рівнем нітратів, нітритів та нітрозотіолів не виявлено. Наявність поліморфного генотипу 4aa/ab гену *eNOS* достовірно асоціювалась з розвитком у передчасно народженої дитини клінічних проявів ВУГ, тобто зменшувала шанси дитини мати клінічні наслідки внутрішньоутробної гіпоксії, і не асоціювалась з розвитком інших неонатальних станів. Виявлено достовірний прямий зв'язок між розвитком ВУГ у передчасно народжених немовлят та рівнем нітратів та нітрозотіолів у сечі за простим логістичним регресійним аналізом (табл. 2).

Таблиця 2

**Зв'язок поліморфізму гену eNOS та показників обміну оксиду азоту з неонатальними наслідками за простим логістичним регресійним аналізом**

	Нітрати	Нітрити	Нітрозотіоли	Генотип 4aa/4ab
ДН	OR 1,06 95% CI 0,91-1,24 p=0,422	OR 1,13 95% CI 0,81-1,57 p=0,464	OR 1,03 95% CI 0,90-1,19 p=0,651	OR 0,93 95% CI 0,40-2,14 p=0,865
ВШК	OR 0,96 95% CI 0,78-1,18 p=0,766	OR 0,76 95% CI 0,39-1,33 p=0,434	OR 1,03 95% CI 0,90-1,19 p=0,651	OR 1,2 95% CI 0,29-2,54 p=0,781
Наслідки ВУГ	OR 1,19 95% CI 1,01-1,40 p=0,042	OR 1,23 95% CI 0,87-1,72 p=0,236	OR 1,19 95% CI 0,99-1,42 p=0,050	OR 0,28 95% CI 0,12-0,67 p=0,004
Харчова інтолерантність	OR 1,2 95% CI 0,32-4,6 p=0,781	OR 0,85 95% CI 0,46-1,56 p=0,593	OR 0,9 95% CI 0,66-1,23 p=0,503	OR 0,85 95% CI 0,46-1,56 p=0,593

Примітка: ДН – дихальна недостатність, ВШК – внутрішньошлуночковий крововилив, ВУГ – внутрішньоутробна гіпоксія

У той же час, нами не виявлено зв'язку між 4aa/ab генотипом та показниками **обміну оксиду азоту** обміну, зокрема нітратами (ВШ 1,08, p= 0,318), нітритами (ВШ 1,11, p=0,548) та нітрозотіолами (ВШ 1,07, p=0,352).

У подальшому було проаналізовано особливості **обміну оксиду азоту** у передчасно народжених немовлят залежно від наявності у них наслідків ВУГ. Медіанне значення показників нітратів, нітритів та нітрозотіолів у передчасно народжених немовлят з ВУГ було достовірно вище за дані показники дітей без ВУГ (табл. 3).

Оскільки одними з найважливіших функцій NO в організмі людини є регуляція кровотоку, шляхом впливу на судинний тонус та стан ендотелію, нами було вивчено особливості показників гемодинаміки та функції нирок серед цієї когорти пацієнтів (табл. 3). Аналіз системної гемодинаміки виявив відсутність достовірних відмінностей у базових показниках передчасно народжених немовлят з ВУГ та без неї, але ми звернули увагу на наявність зв'язку на рівні <0,1 з погодинним діурезом на третю добу, хоча даний показник залишався в межах норми.

Таблиця 3

**Показники обміну оксиду азоту та системної гемодинаміки серед дітей залежно від наявності або відсутності наслідків внутрішньоутробної гіпоксії**

Прогностичні змінні	Діти з ВУГ, n=50	Діти без ВУГ, n=50	ВШ 95% ДІ	p
Нітрати сечі (нмоль/л) Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	4,86 (3,95-4,08)	3,04 (1,8-6,08)	1,19 (1,00-1,4)	0,017
Нітрити сечі (нмоль/л) Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	1,82 (1,22-2,18)	0,22 (0,61-2,74)	1,22 (0,87-1,72)	0,031
Нітрозотіоли сечі (мкмоль/л) Me (Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> )	3,92 (2,75-5,94)	2,75 (2,61-3,47)	1,19 (0,99-1,42)	0,020
ЧСС 1 доба (уд. за хв.) M±m	148,08±1,91	150,78±1,65	0,98 (0,95-1,01)	0,287
ЧСС 3 доба (уд. за хв.) M±m	149,12±1,86	151,24±1,93	0,99 (0,95-1,02)	0,426
АТ середній, 1 доба (мм.рт.ст) M±m	33,92±1,06	33,06±1,01	1,02 (0,96-1,07)	0,555
АТ середній, 3 доба (мм.рт.ст) M±m	35,24±0,92	35,26±0,92	0,99 (0,94-1,06)	0,988
Діурез, 1 доба (мл/кг/год) M±m	2,07±0,25	2,3±0,2	0,92 (0,72-1,19)	0,535
Діурез, 3 доба (мл/кг/год) M±m	3,03±0,16	3,5±0,18	0,72 (0,51-1,02)	0,067

Для остаточного з'ясування комплексного впливу показників нітратного обміну на розвиток ВУГ та прогнозування розвитку наслідків даного стану у передчасно народжених дітей в регресійну прогностичну модель включено такі показники: рівень нітратів, нітритів, генотип 4aa/4ab та погодинний діурез на третю

добу життя. Як свідчать результати досліджень, існує прямий достовірний зв'язок з нітратами та зворотній з нітритами, генотипом 4aa/4ab та погодинним діурезом (табл. 4).

Дана прогностична модель має високі операційні характеристики – площа під ROC кривою становить 0,8168.

Таблиця 4

Відношення шансів та прогностичні коефіцієнти ( $\beta$ ) прогностичної моделі щодо розвитку наслідків внутрішньоутробної гіпоксії

	ВШ (95% ДІ)	$\beta$ (95% ДІ)	p
Нітрати (нмоль/л)	4,75 (2,05-10,99)	1,56 (0,72-2,39)	<0,001
Нітрити (нмоль/л)	0,06 (0,01-0,32)	-2,79 (-4,43-(-1,14)	0,001
Генотип 4aa/4ab (так)	0,11 (0,03-0,37)	-0,43 (-,082-(-0,99)	<0,001
Погодинний діурез (мл/кг/год)	0,65 (0,17-5,68)	-0,42 (-0,82-(-0,02)	0,037

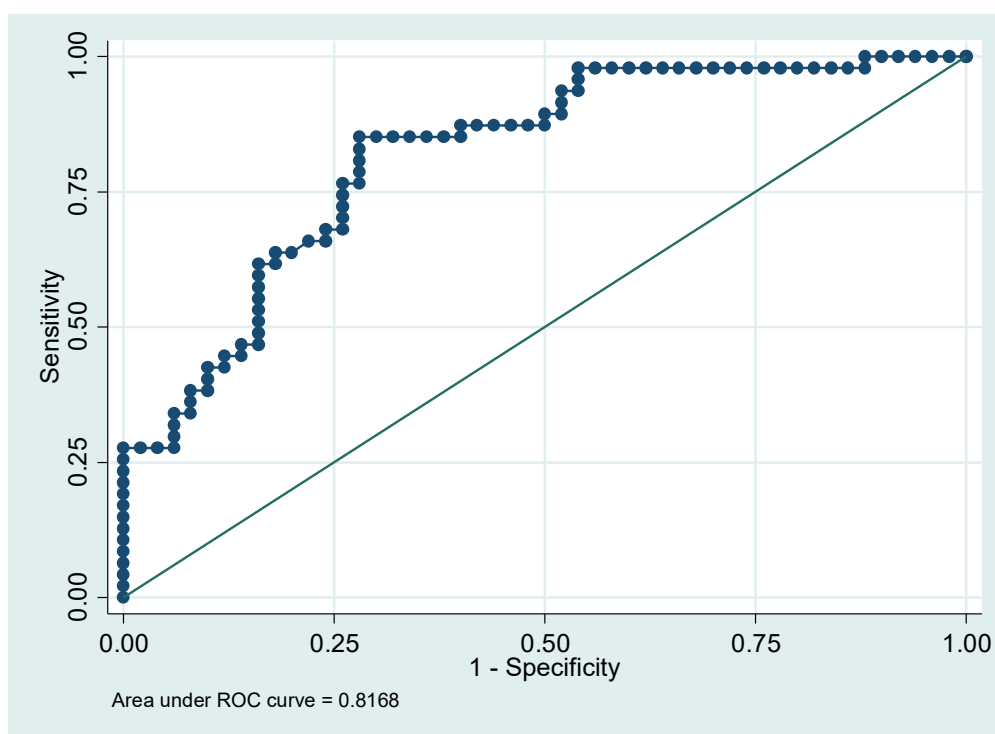


Рис. 1. ROC крива щодо прогнозування розвитку клінічних проявів наслідків внутрішньоутробної гіпоксії у передчасно народжених немовлят

В результаті проведених досліджень не було виявлено зв'язку між МС у матері та показниками нітратного обміну у передчасно народжених дітей. Проте, у нещодавньому метааналізі показано програмуючий вплив МС у матері протягом вагітності на стан обміну речовин новонароджених [20], у ряді когортних досліджень ще раніше було вивчено ризики порушень розвитку у дітей від матерів з МС [21, 22]. Деякі механізми впливу МС у матерів на розвиток відповідних порушень у новонароджених відомі, і серед них порушення синтезу NO, ендотеліальна дисфункція, окислювальний стрес [23, 24]. Зокрема в експериментальних роботах доведено вплив ліпопротеїдів дуже низької щільності (ЛПДНЩ) на біодоступність NO, окисно-відновний гомеостаз і функцію мітохондрій [25]. Високі сироваткові концентрації глюкози викликають дисфункцію ендотелію судин, що призводить до зниженої активації ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS) і збільшення

активних форм кисню, що пояснює знижений синтез і біодоступність NO і збільшення споживання NO [26]. А у роботі Grasemann С. доведено вплив внутрішньоутробного впливу материнської гіперглікемії та дієти з високим вмістом жирів на зміни легеневого метаболізму L-аргініну/NO у нащадків [27]. І хоча ми не отримали достовірних відмінностей щодо порушень обміну оксиду азоту у передчасно народжених немовлят залежно від наявності у їх матерів МС, вважаємо, що потрібні подальші дослідження такого плану на більшій когорті пацієнтів.

У нашому дослідженні наслідки ВУГ достовірно асоціювались зі збільшенням концентрації нітратів у сечі, та зменшенням нітритів, і відсутності генотипу 4aa/ab, який пов'язаний зі зменшеним виділенням NO. Є свідчення про те, що NO може мати як захисну, так і шкідливу дію залежно від таких факторів, як ізоформа NOS і час впливу гіпоксії [28]. Відразу після гіпоксично-ішемічного ураження головного мозку вивільнення NO

з eNOS є захисним, головним чином сприяючи вазодилатації; у зв'язку з цим NO має особливе значення для ауторегуляції церебрального судинного тонуусу. Однак NO, що продукується індуцибельною синтазою оксиду азоту (iNOS), може мати нейротоксичну дію, до якої особливо чутливий незрілий мозок. Слід зазначити, що iNOS легше та інтенсивніше експресується у новонароджених після гіпоксичної події, до того ж ця категорія пацієнтів має знижені резерви антиоксидантної системи [29]. Ймовірно, підвищений рівень нітратів у сечі новонароджених, що достовірно збільшував шанси мати наслідки перенесеної внутрішньоутробної гіпоксії, є підтвердженням цього факту.

Прикладною точкою застосування наших досліджень може стати не тільки прогнозування розвитку ВУГ, яка за клінічними проявами може бути незначною, але й для з'ясування статусу дитини щодо обміну оксиду азоту, оскільки все більше з'являється робіт, які доводять ефективність застосування модуляторів NO, такі як інгалаційний оксид азоту (iNO) і силденафіл, клінічно використовуються для лікування легеневої гіпертензії у недоношених новонароджених [30, 31], із зауваженням засторог щодо відсутності чітких показань. Існує занепокоєння щодо побічних ефектів у передчасно народжених дітей з малим гестаційним віком та за умов отримання матеріями під час вагітності донаторів оксиду азоту, ефективність яких в пролонгації вагітності доведена останнім мета-аналізом [32]. Ці висновки можуть мати важливе патофізіологічне значення для нашого розуміння взаємозв'язку між гематологічними та серцево-судинними захворюваннями та можуть виявити нові терапевтичні підходи до покращення тканинної перфузії головного мозку у передчасно народжених немовлят.

## Висновки

Найчастіше серед передчасно народжених дітей від матерів з метаболічним синдромом були зафіксо-

вані такі патологічні стани, як наслідки внутрішньоутробної гіпоксії (44,1%) та ДН, що потребувала ШВЛ (50,0%), хоча достовірних відмінностей у їх поширеності виявлено не було. Було виявлено достовірні асоціації між наслідками внутрішньоутробної гіпоксії та рівнем нітратів (ВШ 1,19; 95% ДІ 1,01-1,40;  $p=0,042$ ), нітрозотіолів (ВШ 1,19; 95% ДІ 0,99-1,42;  $p=0,050$ ), поліморфним генотипом 4aa/ab гену *eNOS* (ВШ 0,28; 95% ДІ 0,12-0,67;  $p=0,004$ ). Аналіз системної гемодинаміки виявив відсутність достовірних відмінностей у базових показниках передчасно народжених немовлят з ВУГ та без неї, але ми звернули увагу на наявність зв'язку на рівні  $p<0,1$  з погодинним діурезом на третю добу, хоча даний показник залишався в межах норми. За результатами множинного логістичного регресійного аналізу у передчасно народжених дітей від матерів з метаболічним синдромом підвищення рівня нітратів сечі та відсутність генотипу *eNOS 4aa/ab* збільшує шанси мати наслідки внутрішньоутробної гіпоксії.

## Перспективи подальших досліджень

Враховуючи складність і відсутність доведеного алгоритму діагностики можливих наслідків впливу гіпоксії на центральну нервову систему у передчасно народжених дітей, гіпотетично після проведення досліджень на більшій вибірці пацієнтів, можна розглядати визначення рівнів нітратів та нітрозотіолів сечі, як малоінвазивний метод скринінгу. До того ж, вплив на експресію різних ізоформ NOS може бути варіантом розробки нейропротективної терапії у новонароджених з наслідками внутрішньоутробної гіпоксії.

**Конфлікт інтересів.** Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

**Джерела фінансування.** Стаття опублікована без будь-якої фінансової підтримки.

## References:

1. Kwok J, Speyer LG, Soursou G, Murray AL, Fanti KA, Auyeung B. Maternal metabolic syndrome in pregnancy and child development at age 5: exploring mediating mechanisms using cord blood markers. BMC Med [Internet]. 2023[cited 2023 Aug 20];21(1):124. Available from: <https://bmcmedicine.biomedcentral.com/counter/pdf/10.1186/s12916-023-02835-5.pdf> doi: 10.1186/s12916-023-02835-5
2. Manokhina I, Del Gobbo GF, Konwar C, Wilson SL, Robinson WP. Review: placental biomarkers for assessing fetal health. Hum Mol Genet. 2017;26(R2): R237-45. doi: 10.1093/hmg/ddx210
3. Grieger J, Grzeskowiak L, Smithers L, Bianco-Miotto T, Leemaqz S, Andraweera P, et al. Metabolic syndrome and time to pregnancy: a retrospective study of nulliparous women. BJOG Int J Obstet Gynaecol. 2019;126(7):852-62. doi: 10.1111/1471-0528.15647
4. Yang X, Jiang R, Yin X, Wang G. Pre-BMI and Lipid Profiles in Association with the Metabolic Syndrome in Pregnancy with Advanced Maternal Age. Contrast Media Mol Imaging [Internet]. 2022[cited 2023 Aug 20];2022:4332006. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/cmim/2022/4332006/> doi: 10.1155/2022/4332006
5. .Walani SR. Global burden of preterm birth. Int J Gynaecol Obstet. 2020;150(1):31-3. doi: 10.1002/ijgo.13195
6. Martin A, Faes C, Debevec T, Rytz C, Millet G, Pialoux V. Preterm birth and oxidative stress: Effects of acute physical exercise and hypoxia physiological responses. Redox Biol. 2018;17:315-22. doi: 10.1016/j.redox.2018.04.022
7. Chatzi L, Plana E, Daraki V, Karakosta P, Alekakis D, Tsatsanis C, et al. Metabolic syndrome in early pregnancy and risk of preterm birth. Am J Epidemiol. 2009;170(7):829-36. doi: 10.1093/aje/kwp211
8. Gopagondanahalli KR, Li J, Fahey MC, Hunt RW, Jenkin G, Miller SL, et al. Preterm Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. Front Pediatr [Internet]. 2016[cited 2023 Aug 20];4:114. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2016.00114/full> doi: 10.3389/fped.2016.00114
9. He L, Tronstad KJ, Maheshwari A. Mitochondrial Dynamics during Development. Newborn. 2023;2(1):19-44. doi: 10.5005/jp-journals-11002-0053
10. Allen KA, Brandon DH. Hypoxic ischemic encephalopathy: Pathophysiology and experimental treatments. Newborn Infant Nurs Rev. 2011;11(3):125-33. doi: 10.1053/j.nainr.2011.07.004

11. Thornton C, Jones A, Nair S, Aabdien A, Mallard C, Hagberg H. Mitochondrial dynamics, mitophagy and biogenesis in neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *FEBS Lett.* 2018;592(5):812-30. doi: 10.1002/1873-3468.12943
12. Hosmann A, Milivojev N, Dumitrescu S, Reinprecht A, Weidinger A, Kozlov AV. Cerebral nitric oxide and mitochondrial function in patients suffering aneurysmal subarachnoid hemorrhage—a translational approach. *Acta Neurochir (Wien).* 2021;163(1):139-49. doi: 10.1007/s00701-020-04536-x
13. Krystofova J, Pathipati P, Russ J, Sheldon A, Ferriero D. The Arginase Pathway in Neonatal Brain Hypoxia-Ischemia. *Dev Neurosci.* 2018;40(5-6):437-50. doi: 10.1159/000496467
14. Honold J, Pusser NL, Nathan L, Chaudhuri G, Ignarro LJ, Sherman MP. Production and excretion of nitrate by human newborn infants: neonates are not little adults. *Nitric Oxide.* 2000;4(1):35-46. doi: 10.1006/niox.1999.0267
15. Farkouh CR, Merrill JD, Ballard PL, Ballard RA, Ischiropoulos H, Lorch SA. Urinary metabolites of oxidative stress and nitric oxide in preterm and term infants. *Biol Neonate.* 2006;90(4):233-42. doi: 10.1159/000093633
16. Katusic ZS, d'Uscio LV, He T. Emerging Roles of Endothelial Nitric Oxide in Preservation of Cognitive Health. *Stroke.* 2023;54(3):686-96. doi: 10.1161/STROKEAHA.122.041444
17. Thameem F, Puppala S, Arar NH, Stern MP, Blangero J, Duggirala R, et al. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphisms and their association with type 2 diabetes-related traits in Mexican Americans. *Diab Vasc Dis Res.* 2008;5(2):109-13. doi: 10.3132/dvdr.2008.018
18. Gaston B, Reilly J, Drazen JM, Fackler J, Ramdev P, Arnette D, et al. Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(23):10957-61. doi: 10.1073/pnas.90.23.10957
19. Akimov OY, Kostenko VO. Functioning of nitric oxide cycle in gastric mucosa of rats under excessive combined intake of sodium nitrate and fluoride. *Ukr Biochem J.* 2016;88(6):70-5. doi: 10.15407/ubj88.06.070
20. Irakoze L, Manirakiza A, Zhang Y, Liu J, Li J, Nkengurutse L, et al. Metabolic Syndrome in Offspring of Parents with Metabolic Syndrome: A Meta-Analysis. *Obes Facts.* 2021;14(1):148-62. doi: 10.1159/000513370
21. Tain YL, Joles JA. Reprogramming: A Preventive Strategy in Hypertension Focusing on the Kidney. *Int J Mol Sci [Internet].* 2015[cited 2023 Aug 20];17(1):23. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/17/1/23> doi: 10.3390/ijms17010023
22. Wang G, Chen Z, Bartell T, Wang X. Early Life Origins of Metabolic Syndrome: The Role of Environmental Toxicants. *Curr Environ Health Rep.* 2014;1(1):78-89. doi: 10.1007/s40572-013-0004-6
23. Lee WC, Wu KLH, Leu S, Tain YL. Translational insights on developmental origins of metabolic syndrome: Focus on fructose consumption. *Biomed J.* 2018;41(2):96-101. doi: 10.1016/j.bj.2018.02.006
24. Tain YL, Hsu CN. Developmental Programming of the Metabolic Syndrome: Can We Reprogram with Resveratrol? *Int J Mol Sci [Internet].* 2018[cited 2023 Aug 20];19(9):2584. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/9/2584> doi: 10.3390/ijms19092584
25. Martinez-Orgado J, Fernandez-Lopez D, Moro A, Lizasoain I. Nitric Oxide Synthase as a Target for the Prevention of Hypoxic-Ischemic Newborn Brain Damage. *Current Enzyme Inhibition.* 2006;2(3):2019-29. doi: 10.2174/157340806777934784
26. Garry PS, Ezra M, Rowland MJ, Westbrook J, Pattinson KT. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment – from bench to bedside. *Exp Neurol.* 2015;263:235-43. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.10.017

## THE EFFECT OF ENOS GENE POLYMORPHISM AND NITRIC OXIDE METABOLISM INDICATORS ON THE NEONATAL CONSEQUENCES IN PREMATURE BABIES BORN FROM MOTHERS WITH METABOLIC SYNDROME

*O. M. Kovalova, Yu. I. Cherniavska, V. I. Pokhylko, O. Ye. Akimov, A. V. Sliusareva*

Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine)

### Summary

Metabolic syndrome is considered to be a cluster of disorders that directly contribute to the development of cardiovascular disease and are characterized by chronic systemic inflammation. Numerous epidemiological data indicate that an adverse intrauterine environment, caused by the peculiarities of the nutritional status or placental insufficiency in a woman with metabolic syndrome, can «program» the susceptibility of the fetus to further development of cardiovascular and metabolic diseases, has an impact on cognitive and behavioral development. Nitric oxide (NO) plays a critical role in the pathogenesis of components of the metabolic syndrome. Children born prematurely have a high incidence of brain damage, which can lead to motor, cognitive, behavioral, social and sensory disorders.

**The purpose the research** was the study of the effect of the *eNOS* gene polymorphism and indicators of nitric oxide metabolism on the neonatal consequences in prematurely born children from mothers with metabolic syndrome.

**Material and methods.** A study was conducted in which 100 premature infants were included. Two groups were formed: the main group (n=34), which included preterm infants (birth weight 2145.29±148.19 g and gestational age 33.18±0.55 weeks) of mothers with metabolic syndrome, and the comparison group (n=66), which included preterm infants (birth weight 2295.99±101.45 and gestational age 34.03±0.45 weeks) of mothers without metabolic syndrome. The children underwent a genetic study – determination of the polymorphism of the *eNOS* gene, as well as the level of nitrites, nitrates and nitrosothiols in the urine.

By decision of the bioethics commission No. 217 dated 12.06.2023, the materials of the scientific work comply with the Rules of Humane Treatment of Patients.

Traditional methods of parametric and nonparametric statistics were used; nonparametric methods were used to analyze qualitative characteristics expressed mainly in percentages. The methods of parametric statistics were used to check the normality of the distribution of quantitative characteristics using the Kolmogorov-Smirnov criterion.

Statistical processing of the obtained results was carried out using the package of application programs EXCEL-2003® and STATA version 11 for Windows (StataCorp, Texas, USA).

The work was carried out as part of the scientific and experimental work of the Department of Pediatrics #1 with Neonatology of the Poltava State Medical University «To develop clinical and laboratory criteria, methods of predicting and preventing metabolic disorders in young children (state registration number 0120U102856).

**Results.** The most common diseases in the infants of the studied groups were the consequences of intrauterine hypoxia (44.1%) and respiratory failure requiring artificial lung ventilation (50.0%), although no significant differences were found in the prevalence of these conditions. We identified the presence of significant associations between the consequences of intrauterine hypoxia and the levels of nitrates (OR 1.19; 95% CI 1.01-1.40;  $p=0.042$ ), nitrosothiols (OR 1.19; 95% CI 0.99-1.42;  $p=0.050$ ) and the polymorphic genotype 4aa/ab of the eNOS gene (OR 0.28; 95% CI 0.12-0.67;  $p=0.004$ ). Analysis of systemic hemodynamics revealed no significant differences in baseline values between preterm infants with and without intrauterine hypoxia, but we did observe an association with urine output on day 3 of life.

To finally clarify the complex influence of indicators of nitrate metabolism on the development of intrauterine hypoxia and to predict the development of consequences of this condition in premature infants, the following indicators are included in the regression prognostic model: the level of nitrates, nitrites, 4aa/4ab genotype and urine output on the third day of life. As the research results show, there is a direct reliable relationship with nitrates and an inverse relationship with nitrites, 4aa/4ab genotype and urine output. This prediction model has high operating characteristics – the area under the ROC curve is 0.8168.

Some mechanisms of the influence of maternal metabolic syndrome on the development of relevant disorders in newborns are known, including disorders of nitric oxide synthesis, endothelial dysfunction, and oxidative stress. In our study, the consequences of intrauterine hypoxia were reliably associated with an increase in the concentration of urinary nitrates and a decrease in nitrites, as well as the absence of the 4aa/ab genotype, which is associated with reduced release of nitric oxide. There is evidence that nitric oxide can have both protective and deleterious effects, depending on factors such as nitric oxide synthase isoform and duration of exposure to hypoxia.

**Conclusions.** In preterm infants born to mothers with metabolic syndrome, elevated urinary nitrate levels and the absence of the eNOS 4aa/ab genotype increase the likelihood of suffering the consequences of intrauterine hypoxia.

**Key words:** Premature Babies; Mothers with Metabolic Syndrome; eNOS Gene; Nitric Oxide Metabolism; Systemic Hemodynamics; Morbidity.

#### Контактна інформація:

**Ковальова Олена Михайлівна** – доктор медичних наук, професор, професор кафедри педіатрії № 1 з пропедевтикою та неонатологією Полтавського державного медичного університету (м. Полтава, Україна).  
e-mail: slcogor@yandex.ua  
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-2458-6865>  
Researcher ID: <http://www.researcherid.com/rid/H-6559-2017>

**Чернявська Юлія Ігорівна** – кандидат медичних наук, доцент, доцент кафедри педіатрії № 1 із неонатологією Полтавського державного медичного університету (м. Полтава, Україна).  
e-mail: ycherniavska32@gmail.com  
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4522-7538>  
Researcher ID: <http://www.researcherid.com/rid/IAP-0661-2023>  
Scopus Author ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57031925700>

**Похилько Валерій Іванович** – доктор медичних наук, професор, професор кафедри педіатрії № 1 із неонатологією Полтавського державного медичного університету (м. Полтава, Україна).  
e-mail: v.i.pokhylko@gmail.com  
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-1848-0490>  
Researcher ID: <http://www.researcherid.com/rid/HGU-3751-2022>  
Scopus Author ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=16245511700>

**Акімов Олег Євгенович** – кандидат медичних наук, доцент, доцент ЗВО кафедри патофізіології Полтавського державного медичного університету (м. Полтава, Україна).  
e-mail: riseofrevan5@gmail.com  
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-49583695>  
Scopus Author ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=5719260859>

**Слюсарєва Анастасія Володимирівна** – аспірант кафедри педіатрії № 1 із неонатологією Полтавського державного медичного університету (м. Полтава, Україна).  
e-mail: sliusarieva.nastka@gmail.com  
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-8050-7914>

#### Contact Information:

**Olena Kovaleva** – Doctor of Medical Science, Full Professor, Professor of the Department of Pediatrics No. 1 with Neonatology of the Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine).  
e-mail: slcogor@yandex.ua  
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-2458-6865>  
Researcher ID: <http://www.researcherid.com/rid/H-6559-2017>

**Yuliia Cherniavska** – PhD, Associate Professor of the Department of Pediatrics No. 1 with Neonatology of the Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine).  
e-mail: ycherniavska32@gmail.com  
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4522-7538>  
Researcher ID: <http://www.researcherid.com/rid/IAP-0661-2023>  
Scopus Author ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=57031925700>

**Valerii Pokhylko** – Doctor of Medical Science, Full Professor, Professor of the Department of Pediatrics No. 1 with Neonatology of the Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine).  
e-mail: v.i.pokhylko@gmail.com  
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-1848-0490>  
Researcher ID: <http://www.researcherid.com/rid/HGU-3751-2022>  
Scopus Author ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=16245511700>

**Oleh Akimov** – PhD, Docent, Associate Professor of the Department of Pathophysiology of the Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine).  
e-mail: riseofrevan5@gmail.com  
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-49583695>  
Scopus Author ID: <https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=5719260859>

**Anastasiia Sliusareva** – Postgraduate student of Department of Pediatrics No. 1 with Neonatology of Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine).  
e-mail: sliusarieva.nastka@gmail.com  
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-8050-7914>

Надійшло до редакції 13.05.2023 р.  
Підписано до друку 15.08.2023 р.

