

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 577.212.3:616-053.32

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-328-341>

Поступила в редакцию 21.02.2020

Received 21.02.2020

**О. М. Малышева<sup>1</sup>, Е. П. Михаленко<sup>1</sup>, А. П. Сухарева<sup>2</sup>,  
М. В. Артюшевская<sup>3</sup>, Н. Г. Ситник<sup>2</sup>, Г. В. Кулакова<sup>2</sup>,  
И. В. Жевнеронок<sup>3</sup>, А. В. Кильчевский<sup>1</sup>, Г. А. Шишко<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Клинический родильный дом Минской области, Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь

### **РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ИНВАЛИДИЗИРУЮЩИХ ПОСЛЕДСТВИЙ У НЕДОНОШЕННОГО НОВОРОЖДЕННОГО**

**Аннотация.** Представлен клинический случай проявления первичной врожденной глаукомы, синдрома дыхательных расстройств, бронхолегочной дисплазии, ретинопатии и перивентрикулярной лейкомаляции у недоношенного новорожденного. Для поиска патогенных вариантов использован метод высокопроизводительного полноэкзомного секвенирования. Учитывая данные о многофакторной этиологии исследуемых осложнений, проанализированы гены белков сурфактанта и гены, ассоциированные с ангиогенезом, ренин-ангиотензиновой и антиоксидантной системами. Выявлены молекулярно-генетические факторы риска развития врожденной глаукомы у недоношенного новорожденного: р.Е229К *CYP11B1* и р.Р76К *MYOC*, а также полиморфные варианты в генах белков сурфактанта *SFTPB* (rs1130866, VNTR интрона 4) и *SFTPC* (rs4715, rs1124), фактора роста эндотелия сосудов *VEGFA* (rs2010963), синтазы оксида азота 3 *NOS3* (rs1799983), белка связывания инсулиноподобного фактора роста 3 *IGFBP3* (rs2854746), каталазы *CAT* (rs7943316), ассоциированных с развитием исследуемых инвалидизирующих осложнений.

**Ключевые слова:** недоношенные новорожденные, синдром дыхательных расстройств, бронхолегочная дисплазия, ретинопатия, глаукома, секвенирование

**Для цитирования:** Роль генетических нарушений в формировании инвалидизирующих последствий у недоношенного новорожденного / О. М. Малышева [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 328–341. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-328-341>

**Volha M. Malyshava<sup>1</sup>, Alena P. Mikhalenka<sup>1</sup>, Anastasiya P. Suharava<sup>2</sup>,  
Maryna V. Artsiusheuskaya<sup>3</sup>, Nadzeya G. Sitnik<sup>2</sup>, Galina V. Kulakova<sup>2</sup>, Iryna V. Ghevneronak<sup>3</sup>,  
Aleksandr V. Kilchevsky<sup>1</sup>, Georgiy A. Shyshko<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Clinical Maternity Hospital of Minsk Region, Minsk, Republic of Belarus

<sup>3</sup>Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

### **THE ROLE OF GENETIC DISORDERS IN THE FORMATION OF DISABLING EFFECTS IN THE PREMATURE NEWBORN**

**Abstract.** A clinical case of primary congenital glaucoma, respiratory distress syndrome, bronchopulmonary dysplasia, retinopathy and periventricular leukomalacia in a premature newborn is presented. The search for pathogenic variants by the method of new generation whole exome sequencing was performed. The genes of surfactant proteins, genes associated with angiogenesis, renin-angiotensin and antioxidant systems were analyzed, considering the data on the multifactorial etiology of the studied complications. The molecular genetic factors for congenital glaucoma development in the premature newborn were revealed: p.E229K *CYP11B1* and p.R76K *MYOC*, as well as polymorphisms in the genes of surfactant proteins *SFTPB* (rs1130866, VNTR intron 4) and *SFTPC* (rs4715, rs1124), vascular endothelial growth factor *VEGFA* (rs2010963), nitric oxide synthase 3 *NOS3* (rs1799983), insulin growth factor binding protein 3 *IGFBP3* (rs2854746), catalase *CAT* (rs7943316), associated with the development of the studied disabling complications in the premature newborn.

**Keywords:** prematurity, respiratory distress syndrome, bronchopulmonary dysplasia, retinopathy of prematurity, glaucoma, sequencing

**For citation:** Malyshava V. M., Mikhalenka A. P., Suharava A. P., Artsiusheuskaya M. V., Sitnik N. G., Kulakova G. V., Ghevneronak I. V., Kilchevsky A. V., Shyshko G. A. The role of genetic disorders in the formation of disabling effects in the premature newborn. *Vestsi Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2020, vol. 65, no. 3, pp. 328–341 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2020-65-3-328-341>

**Введение.** За последние годы уровень младенческой смертности в Республике Беларусь заметно снизился. Однако заболеваемость новорожденных остается стабильно высокой, что вносит значительный вклад в структуру ранней детской инвалидизации. У каждого пятого недоношенного ребенка развивается осложнение в виде бронхолегочной дисплазии (БЛД), ретинопатии недоношенных (РН) и перивентрикулярной лейкомаляции (ПВЛ), прогрессирование которых приводит к ухудшению качества жизни и возможной инвалидизации. Прогрессирование ретинопатии может вызвать отслойку сетчатки, развитие близорукости, вторичной глаукомы, слепоты. К последствиям БЛД относятся хроническая дыхательная недостаточность, бронхиальная астма, альвеолиты, ателектазы; к ПВЛ – эпилепсия, детский церебральный паралич, судороги, нарушение интеллектуального развития, снижение остроты зрения и слуха.

С точки зрения генетики БЛД, РН и ПВЛ являются мультифакторными заболеваниями, развитие которых обусловлено сложным взаимодействием множества генов и факторов внешней среды. При исследовании взаимодействия между БЛД, РН и ПВЛ обнаружена тесная связь БЛД с РН и ПВЛ. Эти заболевания имеют как уникальные, так и общие факторы риска. Экстремально низкая масса тела при рождении, мужской пол и длительная искусственная вентиляция легких (ИВЛ) с кислородотерапией вносят вклад в развитие БЛД и РН, а хориоамнионит (воспаление плодных оболочек во время беременности и родов), синдром дыхательных расстройств тяжелой степени, длительная ИВЛ и воспаление являются общими факторами риска развития БЛД и ПВЛ [1].

Первичная врожденная глаукома (ПВГ) является причиной детской слепоты в 5 % случаев [2]. В большинстве случаев врожденная глаукома – явление спорадическое, с рецессивным наследованием и почти полной пенетрантностью в популяциях с высоким уровнем кровного родства. Снижение пенетрантности (до 40 % в некоторых популяциях) и наличие различных фенотипических форм может свидетельствовать о полигенной наследственности или многофакторной этиологии [3].

Цель настоящей работы – поиск молекулярно-генетических детерминант инвалидирующих последствий у недоношенного новорожденного.

**Объекты и методы исследования.** Проведен анализ результатов клинического обследования недоношенного новорожденного весом 1080 г в сроке гестации 29 недель с синдромом дыхательных расстройств тяжелой степени тяжести.

Выполнено молекулярно-генетическое обследование ребенка и родителей. Материалом для генетического обследования ребенка послужила геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов пуповинной крови методом фенольно-хлороформной экстракции с использованием протеиназы К [4]; для генетического обследования родителей – геномная ДНК, выделенная из буккального эпителия с помощью коммерческого набора ExtractDNA Blood («Евроген», Россия).

Для поиска у ребенка патогенных вариантов, ассоциированных с БЛД, РН и врожденной глаукомой, применяли метод высокопроизводительного секвенирования, используя панель Nextera DNA Exome (Illumina), на секвенаторе NextSeq 550 (Illumina). Последующую обработку полученных данных (fastq-файлы) осуществляли с помощью алгоритма Dragen Basespace (Illumina). Для аннотирования результатов (vcf-файл) использовали онлайн-ресурс wANNOVAR [5]. Фильтрацию вариантов при поиске патогенных проводили в следующем порядке: 1) некодирующие (интронные) варианты без изменения сайтов сплайсинга удаляли; 2) синонимичные варианты без изменения сайтов сплайсинга удаляли; 3) полиморфизмы с незначительной частотой встречаемости аллелей (MAF) 1 % и более в базах данных 1000Genome, ExAc, GnomadGenome, GnomadExome исключали; 4) миссенс-варианты, которые, согласно программам предсказания PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) и Mutation Taster (<http://mutationtaster.org/>), одинаково благоприятны для функции белка, удаляли; 5) обнаруженные варианты в генах, влияющих на функциональную активность белков, участвующих в патогенезе перинатальных осложнений, отбирали для дальнейших проверки и анализа.

При поиске полиморфных вариантов, ассоциированных с развитием осложнений перинатального периода, алгоритм поиска в выборке осуществляли в следующем порядке: 1) удаляли варианты с частотой встречаемости меньше 5 % и больше 95 %; 2) оставляли гены *SFTPB*, *SFTPC*, *VEGFA*, *KDR*, *FLT1*, *NOS3*, *IGF1*, *IGF1R*, *IGFBP3*, *HIF1*, *AGT*, *ACE*, *AGTR1*, *SOD1*, *SOD2*, *SOD3*, *CAT*,

*GPXI*, полиморфные варианты которых могут вносить определенный вклад в развитие БЛД, РН и ПВЛ.

Для подтверждения обнаруженных у ребенка изменений, а также наличия или отсутствия их у родителей проводили прямое и обратное секвенирование по Сэнгеру.

Для амплификации фрагмента 2-го экзона гена *CYP11B1* и фрагмента 1-го экзона гена *MYOC* были использованы следующие пары олигонуклеотидных праймеров (последовательность 5'→3'): прямой – CAT TTC TCC AGA GAG TCA GC и обратный – GCT TGC AAA CTC AGC ATA TTC [6]; прямой – CCA AAC AGA CTT CTG GAA GG и обратный – TAG CAG GTC ACT ACG AGC C [2] соответственно. Общие условия ПЦР для обеих пар праймеров подобраны экспериментально: 1 мин денатурации при температуре 95 °С, далее 35 циклов: 30 с при 95 °С, 30 с при 56 °С, 60 с при 72 °С, завершающий шаг – 5 мин при 72 °С. Нуклеотидную последовательность определяли методом прямого и обратного секвенирования на автоматическом анализаторе Applied Biosystems 3500 DNA Analyzer. Полученные последовательности ДНК анализировали в программе SequenceScanner v1.0.

В ходе работы были соблюдены принципы добровольности и конфиденциальности в соответствии с международными нормами [7]. Получено разрешение комитета по этике БелМАПО на проведение исследования.

**Результаты и их обсуждение.** Недоношенная девочка родилась в сроке гестации 29 недель от второй беременности (первая беременность трубная) первых преждевременных родов путем экстренного кесарева сечения по показаниям плода.

Данные акушерского анамнеза: возраст матери на момент родов 28 лет; экстрагенитальная патология – хронический гастрит в стадии ремиссии. Из особенностей течения беременности: угроза выкидыша в 5–6 недель, острая респираторная инфекция без повышения температуры тела в 12 и 16 недель, угроза преждевременных родов, истмико-цервикальная недостаточность в 28–29 недель.

Объективные данные и данные инструментальных исследований в первые сутки жизни: состояние ребенка с рождения тяжелое, обусловленное синдромом дыхательных расстройств, недоношенностью. В родильном зале эндотрахеально введен препарат сурфактанта «Куросурф». На искусственной вентиляции легких в условиях транспортного кувеза ребенок переведен в отделение анестезиологии и реанимации (для новорожденных детей). Диагноз при рождении: синдром дыхательных расстройств, дыхательная недостаточность III степени, недоношенность (29 недель).

На первые сутки жизни проведена рентгенография органов грудной клетки. Выявлены болезнь гиалиновых мембран II степени, гиперплазия тимуса и декстрокардия.

Для верификации рентгенологических данных выполнена ЭХО-КТ, в результате которой подтверждена декстрокардия, обнаружены открытый артериальный проток и открытое овальное окно.

По данным нейросонографии, в первые сутки жизни у младенца имелись признаки недоношенности и крайней незрелости головного мозга.

До 36-х суток жизни ребенок выхаживался и получал лечение в отделении реанимации.

До 19-х суток ребенок находился на искусственной вентиляции легких в режимах CMV (continuous mandatory ventilation), SIMV (synchronized intermittent mandatory ventilation) (рис. 1).

На 19-е сутки жизни ребенок П. переведен на неинвазивную вентиляцию (nCPAP), с 23-х суток – на самостоятельном дыхании. Кислородозависимость сохранялась до 64-х суток жизни на фоне перорального приема микродоз дексаметазона с последующим переходом на ингаляционные глюкокортикостероиды (рис. 2).

Наблюдалась относительно стабильная гемодинамика на фоне проводимой волемической и кардиотонической терапии (дофамин – 1–2 раза в сутки, норадреналин – со 2-х по 5-е сутки).

Энтеральное трофическое питание ребенок получал с рождения, а к концу раннего неонатального периода он усваивал его энтерально в полном объеме.

Анемический синдром, развившийся на 9-е сутки жизни (эритроциты  $3,32 \cdot 10^9$ , гемоглобин 112 г/л), был купирован путем переливания отмытых эритроцитов (эритроциты  $4,97 \cdot 10^9$ , гемоглобин 160 г/л).

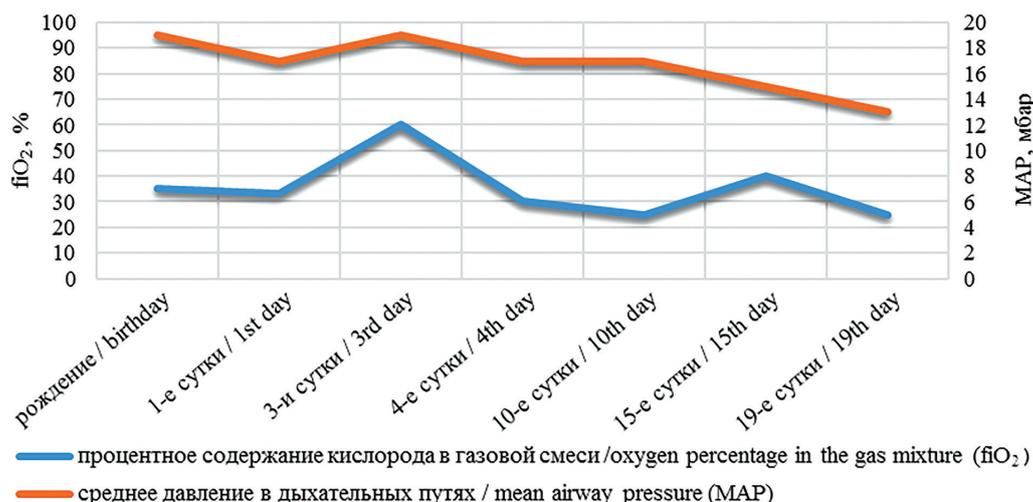


Рис. 1. Динамика основных параметров искусственной вентиляции легких ребенка П.: содержания кислорода в газовой смеси (fIO<sub>2</sub>) и среднего давления в дыхательных путях (MAP)

Fig. 1. The dynamics of the main parameters of mechanical ventilation of the child P.: oxygen content in the gas mixture (fIO<sub>2</sub>) and mean airway pressure (MAP)

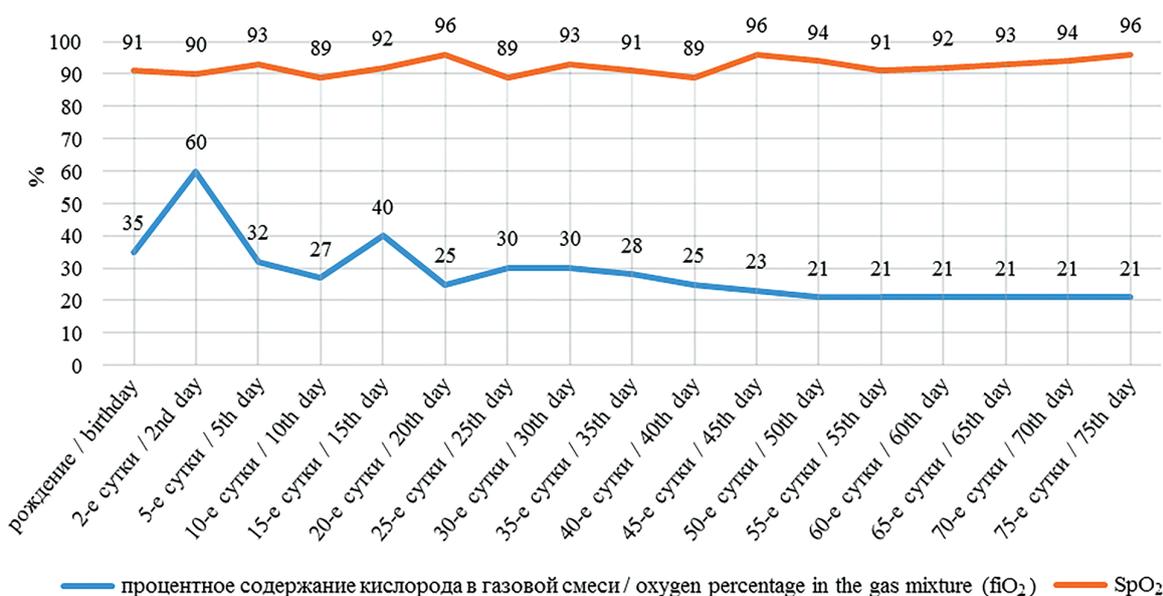


Рис. 2. Динамика кислородозависимости и сатурации (SpO<sub>2</sub>) ребенка П.

Fig. 2 Dynamics of oxygen dependence and saturation (SpO<sub>2</sub>) of the child P.

Выполненная на 2-е сутки жизни рентгенограмма органов грудной клетки показала врожденную пневмонию, болезнь гиалиновых мембран, гиперплазию тимуса, декстрокардию. Рентгенограмма органов грудной клетки на 23-и сутки жизни выявила декстрокардию, врожденную пневмонию (период реконвалесценции), бронхолегочную дисплазию, гиперплазию тимуса.

По результатам ультразвукового исследования головного мозга у ребенка П. на 16-е сутки жизни отмечались: гипоксически-ишемическое поражение головного мозга в лобных областях, над затылочными рогами в бассейне средней мозговой артерии с обеих сторон, кистозная дегенерация, венрикуломегалия боковых желудочков мозга, признаки недоношенности и незрелости.

При осмотре окулистом в 35 недель у ребенка диагностирована ретинопатия II степени обоих глаз (активная фаза).

Ребенок выписан из стационара на 79-е сутки жизни с диагнозом бронхолегочная дисплазия, дыхательная недостаточность 0–I степени, энцефалопатия недоношенного, перивентрикулярная

лейкомаляция, анемия недоношенного, декстрокардия, функционирующее овальное окно, ретинопатия II степени обоих глаз, недоношенность (29 недель), очень низкая масса тела при рождении.

В последующем ребенку диагностирована врожденная глаукома, проведена операция по имплантации клапанного дренажного устройства.

Обследование неврологом в 8 мес. показало выраженную задержку преимущественно моторного развития с формирующимся спастическим тетрапарезом, провоцируемым миоклониями, вентрикуломегалией (субатрофической) вследствие тяжелого перинатального поражения центральной нервной системы и недоношенности.

Осмотр в 11 мес. показал, что пациент П. плохо видит, не переворачивается, не садится, не ползает. Физическое развитие дисгармоничное: вес 6900 г (ниже 3 центиля), рост 73 см (50 центиль). Признаков дыхательной и сердечной недостаточности нет. При обследовании узкими специалистами выданы следующие заключения и рекомендации: врожденная глаукома, оперированная, РН II степени, II и III зоны, рекомендована очковая коррекция (окулист); бронхолегочная дисплазия средней степени тяжести в ремиссии, дыхательная недостаточность 0-й степени, декстрокардия (пульмонолог); праворасположенное, неопределенно сформированное сердце, открытый артериальный проток, недостаточность кровообращения 0-й степени, рекомендовано: прием препарата «Алмиба», контроль частоты сердечных сокращений, частоты дыхания, размеров печени, наблюдение у кардиолога, плановая консультация кардиохирурга (кардиолог); задержка в развитии ориентировочно-познавательных и звуковых реакций в доречевом периоде (дефектолог); множественные пороки развития: декстрокардия, глаукома врожденная, спастический тетрапарез с выраженными двигательными нарушениями и задержкой психоречевого развития, судорожным синдромом (фармакологическая ремиссия) на фоне маляции белого вещества головного мозга и внутренней компенсированной гидроцефалии (невролог).

По данным магнитно-резонансной томографии головного мозга, имеются признаки неокклюзионной гидроцефалии, наблюдается минимальное расширение наружного субарахноидального пространства. При этом отмечается не истинная гидроцефалия, а гидроцефалия как результат массивной лейкомаляции и слияния полостей по мере лизиса белого вещества с желудочковой системой.

Проведенный анализ на кариотип не выявил нарушений.

В ходе проведенного исследования по выявлению патогенных вариантов, ассоциированных с врожденной глаукомой, у пробанда обнаружены несинонимичная гетерозиготная замена во 2-м экзоне гена *CYP11B1* p.E229K и несинонимичная гетерозиготная замена в 1-м экзоне гена *MYOC* p.R76K. Отец пробанда являлся гетерозиготным носителем обоих выявленных вариантов, мать – носителем только гетерозиготного варианта гена *MYOC* (рис. 3).

Мутации в гене *CYP11B1* были первыми выявленными мутациями у пациентов с ПВГ [8], в настоящее время известно около 150 патогенных вариантов в этом гене, вызывающих ПВГ [9].

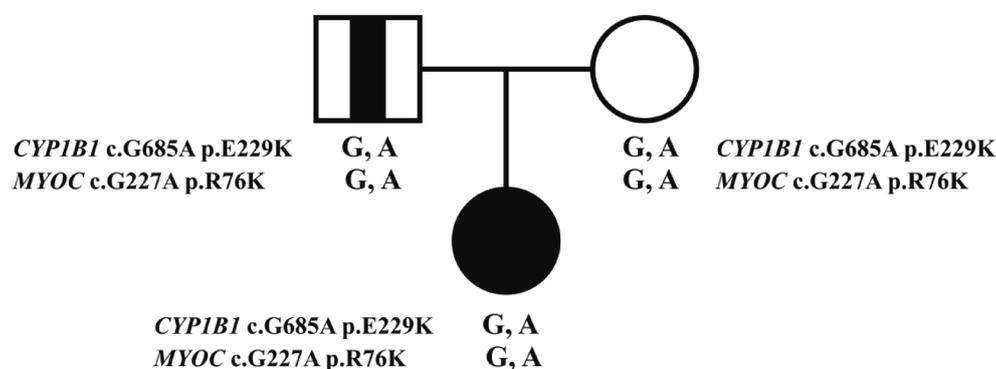


Рис. 3. Родословная семьи недоношенного новорожденного с врожденной глаукомой с указанием аллелей *MYOC* и *CYP11B1*: пораженный пробанд выделен черным цветом, отец (носитель патологического варианта на доклинической стадии) – неполным закрашиванием

Fig. 3. Pedigree showing the *MYOC* и *CYP11B1* sequence variants in primary congenital glaucoma family: the affected child is highlighted in black; the father (carrier of the pathological variant at the preclinical stage) is incomplete fill

Наследование происходит по аутосомно-рецессивному типу и характеризуется вариабельной пенетрантностью. Ген *CYP1B1* расположен на 2-й хромосоме в локусе p22–p21 и состоит из трех экзонов, 2 из которых (2 и 3) являются кодирующими. Белок цитохром P4501B1, кодируемый геном *CYP1B1*, состоит из 543 аминокислот и экспрессируется в различных тканях, в том числе в тканях глаза [10]. Цитохром P4501B1 катализирует некоторые окислительные реакции, продуцируя необходимые гормоны и соединения промежуточного метаболизма большинства живых организмов, включая ксенобиотики, витамины и стероиды. Фермент участвует также в метаболизме витамина А до образования трансретинальной и трансретиноевой кислот. Последняя является мощным морфогеном, регулирующим во время внутриутробного развития рост и дифференцировку тканей. Белок P4501B1 также вовлечен в метаболизм эндогенных и экзогенных субстратов, которые участвуют в ранней дифференцировке тканей глаза [10].

Несинонимичный вариант p.E229K (rs57865060) в гене *CYP1B1* заключается в замене гуанина (G) на аденин (A) в положении с.685, в результате чего глутаминовая кислота (Glu, E) замещается на лизин (Lys, K) в положении 229 зрелого белка. В структуре глутаминовой кислоты имеется отрицательно заряженный остаток, в структуре лизина – положительно заряженная боковая цепь, аминокислотная замена p.E229K влияет на локальное распределение заряда в белке, в результате чего теряется взаимодействие между аргинином в положении 194 белка и глутаминовой кислотой, что может дестабилизировать другие ионные взаимодействия в цитохроме и влиять на его трехмерную структуру [10]. Ферментативная активность цитохрома P4501B1 с лизином в положении 229 на 26–40 % выше, чем в белке дикого типа [11]. По последним данным, эту замену относят к аллелю риска, который может привести к развитию глаукомы в присутствии модификаторов или под влиянием окружающей среды [12]. К таким модификаторам у данного ребенка можно отнести недоношенность (незрелость органов и систем), наличие ретинопатии и фонового гаплотипа гена *CYP1B1*: полиморфизмы p.V432L (rs1056836), p.A119S (rs1056827), p.R48G (rs10012) и –12T>C (rs2617266) в гетерозиготном состоянии, которые, как предполагается, приводят к снижению ферментативной активности и субстратной специфичности цитохрома [13].

Одним из генов, который также связывают с развитием глаукомы, является ген *MYOC*, кодирующий белок миоцилин. Ген расположен на 1-й хромосоме в локусе q24.3–q25.2, состоит из 3 экзонов. Промоторная область гена содержит более 10 гормонорегуляторных элементов, в том числе для глюкокортикостероидов, эстрогенов, прогестерона и тиреоидных гормонов [14]. Миоцилин с патогенными вариантами может изменять трабекулярную сеть и архитектуру цилиарного тела, препятствуя оттоку жидкости и увеличивая внутриглазное давление [2].

Ген *MYOC* кодирует протеин, состоящий из 504 аминокислотных остатков, в состав которого входят два домена, один из которых гомологичен ольфактомеду – белку экстрацеллюлярного матрикса обонятельного эпителия, другой – немышечному миозину [14]. Большинство известных патогенных вариантов обнаружены в ольфактомединовом домене [9].

Миоцилин в организме представлен тремя изоформами, одна из которых является секреторной. В процессе олигомеризации он может образовывать достаточно большие комплексы, а при наличии в белке измененных аминокислот миоцилин может связываться с другими соединениями. Мутации в гене *MYOC* приводят к синтезу белка измененной структуры, в результате чего миоцилин не секретируется и откладывается в зоне трабекулы, создавая механическое препятствие для циркуляции внутриглазной жидкости [15]. Накопление таких форм миоцилина может привести к запуску процесса апоптоза. Мутантный миоцилин, экспрессируемый в ганглиозных клетках сетчатки, а также в астроцитах в области решетчатой пластинки, может оказывать прямое цитотоксическое действие на эти структуры. Клетки трабекулярной ткани при экспрессии в них мутантного миоцилина становятся более чувствительными к оксидативному стрессу за счет снижения экспрессии ряда ферментов, обеспечивающих антиоксидантную защиту, и нарушения функционирования митохондрий [14].

Несинонимичный вариант p.R76K (rs2234926) в гене *MYOC* заключается в замене гуанина (G) на аденин (A) в положении с.227, в результате чего аргинин (Arg, R) замещается на лизин (Lys, K) в положении 76 зрелого белка. По данным ExAc (Exome Aggregation Consortium), этот вариант

встречается у 14 % населения европейских стран и в настоящее время рассматривается как генетический полиморфизм.

Гены *CYP1B1* и *MYOC* экспрессируются в радужной оболочке, трабекулярной сети и ресничном теле глаза [3]. Известно, что цитохром P4501B1 катализирует метаболизм ретиноевой кислоты и 17- $\beta$  эстрадиола, и оба этих эндогенных соединения участвуют в патогенезе глаукомы [12]. Цитохром P4501B1 принимает участие в активации транскрипции гена *MYOC*, регулируя уровень 17- $\beta$  эстрадиола (субстрата фермента), присутствующего в клетках трабекулярной сети и пигментных эпителиальных клетках сетчатки, путем его гидроксилирования. Комплекс эстрадиола и эстрогенового рецептора связывается с промоторной областью гена, кодирующего миоцилин, и вызывает его сверхэкспрессию. При отсутствии мутаций в гене *CYP1B1* 17- $\beta$  эстрадиол превращается в 4-гидроксиэстрадиол, который не участвует в активации экспрессии гена *MYOC* (рис. 4) [11]. Сочетание мутаций в гетерозиготном состоянии в двух этих генах приводит к возникновению глаукомы с более злокачественным течением и ранним манифестированием [15].

Учитывая данные о многофакторной этиологии врожденной глаукомы и влиянии различных сопутствующих состояний, осуществлен поиск дополнительных генетических факторов, способствующих ранней манифестации данного заболевания у недоношенного новорожденного.

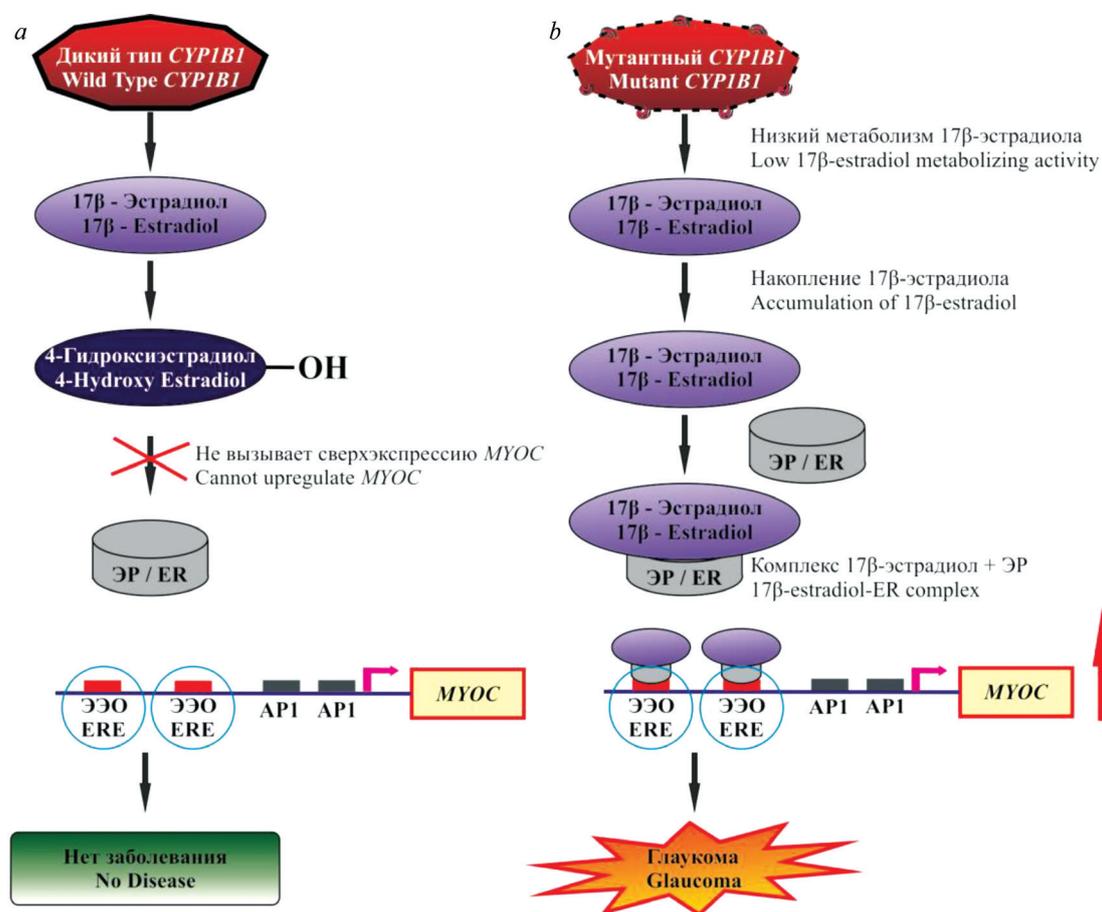


Рис. 4. Диаграмма потенциального влияния мутантных форм *CYP1B1* на экспрессию гена *MYOC* (*a* – полностью функциональный *CYP1B1* превращает 17 $\beta$ -эстрадиол в 4-гидроксиэстрадиол, тем самым препятствуя образованию комплекса гормон – эстрогеновый рецептор (ЭР); *b* – сниженная ферментативная активность *CYP1B1* приводит к накоплению 17 $\beta$ -эстрадиола и формированию комплекса гормон – рецептор, который связывается с элементами эстрогенового ответа в промоторной области гена *MYOC* и вызывает его повышенную экспрессию [11])

Fig. 4. Schematic diagram showing potential influence of *CYP1B1* mutants on *MYOC* expression (*a* – fully functional wild type *CYP1B1* metabolizes 17 $\beta$ -estradiol to 4-hydroxy estradiol; thus, limiting the steroid to form the hormone – estrogen receptor complex (17 $\beta$ -estradiol-ER); *b* – restricted *CYP1B1* enzymatic activity results in accumulation of the steroid and formation of 17 $\beta$ -estradiol-ER complex, which binds with estrogen response elements (EREs) in *MYOC* promoter and leads to *MYOC* upregulation [11])

Проанализированы гены белков сурфактанта и гены, ассоциированные с ангиогенезом, ренин-ангиотензиновой и антиоксидантной системами. После проведенной фильтрации результатов экзомного секвенирования и анализа оставшихся в выборке вариантов выявлены полиморфизмы, влияющие на тяжесть диагноза новорожденного ребенка. В таблице представлены 23 полиморфных варианта, оказывающих как положительное, так и негативное воздействие.

Полиморфизмы rs1130866 и инсерционно-делеционный гена *SFTPB* (генотип СТ и гетерозиготная делеция соответственно), rs4715 и rs1124 гена *SFTPC* (генотипы СА и ГА соответственно), оказывающие влияние на степень тяжести синдрома дыхательных расстройств (СДР) и возможность развития БЛД, указаны в таблице. В гене, кодирующем фактор роста эндотелия сосудов, выявлено три полиморфизма: rs2010963 (генотип СС), rs3025039 (генотип СТ) и rs699947 (генотип АС). В гене, кодирующем белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста третьего типа (*IGFBP3*), и в гене, кодирующем рецептор инсулиноподобного фактора роста первого типа (*IGFIR*), обнаружено по одному полиморфизму: rs2854746 (генотип СG) и rs2229765 (генотип ГА) соответственно. Полиморфные и патогенные варианты в генах *IGF1*, *HIF1* в исследуемом образце не обнаружены. В гене, кодирующем эндотелиальную синтазу оксида азота, обнаружен один значимый полиморфизм – rs1799983 (генотип ТG). Выявлено 6 полиморфизмов в генах ренин-ангиотензиновой системы: rs699 (генотип ТТ), rs4762 (генотип СС) в гене *AGT*, кодирующем ангиотензиноген, rs4341 (генотип GС), rs4343 (генотип ГА) и rs4362 (генотип ТС) в гене *ACE*, кодирующем ангиотензинпревращающий фермент, rs5182 (генотип ТТ) в гене *AGTRI*, кодирующем рецептор ангиотензина 1. У недоношенного ребенка выявлены гомозиготные генотипы АА (rs2536512) 3-го экзона гена *SOD3*, АА (rs2234694) 3-го интрона гена *SOD1*, приводящие к повышенной экспрессии гена, увеличению активности фермента, снижению риска развития перинатальных осложнений недоношенного ребенка. Генотип ТС 2-го экзона гена *SOD2* (rs4880), ТТ промоторной области гена *CAT* (rs7943316), генотип СТ (rs1050450) 2-го экзона и СТ (rs1800668) 5'-UTR области гена *GPX1* могут привести к снижению активности ферментов и увеличению окислительных повреждений в клетках, способствуя развитию перинатальных осложнений. Патогенные мутации среди исследуемых генов не обнаружены.

**Описание полиморфных вариантов, выявленных в данном исследовании**

**Description of the polymorphisms included in this study**

Ген	Название продукта	Генотип	Полиморфизм	Локализация	ID полиморфизма	Действие
<i>SFTPB</i>	Белок сурфактанта SP-B	СТ	с.С428Т, р.Тhr143Ile	5-й экзон	rs1130866	Риск развития СДР повышен [16]
		510/del	vntr	4-й интрон		Снижение уровня функционального белка, риск развития СДР, БЛД [16]
<i>SFTPC</i>	Белок С сурфактанта SP-C	СА	с.С413А, р.Тhr138Asn	4-й экзон	rs4715	Риск развития СДР повышен [16]
		ГА	с.С557А, р.Сer186Asn	5-й экзон	rs1124	Риск развития СДР повышен [16]
<i>VEGFA</i>	Фактор роста эндотелия сосудов	СС	с.-634С>G	5'-UTR	rs2010963	Риск развития БЛД, РН [17]
		СТ	+936С>Т	3'-UTR	rs3025039	Тенденция к снижению продукции фактора роста [18, 19]
		АС	-2578 А>С/А>Т	Интрон	rs699947	Тенденция к увеличению продукции фактора роста [18, 19]
<i>IGFBP3</i>	Белок-3, связывающий инсулиноподобный фактор роста	СG	с.С95G, р.Аla32Gly	1-й экзон	rs2854746	Увеличение концентрации циркулирующего белка [20]
<i>IGFIR</i>	Рецептор-1 инсулиноподобного фактора роста	ГА	с.С3126А, р.Сlu1042Glu	16-й экзон	rs2229765	Тенденция к снижению IGF-1 в плазме [21]
<i>NOS3</i>	Эндотелиальная синтаза оксида азота	ТG	с.Т894G, р.Аsp298Glu	8-й экзон	rs1799983	Риск развития СДР, БЛД [22]

Окончание таблицы

Ген	Название продукта	Генотип	Полиморфизм	Локализация	ID полиморфизма	Действие
<i>AGT</i>	Ангиотензиноген	ТТ	с.803Т>С, р.Met268Thr	2-й экзон	rs699	Норма [19]
		СС	с.620С>Т, р.Thr207Met	2-й экзон	rs4762	
<i>ACE</i>	Ангиотензинпревращающий фермент	GC	с.584-19G>C	Интрон	rs4341	Промежуточный уровень фермента [19]
		GA	с.G2328A, р.Thr776Thr	16-й экзон	rs4343	
		TC	с.T3387C, р.Phe1129 Phe	23-й экзон	rs4362	
<i>AGTR1</i>	Рецептор ангиотензина 1	ТТ	с.C678Т, р.Leu226Leu	4-й экзон	rs5182	Норма [19]
<i>SOD3</i>	Супероксиддисмутаза 3	AA	с.G172A, р.Ala58Thr	3-й экзон	rs2536512	Тенденция к снижению риска развития БЛД
		СС	с. C691G, р.Arg231Gly	3-й экзон	rs1799895	Повышен риск развития заболеваний легких [23]
<i>SOD2</i>	Супероксиддисмутаза 2	TC	с.T47C, р.Val16Ala	2-й экзон	rs4880	Тенденция к снижению активности фермента [24]
<i>SOD1</i>	Супероксиддисмутаза 1	AA	с.+35A>C	Интрон	rs2234694	Повышенная активность фермента [25]
<i>CAT</i>	Каталаза	ТТ	с.–89A>Т	5'-UTR	rs7943316	Снижение активности фермента [26]
<i>GPXI</i>	Глутатионпероксидаза 1	СТ	с. C599Т, р.Pro-200Leu	2-й экзон	rs1050450	Тенденция к снижению активности фермента [24]
		СТ	с.–46С>Т	5'-UTR	rs1800668	Тенденция к снижению активности фермента [24]

*Гены белков сурфактанта.* Тяжесть состояния недоношенного новорожденного во многом определяется его возможностью самостоятельно дышать. Степень незрелости легких и уровень синтеза сурфактанта зависят от срока гестации новорожденного, а также от течения беременности. Легочный сурфактант представляет собой смесь липидов и специфических белков, необходимых для уменьшения поверхностного натяжения на границе взаимодействия сред воздух–жидкость (внутренняя стенка альвеолы) и предотвращения слипания альвеол в конце выдоха. Отсутствие сурфактанта из-за незрелости легких является основной причиной развития синдрома дыхательных расстройств, наблюдаемого у детей, рожденных преждевременно. На уровень синтезируемых белков сурфактанта влияет не только срок гестации плода, но и генетические предпосылки. Гомозиготные мутации в гене *SFTPB* вызывают наследственную недостаточность белка SP-B, что может привести к летальному исходу. Мутации в гене *SFTPC*, влекущие за собой дефицит белка SP-C, связаны с интерстициальными заболеваниями легких.

Обнаруженные у пациента полиморфные варианты в генах белков сурфактанта SP-B и SP-C относятся к вариантам повышенного риска развития СДР [16]. Ген *SFTPB* расположен на коротком плече 2-й хромосомы человека в области p12–p11.2, содержит 12 экзонов, первый и последний из которых нетранслируемы. Замена треонина (Thr) на изолейцин (Ile) в положении 143 аминокислотной последовательности предшественника SP-B (rs1130866) обусловлена наличием либо цитозина (C), либо тимина (T) в 4-м экзоне в положении 428 нуклеотидной последовательности, что приводит к исчезновению второго N-связанного сайта гликозилирования и к синтезу измененного по структуре белка. В 4-м интроне гена описан инсерционно-делеционный полиморфизм, обусловленный вариативностью числа tandemных повторов. Показано, что с делеционных вариантов образуется в большей степени мРНК с неполным сплайсингом, что приводит к снижению уровня синтеза функционального белка [16]. Ген *SFTPC* локализован на коротком плече 8-й хромосомы, в положении 8p23.1. В 5-м экзоне гена расположен полиморфный вариант rs1124, который приводит к замене аминокислоты серина на аспарагин (с.557G>A, р.S186N), в 4-м экзоне находится полиморфный вариант rs4715, который приводит к замене аминокислоты

треонина на аспарагин (с.413C>A, р. T138N). Механизм, с помощью которого эти полиморфные варианты могут влиять на риск развития СДР, до сих пор не ясен. Однако установлено, что полиморфные варианты расположены в соответствующей С-концевой части молекулы предшественника зрелого SP-C и имеют решающее значение в его процессинге [16].

*Гены, ассоциированные с ангиогенезом.* Фактор роста эндотелия сосудов А (VEGFA) важен для физиологического роста сосудов различных органов, участвует в пролиферации эндотелиальных клеток, подавляет апоптоз, увеличивает проницаемость сосудов, играет важную роль в нейрогенезе. Экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о том, что VEGF, принимая участие в васкулогенезе и ангиогенезе сосудов сетчатки, может играть ключевую роль в развитии РН. Увеличение VEGF в аваскулярной сетчатке стимулирует ее патологическую неоваскуляризацию, что может привести к осложнениям, ведущим к слепоте (тракционная отслойка сетчатки). Кроме того, применение анти-VEGF терапии эффективно при тяжелых формах РН. Также VEGFA регулирует процессы поддержания структуры и репарации сосудов легких у взрослого человека, а его отсутствие в период эмбрионального развития приводит к нарушению микрососудистого сплетения легких плода. Поэтому предполагают наличие соответствующей связи между активностью VEGFA и развитием БЛД у недоношенных детей [18, 19]. Регуляция ангиогенеза происходит за счет связывания VEGFA с тирозинкиназными рецепторами VEGFR1 (Flt1) и VEGFR2 (KDR/Flk1) [27].

Ген *VEGFA* расположен на 6-й хромосоме и имеет кодирующую область размером 14 т. п. н. с 8 экзонами и 7 интронами. Полиморфизм rs2010963 (известный также как –634G>C и +405G>C) локализован в 5'-нетранслируемой области гена *VEGF* и, предположительно, находится в пределах потенциального сайта связывания транскрипционного фактора миелоидного цинкового пальца 1 (MZF1), в результате чего может изменяться специфичность связывания этого мотива. Выявленный у пациента генотип CC полиморфного варианта –634G>C характеризуется повышенной продукцией фактора роста эндотелия сосудов и увеличивает риск развития БЛД и РН [17].

Увеличение содержания мРНК VEGF может регулироваться инсулиноподобным фактором роста 1 (IGF-1), обладающим митогенным и антиапоптотическим действием. Плод получает IGF-1 через плаценту и амниотическую жидкость. Недоношенные новорожденные имеют недостаточные уровни IGF-1 для нормального роста, развития и дифференцировки тканей. Низкие уровни IGF-1 способствуют развитию РН и БЛД, однако уже при прогрессировании заболеваний эти уровни достигают более высоких значений. Уровень и биодоступность IGF-1 регулируются в том числе IGFBP-3 и IGF1R. Мутации в гене *IGFR1* связаны с нарушениями, характеризующимися задержкой внутриутробного развития, плохим постнатальным ростом и повышенным уровнем IGF-1 в плазме [21]. В нашем исследовании не выявлено мутаций в гене *IGFR1*.

Ген *IGFBP3* локализован на хромосоме 7p12.3, состоит из 5 экзонов, 4 из которых являются кодирующими. Полиморфный вариант rs2854746 расположен в 1-м экзоне в положении 95 нуклеотидной последовательности и заключается в замене цитозина на гуанин, что соответствует замене аминокислоты аланина на глицин в положении 32 аминокислотной последовательности белка (р.Аla32Gly). Этот полиморфизм влияет на концентрацию свободно циркулирующего белка-3, связывающего инсулиноподобный фактор роста. Выявленный у пациента генотип CC с.С95G *IGFBP3* связан с низкими концентрациями циркулирующего IGFBP-3, что делает фактор роста IGF-1 более эффективным и ускоряет рост клеток [20].

Снижение уровня VEGF, происходящее при гипероксигенации, приводит к сниженной активации рецептора KDR, стимулирующего выработку эндотелиальной синтазы оксида азота в клетках эндотелия, что в свою очередь влечет за собой уменьшение концентрации оксида азота (NO) в клетках. Оксид азота имеет несколько сосудистых действий, которые могут способствовать росту и защите сосудов у недоношенных детей. NO является нейротрансмиттером для неадренергических, нехолинергических нейронов, снижающих тонус сосудов и бронхов, что приводит к вазодилатации и увеличению кровотока, а также облегчает координированное биение респираторных ресничек. Оксид азота опосредованно участвует в регуляции дифференцировки эндотелиальных клеток-предшественниц и процессов апоптоза. NO синтезируется путем окисления L-аргинина в L-цитруллин синтазой оксида азота (NOS). У людей выделены три изофермента NOS: нейрональный (nNOS), эндотелиальный (eNOS) и индуцибельный (iNOS). eNOS преобла-

дает в эндотелии легких [22]. Предполагают, что существует связь между активностью гена эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и риском развития СДР, БЛД и ВЖК [18].

Ген *NOS3* расположен на хромосоме 7q35-36 и состоит из 26 экзонов. Обнаружено большое количество полиморфных вариантов в гене *NOS3*, но немногие из них являются функциональными. Несинонимичный полиморфизм в положении 894 нуклеотидной последовательности 8-го экзона заключается в замене гуанина на тимин и глутамата на аспарат в положении 298 аминокислотной последовательности белка (rs1799983). Полиморфный вариант Glu298Asp может быть вовлечен в патофизиологию СДР и БЛД и может влиять на тяжесть и исход заболевания. Генотип ТТ и аллель Т связаны со сниженной функцией фермента и сниженной продукцией NO эндотелиальными клетками по сравнению с гомозиготными носителями GG и способствуют развитию БЛД вследствие негативного влияния на сосуды легких и рост альвеол [18, 22].

*Гены ренин-ангиотензиновой системы.* Ренин-ангиотензиновая система (RAS) – сигнальный путь, который играет важную роль в гомеостазе кровообращения. Компоненты RAS присутствуют в плацентарных капиллярах, эндотелиальных и эпителиальных клетках II типа легких младенца, а также связаны с развитием сосудов сетчатки и патологическим ангиогенезом [28]. Блокада RAS ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента и инактивация антагонистов рецепторов ангиотензина улучшает ретинопатию у мышей, вызванную избыточным кислородом. Предполагается, что ингибирование RAS может иметь положительный эффект при РН [19]. Активация легочной RAS может влиять на патогенез повреждения легких через ряд клеточных воздействий, таких как изменение проницаемости сосудов посредством модуляции уровней эндотелиальных внутриклеточных ионов кальция; изменение тонуса сосудов за счет притока кальция и сокращение гладких мышц сосудов и активности фибробластов [28]. Предполагается, что полиморфизмы генов, кодирующих ангиотензинпревращающий фермент (ACE), рецептор ангиотензина II первого типа (AGTR1) и ангиотензиноген (AGT) могут влиять на развитие перинатальных осложнений у недоношенных детей [19].

Все обнаруженные в нашем исследовании полиморфные замены в генах ренин-ангиотензиновой системы являются вариантами нормы.

*Гены антиоксидантной защиты.* Новорожденные дети, особенно недоношенные, подвержены высокому риску окислительного стресса из-за недостатка антиоксидантов. Усугубляют действие окислительного стресса незрелость легких, что требует применения кислородной терапии; повышенная подверженность инфекциям и воспалениям; наличие в системе кровообращения недоношенного ребенка свободного железа, которое служит катализатором реакций активных форм кислорода. Окислительный стресс участвует в развитии многих осложнений перинатального периода у недоношенных новорожденных, включая СДР, БЛД, внутрижелудочковое кровоизлияние, РН, что вызвано несовершенством антиоксидантной системы у недоношенных новорожденных [25].

Основными ферментами защиты клеток от окислительного стресса являются супероксиддисмутаза (SOD), превращающие супероксидный радикал в перекись водорода и кислород, каталаза (CAT) и глутатионпероксидаза (GPx), превращающие пероксид водорода в воду и кислород. В гене *GPX1* обнаружены полиморфные варианты СТ rs1050450 и СТ rs1800668, связанные со снижением ферментативной активности глутатионпероксидазы [24].

При анализе молекулярных нарушений в генах, кодирующих супероксиддисмутаза, выявлены значимые в развитии СДР, РН и других заболеваний легких полиморфные варианты ТС rs4880 митохондриальной супероксиддисмутаза (ген *SOD2*), связанные со снижением активности фермента [25] и СС rs1799895 внеклеточной супероксиддисмутаза (ген *SOD3*), которая повышает аффинность связывания фермента с матриксом [23].

Ген каталазы *CAT* расположен на хромосоме 11p13 и содержит 13 экзонов. Замена аденина на тимин в положении –89 промоторной области гена *CAT* (rs7943316) влияет на аффинность связывания транскрипционных факторов. У пациента выявлен генотип ТТ, приводящий к снижению активности фермента. Из-за наличия мутантного аллеля Т с промотором связываются неподходящие факторы транскрипции, что может привести к изменению его активности, экспрессии гена, снижению каталитической активности фермента и увеличению восприимчивости к окислительному стрессу [26].

**Заклучение.** Проведенное полноэкзомное секвенирование позволило выявить аллели риска развития врожденной глаукомы у недоношенного новорожденного: p.E229K *CYP1B1* и p.R76K *MYOC*, а также полиморфные варианты в генах *SFTPB*, *SFTPC*, *VEGFA*, *NOS3*, *IGFBP3*, *CAT*, ассоциированные с развитием неонатальных осложнений, таких как БЛД, РН и ПВЛ. Полученные результаты обследования пробанда и родителей необходимо учитывать при медико-генетическом консультировании семьи при планировании последующей беременности.

### Список использованных источников

1. Identifying risk factors shared by bronchopulmonary dysplasia, severe retinopathy, and cystic periventricular leukomalacia in very preterm infants for targeted intervention / L.-W. Wang [et al.] // *Neonatology*. – 2018. – Vol. 114. – P. 17–24. <https://doi.org/10.1159/000487505>
2. *CYP1B1*, *MYOC*, and *LTBP2* mutations in primary congenital glaucoma patients in the United States / S.-H. Lim [et al.] // *Am. J. Ophthalmol.* – 2013. – Vol. 155, N 3. – P. 508–517.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2012.09.012>
3. Giuffre, I. Molecular analysis of Italian patients with congenital glaucoma / I. Giuffre // *Glaucoma – current clinical and research aspects* / ed. P. Gunvant. – Rijeka, 2011. – P. 71–82.
4. Sambrook, J. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis // *Molecular cloning: a laboratory manual*. – 2nd ed. – New York, 1989. – P. 9.14–9.23.
5. Chang, X. wANNOVAR: annotating genetic variants for personal genomes via the web / X. Chang, K. Wang // *J. Med. Gen.* – 2012. – Vol. 49, N 7. – P. 433–436. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-100918>
6. Sequence analysis of *MYOC* and *CYP1B1* in a Chinese pedigree of primary open-angle glaucoma / J. Chen [et al.] // *Mol. Vis.* – 2011. – Vol. 17. – P. 1431–1435.
7. World medical association declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects / World Med. Assoc. // *JAMA*. – 2013. – Vol. 310, N 20. – P. 2191–2194. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
8. Occurrence of *CYP1B1* mutations in juvenile open-angle glaucoma with advanced visual field loss / E. Souzeau [et al.] // *JAMA Ophthalmol.* – 2015. – Vol. 133, N 7. – P. 826–833. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.0980>
9. Shah, B. R. Cytochrome P450 1B1: role in health and disease and effect of nutrition on its expression / B. R. Shah, W. Xu, J. Mraz // *RSC Adv.* – 2019. – Vol. 9, N 36. – P. 21050–21062. <https://doi.org/10.1039/C9RA03674A>
10. Identification of four novel cytochrome P4501B1 mutations (p.I94X, p.H279D, p.Q340H, and p.K433K) in primary congenital glaucoma patients / M. Tanwar [et al.] // *Mol. Vis.* – 2009. – Vol. 15. – P. 2926–2937.
11. Molecular basis for involvement of *CYP1B1* in *MYOC* upregulation and its potential implication in glaucoma pathogenesis / S. Mookherjee [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – Art. e45077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045077>
12. Role of *CYP1B1* p.E229K and p.R368H mutations among 120 families with sporadic juvenile onset open-angle glaucoma / V. Gupta [et al.] // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2017. – Vol. 256, N 2. – P. 355–362. <https://doi.org/10.1007/s00417-017-3853-0>
13. Somarajan BI2, Walia GK3, Kaur J4, Kumar S4, Gupta S2, Chaurasia AK2, Gupta D5, Kaushik A5, Mehta A2, Gupta V6, Sharma A7. *CYP1B1* variants are associated with prostate cancer in non-Hispanic and Hispanic Caucasians / J. Beuten [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2008. – Vol. 29. – P. 1751–1757. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm300>
14. Астахов, Ю. С. Наследственность и глаукома / Ю. С. Астахов, В. В. Рахманов // *Офтальмол. ведомости*. – 2012. – Т. 5, № 4. – С. 51–57.
15. Старикова, Д. И. Генетические исследования при первичной открытоугольной глаукоме / Д. И. Старикова, М. И. Чурносов // *PMЖ. Клини. офтальмология*. – 2017. – Т. 17, № 1. – С. 49–52.
16. Population-based frequency of surfactant dysfunction mutations in a native Chinese cohort Population / Y.-J. Chen [et al.] // *World J. Pediatr.* – 2015. – Vol. 12, N 2. – P. 190–195. <https://doi.org/10.1007/s12519-015-0047-x>
17. Association of a vascular endothelial growth factor polymorphism with the development of bronchopulmonary dysplasia in Japanese premature newborns / K. Fujioka [et al.] // *Sci. Reports*. – 2015. – Vol. 4. – Art. 4459. <https://doi.org/10.1038/srep04459>
18. Genetic contributions to the development of complications in preterm newborns / C. Poggi [et al.] // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10, N 7. – Art. e0131741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131741>
19. The genetics of retinopathy of prematurity: a model for neovascular retinal disease / R. Swan [et al.] // *Ophthalmol. Retina*. – 2018. – Vol. 2, N 9. – P. 949–962. <https://doi.org/10.1016/j.oret.2018.01.016>
20. Association of *IGF-1* CA(n) and *IGFBP3* rs2854746 polymorphisms with endometrial polyp risk / P. Leopoldo [et al.] // *BioMed Res. Int.* – 2018. – Vol. 2018. – Art. 8704346. <https://doi.org/10.1155/2018/8704346>
21. A pathogenic relationship of bronchopulmonary dysplasia and retinopathy of prematurity? A review of angiogenic mediators in both diseases / A. Stark [et al.] // *Front. Pediatr.* – 2018. – Vol. 6. – Art. 125. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00125>
22. Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism in preterm neonates with respiratory distress syndrome / M. A.-W. Albeshery [et al.] // *Int. J. Res. Med. Sci.* – 2016. – Vol. 4, N 12. – P. 5382–5386. <https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20164214>
23. Superoxide dismutase 3, extracellular (SOD3) variants and lung function / K. Ganguly [et al.] // *Physiol. Genom.* – 2009. – Vol. 37, N 3. – P. 260–267. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.90363.2008>
24. Association of rs1800668 polymorphism in glutathione peroxidase-1 gene and risk of rheumatoid arthritis in Pakistani population / S. Irfan [et al.] // *Pak. J. Med. Sci.* – 2016. – Vol. 32, N 5. – P. 1204–1207. <http://dx.doi.org/10.12669/pjms.325.10325>

25. Genetic polymorphisms of antioxidant enzymes as risk factors for oxidative stress-associated complications in preterm infants / B. Giusti [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2012. – Vol. 46, N 9. – P. 1130–1139. <https://doi.org/10.3109/10715762.2012.692787>
26. Association of catalase polymorphisms with primary open-angle glaucoma in a Chinese population / B. Gong [et al.] // *Ophthalmic Genetics.* – 2017. – Vol. 39, N 1. – P. 35–40. <http://dx.doi.org/10.1080/13816810.2017.1342132>
27. Роль VEGF в развитии неопластического ангиогенеза / В. П. Чехонин [и др.] // *Вестн. Рос. акад. мед. наук.* – 2012. – Т. 67, № 2. – С. 23–34.
28. ACE gene deletion/deletion polymorphism may be a protective factor for respiratory distress in preterm infants / E. Sivasli [et al.] // *Turk. J. Pediatr.* – 2007. – Vol. 49, N 1. – P. 69–74.

## References

1. Wang L.-W., Lin Y.-C., Wang S.-T., Huang C.-C. Identifying risk factors shared by bronchopulmonary dysplasia, severe retinopathy, and cystic periventricular leukomalacia in very preterm infants for targeted intervention. *Neonatology*, 2018, vol. 114, no. 1, pp. 17–24. <https://doi.org/10.1159/000487505>
2. Lim S.-H., Tran-Viet K. N., Yanovitch T. L., Freedman S. F., Klemm T., Call W., Powell C., Ravichandran A., Metlapally R., Nading E. B., Rozen S., Young T. L. *CYP1B1*, *MYOC*, and *LTBP2* mutations in primary congenital glaucoma patients in the United States. *American Journal of Ophthalmology*, 2013, vol. 155, no. 3, pp. 508–517.e5. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2012.09.012>
3. Giuffre I. Molecular analysis of Italian patients with congenital glaucoma. *Glaucoma – current clinical and research aspects*. Rijeka, 2011, pp. 71–82.
4. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York, 1989, pp. 9.14–9.23.
5. Chang X., Wang K. wANNOVAR: annotating genetic variants for personal genomes via the web. *Journal of Medical Genetics*, 2012, vol. 49, no. 7, pp. 433–436. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-100918>
6. Chen J., Cai S. P., Yu W., Yan N., Tang L., Chen X., Liu X. Sequence analysis of *MYOC* and *CYP1B1* in a Chinese pedigree of primary open-angle glaucoma. *Molecular Vision*, 2011, vol. 17, pp. 1431–1435.
7. World medical association declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*, 2013, vol. 310, no. 20, pp. 2191–2194. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>
8. Souzeau E., Hayes M., Zhou T., Siggs O. M., Ridge B., Awadalla M. S. [et al.]. Occurrence of *CYP1B1* mutations in juvenile open-angle glaucoma with advanced visual field loss. *JAMA Ophthalmology*, 2015, vol. 133, no. 7, pp. 826–833. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.0980>
9. Shah B. R., Xu W., Mraz J. Cytochrome P450 1B1: role in health and disease and effect of nutrition on its expression. *RSC Advances*, 2019, vol. 9, no. 36, pp. 21050–21062. <https://doi.org/10.1039/C9RA03674A>
10. Tanwar M., Dada T., Sihota R., Dada R. Identification of four novel cytochrome P4501B1 mutations (p.I94X, p.H279D, p.Q340H, and p.K433K) in primary congenital glaucoma patients. *Molecular Vision*, 2009, vol. 15, pp. 2926–2937.
11. Mookherjee S., Acharya M., Banerjee D., Bhattacharjee A., Ray K. Molecular basis for involvement of *CYP1B1* in *MYOC* upregulation and its potential implication in glaucoma pathogenesis. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, no. 9, art. e45077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045077>
12. Gupta V., Somarajan B. I., Walia G. K., Kaur J., Kumar S., Gupta S. [et al.]. Role of *CYP1B1* p.E229K and p.R368H mutations among 120 families with sporadic juvenile onset open-angle glaucoma. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 2017, vol. 256, no. 2, pp. 355–362. <https://doi.org/10.1007/s00417-017-3853-0>
13. Beuten J., Gelfond J. A., Byrne J. J., Balic I., Crandall A. C., Johnson-Pais T. L., Thompson I. M., Price D. K., Leach R. J. *CYP1B1* variants are associated with prostate cancer in non-Hispanic and Hispanic Caucasians. *Carcinogenesis*, 2008, vol. 29, no. 9, pp. 1751–1757. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm300>
14. Astakhov Yu. S., Rakhmanov V. V. Heredity and glaucoma. *Oftal'mologicheskie vedomosti* [Ophthalmology journal], 2012, vol. 5, no. 4, pp. 51–57 (in Russian).
15. Starikova D. I., Churnosov M. I. Genetic studies in primary open-angle glaucoma. *RMZh. Klinicheskaya oftal'mologiya = Russian Journal of Clinical Ophthalmology*, 2017, vol. 17, no. 1, pp. 49–52 (in Russian).
16. Chen Y.-J., Wambach J. A., Pass K., Wegner D. J., Chen S.-K., Zhang Q.-Y., Heins H., Cole F. S., Hamvas A. Population-based frequency of surfactant dysfunction mutations in a native Chinese cohort population. *World Journal of Pediatrics*, 2015, vol. 12, no. 2, pp. 190–195. <https://doi.org/10.1007/s12519-015-0047-x>
17. Fujioka K., Shibata A., Yokota T., Koda T., Nagasaka M., Yagi M., Takeshima Y., Yamada H., Iijima K., Morioka I. Association of a vascular endothelial growth factor polymorphism with the development of bronchopulmonary dysplasia in Japanese premature newborns. *Scientific Reports*, 2015, vol. 4, art. 4459. <https://doi.org/10.1038/srep04459>
18. Poggi C., Giusti B., Gozzini E., Sereni A., Romagnuolo I., Kura A., Pasquini E., Abbate R., Dani C. Genetic contributions to the development of complications in preterm newborns. *PLoS ONE*, 2015, vol. 10, no. 7, art. e0131741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131741>
19. Swan R., Kim S. J., Campbell J. P., Chan R. V. P., Sonmez K., Taylor K. D. [et al.]. The genetics of retinopathy of prematurity: a model for neovascular retinal disease. *Ophthalmology Retina*, 2018, vol. 2, no. 9, pp. 949–962. <https://doi.org/10.1016/j.oret.2018.01.016>
20. Leopoldo P., Doria S., Moscovitz T., Tcherniakovsky M., Fernandes C. E., Pompei L. M., Wajman M., Nimwegen A., Haimovich S. Association of *IGF-1* CA(n) and *IGFBP3* rs2854746 polymorphisms with endometrial polyp risk. *BioMed Research International*, 2018, vol. 2018, art. 8704346. <https://doi.org/10.1155/2018/8704346>

21. Stark A., Dammann C., Nielsen H. C., Volpe M. V. A pathogenic relationship of bronchopulmonary dysplasia and retinopathy of prematurity? A review of angiogenic mediators in both diseases. *Frontiers in Pediatrics*, 2018, vol. 6, art. 125. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00125>
22. Albeshery M. A.-W., Abdel-Haie O. M., Ramadan N. S., Mohammed S. A. Endothelial nitric oxide synthase gene Glu298Asp polymorphism in preterm neonates with respiratory distress syndrome. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 2016, vol. 4, no. 12, pp. 5382–5386. <https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20164214>
23. Ganguly K., Depner M., Fattman C., Bein K., Oury T. D., Wesselkamper S. C. [et al.]. Superoxide dismutase 3, extracellular (SOD3) variants and lung function. *Physiological Genomics*, 2009, vol. 37, no. 3, pp. 260–267. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.90363.2008>
24. Irfan S., Rani A., Sameem M., Nawaz S. K., Liaqat I., Arshad M. Association of rs1800668 polymorphism in glutathione peroxidase-1 gene and risk of rheumatoid arthritis in Pakistani population. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 2016, vol. 32, no. 5, pp. 1204–1207. <http://dx.doi.org/10.12669/pjms.325.10325>
25. Giusti B., Vestriani A., Poggi C., Magi A., Pasquini E., Abbate R., Dani C. Genetic polymorphisms of antioxidant enzymes as risk factors for oxidative stress-associated complications in preterm infants. *Free Radical Research*, 2012, vol. 46, no. 9, pp. 1130–1139. <https://doi.org/10.3109/10715762.2012.692787>
26. Gong B., Shi Y., Qu C., Ye Z., Yin Y., Tan C., Shuai P., Li J., Guo X., Cheng Y., Yang Z., Lin Y., Liu X. Association of catalase polymorphisms with primary open-angle glaucoma in a Chinese population. *Ophthalmic Genetics*, 2017, vol. 39, no. 1, pp. 35–40. <http://dx.doi.org/10.1080/13816810.2017.1342132>
27. Chekhonin V. P., Shein S. A., Korzhagina A. A., Gurina O. I. The role of VEGF in the development of neoplastic angiogenesis. *Vestnik Rossijskoi akademii meditsinskikh nauk = Annals of the Russian academy of medical sciences*, 2012, vol. 67, no. 2, pp. 23–34 (in Russian).
28. Sivasli E., Yurdakök M., Babaoğlu E., Karabulut H., Yiğit S., Babaoğlu M., Tekinalp G., Tükün A. ACE gene deletion/deletion polymorphism may be a protective factor for respiratory distress in preterm infants. *Turkish Journal of Pediatrics*, 2007, vol. 49, no. 1, pp. 69–74.

### Информация об авторах

*Малышева Ольга Михайловна* – аспирант, мл. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: O.Malysheva@igc.by

*Михаленко Елена Петровна* – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: E.Michalenko@igc.by

*Сухарева Анастасия Павловна* – аспирант, врач-неонатолог. Клинический родильный дом Минской области (ул. Ф. Скорины, 16, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: nstbor@tut.by

*Артошевская Марина Владимировна* – канд. мед. наук, ассистент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: 6579542@bk.ru

*Ситник Надежда Геннадьевна* – аспирант, врач-реаниматолог. Клинический родильный дом Минской области (ул. Ф. Скорины, 16, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: n.g.sitnik@gmail.com

*Кулакова Галина Валерьевна* – врач анестезиолог-реаниматолог. Клинический родильный дом Минской области (ул. Ф. Скорины, 16, 220114, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: dockulakova@gmail.com

*Жевнеронок Ирина Владимировна* – канд. мед. наук, доцент. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: ira\_jevner@tut.by

*Кильчевский Александр Владимирович* – академик, д-р биол. наук, профессор. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: Kilchev@presidium.bas-net.by

*Шишко Георгий Александрович* – д-р мед. наук, профессор. Белорусская медицинская академия последипломного образования (ул. П. Бровки, 3/3, 220013, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: georg\_shishko@mail.ru

### Information about the authors

*Volha M. Malysheva* – Postgraduate student, Junior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: O.Malysheva@igc.by

*Alena P. Michalenska* – Ph. D. (Biol.), Leading Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: E.Michalenko@igc.by

*Anastasiya P. Suharava* – Postgraduate student, Neonatologist. Clinical Maternity Hospital of Minsk Region (16, F. Skorina Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: nstbor@tut.by

*Maryna V. Artsiusheuskaya* – Ph. D. (Med.), Assistant. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Brovka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: 6579542@bk.ru

*Nadzeya G. Sitnik* – Postgraduate student, Resuscitator. Clinical Maternity Hospital of Minsk Region (16, F. Skorina Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: n.g.sitnik@gmail.com

*Galina V. Kulakova* – Resuscitation anesthetist. Clinical Maternity Hospital of Minsk Region (16, F. Skorina Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dockulakova@gmail.com

*Iryna V. Ghevneronak* – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Brovka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ira\_jevner@tut.by

*Aleksandr V. Kilchevsky* – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Kilchev@presidium.bas-net.by

*Georgiy A. Shyshko* – D. Sc. (Med.), Professor. Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education (3/3, P. Brovka Str., 220013, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: georg\_shishko@mail.ru