

ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ, «ОТВЕТСТВЕННЫХ» ЗА МИНЕРАЛИЗАЦИЮ КОСТНОЙ ТКАНИ У ПОДРОСТКОВ

**Плехова Н.Г.¹, Крукович Е.В.¹, Воронин С.В.², Догадина Н.А.¹, Каблуков Д.А.¹,
Мисливец О.В.¹, Елисеева В.С.¹**

¹ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Владивосток, e-mail: vgm.nauka@mail.ru;

²ГАУЗ «Краевой клинический центр специализированных видов медицинской помощи» (ГАУЗ «ККЦ СВМП»), Владивосток, e-mail: info@kkcsvmp.ru

Рассмотрено влияние полиморфных вариантов генов (ген рецептора витамина D, VDR; ген рецептора кальцитонина, CALCR; ген коллагена 1 типа, COL1A1) на развитие костно-мышечной системы у подростков Приморского края. В исследовании приняли участие 51 человек, с первой и второй группой здоровья. У большинства обследованных детей отмечались определенные нарушения осанки, правильная осанка была только у 63% детей. Найдено сочетание аллелей 3 генов, характерных для обследуемых, из которых наиболее распространенное C/T C/T G/T, затем T/T C/T G/T и C/T C/C GT, причем совместное сочетание указанных генов составляло 80%. Эти данные значительно отличаются от результатов, полученных исследователями в других регионах России, что позволяет сделать предположение о наличии значимых отличий по изученным вариантам генов населения Приморского края от генотипа населения центральной части России.

Ключевые слова: костно-мышечная система, генетика, факторы риска, витамин D, ген рецептора витамина D (VDR), ген рецептора кальцитонина (CALCR), ген коллагена 1 типа.

FREQUENCY OF MEETING POLYMORPHIC VARIANTS OF GENES, "RESPONSIBLE" FOR MINERALIZATION OF BONE TISSUE TEENAGERS

**Plekhova N.G.¹, Krukovich E.V.¹, Voronin S.V.², Dogadina N.A.¹, Kablukov D.A.¹,
Mislivets O.V.¹, Eliseeva V.S.¹**

¹Pacific State Medical University, Vladivostok, e-mail: vgm.nauka@mail.ru;

²Regional Clinical Center for Specialized Medical Aid, Vladivostok, e-mail: info@kkcsvmp.ru

The influence of polymorphic variants genes (the gene of the vitamin D receptor (VDR), the calcitonin receptor gene (CALCR) and the collagen type 1 gene (COL1A1)) on the development of the musculoskeletal system in TEENAGERS of Primorsky Krai were considered. The study involved 51 person, with the first and second group of health. Most of the children surveyed had certain postural abnormalities, only 63% of children had a correct posture. A combination of alleles of 3 genes for the subjects of which the most common C / TC / TG / T, then T / TC / TG / T and C / TC / C GT, was found, and the combination of these genes was 80%. These data vary significantly from the results of the study of the population in the central part of the Russian Federation. This allows us to make an assumption about the existence of significant differences in the studied variants of the Primorsky Krai population genes against the genotype of the population in the central part of Russia.

Keywords: musculoskeletal system, genetics, risk factors, vitamin D, vitamin D receptor gene (VDR), calcitonin receptor gene (CALCR), type 1 collagen gene.

Активное внедрение генетики в практическое здравоохранение на настоящий момент является приоритетным направлением развития медицины. Это связано с тем, что заболевания человека в большей или меньшей степени связаны с особенностями наследственности. Заболевания могут быть следствием мутации одного аллеля гена (доминантные), сочетания мутаций в двух аллелях: рецессивные и мультифакториального сочетания, так называемые полигенные заболевания. Практическое применение в медицине знаний о существовании «генов предрасположенности», мутантные аллели которых

совместимы с нормальным жизнеобеспечением организма в постнатальном периоде, позволяет более точно осуществлять прогнозирование течения заболевания при неблагоприятных условиях. При правильном подходе к трактовке результатов молекулярного исследования возможно выявление не только генов, лежащих в основе наследственных заболеваний, но и генов предрасположенности к ним [1].

В ходе онтогенеза каскад генов последовательно включается в развитие тканей организма, обеспечивая процесс специализированной дифференцировки клеток и формирования органных структур. Изменение стадий под влиянием различных факторов этого процесса приводит к нарушению или прекращению развития эмбриона. Известно, что многие врожденные пороки развития (ВПР) могут быть вызваны мутациями разных типов генов. К ним относятся гены, кодирующие факторы транскрипции, включающие специфические нуклеотидные последовательности (мотивы), которые принимают участие в процессе регуляции экспрессии генов и, таким образом, контролируют процессы развития организма [2]. Также на нарушение процесса онтогенеза оказывают влияние мутации генов, кодирующих рецепторы, ферменты, транспортные молекулы и структурные белки. Причем отмечается, что большинство изолированных пороков развития возникает в результате взаимодействия не только генетических, но и средовых (внешних) факторов, и эти патологии мультифакториальной этиологии составляют от 20 до 30% в общей группе пороков развития [1-3].

Показано, что более 30% россиян являются носителями хотя бы 5-6 рецессивных генетических мутаций, связанных с тяжелым наследственным заболеванием [3]. Так, до 5% населения в настоящее время страдают от ВПР, хромосомных и моногенных заболеваний. При этом на удельный вес ВПР приходится 3,5%, на наследственные орфанные болезни – 1% и заболевания при хромосомной патологии – 0,5%. Вместе с тем на настоящий момент представлено достаточно данных о генетической причине многих заболеваний костно-мышечной системы, и частота встречаемости врожденных пороков этой системы ежегодно растет. Так, частота и структура формирования пороков развития костно-мышечной системы в России превышают данные других стран в 2,7 раза [4]. На территории Приморского края пороки костно-мышечной системы у новорожденных занимают 2 ранговое место с частотой до 5%, и, как правило, в структуре пороков костно-мышечной системы, выявленных у новорожденных, преобладает вывих бедра.

Помимо изученных, известных наследственных и врожденных заболеваний костно-мышечной системы, рассматривается влияние предрасполагающих факторов, в том числе и генетических. Показана связь минеральной плотности костной ткани с наличием различных аллельных вариантов генов витамина D и полиморфизмом в регуляторной области гена

COL1A1. Аминокислотная структура основного структурного белка костной ткани, коллагена 1 типа, кодируется генами COL1A1 и COL1A2. Увеличение уровня транскрипции гена COL1A1, вызванное полиморфизмом регуляторной области, приводит к изменению соотношения альфа 1 и альфа 2 цепей коллагена. Это вызывает дезорганизацию межклеточного матрикса и инициирует процесс прогрессивного снижения минеральной плотности костной ткани. По данным Е.М. Базилевской [4], около 80% обследованных по функциональному состоянию генов COL1A1 и VDR имеют «неблагоприятные» сочетания в различных вариантах их неполноценности, при этом у 80% выявлено сочетание двух таких аллелей, а у 20% трех аллелей «предрасположенности». Действительно, по мнению большинства авторов, существует определенная зависимость между снижением минеральной плотности кости, остеопорозом и функциональным состоянием генов COL1A1 и VDR [5; 6]. С другой стороны, Е.М. Яковлевым [7] показано, что вариабельность дефектов в генах, кодирующих белки, связанные с процессом биосинтеза и деградацию коллагена и других компонентов межклеточного вещества, при многофакторном сочетании, коррелирует с выраженностью гетерогенности и полиморфизмом наследственной патологии дисплазии соединительной ткани. Причем последняя не является отдельной нозологической единицей патологии и определяется как генетически детерминированный процесс, который выражается фенотипическими особенностями наследственной патологии. Таким образом, инициация системного патологического процесса дисплазии соединительной ткани обусловлена генетической предрасположенностью, а условия его развития сопровождаются эндогенными механизмами, также связанными со свойственными для него наследственными характерными [7; 8]. По мнению других авторов [9], состояние мезенхимы зависит также от особенностей генов, кодирующих белки экстрацеллюлярного матрикса, и различных сигнальных механизмов. Показана прямая корреляционная связь между аллелями TT TaqI rs731236 гена, кодирующего рецептор для витамина D (VDR), и наличием остеопороза [2]. Указывается, что частота аллеля T полиморфизма TaqI rs731236 гена VDR статистически значимо чаще встречается в группе у женщин с остеопатическими переломами, по сравнению со здоровыми женщинами. Наибольшую статистическую значимость у женщин с остеопорозом имел гомозиготный генотип TT полиморфизма TaqI rs731236 гена VDR по сравнению со здоровыми женщинами, а гетерозиготный генотип СТ статически значимо чаще встречался у женщин с переломами.

В последние десятилетия, по мнению педиатров, педагогов и врачей общей практики, наблюдается снижение количества детей 1-й и 2-й группы здоровья и отмечается рост заболеваемости. Несмотря на то что патология костно-мышечной системы не относится к ведущим в структуре заболеваемости и смертности у детей и подростков, а в Приморском

крае составляет всего 15-19%, эта патология является предрасполагающим фактором в развитии последующих артрозов, артритов, остеохондрозов и остеопорозов. Данные заболевания во взрослом состоянии прогрессируют и в 40-50% случаев приводят к инвалидизации. Одной из основных причин формирования патологии костно-мышечной системы у детей и подростков является изменение молекулярно-генетического регулирования, что выражается нарушением кальциевого обмена. К одной из причин, инициирующей изменение процесса минерализации костной ткани, можно отнести изменение генов, кодирующих белки, принимающих участие в этом процессе, а именно: гена рецептора кальцитонина CALCR, гена коллагена I типа COL1A1, гена рецептора витамина D (VDR).

Цель исследования: изучить распространенность полиморфных вариантов генов (COL1A1, CALCR и VDR), участвующих в процессе минерализации костной ткани у подростков 15-17 лет (1-я и 2-я группа здоровья), проживающих в г. Владивостоке.

Материалы и методы

С помощью метода активного интервью с использованием индивидуальной карты изучено состояние здоровья 51 ребенка 1-й и 2-й группы здоровья (20 мальчиков и 31 девочка), в возрасте от 15 до 17 лет в общеобразовательных учреждениях г. Владивостока: средняя школа № 17 и средняя школа № 51. Физическое развитие оценивали на раздетом ребенке в положении «по стойке смирно» между антропологическими точками. Методика антропометрических исследований включала измерение тела стандартными инструментами (вертикальный ростомер, весы медицинские, рулетка). Изучение состояния костно-мышечной системы включало: общую оценку, осанку, двигательную активность, силовые возможности, фотоплантографию. Фотоплантография заключалась в анализе отпечатка стопы, окрашенной раствором Люголя при нагрузке. В норме отпечаток середины стопы не пересекает границу средней и латеральной трети перпендикуляра, проведенного от середины линии, соединяющей края отпечатка в области медиального края пятки и основания 1 пальца. Линию поперек стопы делили на три равные части, упрощение наружного свода в одной трети принимали за норму, в двух третях относили к первой степени, в трех третях – второй, и при большем - к третьей.

Для молекулярно-генетического анализа использовали образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов крови с помощью наборов «Экстра ДНК Био» компании «Алкор Био». Определение типа полиморфизма генов COL1A1, CALCR и VDR осуществляли с использованием набора реагентов для определения полиморфных вариантов rs1800012 IVS1 2046 G\T гена альфа-1 цепи коллагена-I COL1A1, rs1801197 c.1377C/T p.P447L гена рецептора кальцитонина CALCR и rs731236 c.1056 T/C гена внутриклеточного рецептора

витамина D VDR (ООО «Генотехнология», Россия). Полимеразно-цепную реакцию в реальном времени проводили по стандартной схеме (БаЗо, 1989), согласно инструкции производителя набора, для амплификации использовали программированный термоциклер PicoReal (Финляндия). Статистическая обработка данных произведена в программе Statistica 5.5 (Stat-Soft, Inc). Для оценки соответствия распределения генотипов по изученным полиморфным маркерам равновесию Харди – Вайнберга статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что у подавляющего большинства обследуемых детей отмечаются отклонения костно-мышечной системы. Так, правильная осанка наблюдалась у 63% детей, причем у мальчиков этот показатель преобладал и составлял 73% относительно 54% у девочек. Тогда как гиперкифоз у девочек отмечался чаще, чем у мальчиков: 15% и 9%, так же как и выпрямленная осанка: 22% и 14% соответственно. Х-образная форма ног преобладала у девочек и встречалась в 25% случаев, а у мальчиков в 19%, остальные показатели приведены в таблице 1.

Таблица 1

Показатели состояния костно-мышечной системы

Пол	Переломы			Вывихи			Телосложение			Уровень плеч		Уровень лопаток		Уровень таза		Гипермоб суставов	
	0	1	2,3	0	1	2,3	норм	гипер	гипо	пр	лев	пр	лев	пр	лев	есть	нет
Жен	71	16	13	87	10	3	84	10	6	68	32	61	39	50	50	31	69
Муж	60	30	10	100	-	-	80	5	15	69	31	56	44	50	50	15	85

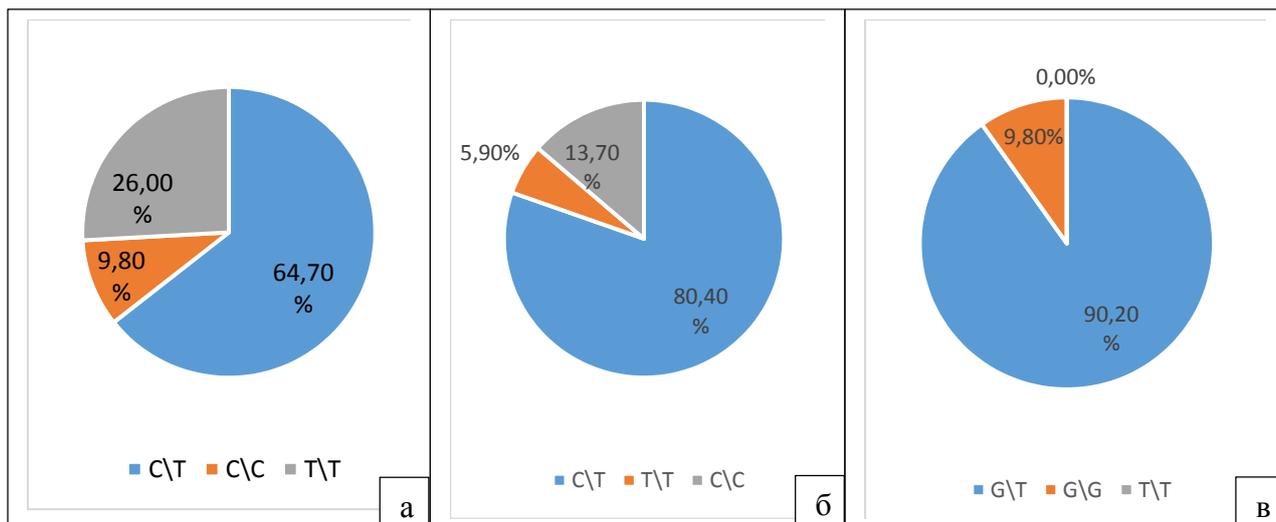
По результатам фотоплантографии поперечное плоскостопие 1-й степени обнаружено у 27%, 2-й степени у 63%, 3-й степени у 5% обследуемых. Продольное плоскостопие 1-й степени наблюдалось у 39%, 2-й степени 8% и 3-й степени не выявлялось. Вальгус определялся в 8% случаев, а варус в 29%, и всего 7% обследуемых имели стопы без каких-либо отклонений.

По результатам генетического тестирования, обследуемые были распределены на группы по C\T-, C\C-, T\T-генотипам по генам VDR и CALCR и на G\T-, G\G-, T\T-генотипы по гену COL1A1.

При изучении распределения аллелей полиморфного маркера rs 731236 T/C гена внутриклеточного рецептора витамина D VDR 1-ю группу (C\T-генотип) составили 33 человека обследуемых (64.7%), 2-ю группу (C\C –генотип) 5 человек (9.8%) и 3-ю группу (T\T-генотип) – 13 человек (26.0%) (рис. а). Тогда как, по данным М.М. Костик [10], распределение аллелей указанного гена у детей с нормальной минеральной плотностью кости было следующим: носители C\T-генотипа – 48%, носители C\C генотипа – 8.7%,

носители T\T-генотипа – 43.3%, что значимо отличалось от полученных нами данных.

В полиморфных вариантах rs 1801197 с.1377 C/T p.P447L гена рецептора кальцитонина CALCR нами обнаружено, что 1-ю группу обследуемых (C\T-генотип) составили 41 человек (80.4%), 2-ю группу (C\C-генотип) – 7 человек (13,7%), и 3-ю группу (T\T-генотипа) – 3 человека (5,9%) (рис. б). При изучении частоты встречаемости аллеля альфа-1 цепи коллагена-I COL1A1 полиморфных вариантов rs 1800012 IVS1 2046 G\T в 1-ю группу (G\T-генотипа) было отнесено 46 человек (90,2%), во 2-ю группу (G\G-генотип) 5 человек (9,8%), T\T-генотип не обнаружен (рис. в).



Распределение аллелей генов у обследуемых по группам: а) внутриклеточного рецептора витамина D VDR полиморфного маркера rs 731236 T/C; б) рецептора кальцитонина CALCR в полиморфных вариантах rs 1801197 с.1377 C/T p.P447L; в) альфа-1 цепи коллагена-I COL1A1 полиморфных вариантов rs 1800012 IVS1 2046 G/T

В исследованиях Н.М. Шилиной [11] в обследованной когорте преобладающим генотипом полиморфизма rs1800012 гена COL1A1 был выявлен генотип GG (55,1%), частота генотипа TT - 7,6%, аллеля T - 26,2%. Отмечена обратная ассоциация аллеля T с риском снижения костной прочности (OR=0,621 при p=0,037) полиморфизма rs1800012 гена COL1A1 у всех обследованных детей дошкольного и школьного возраста. По данным Э.А. Майлян [12], распределение полиморфизмов в гене COL1A1 было следующим: GG - 67,1%, GT - 29,8%, а в TT - 3,1%.

Нами установлено, что полиморфизмы в гене внутриклеточного рецептора витамина D VDR в 2 раза чаще встречались у девочек, чем у мальчиков (60,8% и 39,2% соответственно). Преобладание гомозиготной T\T и G\G в указанном гене также встречалось у девочек в 5 и 4 раз чаще (таблица 2), чем у мальчиков. Известно, что аллель G* является неблагоприятным по «предрасположенности» обследуемых к остеопорозу [2].

Гетерозиготный вариант G\T - преобладал у девочек в соотношении 1:1,6. Структура распределения полиморфизмов в генах VDR, CALCR, COL1A1 по половому признаку представлена в таблице 2.

Таблица 2

Структура распределения полиморфизмов генов VDR, CALCR, COL1A1 у детей различного пола (%)

	VDR		CALCR			COL1A1	
	мальчики	девочки	мальчики	девочки		мальчики	девочки
C\C	3,9	5,9	7,8	5,8	G\G	2,0	7,8
T\T	3,9	19,6	2,0	3,9	T\T	0	0
C\T	31,4	35,3	29,4	51,0	G\T	37,3	53,0
Всего	39,2	60,8	39,2	60,8	Всего	39,2	60,8

Таким образом, сочетание полиморфизмов генов VDR C/T, CALCR C/T, COL1A1 G/T выглядело следующим образом: C/T C/T G/T – 51%; T/T C/T G/T – 13,7%; C/T C/C G/T – 11,7%; C/C C/T G/T – 7,8%; T/T C/T G/G – 7,8%; C/T T/T G/T – 2%; T/T T/T G/G – 2%; T/T C/C G/T – 2%; C/C T/T G/T – 2%, и совместное сочетание этих генов занимало почти 80%. Нами в литературных источниках не найдено данных о сочетании вариантов аллелей в генах VDR C/T, CALCR C/T, COL1A1 G\T. Учитывая значимые различия между результатами, полученными в наших исследованиях, и данными, отмечаемыми в других регионах, можно сделать предположение о наличии отличий указанных генов населения Приморского края от генов населения центральной части России. На наш взгляд, это связано с активной миграцией населения в страны Юго-Восточной Азии, а также значительным удельным весом переселенцев из Украины. Это утверждение требует проведения расширенного сравнительного анализа остальных полиморфизмов генов населения Приморского края.

Список литературы

1. Москаленко М.В. Полиморфизм ряда генов метаболизма костной ткани и остеопороз у человека: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.07. – СПб., 2011. - 171 с.
2. Мордовский В.С. Генетические предикторы переломов проксимального отдела бедра у женщин с остеопорозом г. Красноярск / В.С. Мордовский, Е.В. Капустина, А.С. Кенц, С.Ю. Никулина // Наука 21 века. Проблемы и перспективы. – 2016. - № 1 (4). - С. 29-31.
3. Хусаинова Р.И. Молекулярно-генетические основы остеопороза // Биомика. – 2014. – Т. 6, № 1. – С. 24-51.
4. Базилевская Е.М. Оценка генетической предрасположенности молодых жителей Санкт-Петербурга к заболеваниям, связанным с нарушением обмена кальция / Е.М.

Базилевская, И.Ш. Якубова, А.А. Топанова // Профилактическая и клиническая медицина. - 2014. - N 3 (52). - С. 96–101.

5. Кочеткова Е.А. Генетические аспекты остеопороза / Е.А. Кочеткова, О.Ю. Бубнов, Т.Г. Васильева // Тихоокеанский медицинский журнал. - 2005. - № 2. - С. 14-17.

6. Селезнева Л.И. Молекулярно-генетическое исследование остеопороза: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2008. – 19 с.

7. Яковлев Е.М. Молекулярно-генетические и структурно-функциональные аспекты дисплазии костной ткани постнатального периода онтогенеза // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2010. – N 4. - С. 3-7.

8. Крукович Е.В. Причины формирования и факторы риска патологии костно-мышечной системы у детей и подростков / Е.В. Крукович, Н.А. Догадина, Д.А. Каблуков, Н.Г. Плехова // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 5. - URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26891>.

9. Строев Ю.И. О дефиците массы тела у современного молодого поколения / Ю.И. Строев, Л.П. Чурилов, С.А. Садов // Здоровье - основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. - 2007. - С. 163-167.

10. Костик М.М. Клиническое значение полиморфизма гена рецептора витамина Д у детей с ювенильным идиопатическим артритом / М.М. Костик, А.М. Смирнов, Г.С. Демин // Лечение и профилактика. -2013. - № 1. – С. 13-18.

11. Шилина Н.М. Изучение полиморфизма RS1800012 гена ALPHA1-цепи коллагена 1-го типа у женщин и детей г. Москвы с различным уровнем костной прочности / Н.М. Шилина, Е.Ю. Сорокина, И.А. Иванушкина // Вопросы питания. - 2015. - № 4. - С. 74-81.

12. Майлян Э.А. Связь полиморфизма SP1 гена COL1A1 с минеральной плотностью костной ткани у женщин в постменопаузальном периоде // Ульяновский медико-биологический журнал. - 2017. - № 2. – С. 81-88.