

Т.Г. Васильева, Е.А. Кочеткова, Ф.Ф. Антоненко

АССОЦИАЦИЯ ГЕНА КОЛЛАГЕНА И РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D С ОСТЕОПЕНИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ ПРИ ЮВЕНИЛЬНЫХ АРТРИТАХ У ДЕТЕЙ

Владивостокский филиал НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН, Краевой клинический центр охраны материнства и детства (глав. врач — член-корр. РАМН, д. м. н. Ф.Ф. Антоненко), г. Владивосток, РФ

В работе исследована распространенность полиморфизма гена рецептора витамина D₃ (VDR₃) BsmI и коллагена α 1-го типа (COL1A1) Sp1 среди больных ювенильными артритами (ЮА). Изучена их связь с биохимическими маркерами костного метаболизма (остеокальцин, β-Crosslaps). Объектом исследования стали 90 детей с различными вариантами ЮА. Выявлена вариабельность генов-предшественников остеопороза при различных вариантах ЮА. Установлено, что реализация эффектов BsmI полиморфизма гена рецептора витамина D₃, вероятно, происходит преимущественно через механизмы, лежащие в основе костного формирования, а Sp1 (COL1A1) – через процессы резорбции кости.

Incidence of polymorphism in vitamin D₃ receptor (VDR₃) gene BsmI and in α 1- collagen type (COL1A1) gene Sp1 and correlation with biochemical markers of bone metabolism (osteocalcine, β+ crosslaps) was studied in 90 children with different variants of juvenile arthritis (JA). Authors detected variability of genes-precursors of osteoporosis in different variants of JA and showed that effects of VDR₃ gene BsmI polymorphism were realized trough mechanisms of bone formation, and effects of Sp1 (COL1A1) polymorphism-through processes of bone resorption.

Остеопороз (ОП) является классическим мультифакториальным заболеванием, генетическая составляющая которого формируется за счет взаимодействия многих генов [1–3]. Существенный вклад в изучение наследственных факторов ОП внесли работы по идентификации генов, вовлеченных в процесс остеогенеза [4–6]. Среди многих генов-кандидатов, участвующих в регуляции костного метаболизма и детерминирующих минеральную плотность костной ткани (МПКТ), важная роль принадлежит гену рецептора витамина D₃ (VDR₃) и гену коллагена α 1-го типа (COL1A1). Несмотря на то, что изучению их роли в реализации ОП посвящено большое количество работ, взаимосвязь VDR₃ и COL1A1 с костным обменом обсуждается только в единичных исследованиях [7]. На основе литературных данных были определены две наиболее значимые мутации для предрасположенности к ОП: это нуклеотидные замены в генах COL1A1 (Sp1) и VDR₃ (Bsm1). Интерес к их изучению не случаен. Так, на сегодняшний день установлено, что витамин D и его активные метаболиты являются главными компонентами системы, регулирующей кальций-фосфорный обмен, нарушение которого лежит в основе остеопенического синдрома у детей. А VDR₃, как ядерный рецептор, выступает в роли посредника в передаче биологического действия 1,25-дигидрооксивитамина D₃ на экспрессию различных генов-мишеней [5, 8, 9]. Напротив, коллаген 1-го типа является основным белком костной ткани, аминокислотная структура которого кодируется генами COL1A1 и COL1A2. Полиморфизм в регуляторной области гена COL1A1 приводит к изменению соотношения α₁- и α₂-цепей белка и, как следствие, к нарушениям структуры коллагена кости [4, 6, 10]. Таким образом, оба гена непосредственно вовлечены в процесс остеогенеза, несмотря на определенные различия в молекулярных механизмах их действия. Определение полиморфизмов в гене коллагена 1-го типа и рецептора витамина D₃ представляет интерес не только для выявления ассоциации различных генотипов и ОП, но и для выбора адекватной терапии. Необходимо отметить, что вопросу о детерминации генов-кандидатов предрасположенности к развитию остеопенического синдрома у больных ювенильными артритами (ЮА) посвящены единичные работы [11, 12].

Целью нашего исследования было изучение распространенности полиморфизма гена рецептора витамина D₃ (VDR₃) Bsm1 и коллагена α 1-го типа (COL1A1) Sp1 и проведение анализа их связи с биохимическими маркерами костного ремоделирования при ЮА.

Материалы и методы исследования

Нами было обследовано 55 детей с ЮА, из них 20 пациентов с ювенильным ревматоидным артритом (ЮРА) и 35 детей с ювенильным хроническим

(недифференцированным) артритом (ЮХА). В качестве групп сравнения обследованы 35 больных реактивным артритом (РеА) и 50 здоровых детей.

Нормальные и патологические аллели геномной ДНК лимфоцитов периферической крови обследованных детей идентифицировали при помощи полимеразной цепной реакции и капиллярного электрофореза на автоматическом анализаторе ДНК «MultiGene» с последующим секвенированием ДНК по Сэнгеру [13]. Определяли частоту «нормальных» (мутация отсутствует в обоих аллелях) – В, s и функционально «неполноценных» (мутация содержится в обоих аллелях) – b, S аллелей VDR₃, COL1A1. При этом изучали частоту аллелей Bsm1 (генотипы BB, Bb и bb) и Sp1 (генотипы SS, Ss и ss) при различных вариантах ЮА. Исследование МПКТ проведено методом дихроматической рентгеновской абсорбциометрии на аппарате «Prodigy» (General Electrics Medical Systems «Lunar», США). Уровень в крови маркеров костного формирования (остеокальцин) и резорбции (β-Crosslaps) изучен при помощи иммуноферментного метода на аппарате «ELECSIS» фирмы «HOFFMANN LA ROCHE» (Швейцария).

Результаты и их обсуждение

В результате проведенного анализа полученных данных установлена вариабельность частоты генотипов в зависимости от нозологической формы ЮА. Среди больных ЮРА и РеА носителей генотипа BB полиморфизма Bsm1 гена рецептора витамина D₃ было достоверно меньше, чем в группе здоровых детей (21,82%, 11,43% и 36% соответственно; p<0,01). При этом гетерозиготы Bb при РеА выявлялись чаще, а при ЮРА – реже относительно контроля (71,43%, 32,73% и 50% соответственно; p<0,05). Примечательно, что рецессивных гомозигот среди здоровых детей было в 3,25 раза меньше, чем при ЮА (14% и 45,5% соответственно, p<0,001), но их количество в контрольной группе не отличалось относительно РеА (17,14%). Распределение частоты «нормального» (В) и «неполноценного» (b) аллелей гена полиморфизма Bsm1 (VDR₃) в сравниваемых группах составило соответственно 38,18% при ЮРА, 47,14% при РеА и 61% в контроле (В) и 61,82%, 52,86% и 39% (b), с достоверным различием признака между группами пациентов с ЮА и здоровых детей (p<0,01).

Примечательно, что у больных ЮА также были выявлены различия показателей частоты генотипов Bsm1 в зависимости от клинического варианта заболевания. Так, большинство детей с ЮРА имели генотип bb (65%), что достоверно отличалось от здоровых (p<0,001) и больных другими вариантами артрита (p<0,001 и p<0,05 соответственно). А распределение частоты «нормального» (В) и «неполноценного» (b) аллелей соответствовало у данного контингента больных 22,5% и 78,5% (p<0,001). У детей с ЮХА эти частоты составили 47,92% и 52,08% (соответственно В и b аллелям),

что достоверно отличалось от группы ЮРА ($p < 0,05$).

Среди больных ЮА детей с генотипом SS (COL1A1) было больше, чем у здоровых ($p < 0,05$), с максимальным различием признака между группами ЮХА и контроля (75% и 52% соответственно, $p < 0,01$). Частота других генотипов Sp1 (COL1A1) в группах сравнения распределилась следующим образом: для Ss – 33,33%, 16,67%, 17,14% и 34% и ss – 0%, 8,33%, 17,15% и 14% соответственно ЮРА, ЮХА, РеА и контроль. Необходимо отметить, что при ЮРА детей с генотипом ss не выявлено, а достоверность различия показателей была установлена только для Ss между ЮХА, РеА и контролем ($p < 0,05$). Также не выявлена достоверность различия распределения частоты «нормального» (s) и «неполноценного» (S) аллелей полиморфизма (Sp1) гена COL1A1 в вышеуказанных группах сравнения. Однако при изучении показателей у больных ЮА (объединенная группа детей с ЮРА и ЮХА) достоверность аналогичных показателей была установлена (84,23% – S и 15,77% – s, $p < 0,05$).

При проведении анализа сочетания генотипов по генам рецептора витамина D₃ и COL1A1, связанных с повышенным риском ОП, выявлено, что носителей «неполноценных» генов bbSS среди больных ЮРА было 40% ($p < 0,01$ относительно контроля), а при ЮХА – 22,84% ($p < 0,05$). Среди здоровых детей и пациентов с РеА данный суммарный генотип встречался значительно реже (4% и 8,57% соответственно). Но необходимо отметить, что удельный вес сочетания «полноценных» аллелей (BBss) в группах сравнения был небольшой и составлял от 2,86% при ЮХА до 9% в контроле ($p > 0,05$). Мы не выявили детей с аналогичным генотипом в группе ЮРА. Гетерозиготные носители мутаций в гене (BbSs) у пациентов с хроническими вариантами ЮА диагностировались достоверно реже, чем у здоровых детей и больных РеА ($p < 0,01$).

Мы исследовали взаимосвязи аллелей Bsm1 полиморфизма гена VDR₃ и Sp1 полиморфизма гена COL1A1 с маркерами формирования и резорбции костной ткани. Установлено, что у больных ЮА детей обнаружены достоверные различия между средними значениями остеокальцина и генотипами BB и bb (168,22±15,29 и 116,14±12,89 ng/ml соответственно; $p < 0,01$), что указывает на связь Bsm1 (VDR₃) с уровнем маркера костного формирования в изученной выборке пациентов. Динамика β-Crosslaps в зависимости от генотипа носила аналогичный характер. Так, более высокий уровень маркера резорбции кости был в группе детей с генотипами Bb (1,52±0,10 ng/ml) и BB (1,44±0,09 ng/ml), а у гомозигот по рецессивному признаку (bb) его уровень был ниже (1,18±0,08 ng/ml) ($p < 0,05$).

Таким образом, аллель b в гомозиготном состоянии ассоциируется с более низкими средними

показателями концентрации остеокальцина и β-Crosslaps, что свидетельствуют о синхронном снижении процессов остеосинтеза и костной резорбции, активности остеогенеза у носителей bb-генотипа. Соотношение остеокальцина и β-Crosslaps (K₁) достоверно различалось у детей с BB- и bb-генотипами ($p < 0,05$). Это, вероятно, доказывает преимущественное воздействие аллеля b на биохимические процессы, лежащие в основе остеосинтеза.

Достоверных различий между показателями костного формирования в зависимости от генотипов SS, Ss и ss и их сочетаний с Bsm1 (VDR₃) в изученной выборке пациентов не выявлено. Однако при изучении взаимосвязи носительства «неполноценного» аллеля S (SS) гена коллагена 1-го типа с маркерами костного ремоделирования диагностировано повышение уровня β-Crosslaps относительно показателя при ss-генотипе ($p < 0,05$). Этому соответствуют значения K₁, который был достоверно ниже при генотипе ss по сравнению с противоположным гаплотипом ($p < 0,05$).

При исследовании показателей денситометрии установлено, что генотип BB у больных ЮА сопровождается более высокой минеральной плотностью костной ткани поясничных позвонков (L₁–L₄) по сравнению с bb-генотипом ($p < 0,001$). При этом зарегистрированы более низкие значения стандартного отклонения от ее возрастной нормы.

Градации Z-score по генотипам была следующей: -0,29±0,07 SD для BB, -0,64±0,12 SD для Bb ($p < 0,05$) и -1,18±0,13 SD для bb ($p < 0,001$). Содержание минерала в костной ткани также было более высоким у гомозигот по «полноценному» B-аллелю. Необходимо отметить, что у 82% больных ЮА с остеопеническим синдромом были зарегистрированы суммарные генотипы bbSS, BbSS и bbSs.

Таким образом, полиморфизм генов VDR₃ (Bsm1) и COL1A1 (Sp1) играет важную роль в процессе остеогенеза, ассоциирован с маркерами костного обмена, что свидетельствует о его функциональной значимости в развитии остеопенического синдрома. При этом реализация эффектов Bsm1 полиморфизма гена рецептора витамина D₃, вероятно, происходит преимущественно через механизмы, лежащие в основе формирования, а Sp1 (COL1A1) – через процессы резорбции кости. Высокая распространенность функционально неполноценных (b и S) аллелей доказывает, что в основе патогенеза костных изменений при ЮА, вероятно, лежат генетически детерминированные нарушения регуляции костного метаболизма, синтеза коллагена, которые реализуются под воздействием инфекционных и иммунопатологических факторов, ятрогении. Определение факторов риска развития остеопенического синдрома, генов предрасположенности к ОП позволит выделять группы риска, прогнозировать течение заболевания, производить индивидуальный подбор комплекса профилактических и лечебных мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Зазерская И.Е., Асеев М.В., Кузнецова Л.В.* Анализ ассоциации генов VDR3 и COL1A1 с постменопаузальным остеопорозом. Остеопороз и остеопатии. 2002; 2: 2–6.
2. *Беневоленская Л.И., Финогенова С.А.* Генетика остеопороза: II. Изучение роли гена рецептора витамина D (обзор литературы). Остеопороз и остеопатии. 1999; 3: 21–25.
3. *Ralston SH.* The genetic of osteoporosis. Bone. 1999; 25(1): 85–86.
4. *Dawson PA, Kelly TE, Marini JC. J.* Extension of phenotype associated with structural mutation in type I collagen: siblings with juvenile osteoporosis have an alpha 2 (I) gly 436 arg substitution. Bone Miner. Res. 1999; 14: 449–455.
5. *Morrison N.A.* Vitamin D receptor gene variants and osteoporosis: a contributor to the polygenic control of bone density. In: Vitamin D. Eds. D. Feldman, FN. Glorieux, JW. Pike. San Diego: Academic Press, 1997: 713–731.
6. *Harris SS, Pettel MS, Cole DEC.* Association of collagen type 1 α 1 Sp1 polymorphism with five-year rates of bone loss in older adults. Calcif. Tissue Int. 2000; 66: 268–271.
7. *Eisman JA.* Genetic of osteoporosis. Endocrine Rev. 1999; 20: 788–804.
8. *Gong G, Stern HS, Cheng SC.* The association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphisms. Osteoporosis Int. 1999; 9: 55–64.
9. *Короткова Т.А.* Влияние генетических и внешнесредовых факторов на формирование пика костной массы у подростков. Остеопороз и остеопатии. 2004; 3: 34–37.
10. *Mann V, Ralston SH.* Meta-analysis of COL1A1Sp1 polymorphism in relation to bone mineral density and osteoporotic fracture. Bone. 2003; 32(6): 711–717.
11. *Костик М.М., Баранов Д.Н., Масалова В.В. и др.* Влияние полиморфизма гена рецептора витамина D на степень воспалительной активности и характер течения хронических артритов у детей. Вopr. совр. пед. 2006; 5(1): 283–284.
12. *Васильева Т.Г.* Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии. Материалы Российской научной конференции с межд. участием. В 2-х томах. Т.1. Курск: КГМУ, 2006: 452–456.
13. *Ванюшева О.В.* Разработка технологии детекции точечных мутаций на основе аллель-специфической ПЦР с применением автоматических анализаторов ДНК: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2005.

РЕФЕРАТЫ

**КОРРЕЛЯЦИЯ КЛИНИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ДАННЫХ У ДЕТЕЙ
С ОТЕКОМ МОЗГА, ОБУСЛОВЛЕННЫМ ДИАБЕТИЧЕСКИМ КЕТОАЦИДОЗОМ,
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МАГНИТНОЙ РЕЗОНАНСНОЙ ТОМОГРАФИИ**

Цель исследования: определить клинические и биохимические параметры, влияющие на развитие отека мозга при диабетическом кетоацидозе (ДКА) у детей. Для определения степени отека мозга мы использовали магнитно-резонансную томографию. У 26 детей был определен видимый коэффициент диффузии (ВКД) воды в головном мозге до и после коррекции кетоацидоза и рассчитаны корреляции изменения ВКД с клиническими и биохимическими параметрами. Средняя величина ВКД после коррекции ДКА увеличивалась по сравнению с его исходными значениями ($8,13 \pm 0,47$ vs $7,74 \pm 0,49 \cdot 10^{-4}$ мм²/с, разница средних значений $0,40$, 95% ДИ: $0,25$ до $0,55$, $p < 0,01$). У детей с нарушениями сознания во время ДКА увеличение ВКД было более значительным. Увеличение ВКД во время ДКА имело положительную корреляцию с исходной концентрацией мочевины в сыворотке крови (коэффициент корреляции $0,41$, $p = 0,03$) и с исходной частотой дыхания (коэффициент корреляции $0,61$, $p < 0,001$). Не было достоверной корреляции

увеличения ВКД с исходным уровнем глюкозы в сыворотке, с уровнем натрия или с эффективной осмолярностью, а также со степенью изменения этих параметров в процессе лечения. Многовариантный анализ показал, что исходный уровень мочевины в сыворотке и исходная частота дыхания независимо коррелировали с увеличением ВКД. Таким образом, степень отека мозга при ДКА у детей коррелирует со степенью дегидратации и гипервентиляции, но не с факторами, зависящими от исходной осмолярности или от изменений осмолярности в процессе лечения. Эти данные подтверждают гипотезу, что отек мозга при ДКА зависит от гипоперфузии, а колебания осмолярности во время коррекции ДКА не играют значимой роли.

Glaser NS, Marcin JP, Wootton-Gorges SL, Buonocore MH, Rewers A, Strain J, Dicarolo J, Neely EK, Barnes P, Kuppermann N. J. Pediatr. 2008; 25.