

УДК616.711-007.5-07:575.113:577.121]-053.6

Е.А. Кочеткова, Б.И. Гельцер, О.Ю. Бубнов,
Т.Г. Васильева, О.А. Белых, П.А. Лукьянов

АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ ГЕНОВ VDR3 И COL1A1 С МАРКЕРАМИ КОСТНОГО МЕТАБОЛИЗМА У ПОДРОСТКОВ С НАРУШЕНИЕМ ОСАНКИ

Владивостокский филиал НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН,
Тихоокеанский институт биоорганической химии
(г. Владивосток)

Ключевые слова: гены-кандидаты, костный метаболизм, нарушение осанки, остеопороз.

В настоящее время интенсивно обсуждается взаимосвязь различных вариантов костного метаболизма в детском возрасте с развитием остеопороза у взрослых [3]. Известно, что подростковый период характеризуется максимальным повышением минеральной плотности костной ткани [5]. На накопление костной массы в этом периоде влияют как наследственные, так и средовые факторы. К последним относят снижение физической активности, неадекватное потребление кальция и витамина D, недостаточную инсоляцию, курение и др. [11]. Именно подростковый возраст является решающим в отношении реакции различных экзогенных и эндогенных стимулов на формирование пика костной массы и, следовательно, риска развития остеопенического синдрома в будущем.

В пользу генетической природы ОП свидетельствуют половые и расовые различия в частоте и тяжести его проявлений [13], семейная предрасположенность к привычным переломам, высокая конкордантность заболевания у монозиготных близнецов [9]. Так, различные исследования показывают, что около 70-80% изменчивости минеральной плотности костной ткани в популяции определяется генетическими факторами [6]. Это утверждение основано на сравнении минеральной костной плотности среди монозиготных и дизиготных близнецов, а также между близнецами и неблизнецами-сибсами [9, 13]. Существенный вклад в изучение наследственных факторов ОП внесли работы по идентификации генов, вовлеченных в процесс остеогенеза [7, 10, 13]. Среди многих генов-кандидатов, участвующих в регуляции костного метаболизма и детерминирующих минеральную плотность костной ткани, важная роль принадлежит гену рецептора витамина D3 (VDR3) и гену коллагена тип 1 (COL1A1) [8, 12]. Показано наличие определенной зависимости между снижением минеральной костной плотности, костным обменом и функционально неполноценными аллелями генов VDR3 и COL1A1 [8]. Нарушение костного метаболизма и снижение минеральной плотности костной ткани у подростков, особенно в период их интенсивного роста, встречается достаточно часто

[3], поэтому особый интерес представляет изучение полиморфизма генов-кандидатов предрасположенности к остеопорозу именно в этой возрастной группе, в частности, у лиц с патологией опорно-двигательного аппарата [2]. Несмотря на то, что изучению аллельной связи генов VDR3 и COL1A1 с минеральной костной плотностью посвящено большое количество работ, их взаимосвязь с костным обменом обсуждается только в единичных исследованиях.

Цель настоящего исследования заключалась в анализе связи полиморфизма гена VDR3 и COL1A1 с биохимическими маркерами костного ремоделирования у подростков с нарушением осанки.

Обследовано 45 детей в возрасте $16,2 \pm 1,4$ года с различными типами нарушения осанки, которые диагностировались с помощью осмотра на основании клинических критериев (по Штоффелю). Мальчиков было 25 и девочек — 20. У 17 пациентов наблюдалась сколиотическая осанка, характерными признаками которой было отклонение линии остистых отростков во фронтальной плоскости, сопровождающееся легкой асимметрией надплечий, углов лопаток, треугольников талии и позиций таза. Асимметрия исчезала при горизонтальном положении и наклоне вперед. У 15 подростков диагностирована сутулость (усиление грудного кифоза на фоне нормального или сглаженного поясничного лордоза). 13 детей подросткового возраста были с «круглой спиной», что проявлялось тотальным пологим кифозом с каудально смещенной вершиной при отсутствии физиологического поясничного лордоза.

Всем пациентам, для исключения структурных деформаций, выполнялась рентгенография грудного и поясничного отделов позвоночника в двух проекциях. Оценка антропометрических данных осуществлялась вычислением индекса массы тела по формуле:

$$ИМТ = \text{масса тела (кг)} / \text{рост}^2 (\text{м}).$$

При опросе пациентов особое внимание уделялось анамнезу, наследственности и характеру диеты. Проводился ретроспективный анализ частоты переломов, регистрировались их количество и локализация. До начала обследования пациенты не получали антирезорбтивную терапию для профилактики или лечения ОП. Подростки находились на обычном режиме питания без добавления препаратов кальция в течение всего периода наблюдения. Из работы были исключены лица, имевшие другие сопутствующие заболевания, которые могли оказывать самостоятельное влияние на метаболизм костной ткани.

О состоянии костного метаболизма судили по концентрации в сыворотке крови биохимических маркеров костного формирования (остеокальцина — ОКЦ — неколлагенового протеина, синтезируемого остеобластами, специфичного для костной ткани) и маркера резорбции кости (iCrossLaps — p^*CL — компонента С-терминального телопептида коллагена I типа, продукта деградации разрушенной молекулы

коллагена). Концентрацию ОКЦ и (3CL в сыворотке крови, а также базальную секрецию паратиреоидного гормона (ПТГ) определяли иммуноферментным методом с помощью наборов фирмы Hoffmann La Roche (Швейцария) на аппарате Elecsis той же фирмы.

Анализировали частоты нормальных (B и S) и функционально неполноценных (b и s) аллелей VDR3 и COL1A1. Частоту аллелей BsmI полиморфизма в гене рецептора витамина D3 (генотипы BB, Bb, bb) и Sp1 полиморфизма в гене COL1A1 (генотипы SS, Ss, ss) изучали методом анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови стандартным методом фенолхлороформной экстракции с использованием протеиназы К. Нормальные и патологические аллели идентифицировали при помощи полимеразной цепной реакции с последующей рестрикцией эндонуклеазами Sp1 (COL1A1), BsmI (VDR3). Аллели B и S соответствовали отсутствию сайтов рестрикции для соответствующих эндонуклеаз, при наличии аллелей b и s продукты ПЦР-амплификации содержали сайты рестрикции для этих эндонуклеаз.

Контрольную группу составили 40 подростков аналогичного возраста и пола с I и II группами здоровья [4].

Статистическая обработка всех полученных цифровых данных проводилась на персональном компьютере по программе «Статистика 2» с подсчетом средней арифметической, среднего квадратичного отклонения, средней ошибки средней арифметической, коэффициентов достоверности и различий, коэффициента линейной корреляции, его ошибки и достоверности.

При анализе костного метаболизма нами установлено, что средние значения сывороточного ОКЦ ($86,47 \pm 1,7$ нг/мл), являющегося специфическим маркером костеобразования, у лиц молодого возраста с нарушением осанки были достоверно ниже по сравнению с аналогичным показателем в контроле, что свидетельствует о снижении функциональной способности клеток остеобластического ряда у подростков с нарушением осанки. В целом по группе пациентов с нарушением осанки концентрация (3CL имела лишь тенденцию к повышению (в среднем $1,32 \pm 0,02$ нг/мл), достоверно не отличаясь от показателей здоровых сверстников. При этом выявлена корреляционная связь средней силы ($r=0,64$) между ИМТ и уровнем ОКЦ в сыворотке крови. Так, в группе подростков с нарушением осанки и пониженным питанием концентрация маркера формирования была достоверно ниже по сравнению с подростками с нормальным значением ИМТ. При этом отсутствие сбалансированности важнейших составляющих костного ремоделирования (остеосинтеза и резорбции) у лиц молодого возраста с нарушением осанки с преобладающим снижением процессов формирования приводит к нарушению костного обмена и, как следствие, развитию остеопенического синдрома в

будущем. В нашем исследовании у подростков с нарушением осанки уровень ПТГ находился в диапазоне нормативных значений, но был ниже аналогичного показателя у лиц контрольной группы. Внутригрупповой анализ показал различия между базальной секрецией ПТГ и половой принадлежностью пациентов. Примечательно, что у мальчиков с нарушением осанки уровень паратгормона был выше по сравнению с девочками.

Интерес к изучению связи именно полиморфизма BsmI в гене рецептора витамина D3 и Sp1 полиморфизма в гене COL1A1 с костным метаболизмом не случаен. Так, на сегодняшний день установлено, что витамин D и его активные метаболиты являются главными компонентами системы, регулирующей кальциево-фосфорный обмен. VDR3, как ядерный рецептор, выступает в роли посредника в передаче биологического действия 1,25-дигидрооксивитамина D3, влияя на экспрессию различных генов-мишеней [1]. Появление функционально неполноценной аллели b приводит к нарушению гомеостаза кальция в организме. Напротив, коллаген I типа является основным структурным белком костной ткани, аминокислотная структура которого кодируется генами COL1A1 и COL1A2 [10]. Полиморфизм в регуляторной области гена COL1A1 приводит к увеличению уровня его транскрипции, к изменению соотношения $\alpha 1$ и $\alpha 2$ цепей белка и, как следствие, к нарушениям структуры коллагена кости. Последнее может быть причиной как снижения минеральной плотности и прогрессирующего уменьшения костной массы, так и усиления костной резорбции, что иллюстрируется увеличением уровня маркеров резорбции.

Таким образом, оба гена VDR3 и COL1A1 непосредственно вовлечены в процесс остеогенеза, несмотря на определенные различия в молекулярных механизмах их действия.

Частота генотипов и аллелей гена VDR3 для подростков с нарушением осанки распределились следующим образом: 24,3% — генотип BB, 42,4% — генотип Bb, 33,3% — генотип bb, 39,8% — B аллель и 60,2% — b аллель гена VDR3. В контрольной группе распределение частоты генотипов VDR3 (BB и Bb) составило соответственно 67,3 и 32,7%. Примечательно, что гомозигот по b аллели в группе здоровых подростков выявлено не было. Таким образом, при анализе аллелей гена VDR3 установлены достоверные различия в распределении генотипов между подростками с нарушением осанки и индивидуумами контрольной группы: более высокие частоты функционально неполноценного b аллеля BsmI полиморфизма (Bb и bb генотипы) зарегистрированы у подростков с нарушением осанки.

Распределение частот нормальной (S) и неполноценной (s) аллелей гена COL1A1 в группе подростков с нарушением осанки составило 65,2 (S) и 34,8% (s), а соответствующих генотипов — 67,2 % (SS), 23,4 % (Ss), 9,4 % (ss). В то время как в контрольной группе

процентное распределение частот аллелей Sp1 полиморфизма и генотипов по гену COL1A1 было следующим: 76,3% (S) и 23,7% (s), 75,6% (SS) и 24,4% (ss). Необходимо отметить, что мы не выявили подростков, гомозиготных по функционально неполноценной аллели s, в контроле. Таким образом, частоты аллелей и генотипов генов VDR3 и COL1A1 достоверно отличались у подростков с нарушением осанки и здоровых лиц.

В ряде исследований показана значимая роль генетических факторов в процессах обмена костной ткани. Выявлено, что у женщин-близнецов репродуктивного возраста межиндивидуальная изменчивость по маркерам костеобразования и резорбции на 65% определяется генетическими факторами [9]. Мы провели анализ взаимосвязи аллелей BsmI полиморфизма в гене VDR3 и Sp1 полиморфизма в гене COL1A1 с маркерами формирования и резорбции костной ткани. Установлено, что у подростков с нарушением осанки обнаружены достоверные различия между средними значениями ОКЦ и генотипами BB, Bb и bb ($122,2 \pm 3,2$, $84,7 \pm 1,3$ и $56,8 \pm 1,1$ нг/мл, соответственно), что указывает на связь BsmI полиморфизма гена VDR3 с уровнем маркера костного формирования в изученной выборке пациентов.

Таким образом, аллель В в гомо- и гетерозиготном состоянии ассоциируется с более низкими средними показателями концентрации ОКЦ. Максимальный уровень ОКЦ отмечается у BB-гомозигот как у подростков с нарушением осанки, так и в контрольной группе. Кроме того, с этой же аллелью связан и более высокий уровень (ЗСЛ в сыворотке крови. Так, максимальное снижение концентрации ОКЦ и повышение уровня (ЗСЛ ассоциировалось с гомозиготным генотипом bb, что свидетельствует о снижении процессов формирования и интенсификации разрушения коллагена костной ткани у bb-гомозигот, по сравнению с носителями генотипа BB. Аналогичная зависимость прослеживалась и в отношении функциональной аллели S.

Несмотря на отсутствие достоверных различий между уровнем маркера костной резорбции (ЗСЛ в сыворотке крови у подростков с нарушением осанки и здоровых индивидуумов, в группе с максимальным значением (ЗСЛ частота функционально неполноценной аллели s оказалась достоверно выше. У подростков с нарушением осанки, носителей генотипов Ss и ss гена COL1A1, отмечались более высокие показатели сывороточного (ЗСЛ по сравнению с носителями SS-генотипа. При этом достоверных различий между Ss- и ss-генотипами и концентрацией маркера костной резорбции не выявлено.

Распределение аллелей у подростков с нарушением осанки позволяет рассчитать относительный риск нарушения костного метаболизма в зависимости от генотипов VDR3 и COL1A1. Так, у подростков, гомозиготных по функционально неполноценным аллелям генов VDR3 и COL1A1 (суммарный генотип

bbss), отмечается резкое нарушение костного ремоделирования, что иллюстрируется более низкими показателями ОКЦ и максимальным повышением (ЗСЛ. Аналогичная картина характерна и для носителей генотипов Bbss, bbSs, BBss, ассоциируемых с нарушением костного метаболизма.

Частота гетерозигот (генотип Bb) среди подростков с нарушением осанки и сниженным уровнем ОКЦ составила 37,4%, что достоверно выше контроля. Все подростки с генотипом bb имели низкий уровень ОКЦ. Сходный характер распределения генотипов наблюдался и в отношении функционально неполноценной аллели s гена COL1A1. Частота патологических гомозигот ss в группе подростков с нарушением осанки и функции костного ремоделирования составила 9,4%. В контроле генотипы bb и ss не регистрировались.

Следовательно, учитывая, что b и s аллели полиморфизма генов VDR3 и COL1A1 связаны с маркерами костного обмена, можно сделать вывод о функциональной значимости данных аллелей в развитии остеопенического синдрома.

Полученные результаты доказывают наличие ассоциации неполноценных аллелей рецептора витамина D и гена коллагена I типа с маркерами костного метаболизма у подростков с нарушением осанки. Особый интерес для генетического тестирования наследственной предрасположенности к остеопорозу представляют подростки с нарушением осанки, гомозиготные по функционально неполноценным аллелям обоих генов VDR3 и COL1A1 (bbss), а также носители генотипов Bbss, bbSs, BBss. Тестирование генов VDR3 и COL1A1 в детском и подростковом возрасте открывает реальные возможности для определения предрасположенности к развитию остеопенического синдрома в будущем.

Литература

1. Зазерская И.Е., Асеев М.В., Кузнецова Л.В. // *Остеопороз и остеопатии*. — 2002. — № 2. — С. 2-6.
2. Калб Т.Л. // *Вестн. новых медицинских технологий*. — 2001. — №4. — С. 62-64.
3. Короткова Т.А. // *Остеопороз и остеопатии*. — 2004. — №3. — С. 34-37.
4. Приказ № 60 от 14.03.95 об утверждении инструкции по проведению профилактических осмотров дошкольного и школьного возраста на основе медико-экологических нормативов. МЗ и Медпромышленности, РФ, М.
5. Семичева Т.В., Баканова Т.Д. // *Остеопороз и остеопатии*. — 2002. — №1. — С. 28-31.
6. Beavan S. // *Lancet*. — 1996. — Vol. 348. — P. 136-137.
7. Gong G., Stern H.S., Cheng S.C. et al. // *Osteoporosis Int.* — 1999. — Vol. 9. — P. 55-64.
8. Grant S.F., Reid D.M., Blake G. // *Nat. Genet.* — 1996. — Vol. 14, No. 2. — P. 203-205.
9. Harris S.S., Nguyen T.V., Kelly P.J. et al. // *Bone*. — 1998. — Vol. 22. — P. 141-145.

10. Hobson E., Dean V., Grant S.F.A. // J. Med. Genet. - 1998. - Vol. 35. - P. 32-37.
11. Mora S., Pitukcheewanont F.R., Kaufman P. // J. Bone Miner. Res. - 1999. - No. 14. - P. 271-275.
12. Morrison N.A., Tokita J.C., Kelly P.J. // Natur. - 1994. - Vol. 367. P. 284-287.
13. Ralston S.H. // Bone - 1999. - Vol. 25, No. 1. - P. 85-86

Работа выполнена при поддержке ДВО РАН и СО РАМН (05-II-СМ-05-004)

Поступила в редакцию 23.12.04.

ANALYSIS RELATIONSHIP OF GENE-CANDIDATES VDR3 AND COL1A1 WITH BONE METABOLISM'S MARKERS IN ADOLESCENCES WITH CARRIAGE DISORDERS

E.A. Kochetkova, B.I. Geltser, O.Y. Bubnov, T.G. Vasileva, O.A. Beluh

Vladivostok department of Tomsk Institute Medical Genetic Siberian Branch of Russia Academia of Medical Sciences
Summary — Objective of study was to study relation of VDR and COL1 A1 gene's polymorphism in adolescences with carriage disorders. We investigated 45 adolescences with carriage disorders. Condition of bone metabolism was estimated on blood osteocalcini (OC) and pCrossLaps (p*CL) concentration by immunoassay method. BsmI polymorphism of length of restrictive fraction VDR3 (genotypes BB, Bb, bb) and SpI polymorphism COL1A1 (genotypes SS, Ss, ss) was studied using PCR. Control group was consisted by 40 health adolescences similar ages and a sex. We discovered significant different between average indices of OC level in adolescences with carriage disorders with genotypes BB, Bb and bb (BsmI-polymorphism). The difference between CL levels is found only for SS and ss genotypes. Conclusion: a polymorphism VDR3 and COL1 A1 gene has intimately relation with bone metabolism markers in adolescences with carriage disorders and it is key genes in development of osteopenic syndrome.

Pacific Medical Journal, 2005, No. 1, p. 34-37.

УДК 616.24-002-022.7-073.43

*Ю.В. Кулаков, Л.М. Молдованова,
В.И. Коренбаум*

ВОЗМОЖНОСТИ БИЛАТЕРАЛЬНОЙ БРОНХОФОНОГРАФИИ И В ДИАГНОСТИКЕ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ОЧАГА В ЛЕГКОМ

Владивостокский государственный медицинский университет,
Тихоокеанский океанологический институт ДВО РАН (г. Владивосток)

Ключевые слова: билатеральная бронхофонография, пневмония, аускультация легких, диагностика.

Одной из важных задач современной медицины является поиск новых методов диагностики заболеваний органов дыхания, которые позволят повысить эффективность лечения больных [1, 4, 7]. Физикальное обследование уже в течение почти двух столетий является основой диагностики у постели больного, однако оно имеет субъективный характер. Благодаря развитию компьютерной техники появилась возможность анализировать легочные звуки и представлять их в виде бронхофонограмм, которые могут быть подвергнуты объективному анализу и количественной (математической) оценке [2, 5]. Одним из перспективных направлений являются так называемые акустические методы исследования легких (бронхофонография, пневмофонография), задача которых состоит в объективной оценке параметров звуковых сигналов на поверхности грудной клетки [2]. Работ, посвященных изучению звукопроводения при очаговых процессах в легких, немного [6]. Основная причина этого — взаимная маскировка проведения звуков по воздушным каналам и структурам легких [2]. Метод, основанный на сравнении звуковых сигналов с симметричных участков легких, далее называемый

билатеральной бронхофонографией, был ранее представлен в ряде работ [3, 8].

Цель настоящего исследования состояла в разработке критериев акустической диагностики патологического очага в легком на примере больных бактериальной пневмонией. Проанализированы результаты обследования 76 больных бактериальной пневмонией (42 мужчины и 34 женщины) в возрасте от 16 до 70 лет (средний возраст 42,3 года). Все пневмонии были бактериальными, внебольничными, с локализацией преимущественно в нижних отделах (77,6%), причем значительно чаще справа (70,7%). В зависимости от тяжести больные пневмонией распределились следующим образом: у 9,2% — легкое течение, у 29% — тяжелое, у 61,8% — средней тяжести. В первые 72 часа от начала заболевания было госпитализировано 39,4% больных, остальные были помещены в стационар позднее 3 суток.

Данные физикального обследования характеризовались разнообразием и изменчивостью. При объективном осмотре у 69,7% больных имелось отставание половины грудной клетки в акте дыхания на стороне поражения, у 65,8% — изменение голосового дрожания над очагом поражения (причем в 52,6% случаев отмечалось его усиление и в 13,2% — ослабление). Неизменное голосовое дрожание было у 34,2% больных. Укорочение перкуторного тона выявлено в 63,2% наблюдений.

При аускультации изменение основного дыхательного шума над очагом поражения зарегистрировано у 76,3%, жесткое дыхание — у 36,8%, ослабленное — у 30,3% и бронхиальное — у 9,2% больных. В 23,7% случаев обнаружено везикулярное дыхание. При аускультации над очагом поражения у 71,1% пациентов выявлены дополнительные дыхательные шумы. Влажные хрипы выслушивались у 47,4% больных, в 13,2% случаев выслушивалась крепитация, в 5,3% — сухие хрипы и шум трения плевры. Изменение бронхофонии наблюдалось у 65,8% больных: усиление (52,6%) и ослабление (13,2%). В 34,2% на-