О.С. Ларін, Д.С. Зябліцев

АСОЦІАЦІЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ *T1245G* ГЕНА *COL1A1* З РІВНЕМ ОСТЕОАСОЦІЙОВАНИХ ГОРМОНІВ НА ТЛІ ПОСТМЕНОПАУЗНОГО ОСТЕОПОРОЗУ

Український науково-практичний центр ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України, Київ

ВСТУП

Метаболічні захворювання кістки, до яких належить постменопаузний остеопороз (ОП), об'єднують процеси, яким притаманна прогресуюча та генералізована втрата мінеральної щільності кістки (МЩК), на відміну від станів, за яких спостерігаються локальні зміни кістки [2]. В Україні у період з 1950 р. по 2010 р. частка вперше діагностованого ОП зросла на 1% (з 0,2% до 1,2%), причому частка міського населення досягла 90%. [1]. Високий ризик розвитку ОП мають жінки у постменопаузний період. За даними літератури, формування остеодефіциту (ОД), що є маркером розвитку ОП, починається ще в менструальний період [3, 4], а щорічна втрата кісткової маси з поглибленням гормональних клімактеричних порушень збільшується втричі. Фізіологічна гіпоестрогенемія зумовлює зменшення утворення періостальної кістки на тлі збільшення її ендокортикальної сорбції, зниження активності остеобластів із незначним підвищенням активності остеокластів, що спричинює негативний процес ремоделювання [5]. Вважають [6], що ОП є класичним багатофакторним захворюванням, генетична складова якого формується за рахунок взаємодії багатьох генів. Одним із них є ген α-1 ланцюга колагену 1-го типа (*COL1A1*), який має хромосомну локалізацію 17q21.33. Вважають, що поліморфізм *T1245G* (Sp1 SNP; bdSNP rs 1800012) у сайті зв'язку транскрипційного чинника Sp1 у першому інтроні гена *COL1A1* асоційовано зі зниженою щільністю, ламкістю кісткової тканини, порушенням геометрії та мінералізації кістки. Отже, визначення асоціації однонуклеотидного поліморфізму *T1245G* гена *COL1A1* із ризиком розвитку ОП, рівнем остеоасоційованих гормонів і біологічно активних речовин у жінок у постменопаузний період є актуальною медико-профілактичною проблемою сьогодення.

Мета роботи – визначити вплив однонуклеотидного поліморфізму *T1245G* гена *COL1A1* на рівень остеоасоційованих гормонів у жінок із постменопаузним остеодефіцитом.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Обстежено 74 жінки у менопаузний період, серед яких 30 пацієнток (40,5%) без ОД склали контрольну групу, 44 жінки з проявами ОД (59,5%) увійшли до групи дослідження (випадки). Використовуючи біохімічний аналізатор BS-200 (Китай), у сироватці крові вивчали активність лужної фосфатази (ЛФ, La Chema, Чехія). Імуноферментним методом (ридер PR2100 Sanofi Diagnostic Pasteur, Франція) досліджували вміст у сироватці крові паратиреоїдного гормону (ПТГ), кальцитоніну (КТ), остеокальцину (ОК), естрадіолу (ЕС), прогестерону (ПГ), тестостерону (ТС), кортизолу (КЗ), інсуліну (ІН), трийодтироніну (T_3), тироксину (T_4), циклічного аденозинмонофосфату (cAMP), інтерлейкіну 1β (IL-1β) і чинника некрозу пухлин альфа (TNFα) (набори ВАТ «ВекторБест», Росія; Amercham pharmacia biotech, Велика Британія; DRG, США).

Методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) виявляли однонуклеотидний поліморфізм *T1245G* гена *Col1A1* (набір реагентів ОстеоГЕН-М, Росія). ПЛР проводили за стандартом: виділення ДНК, проведення реакції ампліфікації зі специфічними праймерами, ферментативний гідроліз продуктів ампліфікації, електрофоретичне розподілення в поліакриламідному або агарозному гелі з подальшою реєстрацією отриманих фрагментів ДНК у минущому УФ-світлі. Досліджувана концентрація ДНК у сироватці складала 10-300 нг/мкл. Для ідентифікації однонуклеотидного поліморфізму в гені *Col1A1* добрано систему праймерів, які фланкують досліджувану ділянку молекули ДНК. До позитивного контролю проведення ПЛР належить поява бендів, відповідних визначеним розмірам. Відсутність бендів у доріжках, відповідних бендам позитивного контролю після проведення реакції без додавання ДНК, вважається негативним контролем проведення мультиплексної ПЛР. Після проведення електрофорезу продуктів розщеплення під УФ-світлом проводили їх ферментативний гідроліз. Позитивний контроль відзначали за появи бендів, відповідних розмірам фрагментів амплікона. З метою реєстрації

отриманих результатів ензиматичної рестрикції проводили електрофорез у 8% поліакриламідному або 2,5-3% агарозному гелі.

Статистичні розрахунки здійснювали з використанням програми STATISTIKA 7.0 (StatSoft, Inc.). Статистичну значущість різниць у розподілі частот генотипів між групами визначали з використанням точного методу Фішера (Fet). Вірогідність різниць у розподілі генотипів та алелей між групами, а також відповідність розподілу закону Харді-Вайнберга (HWE) оцінювали за допомогою аналізу таблиць зчеплення за критерієм χ^2. Розподіл генотипів у групах з ОД і без нього вважали вірогідним за відповідності закону Харді-Вайнберга (HWE) для груп контролю та випадків.

Ступінь асоціації генотипу з наявністю ОД визначали за величиною відношення шансів (OR), що характеризує відносний ризик (шанси) розвитку захворювання в даному випадку залежно від алельного поліморфізму досліджуваного гена. Про вірогідне підвищення ризику свідчить величина OR понад 1 за умови потрапляння до вірогідного інтервалу (CI=95%). На вірогідне зниження ризику вказує величина OR менша від 1. Вірогідність впливу варіантів алельного поліморфізму на вміст у крові остеоасоційованих гормонів, Ca, P, активності ЛФ і величини МЩК визначали з використанням однофакторного дисперсійного аналізу за критерієм Фішера (F). Вірогідність різниць між середніми величинами розраховували за t-критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Згідно з даними [7, 9], гетерозиготний поліморфізм гена *COL1A1* визначає суттєве зниження МЩК порівняно з гомозиготним за домінантною та рецесивною алелями. Як видно з даних, наведених на рис. 1, за наявності ОД генотип G/G (гомозиготність за домінантною алеллю) трапляється значно рідше. У жінок із ОД генотип G/G виявлено у 22,7% випадків, а без нього – у 60,0%. Незважаючи на суттєву різницю в інших випадках (для генотипу G/T 36,4% і 26,7% відповідно; для генотипу T/T 40,9% і 13,3%

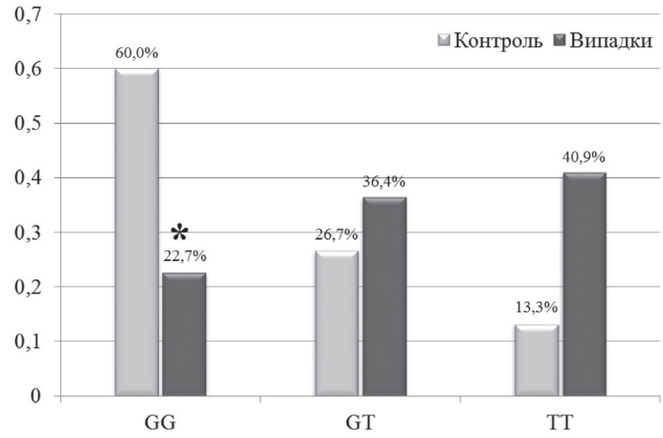

Рис. 1. *Частоти розподілу генотипів поліморфізму T1245G гена Col1A1: * – вірогідна різниця частот між групами за критерієм Фішера ($p_{(Fet)}$=0,02).*

відповідно), статистичної різниці за критерієм Фішера виявлено не було.

За результатами, наведеними у таблиці 1, OR за гомозиготного мажорного генотипу (G/G) є значно меншою від 1 (OR=0,196; CI=0,047-0,824). Це свідчить, що носії даного генотипу мають знижений у 5,1 разу ризик розвитку ОД. Залежності в розподілі генотипів поліморфізму *T1245G* гена *Col1A1* від наявності або відсутності ОД виявлено не було – p (χ^2)=0,06. Розподіл генотипів відповідало до HWE для груп контролю (без ОД) і випадків (з ОД) – χ^2=1,52; p=0,49 і χ^2=1,35; p=0,53 відповідно.

Натомість за результатами оцінки розподілу поліморфних алелей між групами (табл. 2) таку залежність було виявлено: мінорна алель (T) за наявності ОД траплялася частіше (p (χ^2)=0,006). Оцінка величини OR показала, що присутність у генотипі жінок мінорної алелі (T) підвищує ризик розвитку ОД майже у 4 рази (OR=3,97; CI=1,45-10,88). Водночас присутність мажорної алелі (G) суттєво знижує ризик розвитку ОД (OR=0,25; CI=0,09-0,69). Причому (див. табл. 1) наявність мінорної гомозиготи збільшує ризик розвитку ОД у 4,5 разу (OR=4,50; CI=0,81-24,97).

Поліморфізм *T1245G* гена *Col1A1* вірогідно

Таблиця 1

Вірогідність різниць розподілу генотипів поліморфізму *T1245G* гена *Col1A1* між групами жінок із наявністю та без остеодефіциту та величини відношення шансів (OR) залежно від генотипу

Генотип	Контроль	Випадки	χ^2	p (χ^2)	OR	95% довірчий інтервал
GG	18	10			0,196	0,047-0,824
GT	8	16	5,82	0,06	1,571	0,374-6,611
TT	4	18			4,500	0,810-24,986

Таблиця 2

Вірогідність різниць розподілу алелей поліморфізму *T1245G* гена *Col1A1* між групами та величина відношення шансів (OR) залежно від алелей

Алель	Контроль	Випадки	χ^2	p (χ^2)	OR	95% довірчий інтервал
G	22	18	7,55	0,006	0,25	0,09-0,69
T	8	26			3,97	1,45-10,88

впливав на рівні у крові ПТ, ОК, ПГ, T_3, Р і величину МЩК (табл. 3).

За результатами дисперсійного аналізу з'ясовано, що наявність у генотипі мінорної алелі (Т) асоційовано зі збільшенням вмісту в крові ПТ, ОК, T_3, Р, величини МЩК і зниженням вмісту ПГ. Ці дані збігаються з біологічною значущістю цих гормонів у регуляції кальцій-фосфорного гомеостазу. Найбільше значення F-критерію (F=34,64; p=0,0001) відзначено для величини МЩК, що доводить вплив мінорної алелі (Т) на процеси розвитку ОД.

ВИСНОВКИ

1. У жінок з ОД мажорний генотип (G/G) полімор-

Таблиця 3

Вплив поліморфізму *T1245G* гена *Col1A1* на клініко-лабораторні показники у жінок з остеодефіцитом

Показник	Генотип *Col1A1* (+1245G/T)			F	p
	GG (n=10)	GT (n=16)	TT (n=18)		
ПТ, пг/мл	22,21±4,06	42,25±8,66	59,89±2,79	10,06	0,001
КТ, пг/мл	10,00±1,03	8,00±0,94	7,89±1,07	1,23	0,34
ОК, нг/мл	15,87±0,74	13,00±2,21	18,22±0,34	7,51	0,003
ЕС, пмоль/л	37,10±15,92	30,10±14,84	11,00±1,90	1,916	0,17
ПТГ, нмоль/л	24,80±6,16	32,50±3,59	17,11±2,34	6,006	0,009
ТС, нмоль/л	4,91±1,21	5,26±1,01	3,29±0,69	1,65	0,22
КЗ, нмоль/л	545,40±76,74	481,87±43,02	502,67±31,69	0,48	0,63
ІН, мкМО/мл	12,40±1,15	10,63±1,01	12,78±1,33	1,09	0,35
T_4, нмоль/л	109,80±4,24	114,75±6,12	111,00±8,00	0,16	0,85
T_3, нмоль/л	1,88±0,10	1,81±0,13	2,32±0,12	6,59	0,006
cAMP, нг/мл	4,60±0,59	4,75±0,45	4,89±0,41	0,08	0,92
IL-1β, пг/мл	9,20±1,98	14,38±2,04	14,33±1,04	2,89	0,07
TNF-α, пг/мл	55,50±1,95	56,24±1,11	54,94±1,31	0,29	0,75
ЛФ, Од/л	142,40±9,38	122,57±10,85	152,67±2,97	4,84	0,02
Ca, мг/л	59,80±0,68	58,70±1,12	58,20±0,82	0,70	0,51
P, мг/л	389,80±2,07	399,66±8,69	428,38±5,35	6,71	0,006
Mg, мг/л	31,92±2,07	33,27±0,96	36,16±0,99	3,06	0,06
МЩК, SD	1,080±0,16	1,85±0,07	2,20±0,09	34,64	<0,0001
МКІ, у.о.	0,40±0,01	0,41±0,01	0,384±0,01	1,94	0,17

***Примітка**: МКІ – метакарпальний індекс.*

фізму *T1245G* гена *Col1A1* траплявся у 2,6 разу частіше. З урахуванням величини OR відзначено, що носії даного генотипу мають знижений у 5,1 разу ризик розвитку ОД.

2. Наявність у генотипі мінорної алелі (T) збільшує ризик розвитку ОД у 4 рази, а наявність мінорної гомозиготи (T/T) – у 4,5 разу. Наявність мінорної алелі в однонуклеотидному поліморфізмі *T1245G* гена *Col1A1* асоційовано зі збільшенням вмісту в крові ПТ, ОК, T_3, Р, величини МЩК і зниженням вмісту ПГ.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Бердыева Э.Б.* Факторы риска развития системного остеопороза / Э.Б. Бердыева // Молодой ученый. – 2014. – №14. – С. 73-75.
2. *Насонов Е.Л.* Клинические рекомендации по диагностике, профилактике и лечению остеопороза / Е.Л. Насонов, Л.И. Беневоленская, О.М. Лесняк. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – С. 231-239.
3. *Capozza R.F., Cure-Cure C., Cointry G.R., Meta M.* Association between low lean body mass and osteoporotic fractures after menopause // Menopause. – 2008. – Vol. 15, № 5. – P. 905-913.
4. *Clin Chim.* Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with BMD and their effect on 1, 25-dihydroxy vitamin D3 levels in pre- and postmenopausal South Indian women from Andhra Pradesh / Chim Clin // Acta Epub. – 2011. – Vol. 412 (7-8). – P. 541-544.
5. *Ho S.C., Chan S.G., Yip Y.B., Chan C.S.* Change in bone mineral density and its determinants in pre- and perimenopausal Chinese women: the Hong Kong perimenopausal women osteoporosis study // Osteoporos. Int. – 2008. – Vol. 19, № 12. – P. 1785-1796.
6. Molecular mechanisms of vitamin D action / M.R. Haussler, G.K. Whitfield, I. Kaneko [et al.] // Calcif. Tissue Int. – 2013. – Vol. 92, № 2. – P. 77-98.
7. *Nguen T.V., et al.* The contribution of polymorphisms of Col1A1 gene allels to the determination of bone mineral density in normal and osteoporotic women. / T.V. Nguen / J. Bone Miner. Res. – 2005. – Vol. 10, № 3. – P. 991-996.
8. *Szulc P., Seeman E., Duboeuf F., Sornay-Rendu E.* Bone fragility: failure of periosteal apposition to compensate for increased endocortical resorption in postmenopausal women // J. Bone Miner. Res. – 2006. – Vol. 21, № 12. – P. 1856-1863.
9. *Todhunter C.E., et al.* Genetic and biology of gene Col1A1 polymorphisms / C.E. Todhunter // Gene. – 2010. – Vol. 338, № 1. – P. 143-156.

РЕЗЮМЕ

Асоціація однонуклеотидного поліморфізму *T1245G* гена *COL1A1* з рівнем остеоасоційованих гормонів на тлі постменопаузного остеопорозу

О.С. Ларін, Д.С. Зябліцев

Мета роботи – визначення впливу однонуклеотидного поліморфізму *T1245G* гена *COL1A1* на рівень остеоасоційованих гормонів у жінок із постменопаузним остеопорозом.

Матеріали та методи. Обстежено 74 жінки у постменопаузний період: 30 пацієнток (40,5%) без ОД – контрольна група, 44 жінки з проявами ОД (59,5%) – група дослідження (випадки). У крові визначали: активність лужної фосфатази, вміст паратиреоїдного гормону, кальцитоніну, остеокальцину, естрадіолу, прогестерону, тестостерону, кортизолу, інсуліну, трийодтироніну, та тироксину, циклічного аденозинмонофосфату, інтерлейкіну 1β, чинника некрозу пухлин α. Генетичні дослідження проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Статистичні розрахунки здійснювали з використанням програми STATISTIKA 7.0 (StatSoft, Inc.): точного методу Фішера (Fet), аналізу критерію узгодженості Пірсона χ^2. Розподіл генотипів в групах з ОД і без нього вважали вірогідним за відповідності закону Харді-Вайнберга (HWE) для обох груп.

Результати та обговорення. У контролі мажорна гомозигота (G/G) трапляється частіше (60,0% vs 22,7%), а носії даного генотипу мають знижений ризик розвитку остеопорозу в 5,1 разу. Гетерозигота (G/T) збільшує шанси розвитку остеопорозу в 1,6 разу та асоціюється з підвищеними рівнями у крові паратиреоїдного гормону, остеокальцину, трийодтироніну, фосфору та зниженими рівнем прогестерону й величиною мінеральної щільності кістки. Гомозиготність за даною алеллю збільшує шанси розвитку остеопорозу в 4,5 разу.

Висновки. Домінантна гомозигота (G/G) трапляється майже у 3 рази частіше та асоціюється зі зниженням ризику розвитку постменопаузного остеопорозу в 5,1 разу (OR=0,196; CI=0,047-0,824). Гетерозигота (G/T) в 1,6 разу збільшує ризик захворювання через дисбаланс остеоасоційованих гормонів і метаболізму кістки (OR=3,97; CI=1,45-10,88). За наявності в генотипі поліморфної гомозиготи (T/T) ризик розвитку остеопорозу збільшується в 4,5 разу (OR=4,50; CI=0,81-24,97).

Ключові слова: остеопороз, остеодефіцит, ген *COL1A1*, однонуклеотидний поліморфізм *T1245G*, остеоасоційовані гормони.

РЕЗЮМЕ

Ассоциация однонуклеотидного полиморфизма *T1245G* гена *COL1A1* с уровнем остеоассоциированных гормонов при постменопаузальном остеопорозе

О.С. Ларин, Д.С. Зяблицев

Цель работы – определить влияние однонуклеотидного полиморфизма *T1245G* гена *COL1A1* на уровень остеоассоциированных гормонов у женщин с постменопаузальным остеопорозом.

Материалы и методы. Обследовано 74 женщины в постменопаузальный период: 30 пациенток (40,5%) без ОД – контрольная группа, 44 женщин (59,5%) – группа исследования (случаи). В крови определяли: активность щелочной фосфатазы, содержание паратиреоидного гормона, кальцитонина, остеокальцина, эстрадиола, прогестерона, тестостерона, кортизола, инсулина, трийодтиронина и тироксина, циклического аденозинмонофосфата, интерлейкина 1β, фактора некроза опухолей α. Генетические исследования проводили с помощью полимеразной цепной реакции. Статистические расчёты проводили с использованием программы STATISTIKA 7.0 (StatSoft, Inc.): точного метода Фишера (Fet), анализа критерия согласования Пирсона χ^2. Распределение генотипов в группах с ОД и без него считали достоверным при соответствии закону Харди-Вайнберга (HWE) для обеих групп.

Результаты и обсуждение. В контроле мажорная гомозигота (G/G) встречается чаще (60,0% vs 22,7%), а носители данного генотипа имеют сниженный в 5,1 раза риск развития остеопороза. Гетерозигота (G/T) увеличивает шансы развития остеопороза в 1,6 раза и ассоциируется с повышенным уровнем в крови паратиреоидного гормона, остеокальцина, трийодтиронина, фосфора и сниженными уровнем прогестерона и величиной минеральной плотности кости. Гомозиготность по данной аллели увеличивет шансы развития остеопороза в 4,5 раза.

Выводы. Доминантная гомозигота (G/G) встречается почти в 3 раза чаще и ассоциируется со снижением риска развития постменопаузального остеопороза в 5,1 раза (OR=0,196; CI=0,047-0,824). Гетерозигота (G/T) в 1,6 раза увеличивает риск заболевания (OR=3,97; CI=1,45-10,88) из-за дисбаланса остеоассоциированных гормонов и метаболизма кости. При наличии в генотипе полиморфной гомозиготы (T/T) риск развития остеопороза увеличивается в 4,5 раза (OR=4,50; CI=0,81-24,97).

Ключевые слова: остеопороз, остеодефицит, ген *COL1A1*, однонуклеотидный полиморфизм *T1245G*, остеоассоциированные гормоны.

SUMMARY

Single nucleotide polymorphism *T1245G* of gene *COL1A1* association with the level of osteoassociated hormones of postmenopausal osteoporosis

O. Larin, D. Zyablisev

Purpose – to determine the influence of single nucleotide polymorphism *T1245G* of gene *COL1A1* over the level of osteoassociated hormones of woman's with postmenopausal osteoporosis.

Materials and methods. We have researched 74 women's in postmenopausal period: 30 women's (40, 5%) without OD – control group, 44 women's (59, 5%) – research group (cases). In the blood we have determine: activity of alkaline phosphatase, maintenance of parathyrine ,calcitonine, osteocalcine, estradiole, progesterone, testosterone, cortisol, insuline, three- and tetraiodthyronine, cyclic adenosinmonophosphat, interleukin 1β, tumor necrosis factor α. Genetically research carried out with the help of polymerase chain reaction (PCR). To statistical estimation we have used the programe STATISTIKA 7.0 (StatSoft, Inc.): Fisher rigorous method (Fet), analyses of Pearson's chi-squared test χ^2. We considered that genotype distribution in groups with and without OD is significant accordance to Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) for both groups.

Results and discussion. We elicited that major homozygosis (G\G) was found more often (60,0 % vs 22,7 %). Carriers of this genotype have decreased risk of development of osteoporosis in 5,1 (OR=0,196). Geterozygous (G\T) was increased the odds in 4 (OR=1,571) and increased levels of parathyrin, osteocalcin, triiodotyronin, phosphorus and low concentration of progesterone and bone mineral density quantity, homozygous of this allele – in 4,5 (OR=4,5) in order to 95 % confidence interval.

Conclusion. Dominant homozygous (G/G) has been detected almost in 3 times more often and has a protective effect of the development of postmenopausal osteoporosis in 5,1 times (OR=0,196; CI=0,047-0,824). Geterozygous (G/T) in 1,6 times has been increasing the risk of decease (OR=3,97; CI=1,45-10,88) and leads to disbalance of osteoassociated hormons and bone metabolic rate. Polymorphic homozygous (T/T) has been increasing the risk of development of osteoporosis in 4,5 times (OR=4,50; CI=0,81-24,97).

Key words: osteoporosis, osteodefisiency, association, allele, gene *COL1A1, SNiP*, osteoassociated hormones.

Дата надходження до редакції 21.01.2015 р.