

ЗВ'ЯЗОК МІЖ ПОЛІМОРФІЗМОМ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВІТАМІНУ D ТА СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ

В. В. Поворознюк, Н. І. Балацька, Ф. В. Климовицький
 ДУ “Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України”, м. Київ
 НДІ травматології та ортопедії
 Донецького національного медичного університету ім. М. Горького, Україна

RELATIONSHIP BETWEEN POLYMORPHISM OF GENE RECEPTOR OF VITAMIN D AND STRUCTURAL-FUNCTIONAL STATE OF BONE TISSUE

V. V. Povoroznyk, N. I. Balatska, F. V. Klimovitsky

The article has presented the results of study relationship between genotype of vitamin D receptor polymorphism, secondary hyperparathyroidism, and structural-functional state of bone tissue. It has been established that the carriers of the genotype Bb are characterized by high bone mineral density values of bone tissue. That condition low frequency of osteoporosis progress and its complications (fractures), low frequency of severe vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism.

Key words: gene polymorphisms of vitamin D receptor, structural-functional state of bone tissue.

СВЯЗЬ МЕЖДУ ПОЛИМОРФИЗМОМ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ СОСТОЯНИЕМ КОСТНОЙ ТКАНИ

В. В. Поворознюк, Н. И. Балацкая, Ф. В. Климовицкий

В статье представлены результаты исследования связи между генотипом полиморфизма гена рецептора витамина D и структурно-функциональным состоянием костной ткани. Установлено, что для носителей генотипа Bb характерны: высокие показатели минеральной плотности костной ткани, которые обуславливают низкую частоту развития остеопороза и его осложнений (переломов), низкая частота тяжелого дефицита витамина D и вторичного гиперпаратиреоза.

Ключевые слова: полиморфизмом гена рецептора витамина D, структурно-функциональное состояние костной ткани.

Вступ

Рецептори вітаміну D (VDR) мають високу спорідненість із гормональною формою вітаміну D — $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Секреція останнього залежить від потреб організму в кальцію та фосфорі. За гіпокальціємії підвищується рівень паратгормону, який стимулює активність ниркової 1α -гідроксилази та сприяє синтезу $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ зв'язується із VDR та підвищує абсорбцію кальцію в тонкому кишечнику за допомогою TRPV6 та інших генів транслокації кальцію [4, 6, 10].

На сьогодні відсутня єдина думка щодо зв'язку між поліморфізмом певних генів і станом кісткової тканини, оскільки в одних наукових працях такий зв'язок знаходять, а в інших — ні [2, 7, 8]. Розбіжності в результатах дослідження багато дослідників пояснюють існуванням відмінностей у будові самого геному, в особливостях харчування (передусім у рівні споживання кальцію та вітаміну D), а також впливу чинників довкілля на організм людини в різних регіонах світу [6].

Мета дослідження — дослідити зв'язок між поліморфізмом гена VDR і структурно-функціональним станом кісткової тканини (СФС КТ) у жінок постменопаузально-го періоду.

Матеріали і методи

Обстежено 178 жінок постменопаузального періоду, середній вік яких становив $57,0 \pm 1,2$ років. У дослідження було включено жителів західного (36,5%), східного (24,7%) та північного (38,8%) регіонів. Усім обстеженим виконувалася ультразвукова денситометрія п'яткової кістки апаратом SAHARA (Hologic), за допомогою якої визначали:

- 1) швидкість поширення ультразвуку через кістку (ШПУ, м/с);
- 2) широкосмугове ослаблення ультразвуку (ШОУ, дБ/МГц);
- 3) індекс міцності кістки (ІМ, %);
- 4) екстрапольований показник мінеральної щільності кісткової тканини (еМЩ КТ, г/см²).

Вміст $25(\text{OH})$ вітаміну D ($25(\text{OH})\text{D}$) та інтактного паратгормону (іПТГ) у сироватці крові визначали за допомогою електрохемилюмінесцентного методу на аналізаторі Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Німеччина) тест-системами cobas.

Оцінку статусу вітаміну D здійснювали згідно з останньою класифікацією [1], відповідно до якої:

- дефіцит вітаміну D (ДВД) установлюється при вмісті $25(\text{OH})\text{D}$ у сироватці крові нижче 50 нмоль/л.

Концентрація 25(OH)D у сироватці крові в межах 75–150 нмоль/л вважається нормою;

- *недостатність* вітаміну D установлюється при вмісті 25(OH)D у сироватці крові від 75 до 50 нмоль/л. Тяжкий ДВД — це стан при якому рівень 25(OH)D у сироватці крові нижче 25 нмоль/л.

Поліморфізм рецепторів вітаміну D визначали за допомогою полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) — RLP (Restricted Length Fragment Polymorphism), яка забезпечує визначення точкових мутацій за допомогою специфічної ендонуклеази Bsm I, остання додавалася до зразків після процедури ампліфікації. Після аналізу зразки класифікували як BB, Bb або bb (великі літери являють відсутність, маленькі — наявність місць рестрикції для ендонуклеази Bsm I).

Статистичний аналіз виконували з визначенням параметричних та непараметричних критеріїв. При аналізі використовували пакети програм StatSoft "Statistica 6.0".

Результати та їх обговорення

Аналіз СФС КТ в обстежених залежно від регіону проживання встановив, що показники СФС КТ у жителів західного регіону були достовірно вищими порівняно із середніми даними обстежених східного та північного регіонів ($p < 0,001$). Достовірних відмінностей між показниками СФС КТ населення східного та північного регіонів не виявлено. Необхідно зауважити, що середній вік обстежених був достовірно нижчим ($67,21 \pm 0,64$ роки) у жителів північного регіону порівняно з обстеженими східних та західних регіонів ($p < 0,001$) (рис. 1).

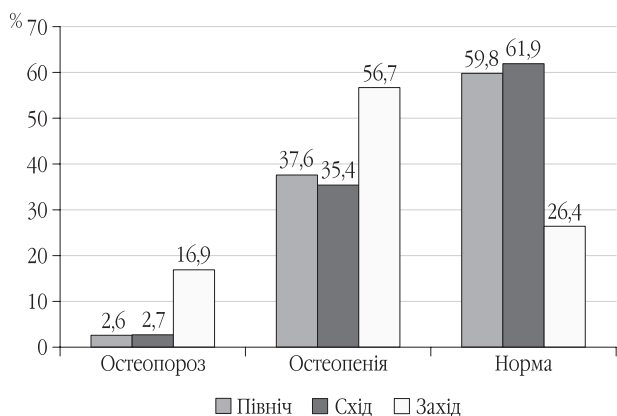


Рис. 1. Структурно-функціональний стан кісткової тканини у жителів України залежно від регіону проживання

Згідно з дослідженнями поліморфізму гена RVD всі пацієнти були розподілені на три групи:

- *I група* із генотипом bb — 86 осіб;
- *II група* із генотипом Bb — 67 осіб;
- *III група* із генотипом BB — 25 осіб.

Групи достовірно не відрізнялися за основними показниками. Клінічна характеристика обстежених наведена в табл. 1.

Таблиця 1

Клініко-анамнестична характеристика обстежених жінок

Показники	Генотипи		
	bb	Bb	BB
Число обстежених	86	67	25
Вік, роки	57,49±1,74	56,74±2,04	56,23±3,21
Ріст, см	163,5±0,85	163,9±0,74	165,8±1,83
Маса, кг	74,05±2,01	78,02±1,76	79,08±2,83
Індекс маси тіла, кг/м ²	27,57±0,65	29,17±0,73	28,69±0,81

Серед обстежених жінок рівень 25(OH)D у сироватці крові в межах норми зареєстровано у 4,5%, недостатність — у 10,1%, дефіцит — у 85,4% випадків; глибокий ДВД мали 46,6%.

Вторинний гіперпаратиреоз було виявлено у 29,2% обстежених. Високий рівень іПТГ серед жінок обумовлений тим, що в групу обстежених північного регіону переважно включали осіб із вторинним гіперпаратиреозом для вивчення ролі поліморфізму гена VDR.

Остеопороз зареєстровано у 28 (15,7%) осіб, остеопенію — у 31,5%, а нормальний СФС КТ — у 94 (52,8%). В анамнезі 28,7% обстежених мали низькоенергетичні переломи.

Вивчення поліморфізму гена VDR показало, що генотип bb виявлявся у 86 (48,3%) обстежених; генотип Bb — у 67 (37,6%); генотип BB — у 25 (14,1%).

Як видно з табл. 2, поліморфізм гена VDR bb реєструвався з однаковою частотою серед жителів як західного, так і східного та північного регіонів (46,2%, 47,7 та 44,7% відповідно). Поліморфізм гена VDR BB був вищим (20,5%) у жителів східного регіону і майже удвічі нижчим у жителів північного регіону (10,5%) та однаково часто реєструвався як в осіб західного, так і північного регіонів.

Таблиця 2

Розподіл обстежених (у %) по регіонах залежно від генотипу VDR

Регіон дослідження	Частота генотипів VDR		
	bb	Bb	BB
Захід	46,2	41,5	12,3
Схід	47,7	31,8	20,5
Північ	44,7	42,1	10,5

Характеристики пацієнтів залежно від генотипу наведені в табл. 3.

Аналіз даних, представлених в табл. 3, показав, що пацієнти достовірно не відрізнялися за віком. Також не було виявлено суттєвої різниці середнього рівня 25(OH)D та іПТГ у сироватці крові обстежених. Було проведено порівняльний аналіз частоти остеопорозу, переломів, вторинного гіперпаратиреозу, ДВД та тяжкого ДВД залежно від генотипу обстежених. Установлено, що при генотипі Bb реєструвалася найнижча частота остеопорозу

Таблиця 3

Характеристика обстежених відповідно до поліморфізму гена VDR

Показники	Генотипи		
	bb	Bb	BB
Число обстежених	86	67	25
Вік, роки	57,49±1,74	56,74±2,04	56,23±3,21
25(ОН)D, нмоль/л	31,78±2,52	31,97±2,31	25,92±2,64
iПТГ, нг/мл	53,45±2,41	52,15±2,79	53,45±3,75
Остеопороз, %	22,1	7,4	16,0
Переломи, %	27,4	23,1	29,2
ДВД, %	82,6	85,1	96,0
Тяжкий ДВД, %	48,8	41,8	52,0
Вторинний гіперпаратиреоз, %	29,1	28,4	32,0

(7,4% проти 22,1% при генотипі bb) та переломів (23,1% проти 29,2% при генотипі BB). У жінок із генотипом bb реєструвався високий відсоток остеопорозу (22,1%), а у носіїв генотипу BB — високий відсоток переломів (29,2%).

Найвищий відсоток ДВД (96% проти 82,6% при генотипі bb) та вторинного гіперпаратиреозу зареєстровано у пацієнтів із генотипом BB — 32,0% проти 28,4% при генотипі Bb. Тяжким ДВД страждали носії генотипу BB — 52% проти 41,8% осіб із генотипом Bb.

Показники СФС КТ були вищими у пацієнтів із генотипом Bb і достовірно відрізнялися порівняно з обстеженими із генотипом bb (табл. 4).

Таким чином, жінки, у яких генотип Bb, мають кращі показники СФС КТ і, відповідно, нижчий відсоток остеопорозу та переломів. Жінки, які проживають на сході і частіше (20,5%) є носіями генотипу BB, мають високий ризик щодо виникнення переломів, ДВД та важкого ДВД і вторинного гіперпаратиреозу. Особи, які є носіями генотипу bb, мають високий ризик розвитку остеопорозу та вторинного гіперпаратиреозу.

Отримані нами результати підтверджуються дослідженнями інших науковців. Так, P. Garnero et al. [9] вивчали зв'язок поліморфізму гена VDR з виникненням вертебральних і неverteбральних переломів. Автори виявили

зв'язки між збільшенням частоти алеля В у жінок із вперше зареєстрованими переломами. Відносний ризик подібних переломів для жінок з генотипом Bb становив 1,5 (95% довірчий інтервал, 0,95; 2,40), а при наявності генотипу BB — 2,10 (95% довірчий інтервал, 1,16; 3,79) порівняно із жінками з генотипом bb.

У роботі I.M. Пішель [1] було встановлено зв'язок між частотою виникнення переломів та наявністю генотипу bb гена VDR (BsmI; 51,0%) в українських жінок постменопаузального віку. Відносний ризик виникнення переломів у пацієнок із цим генотипом порівняно з носіями В алелі (BB/bb) становив 1,76 (95% довірчий інтервал, 1,14; 2,70; p<0,02). Зв'язку між генотипом і мінеральною щільністю кісткової тканини у цьому спостереженні не було встановлено.

При дисперсійному аналізі встановлено, що в осіб із генотипом bb існував негативний кореляційний зв'язок між рівнем 25(ОН)D та iПТГ у сироватці крові (r=-0,28, p<0,01). В обстежених із генотипом Bb зв'язок між рівнем 25(ОН)D та iПТГ у сироватці крові був також негативним, суттєвим, проте вже середньої сили (r=-0,28, p<0,01), а в жінок із генотипом BB зв'язку між 25(ОН)D та iПТГ у сироватці крові не виявлено.

Таким чином, жінки із генотипом Bb мають достовірно вищі показники СФС КТ, такі як ІМ (p<0,05), еМЩ КТ (p<0,05) та ШПУ (p<0,05) порівняно з жінками, які є носіями генотипу bb. У жінок із генотипом Bb відзначається нижча частота остеопорозу, переломів та вторинного гіперпаратиреозу. Установлено, що у жінок із генотипом BB відсутній зв'язок між рівнем 25(ОН)D та iПТГ у сироватці крові, проте виявляється зв'язок у пацієнок, які є носіями генотипу bb (r=-0,28, p<0,01) та Bb (r=-0,33, p<0,01).

Висновки

Установлено зв'язок між генотипом поліморфізму гена рецептора вітаміну D та структурно-функціональним станом кісткової тканини. Для носіїв генотипу Bb характерні: високі показники мінеральної щільності кісткової тканини, які обумовлюють низький відсоток розвитку остеопорозу та його ускладнень (переломів).

Література

1. Пішель I.M. Взаємозв'язок імунної системи та структурно-функціонального стану кісткової тканини : вікові та генетичні аспекти : дис. ... доктора мед. наук : 14.03.03 / Пішель Ірина Миколаївна. — К., 2011. — 320 с.
2. Bikle D. Extrarenal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D and its health implications / D. Bikle // Clin. Rev. Bone Miner. Metab. — 2009. — Vol. 7, № 2. — P. 114–125.
3. Coactivator function defines the active estrogen receptor alpha cis-trome / Lupien M., Eeckboute J., Meyer C. A. [et al.] // Mol. Cell Biol. — 2009. — Vol. 29, № 12. — P. 3413–3423.
4. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency : an endocrine society clinical practice / Holick M. F., Binkley N. C., Bischoff-Ferrari H. A. [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2011. — Vol. 96, № 7. — P. 191–193.

Таблиця 4
Показники СФС КТ у жінок постменопаузального періоду із різним генотипом VDR

Показники	Генотипи		
	bb	Bb	BB
T-score	-1,70 [-2,20 – -0,90]	-0,90** [-1,60 – -0,55]	-0,95* [-1,40 – -0,40]
ІМ, %	81,59±2,15	87,78±1,95*	86,82±3,23
еМЩ КТ, г/см ²	0,440±0,014	0,479±0,012*	0,473±0,020
ШПУ, м/с	1527,1±3,6	1535,4±3,2	1533,8±5,9
ШОУ, дБ/МГц	64,53±1,87	71,41±1,89*	70,69±2,76

Примітки. T-score — критерій, за яким визначають остеопороз. Достовірність різниці показників порівняно з групою, яка мала генотип bb (p<0,05 і **p<0,01).

5. Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis : formal histomorphometric and biomechanical analyses / *Amling M., Priemel M., Holzmann T. [et al.]* // *Endocrinology*. — 1999. — Vol. 140, № 11. — P. 4982–4987.
6. The nuclear vitamin D receptor controls the expression of genes encoding factors which feed the “fountain of youth” to mediate healthful aging / *Hausssler M.R., Hausssler C.A., Whitfield G.K. [et al.]* // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 2010. — Vol. 121, № 1–2. — P. 88–97.
7. The nuclear vitamin D receptor : biological and molecular regulatory properties revealed / *Hausssler M.R., Whitfield G.K., Hausssler C.A. [et al.]* // *J. Bone Miner. Res.* — 1998. — Vol. 13, № 3. — P. 325–349.
8. Vitamin D : molecular mechanism of action / *Christakos S., Dawson P., Benn B. [et al.]* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2007. — Vol. 1116. — P. 340–348.
9. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with the risk of fractures in postmenopausal women, independently of bone mineral density / *Garnero P., Munoz F., Borel O. [et al.]* // *J. Endocrinol. Invest.* — 2005. — Vol. 28, № 4. — P. 312–321.
10. Vitamin D receptor : molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention / *Hausssler M.R., Hausssler C.A., Bartik L. [et al.]* // *Nutr. Rev.* — 2008. — Vol. 66 (10 Suppl. 2). — P. 98–112.

УДК 616.717/718-001.5-003.9:611.018.4

ЗМІНИ КЛОНОГЕННОЇ АКТИВНОСТІ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ХВОРИХ З ДІАФІЗАРНИМИ ПЕРЕЛОМАМИ ПІД ВПЛИВОМ АУТОЛОГІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ

*Л. М. Панченко, А. В. Калашніков, В. А. Боєр, А. Г. Зубенко, Ю. О. Ставінський, В. В. Тимочук
ДУ “Інститут травматології та ортопедії НАМН України”, м. Київ*

CHANGES OF CLONOGENIC ACTIVITY OF MESENCHYMAL STEM CELLS OF BONE MARROW IN PATIENTS WITH DIAPHYSEAL FRACTURES UNDER THE INFLUENCE OF AUTOLOGOUS MATERIALS OF CONNECTIVE TISSUE

L. M. Panchenko, A. V. Kalashnikov, V. A. Boyer, A. G. Zubenko, Yu. O. Stavinsky, V. V. Timochuk

Cultural-immunologic research carried out in 30 patients in vitro with the purpose of definition of osteogenic activity of mesenchymal stem cells of bone marrow in various parts of bones with diaphysial fractures and disorders of reparative osteogenesis. It has been found that clonogenic activity of mesenchymal stem cells of bone marrow depends on its localization in bones. Efficiency of cloning and clone formation ability of mesenchymal stem cells of bone marrow in proximal fragments was higher than in distal fragments with diaphyseal fractures both with noncomplicated disorders of osteogenesis and with false joints. It has been shown increasing of proliferative activity of mesenchymal cells under the influence of fibrin gel enriched by thrombocytes.

Key words: mesenchymal stem cells, efficiency of cloning, diaphyseal fractures, disorder of reparative osteogenesis, autologous materials of connective tissue.

ИЗМЕНЕНИЯ КЛОНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ С ДИАФИЗАРНЫМИ ПЕРЕЛОМАМИ ПОД ВЛИЯНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Л. М. Панченко, А. В. Калашников, В. А. Боєр, А. Г. Зубенко, Ю. А. Ставінський, В. В. Тимочук

Культурально-иммунологические исследования проведены у 30 больных in vitro с целью определения остеогенной активности мезенхимальных стволовых клеток костного мозга различных отделов длинных костей при диафизарных переломах и нарушениях репаративного остеогенеза.

Установлено, что клоногенная активность мезенхимальных стволовых клеток костного мозга неодинакова в различных костях. Эффективность клонирования и колониеобразующая способность мезенхимальных стволовых клеток костного мозга проксимальных отломков выше, чем в дистальных, при диафизарных переломах как не осложненных нарушениями остеогенеза, так и при ложных суставах.