

© А.М. Федота, П.П. Рыжко, Л.В. Рощенюк, В.М. Воронцов, А.С. Солодянкин

УДК 575.616.224.2

А.М. Федота, П.П. Рыжко, Л.В. Рощенюк*, В.М. Воронцов*, А.С. Солодянкин***

АНАЛИЗ SNP ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА VDR3 У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ПСОРИАЗА И НАСЕЛЕНИЯ ВОСТОЧНОЙ УКРАИНЫ

Харьковский национальный университет

имени В.Н. Каразина (г. Харьков)

*Харьковский областной клинический

кожно-венерологический диспансер №1 (г. Харьков)

**ННЦ Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины (г. Харьков)

Данная работа выполнена по проблематике темы «Структура та генетичні процеси, розповсюдженість спадкової патології в популяціях різного ступеня урбанізації» (номер госрегистрации 0103U005742).

Вступление. В настоящее время витамин D рассматривается не только как гормон, производное холестерина, регулирующий кальциевый гомеостаз и остеогенез у человека своей наиболее активной формой - 1,25-дигидроксивитамином D3(1,25(OH)2D3) или кальцитриолом. Показано активное участие витамина D в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза, иммуногенеза [5,12]. Эти эффекты осуществляются при взаимодействии кальцитриола с рецепторами к витамину D3 (VDR), которые относятся к семейству ядерных стероидных, эстрогеновых и ретиноидных рецепторов.

Ген рецептора 1,25-дигидроксивитамина D3 (VDR3; 601769) локализован в 12q13.11 и состоит из 11 экзонов. В мировой литературе представлены данные о полиморфных вариантах гена VDR3 - 27823C>T (FokI) в экзоне 2, 60890G>A (BsmI) и 61888G>T (ApaI) в интроне 8, 61968T>C (TaqI) в экзоне 9 и др. и ассоциациях этих полиморфизмов с онкопатологиями, аутоиммунными, системными заболеваниями, например с минеральной плотностью костей и остеопорозом, остеоартрозом, ревматоидным артритом, ювенильным артритом, периодонтитом, рассеянным склерозом, сахарным диабетом, злокачественной меланомой, раком простаты, груди, псориазом [5, 3, 4, 7, 8-10]. Однако полученные различными авторами результаты зачастую неоднозначны и даже противоречивы, что, вероятно, может быть связано не только с этническими характеристиками исследуемых пациентов, но и климатогеографическими и культурологическими особенностями популяций. В связи с этим описанные в литературе результаты генетического тестирования по гену VDR3 с данными о частотах аллелей, генотипов, гаплотипов, ассоциаций их с патологиями в отдельных странах далеко не всегда могут быть использованы для населения других регионов.

Целью данного исследования было получить и проанализировать данные о частотах аллелей и генотипов больных различными формами псориаза и здорового населения для выявления ассоциаций

полиморфизмов гена VDR3 с псориазом среди населения восточной Украины и расчета величин относительного риска развития псориаза у пробандов с полиморфными вариантами ApaI (rs7975232) и TaqI (rs731236) гена VDR3.

Объект и методы исследования. Материалом для исследования послужили образцы периферической крови 68 больных с различными формами псориаза, находящихся на диспансерном учете в ХОККВД №1, составляющих основную группу. Контролем служили образцы периферической крови 55 жителей Харькова и Харьковской области без признаков псориаза и других тяжелых хронических заболеваний, половозрастное распределение которых соответствовало распределению у пробандов. От всех участников исследования или их родственников было получено письменное согласие на участие в данной работе.

Выделение ДНК проводилось с помощью наборов для экстракции ДНК Diatom DNA Prep 100. Анализировались два полиморфизма гена VDR3, 61888G>T (Apa I) в интроне 8 и (61968T>C) Taq I в экзоне 9. Реакция амплификации проводилась с использованием пар праймеров по [4,14]. Для дальнейшего рестрикционного анализа применялись эндонуклеазы рестрикции производства фирмы Fermentas (Литва) Apa I (16-18 часов, 37°C) и Taq I (3 часа, 65°C). Электрофоретический анализ проведен в 2%. Оценка результатов рестрикции осуществлялась по анализу рестрикционной картины электрофореграммы.

При проведении статистического анализа разница частот аллелей и генотипов оценивалась с помощью χ^2 -преобразования Фишера путём угловой трансформации. Проверка статистических гипотез об ассоциации изученных аллелей и генотипов с патологией и оценка равенства рядов распределения проведена с помощью критерия χ^2 на уровне значимости 0,05, 0,01, 0,001 [1]. Относительный риск и доверительный интервал рассчитаны по Armitage [6].

Результаты исследований и их обсуждение. В ходе исследования рассчитаны частоты аллелей A и a полиморфизма Apa I, T и t полиморфизма Taq I гена VDR3 у больных псориазом и лиц контрольной группы (**табл. 1**). Результаты генотипирования, представленные в **табл. 1**, не показывают статистически значимых различий для обычного и

Таблиця 1
Частоти аллелей поліморфізмів Ара I і Таq I гена VDR3 у больных псоріазом і лиц контрольної групи

Група		Статистика
Пробанди	Контроль	
Псоріаз в цілому $P_A=0,58$ $q_a=0,42$ Псоріаз артропатический $P_A=0,55$ $q_a=0,45$ Псоріаз без артропатії $P_A=0,59$ $q_a=0,41$	$P_A=0,61$ $q_a=0,39$	$df=244$, t $ст=3,29$, $t \phi=0,66$, $p>0,001$
Псоріаз в цілому $P_T=0,69$ $q_t=0,31$ Псоріаз артропатический $P_T=0,71$ $q_t=0,29$ Псоріаз без артропатії $P_T=0,68$ $q_t=0,32$	$P_T=0,69$ $q_t=0,31$	$df=244$, t $ст=3,29$, $t \phi=0,00$, $p>0,001$

артропатического псоріаза ($p>0,05$) ні по одному із поліморфізмів. Група больных псоріазом і контрольна група по частотам досліджуваних аллелей також не мають статистически значимих різниць ($p>0,05$). В той же час в інших кліматогеографічних зонах і етносах, наприклад, в Кореї, частоти аллелей А і а склали 0.317 і 0.683 для больных псоріазом, в контрольній групі - 0.168 і 0.832 відповідно, демонструючи статистически значимі різницю ($p = 0.001$) в бік збільшення

частоти аллеля А, як предиктора розвитку псоріаза [14]. Для турецьких популяцій показано, що аллель Т (73.5 vs. 59.5%: $P \leq 0.025$) частіше зустрічається середі больных псоріазом по порівнянню з контролем, і частота аллеля Т середі больных з псоріатическим артритом значенно вище, ніж в контролі (91.7%: $P \leq 0.05$) [8]. Інтересно помітити, що по даним авторів [7] при дослідванні колоректального раку було виявлено, що аллель Т має онкопротекторний ефект. В той же час відомо, середі больных псоріазом онкопатології зустрічаються рідше, ніж в популяції.

Поскольку спостережуване відсуттєвє різниць по частотам аллелей не може слугувати характеристикою нейтральності поліморфізму, проведен анализ розподілення генотипів середі больных і здорового населення.

На основанні частот отриманих аллелей поліморфізму Ара I отримано теоретическе число генотипів для групи больных і для контрольної групи як панмиксних популяцій. Фактическе розподілення генотипів статистически значимо відрізняється від теоретически очікуваного при рівновесії і середі больных ($df=2$, $ст=13,82$, $\phi=30,01$, $p<0,001$) і в контрольній групі ($df=2$, $ст=13,82$, $\phi=22,98$, $p<0,001$) (табл. 2). Избыток гомо- і гетерозигот по аллелю А може свідечувати о том, что локус rs7975232 является, вероятно, селективно значимым для изучаемого населения. Действительно, для европейских популяций получены данные о том, что у лиц с генотипами AA и Aa наблюдаются более высокие показатели минеральной плотности костной ткани и реже формируется остеопороз [3,10,13,17].

Таблиця 2
Розподілення генотипів поліморфізму Ара I гена VDR3 середі лиц контрольної групи і больных псоріазом

Розподілення		AA		Aa		aa	
		Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
Больные	фактическе	12	17,6	55	80,9	1	1,5
	теоретическе	23	33,8	33	48,5	12	17,6
Контроль	фактическе	12	21,8	43	78,2	0	0
	теоретическе	21	38,2	26	47,3	8	14,5

По поліморфізму Таq I структура контрольної групи ($df=2$, $ст=5,99$, $\phi=3,65$, $p>0,05$) відповідає співвідношенню Харді-Вайнберга.

Для поліморфізму Ара I гена VDR3 статистически значимої різницї між рядами рядів розподілення генотипів середі лиц контрольної групи і больных псоріазом не виявлено (табл. 2). По даним дослідвань поліморфних варіантів гена VDR3 в західній Україні середі населення і больных остеопорозом не виявлено статистически значимої різницї між порівнюваними групами [4].

Анализ рядів розподілення генотипів поліморфізму Таq I у здорового населення і больных

псоріазом показав статистически значимі різницю ($df=2$, $ст=5,99$, $\phi=8,31$, $p<0,05$) між ними (табл. 3). Доля гетерозигот в контрольній групі нижче, ніж доля гомозигот ($df=118$, $t \phi=3,37$, $t \phi=3,44$, $p<0,001$), тоді як середі больных доля гомозигот і гетерозигот співставимі.

Для прогнозування ймовірності розвитку псоріаза для кожного генотипу обчислено відношення шансів (OR) і 95% довірительний інтервал (CI). Для гомозигот TT (OR=0,8, 95% CI 0,39–1,62, $p>0,05$) і гетерозигот Tt (OR=1,61, 95% CI 0,77–3,34, $p>0,05$) ймовірність захворіти псоріазом статистически не відрізняється від середньопопуляційної. В той же час для турецьких популяцій показано, что

Таблица 3
Распределение генотипов полиморфизма Taq I у больных и лиц контрольной группы

Распределение	TT		Tt		tt	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
Контроль	29	52,7	18	32,7	8	14,6
Пробанды	32	41,7	30	44,4	6	8,8

генотип TT (51 vs. 35%: $P \leq 0.05$) чаще встречается среди больных псориазом по сравнению с контролем [8].

При условии, что полиморфные аллели исследуемых позиций не являются сцепленными, следует ожидать, что анализируемая выборка будет равновесной по всем независимым комбинациям. Однако анализ рядов распределения генотипов больных и контрольной группы показал статистически значимую разницу между теоретически ожидаемыми частотами и фактическими (**табл. 4**) внутри каждой группы.

Таблица 4
Частоты генотипов по полиморфизмам Ara I и Taq I гена VDR3 у больных псориазом и лиц контрольной группы

Генотип	Количество наблюдений среди больных		Статистики	Количество наблюдений в контрольной группе		Статистики
	Теор.	Фактич.		Теор.	Фактич.	
AA TT	5,64	1	df=8, ст=26,12 ф=29,84 p< 0,001	6,4	0	df=8, ст=26,12 ф=31,6 p< 0,001
AA Tt	5,29	5		3,99	4	
AAtt	1,05	6		1,69	8	
AaTT	25,58	30		22,7	29	
Aa Tt	24,26	25		14,1	14	
Aatt	4,42	0		6,0	0	
aaTT	0,47	1		0	0	
aaTt	0,44	0		0	0	
aatt	0,08	0		0	0	
Статистики		df=8, ст=15,51, ф=9,14, p>0,05				

Отмечается отклонение от равновесия в сторону изменения числа отдельных генотипов, например, увеличения числа лиц с генотипом AAtt как среди больных (df=134, t ст=2,58, t ф=2,75, p<0,01), так и в контрольной группе (df=134, t ст=2,58, t ф=2,78, p<0,01). Как было отмечено выше, аллели A и t в европейских популяциях связывают с меньшим риском развития остеопороза и более высокими показателями минеральной плотности костной ткани. Наблюдаемое отсутствие ряда генотипов связано с тем, что менее ожидаемые генотипы могут быть выявлены в выборке гораздо большего объема, например, генотип aatt может быть обнаружен в количестве как минимум 1 человека в выборке от 775 человек.

Анализ литературных данных показывает, что частоты аллелей и генотипов гена VDR3 находятся в зависимости от этнических характеристик популяции и климатогеографических параметров территории ее обитания. Так, например, для населения Кореи частоты генотипов AA, Aa, и aa составили 3 (2.9%), 29 (27.9%), и 72 (69.2%) в контрольной группе и 10 (9.6%), 46 (44.2%), и 48 (46.2%) в группе больных псориазом. Частоты генотипов среди больных TT, Tt, и tt - 94.5%, 5.5% и 0.0%, статистически значимо не отличались от контроля. Эти данные согласуются с данными ряда авторов, показывающих преобладание аллелей a и T в азиатских популяциях [9,13,14]. По мере удаления от экватора к полюсу

в северном полушарии частота аллелей A и t и соответствующих комбинаций генотипов растет, что может быть связано с механизмами адаптации человека к географическим вариациям солнечной инсоляции и УФ излучения как селективного фактора в эволюции пигментации [11,16].

В тоже время с различными заболеваниями ассоциированы аллели и генотипы, менее частые для данных популяций. Аллель A и генотип AA ассоциирован в азиатских популяциях с периодонтитом [9]. Для европейских популяций показано, что аллели a и T, генотипы aa, TT, комбинации aaTT, aT ассоциированы со сниженной минеральной плотностью костной ткани, предрасположенностью к переломам, остеопорозам у детей и взрослых [3,10,13,17]. В турецких популяциях аллель T и генотип TT чаще, чем в контроле, встречается среди пациентов, толерантных к терапии препаратами витамина D (81.8 vs. 59.5%: $P \leq 0.01$, 63.6 vs. 35%: $P \leq 0.025$) [8] (**табл. 5**). В связи с этим было бы актуально продолжить исследование полиморфных вариантов гена VDR3 в украинских популяциях для дальнейшего развития персонализированной фармакотерапии пациентов [4].

Выводы. Результаты генетического тестирования показали, что частоты исследуемых аллелей гена VDR3 у больных и в контроле статистически значимо не отличаются. Анализ рядов распределения генотипов полиморфизма Taq I у здорового населения и пробандов показал статистически значимую

Частоти генотипов по поліморфізмам Ара I і Таq I гена VDR3 в різних етнічних групах

Виборка	Генотипи		
	AaTT+aaTT	AAtt+AaTt	Другі генотипи
Asians [13]	76,7	10,1	13,2
Hispanics [13]	47,0	32,0	21,0
Caucasians [13]	32,1	53,2	14,7
Всхідна Україна			
контроль	52,7	40,0	7,3
всі обстежені	45,5	38,2	16,6

різницю між ними. Відзначено відхилення від рівноваги в бік окремих генотипів в обох групах.

Перспективи подальших досліджень. Ефекти поліморфізмів гена VDR3, включаючи імунomodulatory, стимуляцію клітинної диференціації та інгібування проліферації,

створюють можливості розвитку персоналізованої терапії псоріаза для запобігання розвитку стероїдного остеопорозу, виявлення пробандів, резистентних до препаратів кальцію та вітаміну D, а також дієтичних рекомендацій та науково обґрунтованої корекції раціону залежно від генотипу пацієнта.

Автори виражають глибоку подяку професору кафедри генетики та цитології ХНУ імені В. Н. Каразіна Л.А.Атраментової та завідувачу лабораторією молекулярної діагностики ННЦ «ІЭКВМ» А.П.Герилівичу за підтримку при виконанні дослідження.

Список літератури

1. Атраментова Л. О. Статистичні методи в біології / Л. О. Атраментова, О. М. Утевська – Харків, 2007. - 288 с.
2. Баранов В.С. Генетичний паспорт – основа індивідуальної та предиктивної медицини / Под ред. В.С.Баранова. – СПб: Н-Л, 2009. – 528с.
3. Васильєва Т.Г. Патогенетичні аспекти остеопенії при ювенільних артритах / Т.Г.Васильєва, Ф.Ф.Антоненко // Педіатрія. – 2007. – т. 86. - № 6. – с. 123-128. Ahn J. Vitamin D-related genes, serum vitamin D concentrations and prostate cancer risk / J. Ahn, D. Albanes, S. I. Berndt [et.al.] // Carcinogenesis. - 2009. - № 30(5). – p.p. 769–776.
4. Гнатейко Н.О. Молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму гена VDR у хворих із сповільненою консолидацією кісток та остеопорозом / Н.О.Гнатейко, Г.В.Макух // Acta Med. Leopoliensa. – 2004. – vol. 10. - № 3-4. - P.33-37.
5. Ahn J. Vitamin D-related genes, serum vitamin D concentrations and prostate cancer risk / J. Ahn, D. Albanes, S. I. Berndt [et.al.] // Carcinogenesis. - 2009. - № 30(5). – p.p. 769–776.
6. Armitage P. Statistical Methods in Medical Research. – 3rd ed./ P. Armitage, Berry G.- Blackwell Scientific Publications. - 1994.
7. Flügge J. Vitamin D receptor haplotypes protect against development of colorectal cancer/ J. Flügge, S. Krusekopf, M. Goldammer [et.al.] // European Journal of Clinical Pharmacology. 2007 - Vol. 63. - № 11. – p.p. 997-1005.
8. Dayangac-Erden D. Polymorphisms of vitamin D receptor gene in Turkish familial psoriasis patients / D. Dayangac-Erden, A. Karaduman, H. Erdem-Yurter // Arch. of Dermatological Research. - 2007. - Vol. 299. - № 10. – p.p. 487-491.
9. Deng H. BsmI, TaqI, Apal, and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor gene and periodontitis: a meta-analysis of 15 studies including 1338 cases and 1302 controls / H. Deng, F. Liu, Y.Pan [et.al.] // J. Clin. Periodontol. - 2011. - № 38(3). – p.p.199-207.
10. Horst-Sikorska W. Polymorphism of VDR gene--the most effective molecular marker of osteoporotic bone fractures risk within postmenopausal women from Wielkopolska region of Poland / W. Horst-Sikorska, A. Wawrzyniak, L. Celczy-ska-Bajew [et.al.] // Endokrynol Pol. - 2009. -№ 56 (3). – p.p.233-9.
11. Jablonski N.J. Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation / N. G. Jablonski, G. Chaplin // Proc Natl Acad Sci U S A. - 2010. - № 11; 107(Suppl. 2). - p.p. 8962–8968.
12. Karami S. Analysis of SNPs and Haplotypes in Vitamin D Pathway Genes and Renal Cancer Risk / S. Karami, P. Brennan, P. Rosenberg [et.al.] // PLoS One. -2009. - № 4(9). – e. 7013.
13. Massarta F. Bone mass pharmacogenetics and ethnic health implications / F. Massarta, M. L. Brandib // Clin. Cases Miner. Bone. Metab. – 2007. - № 4(2). - p.p. 131–138.
14. Park B.-S. Vitamin D Receptor Polymorphism is Associated with Psoriasis /B.-S. Park,J.-S.Park,D.-Y.Lee [et.al.] //J.of Inv. Derm.- 1999. - №112. – p.p.113–116.
15. Rucević I. Vitamin D endocrine system and psoriasis vulgaris--review of the literature / I. Rucević, V. Barisić-Drusko, L. Glavas-Obrovac, M. Stefanić // Acta. Dermatovenerol. Croat. - 2009. - № 17(3). – p.p.187-92.
16. Schlumpf M. Fundamental questions to sun protection / M. Schlumpf, J. Reichrath, B. Lehmann [et.al.] //Dermatoendocrin. – 2010. - № 2(1). – p.p. 19–25.
17. Zintzaras E. BsmI, TaqI, Apal and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and the risk of osteoporosis: a meta-analysis / E. Zintzaras, P. Rodopoulou, G. N. Koukoulis // Dis Markers. – 2006. - № 22(5-6). – p.p.317-26.

УДК 575.616.224.2

АНАЛИЗ SNP ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА VDR3 У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ПСОРИАЗА И НАСЕЛЕНИЯ ВОСТОЧНОЙ УКРАИНЫ

Федота А.М., Рыжко П.П., Рощенюк Л.В., Воронцов В.М., Солодянкин А.С.

Резюме. На образцах ДНК 68 больных псориазом и 55 здоровых людей исследованы однонуклеотидные полиморфизмы 61888G>T (ApaI) и 61968T>C (TaqI) гена VDR3 в Восточной Украине. Частота аллеля А составила 0,58, аллеля а – 0,42, Т - 0,69, т – 0,31 среди больных псориазом, в контрольной группе – А-0,61, а - 0,39, Т – 0,69, т – 0,31. Частоты генотипов AA, Aa, aa составили 17,6%, 80,9%, 1,5%; TT, Tt и tt - 41,7%, 44,4%, 8,8% среди больных псориазом; AA, Aa, aa - 21,8%, 78,2%, 0%, TT, Tt и tt - 52,7%, 32,7% и 14,6% в контрольной группе соответственно.

Ключевые слова: полиморфизмы 61888G>T (ApaI) и 61968T>C (TaqI), ген VDR3.

УДК 575.616.224.2

АНАЛІЗ SNP ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНУ VDR3 У ХВОРИХ З РІЗНИМИ ФОРМАМИ ПСОРИАЗУ ТА НАСЕЛЕННЯ СХІДНОЇ УКРАЇНИ

Федота О.М., Рижко П.П., Рощенюк Л.В., Воронцов В.М., Солодянкин О.С.

Резюме. На зразках ДНК 68 хворих на псориаз та 55 здорових осіб досліджено SNP 61888G>T (ApaI) та 61968T>C (TaqI) гену VDR3 у східній Україні. Частота аллеля А склала 0,58, аллеля а – 0,42, Т - 0,69, т – 0,31 серед хворих на псориаз, у контрольній групі – А-0,61, а - 0,39, Т – 0,69, т – 0,31. Частоти генотипів AA, Aa, aa склали 17,6%, 80,9%, 1,5%; TT, Tt та tt - 41,7%, 44,4%, 8,8% серед хворих на псориаз; AA, Aa, aa - 21,8%, 78,2%, 0%, TT, Tt, tt - 52,7%, 32,7% та 14,6% у контрольній групі відповідно.

Ключові слова: поліморфізми 61888G>T (ApaI) та 61968T>C (TaqI), ген VDR3.

UDC 575.616.224.2

Analysis Of SNP Of VDR3 Gene In Psoriasis Patients And Eastern Ukraine Population

Fedota A.M., Ryzhko P.P., Roshenyuk L.V., Vorontsov V.M., Solodyankin A.S.

Summary. DNA samples from 68 psoriasis patients and 55 normal controls were studied for SNP 61888G>T (ApaI) and 61968T>C (TaqI) of VDR3 gene among persons from Eastern Ukraine. Allele frequencies were: A - 0,58, a – 0,42, T - 0,69, t – 0,31 among psoriasis patients, A-0,61, a - 0,39, T – 0,69, t – 0,31 among controls. Frequencies of genotypes AA, Aa, aa were 17,6%, 80,9%, 1,5%; TT, Tt, tt - 41,7%, 44,4%, 8,8% for psoriasis patients; AA, Aa, aa - 21,8%, 78,2%, 0%, TT, Tt, tt - 52,7%, 32,7% та 14,6% for controls respectively.

Key words: polymorphisms 61888G>T (ApaI) and 61968T>C (TaqI), VDR3 gene.

Стаття надійшла 17.07.2011 р.