

УДК 616.7-61:575

С.О. Мазуренко, М.В. Асеев, А.Н. Шишкин

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА РЕЦЕПТОРОВ ВИТАМИНА Д И РИСК РАЗВИТИЯ ВТОРИЧНОГО ОСТЕОПОРОЗА У БОЛЬНЫХ, ПОЛУЧАЮЩИХ ЛЕЧЕНИЕ ГЕМОДИАЛИЗОМ

Санкт-Петербургский государственный университет, медицинский факультет

Хроническая болезнь почек (ХБП), особенно в терминальной стадии, нередко осложняется тяжелым метаболическим поражением костей и вторичным остеопорозом, приводящим к переломам. Остеопороз — заболевание многофакторное, однако исследования минеральной плотности костей (МПК) в семьях и у близнецов показали, что генетическое влияние на показатели МПК проявляется в 80% случаев [1, 2].

Гены, которые относят к кандидатам, влияющим на развитие остеопороза, разделяют на 5 групп [3]:

- 1) гены, контролирующие гомеостаз кальция;
- 2) гены, контролирующие гормональный статус онтогенеза;
- 3) гены, ответственные за развитие и регуляцию метаболической активности остеобластов и остеокластов;
- 4) гены, контролирующие структуру компонентов внеклеточного матрикса, и гены, участвующие в продукции их белков;
- 5) гены метаболизма липопротеинов.

Наиболее подробно изучалась ассоциация с первичным остеопорозом гена рецепторов витамина Д (ВДР). Ген ВДР расположен на 12 хромосоме. Изменения последовательности оснований гена распознаются рестрикционными энзимами, расщепляющими ДНК в тех местах, где имела место мутация. Используя различные рестрикционные энзимы (*BsmI*, *TaqI*, *ApaI*, *FokI*), можно получить большое количество полиморфизмов. Так была доказана связь полиморфизма *BsmI* рецепторов витамина Д с потерей минеральной плотности костей у женщин с нормальной функцией почки в период менопаузы [4, 5]. Также было показано, что лица с наиболее предпочтительным генотипом ВДР проходят критический порог для переломов ($-2SD$ от пика костной массы) на 10 лет позже по сравнению с лицами с наименее предпочтительным набором генов [4]. В свете этих исследований влияние внешних факторов на развитие первичного остеопороза представляется менее значимым.

Однако вторичный остеопороз у больных с терминальной стадией хронической болезни почек развивается под влиянием гораздо большего количества причин, из которых первостепенное значение имеет прогрессирующий гиперпаратиреоз. Учитывая неоднократно предположения о влиянии полиморфизма гена ВДР на функцию паращитовидных желез у больных с хронической болезнью почек, представляется логичным

изучение влияния полиморфизма гена ВДР на показатели минеральной плотности костей и риск развития остеопороза у больных ХБП, получающих лечение гемодиализом.

В настоящем исследовании была поставлена задача – изучить влияние полиморфизма гена рецепторов витамина Д (ВДР) на показатели минеральной плотности костей и риск развития вторичного остеопороза у больных с терминальной стадией хронической болезни почек.

Методы исследования. Обследовано 82 пациента (37 мужчин и 45 женщин) в возрасте от 20 до 62 лет (средний возраст $43,9 \pm 12,9$) с терминальной стадией хронической болезни почек, получающих лечение программным гемодиализом от 0 до 12 лет (в среднем $6,1 \pm 3,65$). Всем больным проводился бикарбонатный диализ 3 раза в неделю в различных диализных центрах Санкт-Петербурга. У всех пациентов определялся уровень интактного паратиреоидного гормона (иПТГ) методом ИФА (референтные значения иПТГ 15–65 нг/мл). Активность общей щелочной фосфатазы (ОЩФ) сыворотки исследовали колориметрическим методом у всех пациентов. Концентрацию кальция и фосфора крови определяли с помощью стандартных лабораторных методик.

ДНК из лейкоцитов выделяли стандартным способом с протениазой К и последующей депротенизацией фенолом и хлороформом. Молекулярно-генетическое исследование гена ВДР вели методом ПДРФ-анализа (анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов). Тип изученного полиморфизма гена ВДР, последовательности олигопраймеров и размеры амплифицированных фрагментов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика гена ВДР и структуры олигопраймеров, используемых для его изучения

Ген	ВДР
Локализация гена	12p12-q14
Изученный полиморфизм гена	T→C мутация в 9 экзоне
Размер амплифицированного фрагмента	740 п. о.
Структура праймера	5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG-3' 5'-GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC-3'

Забор крови для исследования перечисленных показателей осуществлялся перед началом сеанса гемодиализа. Также у всех пациентов были оценены показатели минеральной плотности костей (МПК) методом двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии в трех отделах скелета:

- поясничный отдел позвоночника (L1–L4);
- проксимальный отдел бедренной кости;
- дистальный отдел предплечья.

Индивидуальные результаты определения МПК оценивали по критерию T (величина среднеквадратичного отклонения МПК пациента от среднестатистического показателя МПК для взрослых лиц того же пола в возрасте 30 лет). Данные денситометрии классифицировали по критерию T в соответствии с рекомендациями ВОЗ (табл. 2).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы StatSoft Statistica v. 6.0. Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений. При анализе данных применяли критерий χ^2 , для изучения межгрупповых различий использовали непараметрические методы Крускала–Уоллиса и Манна–Уитни.

Таблица 2

**Классификация результатов денситометрической
оценки минеральной плотности кости**

Диагностические категории	Критерий <i>T</i>
Норма	$T > -1,0$
Остеопения	$-1,0 < T > -2,5$
Остеопороз	$T < -2,5$

Результаты исследования. Распределение пациентов по генотипу ВДР и их характеристика представлены в табл. 3. В изученной популяции генотип ТТ был выявлен у 47,6% пациентов, генотипы Тt и tt соответственно у 29,3 и 23,2%. Пациенты выделенных групп существенно не различались по возрасту, продолжительности гемодиализа.

Таблица 3

Характеристика выделенных групп

Показатель	Генотип			<i>p</i>
	ТТ	Тt	tt	
Количество пациентов	39	24	19	–
Пол (мужчины/женщины)	18/21	10/14	9/10	–
Средний возраст, лет	40,9±12,7	38,4±12,0	40,8±9,89	> 0,05
Продолжительность гемодиализа, мес	58,4±51,1	59,3±45,7	62,1±53,2	> 0,05

Средние показатели концентрации кальция и фосфора крови в выделенных группах существенно не различались. Средние значения концентрации иПТГ и щелочной фосфатазы во всех группах значительно превышали лабораторные референтные (нормальные) данные. Наиболее высокие показатели концентрации иПТГ и щелочной фосфатазы были отмечены в группе с генотипом ТТ, однако при выполнении тестов Крускала–Уоллиса и Манна–Уитни достоверной разницы между группами не обнаружено (табл. 4).

Таблица 4

Основные лабораторные показатели у пациентов в выделенных группах

Показатель	Генотип			<i>p</i>
	ТТ	Тt	tt	
Кальций крови общий, мМ/л	2,22±0,32	2,18±0,11	2,24±0,21	> 0,05
Кальций крови ионизированный, мМ/л	1,12±0,27	1,18±0,29	1,17±0,25	> 0,05
Фосфор крови, мМ/л	1,98±0,53	2,11±0,78	1,97±0,49	> 0,05
иПТГ, нг/л	785,6±843,0	549,7±596,7	691,7±481,8	> 0,05
Щелочная фосфатаза, МЕ/л	434,6±387,0	392,7±435,9	366,2±243,1	> 0,05

В каждой группе было подсчитано количество пациентов с остеопорозом, остеопенией и нормальными показателями МПК, которое выражали в процентах (рис. 1).

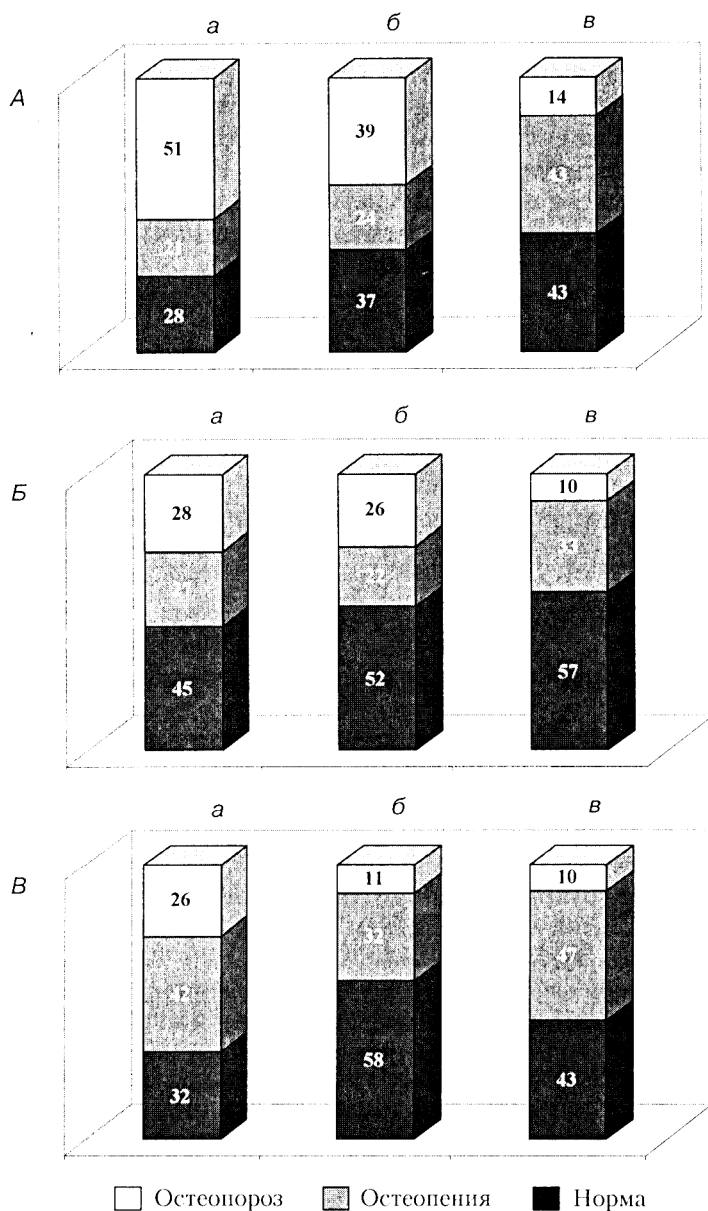


Рис. 1. Распределение пациентов (в процентах) в группах, выделенных по генотипу ВДР, с остеопенией, остеопорозом и нормальными показателями МПК.

А – кости предплечья, Б – позвонки L1–L4, В – бедренная кость;
а – генотип ТТ, б – генотип Тт, в – генотип tt.

Наибольший процент больных с дефицитом минеральной плотности костей ($T < -1,0$) во всех изученных отделах был отмечен в группе с генотипом ТТ. В костях предплечья дефицит МПК ($T < -1,0$) был выявлен у 72% больных с генотипом ТТ (51% с остеопорозом и 21% с остеопенией) против 63 и 57% больных с генотипами Тt и tt. В поясничном отделе позвоночника дефицит МПК ($T < -1,0$) выявлен у 53% больных с генотипом ТТ (28% с остеопорозом и 27% с остеопенией) против 48 и 43% больных с генотипами Тt и tt. В проксимальном отделе бедренной кости дефицит МПК ($T < -1,0$) был выявлен у 68% больных с генотипом ТТ (26% с остеопорозом и 42% с остеопенией) против 43 и 57% больных с генотипами Тt и tt.

Для проверки гипотезы о влиянии генотипа ВДР на МПК у больных, получающих лечение гемодиализом, выполнен сравнительный анализ показателей МПК, критериев T и Z в изученных отделах скелета (табл. 5).

Таблица 5

Показатели минеральной плотности кости у больных с генотипами гена ВДР

Показатель	Генотип			p
	ТТ	Тt	tt	
МПК костей предплечья, г/см ²	0,485±0,116	0,494±0,104	0,517±0,121	> 0,05
Критерий T костей предплечья	-2,23±2,2	-1,8±1,8	1,6±1,6	> 0,05
Критерий Z костей предплечья	-1,59±2,1	-1,2±1,8	1,2±1,5	> 0,05
МПК L1-L4	0,910±0,199	0,928±0,205	0,972±0,122	> 0,05
Критерий T L1-L4	-1,4±1,7	-1,2±1,9	-0,8±1,1	> 0,05
Критерий Z L1-L4	-0,96±1,6	-0,78±1,7	-0,5±1,0	> 0,05
МПК бедренной кости	0,759±0,248	0,865±0,197	0,849±0,126	> 0,05
Критерий T бедренной кости	-1,5±1,2	-0,7±1,4	-0,8±0,9	> 0,05
Критерий Z бедренной кости	-1,1±1,1	-0,3±1,5	-0,8±0,8	0,02

Наиболее низкие значения МПК и критериев T и Z во всех изученных отделах скелета были отмечены в группе пациентов с генотипом ТТ. Однако достоверной разница показателей МПК, оцененных по критерию Z методом Крускала-Уоллиса, оказалась только в бедренной кости ($p = 0,02$) (рис. 2).

При проведении парного теста методом Манна-Уитни наиболее значимой оказалась разница между критериями Z в группах ТТ и Тt ($p < 0,01$). Достоверной разницы между показателями Z бедренной кости в группах Тt и tt мы не обнаружили ($p > 0,05$).

Обсуждение. Влияние полиморфизма рецепторов витамина Д на показатели минеральной плотности костей и риск развития остеопороза изучалось достаточно широко и преимущественно у женщин.

В ряде исследований была обнаружена ассоциация между BsmI полиморфизмом ВДР и риском развития остеопороза у женщин с нормальной функцией почек [4, 5]. В других исследованиях пери- и постменопаузальных женщин подобной ассоциации остеопороза с определенным генотипом ВДР обнаружено не было [6, 7], что, видимо, объясняется влиянием большого количества различных экзогенных и генетических факторов [8].

У пациентов с хронической болезнью почек показатели минеральной плотности костей подвержены влиянию гораздо большего количества факторов, чем у лиц с нор-

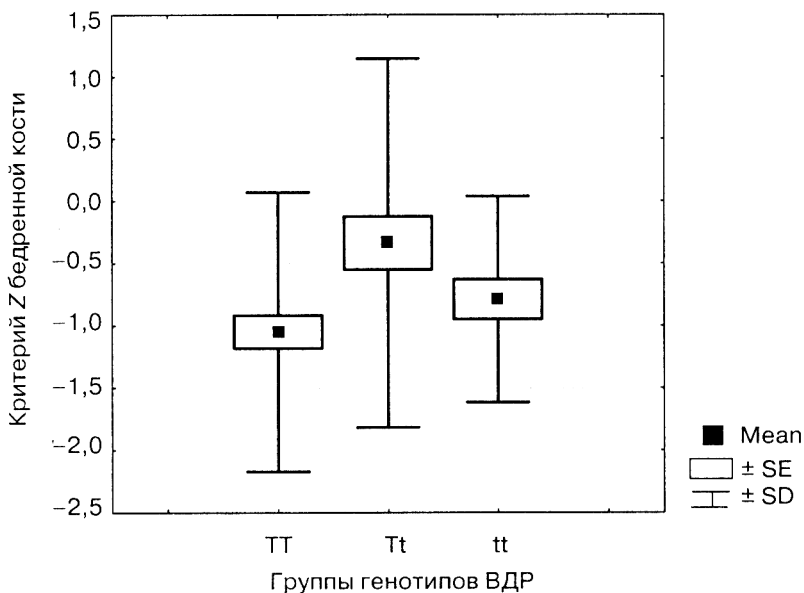


Рис. 2. Сравнение показателей МПК, оцененных по критерию Z бедренной кости, в выделенных группах генотипов ВДР ($p = 0,02$).

мальной функцией почек, при этом, по-видимому, основную роль играет прогрессирующий вторичный гиперпаратиреоз.

В настоящем исследовании самые высокие показатели концентрации иПТГ и щелочной фосфатазы были отмечены в группе больных с генотипом TT. Однако при сравнительном анализе выявленные различия в группах оказались недостоверными.

При подсчете больных с различной выраженностью дефицита МПК (норма, остеопения, остеопороз – классификация ВОЗ) самая большая доля пациентов с остеопорозом (критерий $T \leq -2,5$) во всех изученных отделах скелета была выявлена в группе с генотипом TT (см. рис. 1). При этом во всех изученных группах остеопороз наиболее часто выявлялся в костях предплечья, что, по-видимому, объясняется влиянием вторичного гиперпаратиреоза [9].

При выполнении сравнительного анализа показателей минеральной плотности костей пациентов в выделенных по генотипу ВДР группах самые низкие показатели МПК, а также критерисв T и Z были отмечены у больных с генотипом TT, однако достоверным это различие оказалось только для критерия Z костей бедренной кости.

Наши данные согласуются с результатами других исследователей, изучавших влияние полиморфизма гена ВДР на показатели МПК пациентов с хронической болезнью почек. Подобные находки были обнаружены при изучении влияния полиморфизма BsmI рецепторов витамина D на показатели МПК больных, получавших лечение гемодиализом [10]. Самые низкие показатели МПК, оцененные по критерию Z , нивелирующего влияние пола и возраста, оказались у лиц с генотипом ВВ. Разница между показателями Z в выделенных группах с генотипами ВВ, Vb, bb оказалась достоверной только в шейке бедренной кости и во всем теле. Однако в этом исследовании никто из пациентов не получал активные метаболиты в период наблюдения и изучения показателей МПК.

Пациенты, включенные в наше исследование, получали лечение альфакальцидолом, который подавляет активность парацитовидных желез, снижает костный обмен и

увеличивает минеральную плотность костей. Это лечение могло повлиять на показатели МПК и уменьшить различия между изучаемыми группами.

На основании выполненного исследования можно сделать предварительные выводы о влиянии генотипа ВДР на показатели МПК больных с хронической болезнью почек на стадии заместительной терапии гемодиализом. Генотип ТТ ассоциировался с более высокой концентрацией иПТГ и щелочной фосфатазы в крови, с более низкими показателями МПК и, соответственно, большим риском развития остеопороза. Многофакторность заболевания, влияние лечения (альфакальцидол, препараты кальция), несомненно, сглаживали значение генотипа, что, видимо, и сказалось на статистической достоверности большинства различий.

Summary

Mazurenko S.O., Aseev M.B., Shishkin A.N. Vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of secondary osteoporosis in haemodialysis patients.

The vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism is one of the supposed genetic determinants of bone metabolism. The purpose of this study was to examine whether the vitamin D gene TaqI polymorphism is related to the low bone mineral density and the risk of secondary osteoporosis in patients on maintenance haemodialysis. To test the relationship between VDR genotypes and incidence of osteoporosis, bone mineral density and parameters of bone metabolism, 82 haemodialysis patients have been studied. The incidence of osteoporosis was more prevalent in patients with genotype TT. Concentrations of serum intact parathyroid hormone and activity of alkaline phosphatase were higher in patients with genotype TT. However, the difference between the genotype groups TT, Tt and tt, was statistically insignificant ($p > 0,05$). Bone mineral density parameters were lower in patients with genotype TT in every studied part of the skeleton, and statistically significant in proximal part of the femur assessed by Z criterion ($p = 0,02$). This study confirms the hypothesis suggested that the vitamin D receptor gene polymorphism is a genetic determinant of bone metabolism in patients with chronic kidney disease on maintenance haemodialysis.

Key words: gene VDR polymorphisms, osteoporosis, hyperparathyroidism, haemodialysis.

Литература

1. Pocock N.A., Eisman J.A., Hooper J. et al. Genetic determinants of bone mass in adults // J. Clin. Invest. 1987. Vol. 80. P. 706–710.
2. Krall E.A., Dawson-Hughes B. Heritable and life-style determinants of bone mineral density // J. Bone Miner Res. 1993. Vol. 8. P. 1–8.
3. Пучкова Л.В., Дорохова И.И. Новые генетические факторы риска при остеопорозе // Остеопороз и остеопатия. 2005. № 1. С. 16–19.
4. Morrison N.A., Qi J.C., Tokita A. et al. Prediction of bone mineral density from vitamin D receptor alleles // Nature. 1994. Vol. 367. P. 284–287.
5. Krall E.A., Parry P., Litcher J.B., Dawson-Hughes B. Vitamin D receptor alleles and rates of bone loss: Influence of years since menopause and calcium intake // J. Bone Miner. Res. 1995. Vol. 10. P. 978–984.
6. Garnero P., Borel O., Sornay-Rendu E. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms are not related to bone turnover, rate of bone loss and bone mass in postmenopausal women: the OFELY Study // Ibid. 1996. Vol. 11. P. 827–834.
7. Hansen T.S., Abrahamsen B., Henriksen F.L. et al. Vitamin D receptor alleles do not predict bone mineral density or bone loss in Danish perimenopausal women // Bone. 1998. Vol. 22. P. 571–575.
8. Rizzoli R., Bonjour J.-P., Ferrari S.I. Osteoporosis, genetics and hormones // J. Mol. Endocrinol. 2001. Vol. 26. P. 79–94.
9. Мазурен-ко С.О., Шишкин А.Н., Енькин А.А., Герасимова А.А. Закономерности прогрессирования остеопении у больных ХПН после начала гемодиализа и трансплантации почки // Приложение к журналу «Остеопороз и остеопатия»: Матер. Рос. конгр. по остеопорозу. М., 2003. С. 104.
10. Alonso C.G., Naves Diaz M.L., Diaz-Corte C. et al. Vitamin D receptor gene (VDR) polymorphism: effect on bone mass, bone loss and parathyroid hormone regulation // Nephrol. Dial. Transplant. 1998. Vol. 13. Suppl. 3. P. 73–77.

Статья принята к печати 20 декабря 2006 г.