

УДК 616.71-007.234:618.173-008.9:616.441-008.64

І.В. Паньків

**ЗВ'ЯЗОК ПОЛІМОРФІЗМІВ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВІТАМІНУ D
ІЗ РОЗВИТКОМ ОСТЕОПОРОЗУ У ХВОРИХ НА ГІПОТИРЕОЗ**

Вищий державний навчальний заклад «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці

Резюме. Розвиток остеопорозу детермінується взаємодією багатьох генів. Однак саме з допомогою VDR реалізується синтез та фізіологічна роль вітаміну D₃ у численних органах і тканинах. У проведеному дослідженні встановлено розподіл генотипів та алельні частоти поліморфізму rs731236 (C+61968T; TaqI) гена VDR, а також ризик розвитку та асоціацію з факторами, що визначають розвиток остеопоротичних змін скелета у жінок із гіпотиреозом. Під спостереженням перебувало 95 жінок із гіпотиреозом віком від 34 до 67 років. Виявлення поліморфізмів гена VDR *in vitro* проводили методом полімеразної ланцюгової реакції. Остеопоро-

тичні зміни скелета встановлено в 44 (46,3 %) пацієнток, у тому числі у вигляді остеопенії – у 32 (33,7 %) та остеопорозу – у 12 (12,6 %). Найчастіше ці явища траплялися у пацієнток постменопаузного періоду – у 34 пацієнток (60,7 %). Наявність гомозиготи за мажорним алелем гена VDR (C+61968) C/C володіє протективним ефектом на розвиток остеопоротичних змін скелета, тоді як наявність гомозиготи за мінорним алелем цього поліморфізму T/T сприяє розвитку остеопоротичних змін.

Ключові слова: гіпотиреоз, остеопороз, остеопенія, поліморфізм гена рецептора вітаміну D.

Вступ. Остеопороз розглядається як системне захворювання скелета, що характеризується зниженням мінеральної щільності кісткової тканини (МЩКТ) та порушенням мікроархітектоники кістки зі зниженням її міцності та підвищенням ризику переломів на тлі негативного балансу ремоделювання з клінічним проявом принаймні одним патологічним переломом в анамнезі [5]. Підвищений інтерес до остеопорозу зумовлений його високою поширеністю в популяції серед осіб віком понад 50 років, зниженням якості життя, а за настання переломів – передчасною смертністю від ускладнень захворювання. Остеопороз належить до багатофакторних, полігенних захворювань, генетична складова якого формується за рахунок взаємодії багатьох генів [8]. До одного з найважливіших чинників ризику остеопорозу належить обтяжений сімейний анамнез, в якому підкреслюється важливість генетичної складової в патогенезі захворювання [9].

Основні напрямки генетичних досліджень у галузі остеопорозу здебільшого сконцентровані на вивченні генів-кандидатів, які мають відношення до кісткового метаболізму. Упродовж останніх десятиліть активно вивчається роль гена, який кодує рецептор вітаміну D (VDR). VDR – медіатор дії 1,25(OH)₂D₃ шляхом модуляції транскрипції генів-мішеней, один із генів-кандидатів генетичного контролю підтримання достатньої кісткової маси [1]. Проведені раніше дослідження показали, що 1,25(OH)₂D₃ є стероїдним гормоном і його кінцева точка прикладання безпосередньо пов'язана з генетично детермінованими властивостями рецептора вітаміну D. VDR виявлений у багатьох тканинах і органах, включаючи шлунково-кишковий тракт, сечостатеву систему, органи ендокринної системи, а також у культурі клітинних ліній скелетно-м'язової системи. Цей факт став головним доказом того, що біологічна дія 1,25(OH)₂D₃ виходить за рамки гомеостазу кальцію і фосфору і відіграє ключову

роль у клітинній проліферації і диференціюванні [10].

Акцент у галузі вивчення впливу поліморфізму VDR ставився на взаємозв'язок дії D-гормону на регуляцію всмоктування кальцію в кишечнику, що, у свою чергу, здійснював вплив на МПКТ. Однак крім щільності кістки, встановлені й інші чинники ризику розвитку остеопорозу, такі, як геометричні параметри кісток скелета і м'язовий баланс, що також перебуває під контролем вітаміну D. Найбільша увага дослідників сфокусована на поліморфізмі VDR, виявленому за допомогою рестриктаз BsmI, ApaI, TaqI і FokI [4]. Загалом проведено близько десяти епідеміологічних досліджень зв'язку поліморфізму VDR і ризику низькотравматичних переломів. У більшості з них показано, що генотип VDR пов'язаний із підвищеним ризиком переломів, у тому числі і стегна, і хребта [3]. Однак результати проведених раніше досліджень неоднозначні і відрізняються залежно від популяції та етнічних особливостей досліджуваної когорти.

Розвиток остеопорозу детермінується взаємодією багатьох генів. Однак саме з допомогою VDR реалізується синтез та фізіологічна роль вітаміну D₃ у численних органах і тканинах. Нормальна експресія гена VDR визначає активність процесів остеогенезу та ремоделювання кісткової тканини [2]. Аналіз алелів поліморфних варіантів генів, що кодують VDR, забезпечує раннє виявлення спадкових форм та ендокринних чинників ризику розвитку остеопорозу та профілактики захворювання на доклінічному етапі [6]. Вивчення патогенетичної значущості поліморфізму генів, відповідальних за метаболізм кістки та розвиток остеопорозу, з'ясування їх ролі у механізмах захворювання сприятимуть профілактиці та ранній діагностиці, розробці нових генно-інженерних методів лікування. Тому визначення генетично зумовлених порушень МЩКТ у жінок

із гіпотиреозом та остеопорозом є актуальним та своєчасним.

Мета дослідження. Встановити розподіл генотипів та алельні частоти поліморфізму rs731-236 (C+61968T; TaqI) гена VDR, а також ризик розвитку та асоціацію з факторами, що визначають розвиток остеопоротичних змін скелета у жінок із гіпотиреозом.

Матеріал і методи. Під спостереженням перебувало 95 жінок із гіпотиреозом віком від 34 до 67 років. Жінки були розподілені на дві групи. До першої групи увійшло 39 жінок (41,1 %) зі збереженою менструальною функцією, до другої групи – 56 осіб (58,9 %), які перебували в постменопаузному періоді. Середній вік пацієнток першої групи становив (42,54±0,58) років (від 34 до 47 років). У другій групі середній вік становив (57,46±1,14) років (від 51 до 67 років). Пацієнтки в постменопаузному періоді були вірогідно старшими на 14,92 року ($t=9,26$; $p < 0,001$). Постменопаузний період розглядали як стійку відсутність менструацій протягом більш ніж одного року від дня останньої менструації.

До критеріїв виключення з обстеження належали такі патологічні стани. З боку ендокринної системи: ендогенний гіперкортицизм, тиреотоксикоз, гіперпаратиреоз, гіпогонадізм, полігландулярна ендокринна недостатність; з боку ревматичних захворювань: ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак, анкілозивний спондилоартрит; з боку захворювань органів травлення: операції на шлунку та кишечнику в анамнезі, синдром мальабсорбції, первинний біліарний цироз, запальні захворювання органів шлунково-кишкового тракту; з боку захворювань крові: мієломна хвороба, таласемія, гемофілія, лейкози; з боку захворювань ЦНС: інсульт, епілепсія, хвороба Паркінсона, розсіяний склероз. У дослідження не включали пацієнтів, які отримували кортикостероїди, імунодепресанти, антиконвульсанти, алюміній-вмісні антациди, барбітурати, інгібітори протонної помпи, інгібітори зворотного захоплення серотоніну та ін.

Наявність остеопоротичних змін скелета визначали за показником Т-критерію поперекового відділу хребта та проксимального відділу стегнової кістки за даними двофотонної рентгенівської абсорбціометрії. Відсутність остеопорозу визначали за величиною Т-критерію від -1 SD до +1 SD ($-1 < T < +1$). Остеопенію як латентну стадію остеопорозу визначали за величиною Т-критерію від -2,5 SD до -1 SD ($-2,5 < T < -1$) [15]. Остеопороз визначали за наявності клінічно значущих патологічних переломів тіл хребців на рентгенограмах та величиною Т-критерію на денситограмах менше ніж -2,5 SD ($T < -2,5$).

Кількісний розподіл жінок із гіпотиреозом за групами з огляду на наявність або відсутність у них остеопорозу наведено в таблиці 1. Загалом наявність остеопоротичних змін скелета встановлено у 44 (46,3 %) пацієнток, у тому числі у вигляді остеопенії – у 32 (33,7 %) та остеопорозу –

у 12 (12,6 %). Найчастіше ці явища траплялися в пацієнток другої групи – у 34 (60,7 %). Серед них у 23 пацієнток виявлялася остеопенія (41,1 %), а у решти – остеопороз (11 випадків, що становили 19,6 %). У першій групі остеопенія спостерігалася у 9 (23,1 %) пацієнток, а остеопороз діагностовано лише в одному випадку (2,6 %).

При перевірці за критерієм χ^2 встановлено, що різниця в розподілі частот спостереження остеопоротичних змін скелета в пацієнток двох груп була статистично значимою ($\chi^2=28,0$; $p < 0,001$). Це дозволяє стверджувати, що остеопороз втричі частіше траплявся в пацієнток у постменопаузному періоді. При цьому клінічно виражений остеопороз діагностовано у 19,6 % пацієнток у постменопаузному періоді і лише в одній жінки зі збереженою менструальною функцією ($\chi^2=14,2$; $p < 0,001$).

Відсутність остеопоротичних змін скелета спостерігалася в більшості пацієнток першої групи (74,3 %); остеопенія спостерігалася частіше в пацієнток другої групи: 41,1 % проти 23,1 % у першій групі.

Функціональний стан щитоподібної залози (ЩЗ) оцінювали за допомогою визначення базальних концентрацій тиреотропного гормону (ТТГ) і вільного тироксину (vT_4) у сироватці крові імуноферментним методом за допомогою реактивів фірми DRG (Німеччина) на автоматичному аналізаторі iEMS Reader MF фірми ThermoLabsystems (Фінляндія). Нормальні значення ТТГ відповідали 0,23-4,0 мкМО/мл, vT_4 – 10,2-23,2 пмоль/л.

Серед маркерів кісткоутворення визначали рівень остеокальцину (нормальні величини 11,0-43,0 нг/мл). Стан резорбції відображав рівень β -ізомера С-кінцевого телопептиду колагену I типу (β -СТх) у сироватці крові (нормальні величини $< 0,573$ нг/мл) у лабораторії відділу клінічної фізіології та патології опорно-рухового апарату ДУ «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України». Маркери кісткового ремоделювання вивчали за допомогою хемілюмінесцентного методу на імуноферментному аналізаторі Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Німеччина) за допомогою тест-систем cobas.

Крім того, стан кісткового метаболізму оцінювали за концентрацією в сироватці крові лужної фосфатази (ЛФ) (нормальні величини 26-117 Од/л), неорганічного фосфору (нормальні значення від 0,81 до 1,45 ммоль/л) і загального кальцію – від 2,15 до 2,58 ммоль/л. Для визначення рівня 25 (ОН)D у сироватці крові використовували електрохемілюмінесцентний метод за допомогою апарата Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Німеччина).

Виявлення поліморфізмів гена VDR *in vitro* проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з подальшим ферментативним гідролізом продуктів ампліфікації, електрофоретичним розподіленням і візуалізацією отриманих фрагментів рестрикції в ультрафіолетовому світлі.

Для генотипування венозну кров набирали в стерильних умовах в моновети об'ємом 2,7 мл з каліевою сіллю етилендіамінтетраоцтової кислоти («Sarstedt», Німеччина), що слугувала антикоагулянтом. Кров заморожували і зберігали при температурі -20°C . ДНК з неї виділяли, використовуючи набори «Изоген» (РФ). Ампліфікацію ділянки гена, що містить сайт *ApaI* поліморфізму, проводили за допомогою пари специфічних праймерів: прямого (sense) – 5'-CAGAGCATGGACAGGGA GCAA-3' і зворотного (antisense) – 5'-CACTTCGAGCACAAGGGGCGTT AGC-3'. Праймери синтезовано фірмою «Metabion» (Німеччина). Для ампліфікації брали 50-100 нг ДНК і додавали до суміші, що містила 5 мкл 5-кратного PCR-буфера, 1,5 мМ сульфату магнію, 250 мкМ суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, по 15 рМ кожного з праймерів і 0,75 ОД Тақ-полімерази («Ферментас», Литва), об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. PCR проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2700 («Applied Biosystems», США). Програма ампліфікації: денатурація – 94°C (50 с), гібридизація праймерів – $64,5^{\circ}\text{C}$ (45 с), елонгація – 72°C (1 хв), разом 33 цикли. У подальшому 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 20 годин з 5 ОД рестриктази *ApaI* у буфері В такого складу: 10 мМ трис-НСІ (рН 7,5), 10 мМ хлориду магнію і 0,1 мг/мл альбуміну. Якщо в 59979 позиції гена *VDR* містився гуанін, ампліфікат, який складався з 501 пари основ, розщеплювався рестриктазою *ApaI* на два фрагменти – 284 і 217 пар основ. У разі заміни гуаніну на тимін сайт рестрикції для *ApaI* втрачався і утворювався один фрагмент розміром 501 пара основ. Ампліфікати вивченого фрагмента гена *VDR* після рестрикції розділяли в 2,5% агарозному гелі, що містив бромистий етидид. Горизонтальний електрофорез (0,1А; 140V) проводили протягом 40 хв. Візуалізацію ДНК після електрофорезу здійснювали за допомогою транслюмінатора («Біоком», РФ). Ступінь асоціації генотипів із наявністю остеопорозу визначали за величиною співвідношення шансів (OR), що характеризує відносний ризик (шанси) розвитку захворювання, у даному випадку залежно від алельного поліморфізму досліджуваного гена. Про вірогідне підвищення ризику свідчить величина OR понад 1, за умови потрапляння до вірогідного інтервалу (СІ = 95 %). На вірогідне зниження ризику вказує величина OR нижче 1. Вірогідність впливу варіантів алельного поліморфізму на вміст у крові ОАГ, кальцію, фосфору, активності ЛФ і величини МЩК визначали з використанням однофакторного дисперсійного аналізу за критерієм F. Вірогідність різниць між середніми величинами розраховували за t-критерієм Стьюдента. Статистичний аналіз проводили з використанням програми SPSS-17. При цьому достовірність відмінностей визначали за χ^2 -критерієм. Величини $p < 0,05$ вважали статистично значимими.

Для перевірки гіпотези про наявність зв'язку між двома ознаками та значимості різниць між середніми величинами використовували комп'ютерний варіаційний, кореляційний, регресійний, одно- і багатофакторний дисперсійний аналізи (програми «Microsoft Excel» і «Statistica 6,0», США) з розрахунком та аналізом середніх значень (M), їх похибки (m), коефіцієнтів кореляції (r), критеріїв регресії (R), дисперсії (F), Стьюдента, Уїлкінсона-Рао, Пірсона (χ^2 -квадрат), Фішера і вірогідність статистичних показників (p).

Перевіряючи гіпотезу щодо закону розподілення, розраховували чотирипільні таблиці зчеплення за критерієм узгодженості Пірсона (χ^2 -квадрат). Це дало змогу перевірити розподілення однієї ознаки шляхом порівняння емпіричного розподілу цієї ознаки з теоретичним, тобто відповідність до закону Хайді-Вайберга (HWE) для виявлення зв'язку між ними. За кожним поліморфізмом порівнювали розподіл генотипів й алелів і виявляли асоціацію між розвитком захворювання і генотипом. Частоти поєднань генотипів розраховували з використанням точного двобічного критерію Фішера.

Результати дослідження та їх обговорення.

Нами проаналізовано вплив двох звичайних онднуклеотидних поліморфізмів (SNP) гена *VDR* – rs731236 (C+61968T; TaqI) на показники, що характеризують остеопоротичні зміни скелета, вміст у крові кальцію та фосфору, а також активність ЛФ.

Молекулярно-генетичні дослідження проводили окремо в пацієток з остеопоротичними змінами скелета (випадки; T-критерій ≤ -1 SD) і без таких (контроль; T-критерій > -1 SD). Групу випадків склали 51, а групу контролю – 44 пацієнтки першої та другої груп (всього 95 осіб).

Ген *VDR* має хромосомну локалізацію 12q11-3.11. Поліморфізм rs731236 (C+61968T; TaqI) у дев'ятому екзоні гена *VDR* у багатьох популяціях асоційований із показниками МЩКТ, ризиком виникнення переломів та постменопаузного остеопорозу [16]. Нами встановлено, що частоти розподілу генотипів гена *VDR* (C+61968T) вірогідно відрізняються між групами контролю та випадків за наявності гомозиготних генотипів (рис. 1).

Гомозиготний генотип за мажорним алелем C/C траплявся в контрольній групі у 47,7 % пацієток, а в групі випадків – у 13,7 %, тобто в 3,5 раза достовірно частіше за точним методом Фішера. Гомозиготний генотип за мінорним алелем T/T, навпаки, траплявся частіше у групі випадків – у 45,1 % випадків, проти 13,6 % у контрольній групі, тобто також у 3,3 раза достовірно частіше. Частоти розподілу гетерозиготних генотипів C/T у групах не відрізнялися між собою.

Отже, за наявності остеопоротичних змін скелета частіше спостерігався гомозиготний генотип за мінорним алелем (генотип T/T).

Нами виявлена залежність розподілу генотипів гена *VDR* (C+61968T) від наявності або відсутності остеопоротичних змін скелета (p (χ^2))

Таблиця 1
Кількісний розподіл жінок із первинним гіпотиреозом за наявності або відсутності остеопоротичних змін скелета

Група	n	Зміни МЩКТ					
		відсутні		остеопенія		остеопороз	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
Перша	39	29	74,3	9	23,1	1	2,6
Друга	56	22	39,3	23	41,1	11	19,6
Всього	95	51	53,7	32	33,7	12	12,6

Таблиця 2

Вірогідність відмінностей при розподілі генотипів гена VDR (C+61968T) (χ^2) і величини співвідношення шансів (OR) залежно від генотипу

Генотипи	Контроль	Випадки	χ^2	p (χ^2)	OR	95 % довірчий інтервал
CC	21	7	6,42	0,03	0,16	0,03-0,86
CT	17	21			1,02	0,23-3,94
TT	6	23			5,44	0,96-29,82

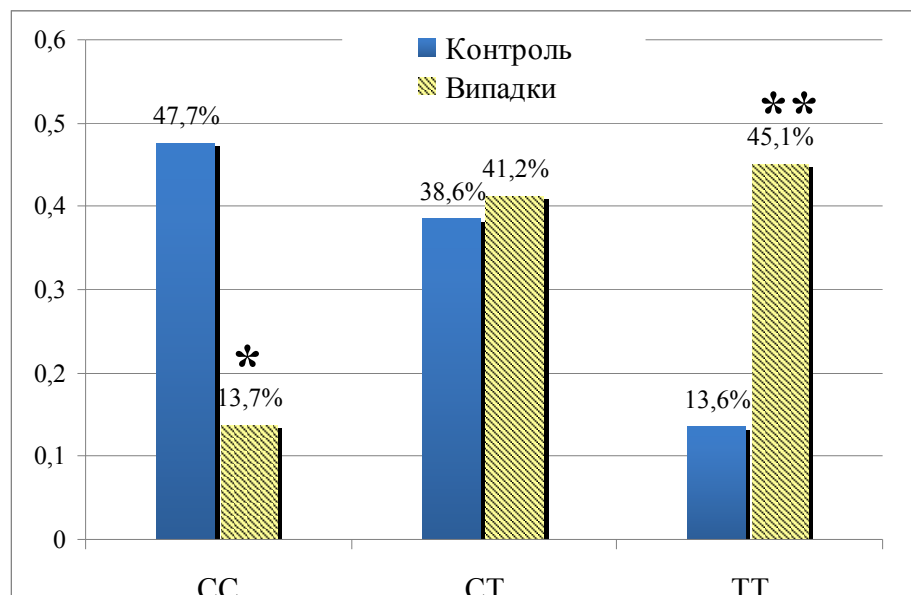


Рис. 1. Частоти розподілення генотипів поліморфізму (C+61968T) гена VDR

Примітка. * – вірогідність відмінностей частот між контролем та випадками за точним методом Фішера ($p_{(Fet)}=0,02$); ** – вірогідність відмінностей частот між контролем та випадками за точним методом Фішера ($p_{(Fet)}=0,03$)

=0,03). HWE для контрольної групи та групи випадків для поліморфних варіантів гена VDR (C+61968T) виконувалося, оскільки, відповідно, $\chi^2=0,16$; $p=0,96$ і $\chi^2=0,19$; $p=0,94$. Результати наведені в таблиці 2.

Наявність гомозиготи за мажорним алелем C/C знижувала ризик розвитку остеопоротичних змін скелета в 5,4 раза (OR=0,16; CI=0,03-0,86), тоді як наявність гомозиготи за мінорним алелем T/T збільшувала такий ризик у 5,3 раза (OR=5,44; CI=0,96-29,82).

Отже, можна стверджувати, що наявність гомозиготи за мажорним алелем гена VDR (C+61968) C/C має протективний ефект на розвиток остеопоротичних змін скелета, тоді як наявність гомозиготи за мінорним алелем цього полі-

морфізму T/T - навпаки, сприяє розвитку остеопоротичних змін. Ризик у першому випадку знижувався в 5,4 раза, а в другому – підвищувався в 5,3 раза.

На рис. 2 зображено дані, отримані за розподілом алелів. За розподілом алелів (C) та (T) поліморфізму (C+61968T) гена VDR між групами виявлена статистично значима різниця: у контрольній групі алель (C) траплявся в 61,4 % пацієнтів, а в групі випадків – у 31,4 % пацієнток; тоді як алель (T) у контрольній групі траплявся у 27,2 % пацієнток, а в групі випадків – у 56,9 % пацієнток.

Така різниця була статистично значимою для обох алелів ($p_{(Fet)}=0,008$). За наявності остеопоротичних змін скелета мажорний алель (C)

Таблиця 3

Вірогідність відмінностей розподілу алелів гена VDR (C+61968T) (χ^2) і величини співвідношення шансів (OR) залежно від алеля

Алелі	Контроль	Випадки	χ^2	$p(\chi^2)$	OR	95 % довірчий інтервал
C	27	16	7,57	0,008	0,28	0,14-0,67
T	12	29			3,85	1,43-10,31

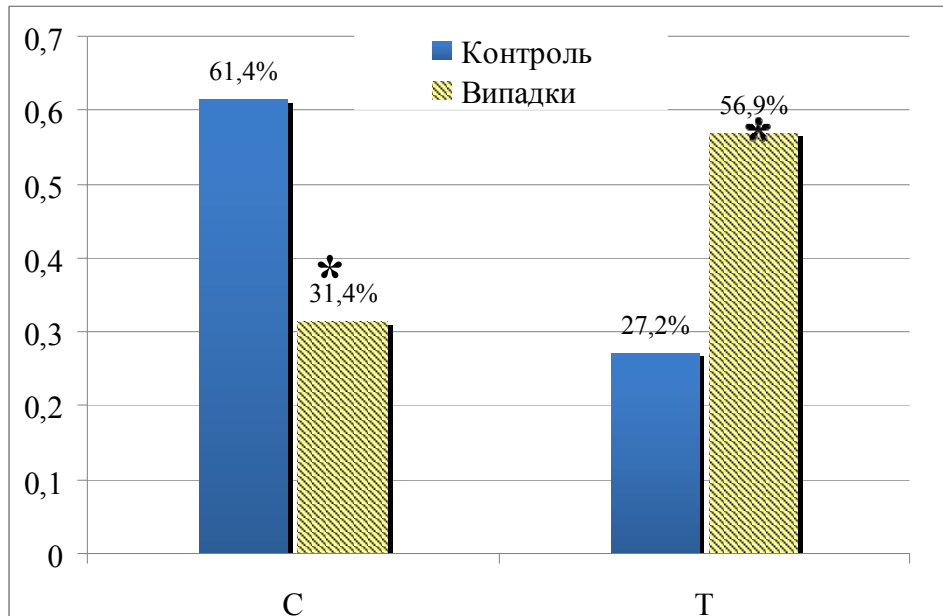


Рис. 2. Частоти розподілення алелів поліморфізму (C+61968T) гена VDR

Примітка. * - вірогідність різниць частот між контролем та випадками за точним методом Фішера ($p_{\text{Fisher}}=0,008$)

траплявся в 1,9 раза рідше, а мінорний алель (T) – у 2,1 раза частіше.

Наявність у генотипі мажорного алеля (C) зменшує ризик розвитку остеопоротичних змін скелета в 3,7 раза, тоді як наявність мінорного алеля (T) підвищує такий ризик у 3,8 раза (OR=3,87; CI=1,45-10,33) (табл. 3).

При оцінці впливу генотипу поліморфізму (C+61968T) гена VDR встановлено його достовірний вплив на величину МЩКТ. При цьому наявність у генотипі гомозиготи за мінорним алелем T/T поєднувалася з виразним зниженням МЩКТ. Так, за наявності гомозиготи за мінорним алелем T/T величина T-критерію була нижчою, ніж при гомозиготному генотипі за мажорним алелем C/C в 1,7 раза ($F=7,08$; $p=0,002$).

Як і у випадках з поліморфізмами гена Coll-A1 (G+1245T і G-1997T), мінорна гомозигота T/T поліморфізму (C+61968T) гена VDR зумовлює розвиток остеопоротичних змін скелета. Це узгоджується з даними інших авторів, що генотип T/T поліморфізму rs731236 (TaqI) асоціюється з більш вираженими остеопоротичними проявами скелета [6].

У процесі дослідження нами проаналізовано вплив алелів поліморфізму (C+61968T) гена VDR на клінічно-лабораторні показники. Статистично значимий вплив за даними дисперсійного аналізу цей алельний поліморфізм мав на МЩКТ (за T-

критерієм), рівні у крові кальцію, фосфору, паратгормону та остеокальцину. При цьому слід зазначити, що генотипи поліморфізму (C+61968T) гена VDR не мали достовірного впливу на інші клінічно-лабораторні показники. Отже, чинником ризику розвитку остеопорозу для цього генетичного поліморфізму був не генотип, а наявність у ньому мінорного алеля (T).

Мінорний алель (T) асоційований з основними патогенетичними механізмами остеопорозу: гіпокальціємією, розрідженням кістки та зниженням МЩКТ, гіперфосфоремією, активацією утворення остеокальцину.

За результатами проведеного дослідження нами встановлено, що для поліморфізму rs731236 (C+61968T; TaqI) гена VDR за наявності остеопоротичних змін скелета домінував гомозиготний генотип за мінорним алелем T/T, який траплявся в 3,4 раза частіше. Відповідно мінорний алель (T) траплялася частіше в 1,7 раза. Наявність гомозиготи за мажорним алелем C/C мала протективний ефект, тоді як наявність гомозиготи за мінорним алелем T/T сприяла розвитку остеопоротичних змін. Ризик у першому випадку знижувався в 5,5 раза, а в другому – підвищувався в 5,4 раза. Наявність у генотипі мажорного алеля (C) зменшувала ризик розвитку остеопоротичних змін скелета в 3,8 раза, тоді як наявність мінорного алеля (T) підвищувала такий ризик у 3,9 раза. У свою чер-

гу, мінорний алель (Т) поєднувався з гіпокальціємією, зниженням МЩКТ, гіперфосфоремією, активацією утворення остеокальцину.

Дослідження виконані відповідно до Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини і Наказу МОЗ України №281 від 01.11.2000 р.

Проведене дослідження має певні обмеження, у тому числі незначна кількість пацієнтів, відсутність інформації про соціальний статус і супутні хвороби. Однак нами на підставі визначення характеру та ступеня остеопоротичних змін скелета, ролі поліморфних генів з'ясована генетична зумовленість розвитку остеопорозу у хворих на гіпотиреоз.

Висновки

1. Порушення мінеральної щільності кісткової тканини встановлено у 44 (46,3 %) жінок із гіпотиреозом, у тому числі у вигляді остеопенії – у 32 (33,7 %) та остеопорозу – у 12 (12,6 %). У жінок із гіпотиреозом зі збереженою менструальною функцією остеопоротичні зміни скелета встановлені у вигляді остеопенії (23,1 %) та остеопорозу (2,6%), а в жінок постменопаузного періоду – у вигляді остеопенії (41,1 %) та остеопорозу (19,6 %). Остеопоротичні зміни скелета частіше траплялися в пацієнток у менопаузному періоді ($\chi^2=28,0$; $p<0,001$).

2. Гомозиготний генотип за мажорним алелем С/С траплявся в контрольній групі у 47,7 % пацієнток, а в групі випадків – у 13,7 %. Гомозиготний генотип за мінорним алелем Т/Т частіше спостерігався у групі випадків – в 45,1 % випадків, проти 13,6 % у контрольній групі. За наявності остеопоротичних змін скелета частіше спостерігався гомозиготний генотип за мінорним алелем (генотип Т/Т).

3. Наявність гомозиготи за мажорним алелем гена VDR (C+61968) С/С володіє протективним ефектом на розвиток остеопоротичних змін скелета. Наявність гомозиготи за мінорним алелем цього поліморфізму Т/Т сприяє розвитку остеопоротичних змін.

4. Наявність у генотипі мажорного алеля (С) зменшує ризик розвитку остеопоротичних змін скелета в 3,8 раза, тоді як наявність мінорного алеля (Т) підвищує ризик у 3,9 раза. Наявність у

генотипі гомозиготи за мінорним алелем Т/Т поєднується з більш вираженим зниженням мінеральної щільності кісткової тканини. Мінорний алель (Т) асоціюється з гіпокальціємією, зниженням мінеральної щільності кісткової тканини, гіперфосфоремією, активацією утворення остеокальцину.

Перспективи подальших досліджень. Необхідні подальші дослідження для встановлення гаплотипу по інших поліморфізмах гена VDR з метою груп ризику розвитку остеопорозу у хворих на гіпотиреоз.

Автор декларує відсутність конфлікту інтересів при підготовці статті.

Література

1. Alonso N. Unveiling the mysteries of the genetics of osteoporosis / N. Alonso, S.H. Ralston // J. Endocrinol. Invest. – 2014. – Vol. 37 (10). – P. 925-934. doi: 10.1007/s40618-014-0149-7.
2. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms (FokI and BsmI) and osteoporosis: a systematic review / Z. Mohammadi, F. Fayyazbakhsh, M. Ebrahimi [et al.] // J. Diabetes Metab. Disord. – 2014. – Vol. 13. doi: 10.1186/s40200-014-0098-x; 98.
3. Genetic and environmental variances of bone microarchitecture and bone remodeling markers: a twin study / A. Bjornerem, M. Bui, X. Wang [et al.] // J. Bone Miner. Res. – 2015. – Vol. 30. – P. 516-524.
4. Lack of Influence of Vitamin D Receptor BsmI (rs1544410) Polymorphism on the Rate of Bone Loss in a Cohort of Postmenopausal Spanish Women Affected by Osteoporosis and Followed for Five Years / M. Pedrera-Canal, J.M. Moran, V. Vera [et al.] // PLoS One. – 2015. – Vol. 22, №10(9). doi: 10.1371/journal.pone.0138606.
5. Lorentzon M. Osteoporosis: the evolution of a diagnosis / M. Lorentzon, S.R. Cummings // J. Intern. Med. – 2015 – Vol. 77 (6) – P. 650-661. doi: 10.1111/joim.12369.
6. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study / A. Thakkinstian, C. D'Este, J. Eisman [et al.] // J. Bone Miner. Res. – 2004. – Vol. 19. – P. 419-428.
7. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: the 2009 update / X/H. Xu, S.S. Dong, Y. Guo [et al.] // Endocr. Rev. – 2010. – Vol. 31. – P. 447-505.
8. Ongphiphadhanakul B. Osteoporosis: the role of genetics and the environment / B. Ongphiphadhanakul // Forum Nutr. – 2007 – Vol. 60. – P. 158-167.
9. Ralston S.H. Genetics of osteoporosis / S.H. Ralston, A.G. Uitterlinden // Endocr. Rev. – 2010. – Vol. 31 (5). – P. 629-662.
10. Zheng H.F. Insights into the genetics of osteoporosis from recent genome-wide association studies / H.F. Zheng, T.D. Spector, J.B. Richards // Expert Rev. Mol. Med. – 2011. – Vol. 26. – P. 13-28.

СВЯЗЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D С РАЗВИТИЕМ ОСТЕОПОРОЗА У БОЛЬНЫХ С ГИПОТИРЕОЗОМ

И.В. Паньків

Резюме. Основные направления генетических исследований в отрасли остеопороза сконцентрированы на изучении генов-кандидатов, которые имеют отношение к костному метаболизму. На протяжении последних десятилетий активно изучается роль гена, кодирующего рецептор витамина D (VDR). Развитие остеопороза детерминируется взаимодействием многих генов. Однако именно с помощью VDR реализуется синтез и физиологическая роль витамина D₃ в многочисленных органах и тканях.

Цель проведенного исследования – установление, распределение генотипов и аллельные частоты полиморфизма rs731236 (C+61968t; TaqI) гена VDR, а также риск развития и ассоциация с факторами, определяющих развитие остеопоротичных изменений скелета у женщин с гипотиреозом.

Матеріал і методи. Под наблюдением находилось 95 женщин с гипотиреозом в возрасте от 34 до 67 лет. В первую группу вошло 39 женщин (41,1 %) с сохраненной менструальной функцией, во вторую группу – 56 лиц (58,9 %), которые находились в постменопаузном периоде. Выявление полиморфизмов гена VDR *in vitro* производилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с дальнейшим ферментативным гидролизом продуктов амплификации, электрофоретическим распределением и визуализацией полученных фрагментов рестрикции в ультрафиолетовом свете.

Результаты. Наличие остеопоротических изменений скелета установлено у 44 (46,3 %) пациенток, в том числе в виде остеопении – у 32 (33,7 %) и остеопороза – в 12 (12,6 %). Чаще всего эти явления встречались у пациенток второй группы – у 34 пациенток, что составляет 60,7 %. Среди них у 23 пациенток установлена остеопения (41,1 %), у остальных – остеопороз (11 случаев, или 19,6 %). В первой группе остеопения наблюдалась у 9 пациенток (23,1 %), а остеопороз диагностирован лишь в одном случае (2,6 %). Наличие гомозиготы по мажорному аллелю гена VDR (C+61968) C/C обладает протективным эффектом на развитие остеопоротических изменений скелета, тогда как наличие гомозиготы по минорному аллелю этого полиморфизма T/T содействует развитию их изменений.

Выводы. Присутствие в генотипе мажорного аллеля (C) уменьшает риск развития остеопоротических изменений скелета в 3,8 раза, тогда как присутствие минорного аллеля (T) повышает риск в 3,9 раза. Наличие в генотипе гомозиготы по минорному аллелю T/T сочетается с более выраженным снижением минеральной плотности костной ткани. Минорный аллель (T) ассоциируется с гипокальциемией, снижением минеральной плотности костной ткани, гиперфосфоремией, активацией образования остеокальцина.

Ключевые слова: гипотиреоз, остеопороз, остеопения, полиморфизм гена рецептора витамина D.

ASSOCIATION OF VITAMIN D RECEPTOR GENE WITH DEVELOPMENT OF OSTEOPOROSIS IN PATIENTS WITH HYPOTHYROIDISM

I.V. Pankiv

Abstract. Osteoporosis is one of the most important medical problems occurring in the aging population. It is defined as a decrease in the bone mass leading to an unacceptably high risk of fractures. Osteoporosis is a multifactorial disease. It is well established that genetic factors are involved in the pathogenesis of osteoporosis. Polymorphism of the vitamin D receptor (VDR) gene has been reported to play a major role in variations for genetic regulation of bone mass. The current study is an attempt to examine the association of these variations with osteoporosis in patients with hypothyroidism.

The purpose of this study was to determine distribution of genotypes and allelic frequencies of polymorphism of rs731236 (C+61968t; TaqI) VDR gene, and also risk of development and association with risk factors of bone mineral density changes in women with hypothyroidism.

Methods. There were 95 women with hypothyroidism under a supervision aged from 34 to years. The first group included 39 women (41,1 %) with the stored menstrual function, the second group – 56 persons (58,9 %) that were in a postmenopausal period. Exposure of vitamin D receptor gene polymorphism *in vitro* was produced by the method of polymerase chain reaction according to the manufacturer's instructions, using the high-salt step for precipitation.

Results. The prevalence of mineral bone density disorders among patients with hypothyroidism was 46,3 %, including those with osteopenia 32 (33,7 %) and osteoporosis in 12 (12,6 %). Mostly these phenomena occurred in patients of the second group in 34 patients (60,7 %). Among them osteopenia was diagnosed in 23 patients (41,1 %) and osteoporosis in 11 cases (19,6 %). In the first group osteopenia was observed in 9 patients (23,1 %), and osteoporosis was diagnosed only in one case (2,6 %). Presence of homozygote on major allele VDR gene rs731236 (C+61968t; TaqI) possesses protective effect on development of osteoporosis, while the presence of homozygote on minor allele of this polymorphism of T/T contributes to the development of osteoporosis.

Conclusions. Presence of genotype major allele (C) is diminished with the 3.8 times greater risk of osteoporosis development, while presence of minor allele (T) is promoted with the 3.9 times greater risk. Presence in the genotype of homozygote on minor allele T/T combines with more expressed decline of mineral bone density. Minor allele (T) is associated with hypocalcemia, by the decline of bone mineral density, hyperphosphatemia, activation of osteocalcin.

Key words: hypothyroidism, osteoporosis, osteopenia, vitamin D receptor gene polymorphism.

Higher State Educational Institution of Ukraine «Bukovinian State Medical University» (Chernivtsi)

Рецензент – д. мед. н. В.Г. Хоперія

Buk. Med. Herald. – 2016. – Vol. 20, № 1 (77). – P. 109-115

Надійшла до редакції 21.01.2016 року