

УДК 575.113-02:616.711-007.55-053.2-001.8

UDC 575.113-02:616.711-007.55-053.2-001.8

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА MET/THR ГЕНА РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D (VDR) У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ СО СКОЛИОТИЧЕСКОЙ ДЕФОРМАЦИЕЙ ПОЗВОНОЧНИКА<sup>1</sup>

## RESEARCH OF POLYMORPHISM OF MET/THR GENE RECEPTOR OF VITAMIN D (VDR) IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH SCOLIOTIC DEFORMATION OF SPINE

**Е. В. Белая,**

*кандидат биологических наук,  
доцент кафедры морфологии  
и физиологии человека и животных  
Белорусского государственного  
педагогического университета  
имени Максима Танка;*

**С. А. Подберезко,**

*старший преподаватель кафедры  
морфологии и физиологии  
человека и животных Белорусского  
государственного педагогического  
университета имени Максима Танка;*

**К. Г. Бобровская,**

*магистрант кафедры морфологии  
и физиологии человека и животных  
Белорусского государственного  
педагогического университета  
имени Максима Танка;*

**О. Н. Папкина,**

*врач травматолог-ортопед  
Витебского областного детского  
клинического центра;*

**Г. Г. Пирханов,**

*специалист отдела организации  
и сопровождения инновационной  
деятельности Витебского  
государственного университета  
имени П. М. Машерова;*

**И. С. Бейшова,**

*ассоциированный профессор, кандидат  
сельскохозяйственных наук РК, доктор  
биологических наук РФ, Западно-  
Казахстанский аграрно-технический  
университет имени Жангир хана*

**E. Belaya,**

*PhD in Biology, Associate  
Professor of the Department  
of Morphology and Physiology  
of Human and Animals, Belarusian  
State Pedagogical University  
named after Maxim Tank;*

**S. Podberezko,**

*Senior Teacher of the Department  
of Morphology and Physiology of  
Human and Animals, Belarusian  
State Pedagogical University  
named after Maxim Tank;*

**K. Bobrovskaya,**

*Master Student of the Department  
of Morphology and Physiology of  
Human and Animals, Belarusian  
State Pedagogical University  
named after Maxim Tank;*

**O. Papkova,**

*Doctor Traumatologist and  
Orthopaedist, Vitebsk Regional  
Children's Clinical Center;*

**G. Pirkhanov,**

*Specialist of the Department  
of Organization and Maintenance  
of Innovational Activity,  
Vitebsk State University named  
after P. M. Masherov;*

**I. Beishova,**

*Associate Professor, PhD in Agriculture  
of the Republic of Kazakhstan, Doctor  
of Biology of the Russian Federation,  
Western-Kazakhstan Agrarian-Technical  
University named after Zhargir-khan*

Поступила в редакцию 13.07.2022.

Received on 13.07.2022.

<sup>1</sup> Статья подготовлена при финансовой поддержке Министерства образования Республики Беларусь, ГР № 20201257.

Изучен полиморфизм A > G; Met/Thr (rs10735810/rs2228570). Проведен сравнительный анализ распределения частоты аллелей и генотипов по полиморфизму Met/Thr (rs10735810/ rs2228570) гена рецептора витамина D у детей и подростков со сколиотической деформацией позвоночника и у детей без ортопедической патологии. Во всех исследованных возрастных группах детей, страдающих нарушениями опорно-двигательного аппарата и группе контроля показано соответствие числа наблюдаемых генотипов, теоретически ожидаемым по закону Харди-Вайнберга. В возрастных группах до 5 лет, 6–7 лет наблюдается классическое менделевское распределение генотипов 25:50:25, что соответствует аутосомно-доминантному характеру фенотипического эффекта полиморфизма. Самая высокая доля генотипа AA 0,425 наблюдается в возрасте 8–11 лет, а также 0,284 в возрастной группе дебюта 12–17 лет, что возможно связано с наступлением пубертата.

*Ключевые слова:* генотип; ген рецептора витамина D; деформация позвоночника; полиморфизм; нарушений опорно-двигательного аппарата.

The article studies the polymorphism A > G; Met/Thr (rs10735810/rs2228570). It presents a comparative analysis of arrangement of alleles and genotypes frequency by polymorphism Met/Thr (rs10735810/ rs2228570) of the gene receptor of vitamin D in children and adolescents with scoliotic deformation of spine and in children with no orthopaedic pathology. In all the studied age groups of children with malfunctions of musculoskeletal system and the control group there is correspondence of the amount of observed genotypes, theoretically anticipated by Hardy-Weinberg principle. In the age groups under 5 years old, 6–7 years old, classical Mendel arrangement of genotypes 25:50:25 is observed, which corresponds to autosomal-dominant character of phenotypical effect of the polymorphism. The highest share of the genotype AA 0,425 is observed at the age of 8–11, as well as 0,284 in the age group of debut of 12–17 which is perhaps connected with puberty coming.

*Keywords:* genotype; gen of receptor of vitamin D; deformation of spine; polymorphism; malfunction of musculoskeletal system.

**Введение.** Одним из важнейших факторов формирования здоровьесберегающей образовательной среды является оценка рисков возникновения наиболее частых заболеваний школьного возраста и проведение профилактических мероприятий по их предотвращению. Самой распространенной группой заболеваний детского возраста выступают различные виды патологии опорно-двигательного аппарата (ОДА). По статистическим данным, размещенным на сайте Министерства здравоохранения Республики Беларусь [1], заболеваемость опорно-двигательного аппарата у детского населения за последние 10 лет вышла на ведущие позиции среди заболеваний, приводящих к инвалидности у подростков. Заболевания костно-мышечной системы и соединительной ткани составляют 13,1 % от общей заболеваемости детского населения. Поэтому исследование генетических факторов нарушений опорно-двигательного аппарата с целью разработки индивидуальных мер предупреждения является одним из современных способов решения таких проблем.

Роль генетики в этиопатогенезе подросткового идиопатического сколиоза не ясна. Потенциальными генами-кандидатами, уча-

ствующими в формировании различных нарушений опорно-двигательного аппарата, являются гены, кодирующие белки, вовлеченные в остеогенез и метаболические процессы в костной ткани [2].

Влияние полиморфных вариантов витамина D в развитии нарушений опорно-двигательного аппарата обусловлено, во-первых, его гормоноподобным эффектом на фосфорно-кальциевый обмен, дифференциацию клеток, созревание, активацию и продолжительность жизни остеокластов [3]. Во-вторых, в настоящее время имеются данные в пользу участия витамина D в работе системы иммунитета [4]. Таким образом, рецептор витамина D вовлечен в реализацию практически всех биологических эффектов витамина D [5].

В открытых международных базах генетических данных для гена рецептора витамина D (VDR) задепонировано порядка 200 однонуклеотидных замен, которые потенциально могут влиять на первичную, вторичную и третичную структуру белка и, таким образом изменяя его физические и химические характеристики, воздействовать на его включения в метаболизм костной ткани в целом и развитие особенностей опорно-двигательного аппарата в частности. Ассоциация полиморфных

вариантов гена VDR с метаболическими показателями кальция и уровнем накопления его в кости в пубертатный период доказана в 2005 году в работе Abrams и соавторов [6].

В Нидерландах в течение 4 лет группой исследователей Van der Sluis IM изучена роль BsmI-, ApaI-, TaqI-полиморфных генотипов гена VDR в метаболизме костной ткани у 148 детей и подростков. Фенотипических эффектов для отдельно взятых полиморфизмов установлено не было. Однако был выявлен гаплотип bAT, содержащий аллель T TaqI-VDR, оказывал влияние на рост и размеры позвонков: увеличение числа мутантных аллелей в гаплотипе было ассоциировано с задержкой линейного роста ( $p = 0,006$ ) и задержкой размера позвонков ( $p = 0,001$ ) [7].

Польскими учеными (E. Jakubowska-Pietkiewicz) исследованы BsmI-, FokI-, ApaI- и TaqI-полиморфные варианты гена VDR. Выборка составила 395 детей в возрасте от 6 до 18 лет. В результате установлена связь «а» аллеля ApaI-VDR полиморфного варианта с повышением плотности и минерализации кости у детей, у которых показатель костной минеральной плотности (BMD-Zscore) находился в промежутке от  $-1,1$  до  $-2,0$  SD [8].

В работе S. Seyhan и соавторов у носителей аллеля t и генотипа tt TaqI-VDR полиморфизма показана повышенная частота гиперкальциурии [9].

Полиморфизм A > G; Met/Thr депонирован в международных базах данных как rs10735810 / rs2228570. Частота встречаемости мутантного варианта A у европейского населения составляет примерно 32,85 %. Молекулярный эффект аллеля A rs10735810 на раннее развитие нарушений опорно-двигательного аппарата не изучен. Имеются данные относительно других мутаций этого гена, в которых показана ассоциация редких аллельных вариантов с развитием нарушения метаболизма костной ткани.

В частности, установлено, что при наличии в генотипе аллеля A полиморфизма G63980A, rs1544410 содержание белка рецептора повышено, что снижает, в свою очередь, содержание в крови парашитовидного гормона и сопровождается учащением переломов независимо от плотности костной ткани. Генотип по данному полиморфизму влияет на результативность лечения остеопороза. Наличие аллеля A при полиморфизме G63980A, rs1544410 увеличивает риск пере-

ломов вертебральной и невертебральной локализации. Это позволяет предположить ассоциацию полиморфизма rs10735810/rs2228570 с похожими нарушениями.

*Цель* нашего исследования заключалась в ДНК-типировании полиморфных вариантов Met/Thr (rs10735810/ rs2228570) гена рецептора витамина D в группе детей с нарушениями опорно-двигательного аппарата и у здоровых детей в качестве контроля, а также проведении дальнейшего сравнительного анализа распределения частот аллелей и генотипов для оценки взаимосвязи полиморфизма с развитием нарушений ОДА.

*Материалы и методы.* Материалом для ДНК-типирования послужили 58 образцов волосных луковиц, собранных за период с 2020 по 2021 г. у детей с различными формами сколиоза в возрасте от 6 месяцев до 17 лет.

Дети, страдающие нарушениями ОДА в структуре различных генетических синдромов (4 человека), были исключены из исследования. Первую группу сравнения составили 11 больных с идиопатическим сколиозом в возрасте от 6 месяцев до 5 лет. Во вторую группу сравнения были включены 8 детей в возрасте от 6 до 7 лет. В третью группу вошли 23 ребенка в возрасте 8–11 лет, в четвертую – 12 детей в возрасте 12–17 лет.

Группа контроля состояла из 18 здоровых участников, достигших 18 лет. Допускалось нефиксированное нарушение осанки. Все дети были включены в исследование на основании информированного согласия их официальных представителей. Сбор информации об анамнезе участников проводился на основании медицинских выписок, по месту регистрации либо по месту диспансерного учета.

Выделение ДНК проводили с помощью набора реагентов производства компании «Литех». ДНК-типирование полиморфизма производилось набором реагентов для определения полиморфизма Met/Thr гена VDR NP-473-100 производства Научно-производственной компании Синтол (Российская Федерация). Общая процедура разработана компанией-производителем и стандартна для всех полиморфизмов. Место проведения: научно-исследовательская лаборатория ПЦР анализа Витебского государственного университета имени П. М. Машерова.

*Статистическая обработка данных.* Частоты генотипов определяются методом прямого подсчета.

Относительные частоты аллелей исследуемых генов по формуле (1):

$$Q(A) = (2N_1 + N_2) / 2n, \quad (1)$$

где  $N_1$  – число гомозигот по исследуемому аллелю;

$N_2$  – число гетерозигот;

$n$  – объем выборки [10].

Статистическую ошибку относительных частот аллелей вычисляли по формуле (2):

$$S_Q = \sqrt{(Q(1 - Q) / 2n)}, \quad (2)$$

где  $Q$  – относительная частота исследуемого аллеля;

$n$  – объем выборки [11].

Соответствие фактического распределения генотипов теоретически ожидаемому в соответствии с законом Харди-Вайнберга

оценивается с помощью критерия  $\chi^2$ , формула 3. Число степеней свободы равняется 1 (число генотипов минус число аллелей).

$$\chi^2 = \sum (H_o - H_e)^2 / H_e, \quad (3)$$

где  $H_o$  – наблюдаемые частоты генотипов;

$H_e$  – ожидаемые частоты генотипов.

AA =  $p^2$ ;

AB =  $2pq$ ;

BB =  $q^2$ .

Допустимое значение  $\chi^2$  для одной степени свободы и 5 %-го уровня значимости составляет 3,84 [11].

*Результаты и обсуждение.* Характер распределения генотипов в разных возрастных группах детей, страдающих сколиозом, и контрольной группе оценивался путем расчета теоретически ожидаемых частот по закону Харди – Вайнберга и критерия  $\chi^2$  (таблица 1).

**Таблица 1. – Распределение генотипов в группах детей, страдающих идиопатическим сколиозом, и контрольной группе**

Возраст начала заболевания	$n_{\text{общ}}$	AA		AG		GG		$\chi^{2*}$
		$n_n$	$n_o$	$n_n$	$n_o$	$n_n$	$n_o$	
до 5 лет	10	3	3	4	5	3	3	0,40
6–7 лет	8	2	2	3	4	2	2	0,14
8–11 лет	23	9	10	12	10	2	3	0,52
12–17 лет	16	3	4	10	7	2	3	1,73
Контроль	18	4	5	10	9	4	5	0,22

*Примечание:* \* Отклонение наблюдаемых частот генотипов от теоретически ожидаемых по закону Харди – Вайнберга значимо при  $\chi^2 \geq 3,84$ .

По данным, приведенным в таблице 1, можно отметить, что во всех исследованных возрастных группах детей, страдающих нарушениями опорно-двигательного аппарата, и группе контроля число наблюдаемых генотипов соответствует теоретически ожидаемому по закону Харди – Вайнберга, что свидетельствует в пользу наличия механизмов

компенсации фенотипического эффекта доминантного аллеля А даже в группах детей, страдающих сколиозом.

Далее с целью оценки возможного влияния генотипа AA и AG на развитие нарушений ОДА был проведен анализ частот генотипов в разных возрастных группах к группе контроля.

**Таблица 2. – Относительные частоты аллелей и генотипов в группах детей, страдающих идиопатическим сколиозом, и контрольной группе (%)**

Группа сравнения	$\omega(A)$	$\omega(G)$	$\omega(AA)$	$\omega(AG)$	$\omega(GG)$	P*
до 5 лет	0,500 ± 0,158	0,500 ± 0,158	0,250	0,500	0,250	0,006
6–7 лет	0,500 ± 0,177	0,500 ± 0,177	0,250	0,500	0,250	0,158
8–11 лет	0,652 ± 0,099	0,348 ± 0,099	0,425	0,454	0,121	0,177
12–17 лет	0,533 ± 0,125	0,467 ± 0,125	0,284	0,498	0,218	0,099
Контроль	0,500 ± 0,118	0,500 ± 0,118	0,250	0,500	0,250	0,125

*Примечание:* \*P – расчетный уровень для оценки значимости разности между относительными частотами генотипов в группах больных и здоровых детей. Разность достоверна при P > 0,05.



Как следует из данных таблицы 2, относительная частота аллеля А среди детей, страдающих различными формами нарушений опорно-двигательного аппарата, наиболее высока в группе с дебютом заболевания в возрасте 8–11 лет. Частота аллеля А в этой группе составляет 0,652, что значительно превышает таковую в контрольной группе (0,500). Незначительное повышение частоты А аллеля наблюдается в возрастной группе дебюта 12–17 лет.

Возрастные группы дебюта до 5 лет и 6–7 лет характеризуются полным соответствием контрольной группе, и распределение аллелей А и G в них составляет 0,500.

Полученные данные позволяют предположить, что фенотипический эффект А аллеля, в случае декомпенсации его на уровне генома, наиболее часто проявляется в возрасте с 8 до 17 лет. Вероятно, с началом полового созревания включаются механизмы контроля развития костной ткани, которые контролируются генами рецептора витамина D и другими гормональными компонентами этой генной сети.

Для оценки фенотипического вклада полиморфизма rs10735810/rs2228570 в нарушения ОДА на уровне генотипа, по данным таблицы была построена диаграмма (рисунок).

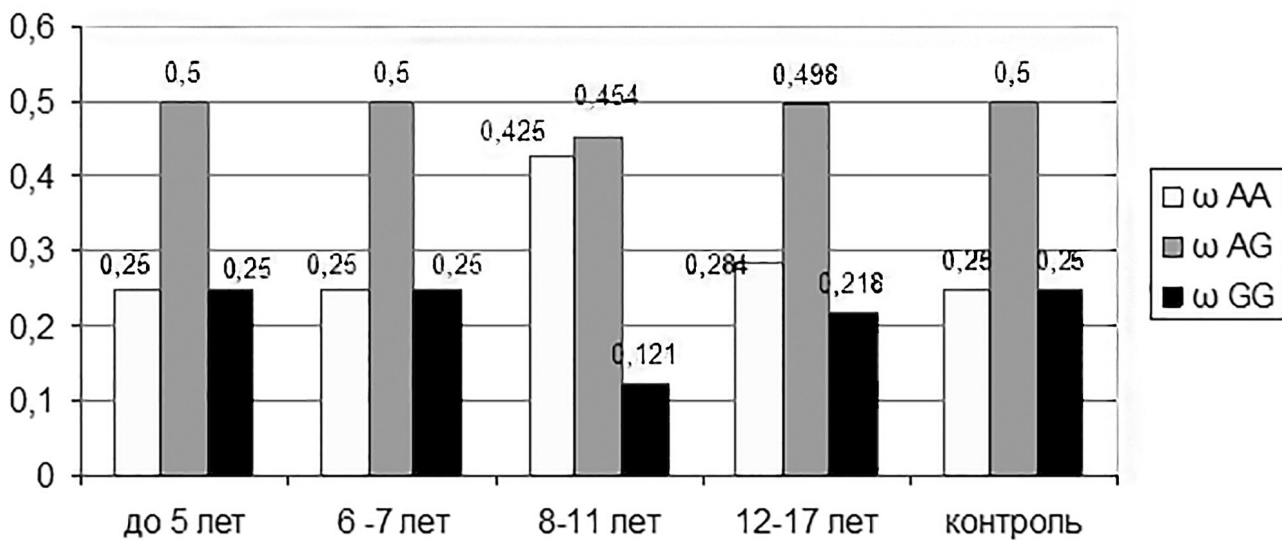


Рисунок. – Частота встречаемости генотипов rs10735810/rs2228570 (%) у детей, страдающих нарушениями ОДА, и в группе контроля

По данным, приведенным на рисунке, можно отметить, что в возрастных группах до 5 лет, 6–7 лет наблюдается классическое менделевское распределение генотипов 25:50:25, что соответствует аутосомно-доминантному характеру фенотипического эффекта полиморфизма. Самая высокая доля генотипа АА 0,425 отмечается в возрасте 8–11 лет, а также 0,284 в возрастной группе дебюта 12–17 лет. Наблюдаемая динамика не достаточна для однозначных выводов по причине небольшого количества участников, тем не менее данная картина позволяет предположить, что в этих возрастных периодах (старт полового созревания) на передний план выступает гормональная функция витамина D и его рецепция и ослабленный аллель на этом фоне

может стать одним из факторов повышенного риска развития сколиоза. Необходимо также учитывать, что дети возрастных групп до 8 лет, которые были здоровы на момент эксперимента и еще не достигли пубертата, вполне могут пополнить группу детей, приобретших нарушения ОДА с достижением пубертатного периода.

**Заключение.** В результате проведенного исследования отмечено, что во всех возрастных группах детей, страдающих нарушениями опорно-двигательного аппарата, и группе контроля число наблюдаемых генотипов соответствует теоретически ожидаемому по закону Харди – Вайнберга, что свидетельствует о компенсации фенотипического эффекта доминантного аллеля А даже в группах детей с нарушениями ОДА. Фено-

типический эффект А аллеля, в случае декомпенсации его на уровне генома, наиболее часто проявляется в возрасте 8–11 лет и с 12 до 17 лет.

Установлено, что в возрастных группах до 5 лет, 6–7 лет наблюдается классическое менделевское распределение генотипов 25:50:25, что соответствует аутосомно-доминантному характеру фенотипического эффекта полиморфизма. Самая высокая доля генотипа АА 0,425 наблюдается в возрасте

8–11 лет, а также 0,284 в возрастной группе дебюта 12–17 лет, что, возможно, связано с наступлением пубертата.

Необходимо отметить также, что малое число участников групп не позволяет рассматривать полученные результаты как статистически значимые. Тем не менее наблюдаемые тенденции представляют определенную ценность и будут исследованы на дальнейших этапах проекта за счет увеличения численности выборки.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Министерство здравоохранения Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://minzdrav.gov.by>. – Дата доступа: 26.06.2022.
2. Congenital and idiopathic scoliosis: clinical and genetic aspects / P. F. Giampietro [et al.] // *Clinical Medicine & Research*. – 2003. – Vol. 1, № 2. – P. 125–136. doi: 10.3121/cm.1.2.125.
3. Molecular Actions of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on genes involved in calcium homeostasis / J. W. Pike [et al.] // *J. of Bone Mineral Research*. – 2007. – Vol. 22. – Issue S 2. – P. 16–19. doi : 10.1359/jbmr.07s207.
4. Hewison, M. Vitamin D and immune function: an overview / M. Hewison // *Proceedings of the Nutrition Society*. – 2011. – Vol. 71. – P. 50–61.
5. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease: A meta-analysis / [L. Xue et al.] // *Inflamm Bowel Dis*. – 2013. – Vol. 19, № 1. – P. 54–60. doi: 10.1002/ibd.22966.
6. Vitamin D receptor Fok1 polymorphisms affect calcium absorption, kinetics, and bone mineralization rates during puberty / [Abrams S. A. et al.] // *J. of Bone Mineral Research*. – 2005. – Vol. 20. – P. 945–953. doi: 10.1359/JBMR.050114.
7. Vitamin D receptor gene polymorphism predicts height and bone size, rather than bone density in children and young adults / [I. M. van der Sluis et al.] // *Calcified tissue international*. – 2003. – Vol. 73, № 4 – P. 332–338. doi: 10.1007/s00223-002-2130-2.
8. Vitamin D receptor gene variability as a factor influencing bone mineral density in pediatric patients / [E. Jakubowska-Pietkiewicz et al.] // *Molecular Biology Reports*. – 2012. – Vol. 39, № 5. – P. 6243–6250. doi: 10.1007/s11033-012-1444-z.
9. Association of vitamin D receptor gene Taq I polymorphism with recurrent urolithiasis in children / [S. Seyhan et al.] // *International Journal of Urology*. – 2007. – Vol. 14. – P. 1060–1062. doi: 10.1111/j.1442-2042.2007.01899.x.
10. Рокицкий, П. Ф. Основы вариационной статистики для биологов / П. Ф. Рокицкий. – Минск : Бел. гос. ун-т, 1961. – 220 с.
11. Современная генетика : в 3 т. / Ф. Айала, Дж. Кайгер. – М. : Мир, 1988. – Т 3. – 335 с.

#### REFERENCES

1. Ministerstvo zdravoochraneniya Respubliki Belarus' [Elektronnyj resurs]. – Rezhim dostupa: <http://minzdrav.gov.by>. – Data dostupa: 26.06.2022.
2. Congenital and idiopathic scoliosis: clinical and genetic aspects / P. F. Giampietro [et al.] // *Clinical Medicine & Research*. – 2003. – Vol. 1, № 2. – P. 125–136. doi: 10.3121/cm.1.2.125.
3. Molecular Actions of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on genes involved in calcium homeostasis / J. W. Pike [et al.] // *J. of Bone Mineral Research*. – 2007. – Vol. 22. – Issue S 2. – P. 16–19. doi : 10.1359/jbmr.07s207.
4. Hewison, M. Vitamin D and immune function: an overview / M. Hewison // *Proceedings of the Nutrition Society*. – 2011. – Vol. 71. – P. 50–61.
5. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease: A meta-analysis / [L. Xue et al.] // *Inflamm Bowel Dis*. – 2013. – Vol. 19, № 1. – P. 54–60. doi: 10.1002/ibd.22966.
6. Vitamin D receptor Fok1 polymorphisms affect calcium absorption, kinetics, and bone mineralization rates during puberty / [Abrams S. A. et al.] // *J. of Bone Mineral Research*. – 2005. – Vol. 20. – P. 945–953. doi: 10.1359/JBMR.050114.
7. Vitamin D receptor gene polymorphism predicts height and bone size, rather than bone density in children and young adults / [I. M. van der Sluis et al.] // *Calcified tissue international*. – 2003. – Vol. 73, № 4 – P. 332–338. doi: 10.1007/s00223-002-2130-2.
8. Vitamin D receptor gene variability as a factor influencing bone mineral density in pediatric patients / [E. Jakubowska-Pietkiewicz et al.] // *Molecular Biology Reports*. – 2012. – Vol. 39, № 5. – P. 6243–6250. doi: 10.1007/s11033-012-1444-z.
9. Association of vitamin D receptor gene Taq I polymorphism with recurrent urolithiasis in children / [S. Seyhan et al.] // *International Journal of Urology*. – 2007. – Vol. 14. – P. 1060–1062. doi: 10.1111/j.1442-2042.2007.01899.x.
10. Rokickij, P. F. Osnovy variacionnoj statistiki dlya biologov / P. F. Rokickij. – Minsk : Bel. gos. un-t, 1961. – 220 s.
11. Sovremennaya genetika : v 3 t. / F. Ajala, Dzh. Kajger. – M. : Mir, 1988. – T 3. – 335 s.