

УДК 575.113.02:616.711.007.55-053.2-001.8

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА –13910 C>T ГЕНА ЛАКТАЗЫ LCT У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ СО СКОЛИОТИЧЕСКОЙ ДЕФОРМАЦИЕЙ ПОЗВОНОЧНИКА

Е.В. Белая*, Г.Г. Пирханов**, С.А. Подберезко*, И.С. Бейшова***, К.Г. Бобровская*,
П.Ю. Колмаков**, А.М. Ковальчук***

**Учреждение образования «Белорусский государственный педагогический
университет имени Максима Танка»*

***Учреждение образования «Витебский государственный
университет имени П.М. Машерова»*

****Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана
(Уральск, Казахстан)*

Актуальность исследования обусловлена тем, что, с одной стороны, сохранение и укрепление здоровья подрастающего поколения является приоритетной задачей Республики Беларусь, с другой – на фоне возрастающей школьной нагрузки, неправильного рациона питания, малоподвижного образа жизни и влияния неблагоприятных экологических факторов – каждый год увеличивается количество детей с различными видами нарушений опорно-двигательного аппарата и одну из лидирующих позиций занимает идеопатический сколиоз.

Цель исследования: провести сравнительный анализ распределения частоты аллелей и генотипов по полиморфизму –13910 C>T гена лактазы у детей и подростков со сколиотической деформацией позвоночника и у детей без ортопедической патологии, проанализировать взаимосвязь исследованных молекулярно-генетических маркеров с развитием сколиоза.

Материал и методы. Генотипировано 58 образцов биологического материала детей с различными формами сколиоза в возрасте от 6 месяцев до 17 лет. Группа контроля составила 18 человек, достигших 18-летия без нарушений опорно-двигательного аппарата. ДНК-типирование проведено методом ПЦР РТ с применением коммерческих наборов.

Результаты и их обсуждение. Установлены генотипы 76 человек по полиморфным вариантам гена лактазы LCT на носительство полиморфизма –13910 C>T (rs4988235), ассоциированного с молочной непереносимостью. В 4-х возрастных группах (до 5 лет, 6–7, 8–11 и 12–17 лет) и группе контроля рассчитаны частоты генотипов, наблюдаемые и ожидаемые по закону Харди–Вайнберга, относительные частоты аллельных вариантов.

Заключение. Установленное во всех возрастных группах детей, страдающих нарушениями опорно-двигательного аппарата, и группе контроля соответствие числа наблюдаемых генотипов теоретически ожидаемому по закону Харди–Вайнберга свидетельствует о компенсации фенотипического эффекта аллеля С даже в группах детей, страдающих сколиозом. Фенотипический эффект С аллеля, в случае декомпенсации его на уровне генома, наиболее часто проявляется в возрасте до 5 лет, а также в возрасте 6–11 лет.

Ключевые слова: генотип, лактоза, деформация позвоночника, полиморфизм, нарушения опорно-двигательного аппарата.

THE STUDY OF POLYMORPHISM –13910 C>T OF THE LCT LACTASE GENE OF CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH SCOLIOTIC SPINAL DEFORMITY

E.V. Belaya*, G.G. Pirkhanov**, S.A. Podberezko*, I.S. Baishova***, K.G. Bobrovskaya*,
P.Yu. Kolmakov**, A.M. Kovalchuk***

**Education Establishment “Maxim Tank Belarusian State Pedagogical University”*

***Education Establishment “Vitebsk State P.M. Masherov University”*

****Zhangir Khan West Kazakhstan Agrarian Technical University (Uralsk, Kazakhstan)*

The relevance of the study is due to the fact that, on the one hand, the preservation and strengthening of the health of the younger generation is a priority task of the Republic of Belarus, on the other hand, against the background of increasing school workload,

improper diet, sedentary lifestyle and the influence of adverse environmental factors, the number of children with various types of musculoskeletal disorders increases every year and one of the leading positions is occupied by ideopathic scoliosis.

The purpose of the study is to conduct a comparative analysis of the frequency distribution of alleles and genotypes according to polymorphism –13910 C>T of the lactase gene of children and adolescents with scoliotic spinal deformity and of children without orthopedic pathology and to analyze the relationship of the studied molecular genetic markers with the development of scoliosis.

Material and methods. 58 samples of biological material of children with various forms of scoliosis aged from 6 months to 17 years old were analyzed. The control group consisted of 18 people who reached the age of 18 without disorders of the musculoskeletal system. DNA typing was carried out by RT PCR using commercial kits.

Findings and their discussion. The genotypes of 76 people were identified according to polymorphic variants of the LCT lactase gene for the carriage of polymorphism –13910 C>T (rs4988235) associated with milk intolerance. In 4 age groups (up to 5 years old, 6–7, 8–11 and 12–17 years old) and the control group, the frequencies of genotypes observed and expected according to the Hardy–Weinberg law, the relative frequencies of allelic variants were calculated.

Conclusion. The correspondence of the number of observed genotypes, theoretically expected according to the Hardy–Weinberg law, established in all age groups of children suffering from disorders of the musculoskeletal system and the control group, indicates compensation for the phenotypic effect of the C allele even in groups of children suffering from scoliosis. The phenotypic effect of the allele, in the case of its decompensation at the genome level, is most often manifested at the age of 5 years old, as well as at the age of 6–11 years old.

Key words: genotype, lactose, spinal deformity, polymorphism, disorders of the musculoskeletal system.

Актуальность исследования обусловлена тем, что, с одной стороны, сохранение и укрепление здоровья подрастающего поколения является приоритетной задачей Республики Беларусь, с другой – на фоне возрастающей школьной нагрузки, неправильного рациона питания, малоподвижного образа жизни и влияния неблагоприятных экологических факторов – каждый год увеличивается количество детей с различными видами нарушений опорно-двигательного аппарата и одну из лидирующих позиций занимает идиопатический сколиоз. По официальным данным 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.

На основании вышесказанного становится очевидной необходимость исследования генетических факторов развития заболеваний опорно-двигательного аппарата в детском и подростковом возрасте для разработки способов ранней оценки рисков их возникновения и профилактики в условиях здоровьесберегающей образовательной среды.

Роль генетики в этиопатогенезе подросткового идиопатического сколиоза неясна [2].

В качестве генов-кандидатов, вносящих определенный вклад в формирование деформаций позвоночника, рассматриваются гены, продукты которых вовлечены в процессы костного метаболизма и остеогенеза. К этой группе генов относится ген лактазы *LCT*.

Ген *LCT* кодирует фермент лактазу, принадлежит к семейству β-галактозидаз и экспрессируется в основном в энтероцитах ворсинок слизистой оболочки в тонком кишечнике. Этот фермент катализирует распад дисахарида лактозы (молочного сахара) до галактозы и глюкозы [3].

У большинства млекопитающих после прекращения грудного вскармливания наблюдаются снижение активности лактазы и непереносимость лактозы, что является нормальным состоянием. Однако у человека порядка 10 000 лет назад появилась мутация –13910 C>T, которая позволила усваивать лактозу на протяжении всей жизни. Дефицит же лактазы приводит к непереносимости лактозы и рассматривается как патологическое состояние.

В ряде исследований изучалась ассоциация полиморфизма гена лактазы (*LCT*, C/T-13910) с минеральной плотностью кости (BMD) и риском переломов. Показано, что лактазная непереносимость является одним из путей развития склонности к остеопорозу и остеоартрозу [4; 5].

Цель исследования: провести сравнительный анализ распределения частоты аллелей и генотипов по полиморфизму –13910 C>T гена лактазы у детей и подростков со сколиотической деформацией позвоночника и у детей без ортопедической патологии; проанализировать взаимосвязь исследованных молекулярно-генетических маркеров с развитием сколиоза.

Материал и методы. В период с 2020 по 2021 год нами было собрано 58 образцов биологического материала детей с различными формами сколиоза в возрасте от 6 месяцев до 17 лет. Группа детей и

подростков с установленными заболеваниями опорно-двигательного аппарата формировалась в виде рандомной выборки детей в возрасте от 5 до 17 лет с медицинским подтвержденным диагнозом ($n=58$).

Дети, имеющие сколиотическую деформацию позвоночника в структуре различных генетических синдромов, были исключены из исследования (4 человека). 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 участников, достигших 18-летия без признаков деформации позвоночника (допускалось нефиксированное нарушение осанки).

Все исследуемые приняли участие в проекте на основании информированного согласия их официальных представителей. Сбор анамнеза проводился на основании предоставляемых справок из медицинского учреждения.

Материалом для исследования послужили образцы волосяных луковиц. Контрольная группа набиралась среди здоровых по профилю опорно-двигательного аппарата студентов I курса ($n = 18$) БГПУ.

Выделение ДНК проводили с помощью набора реагентов производства компании «Литех».

ДНК-типирование полиморфизма гена лактозы (*LCT*) осуществлялось методом ПЦР в реальном времени с применением коммерческих наборов производства компании Литех (РФ). Общая процедура разработана компанией-производителем и стандартна для всех полиморфизмов.

Статистическая обработка данных. Частоты генотипов определяются методом прямого подсчета.

Относительные частоты аллелей исследуемых генов рассчитаны 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 [6].

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

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

где Q – относительная частота исследуемого аллеля;

n – объем выборки [7].

Соответствие фактического распределения генотипов теоретически ожидаемому по закону Харди–Вайнберга оценивается с помощью критерия χ^2 . 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 χ^2 для одной степени свободы и 5%-ного уровня значимости составляет 3,84 [7].

Результаты и их обсуждение. Для оценки характера распределения генотипов в разных возрастных группах детей, страдающих сколиозом, и контрольной группе была произведена оценка соответствия числа наблюдаемых генотипов теоретически ожидаемым по закону Харди–Вайнберга. Результаты отражены в табл. 1.

По данным, приведенным в табл. 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 позволяет предположить наличие механизмов компенсации фенотипического эффекта доминантного аллеля *S* даже в группах детей, страдающих сколиозом.

Таблица 1

Распределение генотипов в группах детей, страдающих идиопатическим сколиозом, и контрольной группе

Возраст начала заболевания	n _{общ}	ТТ		ТС		СС		χ ²
		n _н	n _о	n _н	n _о	n _н	n _о	
до 5 лет	11	1	2	7	5	3	4	0,36
6–7 лет	8	2	3	5	4	1	2	0,08
8–11 лет	23	5	6	13	12	5	6	0,11
12–17 лет	12	5	5	5	6	2	2	0,03
Контроль	18	6	7	10	9	2	3	0,13

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

Далее с целью оценки возможного влияния генотипов СТ и СС на развитие нарушений ОДА был проведен анализ частот генотипов в разных возрастных группах и группе контроля.

Таблица 2

Относительные частоты аллелей и генотипов в группах детей, страдающих идиопатическим сколиозом, и контрольной группе (%)

Возраст начала заболевания	ω(T)	ω(C)	ω(ТТ)	ω(ТС)	ω(СС)	P*
до 5 лет	0,41±0,04	0,59±0,04	9,1	63,6	27,3	0,0801
6–7 лет	0,56±0,06	0,44±0,06	25,0	62,5	12,5	0,7430
8–11 лет	0,50±0,02	0,50±0,02	21,7	56,5	21,7	0,3187
12–17 лет	0,63±0,04	0,38±0,04	41,7	41,7	16,7	0,9141
Контроль	0,61±0,03	0,39±0,03	33,3	55,6	11,1	–

Примечание: P – расчетный уровень значимости для оценки вероятности значимости разности между относительными частотами генотипов в группе сравнения и контрольной группе. Разность между группами достоверна при P > 0,95.

Как следует из данных табл. 2, относительная частота аллеля С среди детей, страдающих различными формами нарушений опорно-двигательного аппарата, наиболее высока в возрастной группе до 5 лет. Частота аллеля С в этой группе составляет 0,59, что значительно превышает таковую в контрольной группе (0,39).

Следующие возрастные группы 6–7 и 8–12 лет также характеризуются превышением относительной частоты аллеля С по сравнению с контрольной. В них частота аллеля С составляет 0,44, 0,50 и 0,39 соответственно.

Интерес представляет результат возрастной группы 12–17 лет, которая характеризуется возрастным скачком роста и повышенным воздействием внешних факторов на опорно-двигательный аппарат в целом и позвоночник в частности. Показано, что в данной возрастной группе относительная частота аллеля С практически равна таковой в контрольной группе и составляет 0,38.

Полученные данные позволяют предположить, что фенотипический эффект С аллеля, в случае декомпенсации его на уровне генома, наиболее часто проявляется в возрасте до 5 лет, а также в возрасте 6–11 лет. Вероятно, с началом полового созревания включаются механизмы контроля развития костной ткани, которые компенсируют сниженную усвояемость кальция из молочных продуктов несмотря на активный рост детского организма и повышение его потребности в данном микроэлементе.

Для оценки фенотипического вклада полиморфизма rs4988235 в нарушения ОДА на уровне гено-типа по данным табл. 2 была построена диаграмма (рис.).

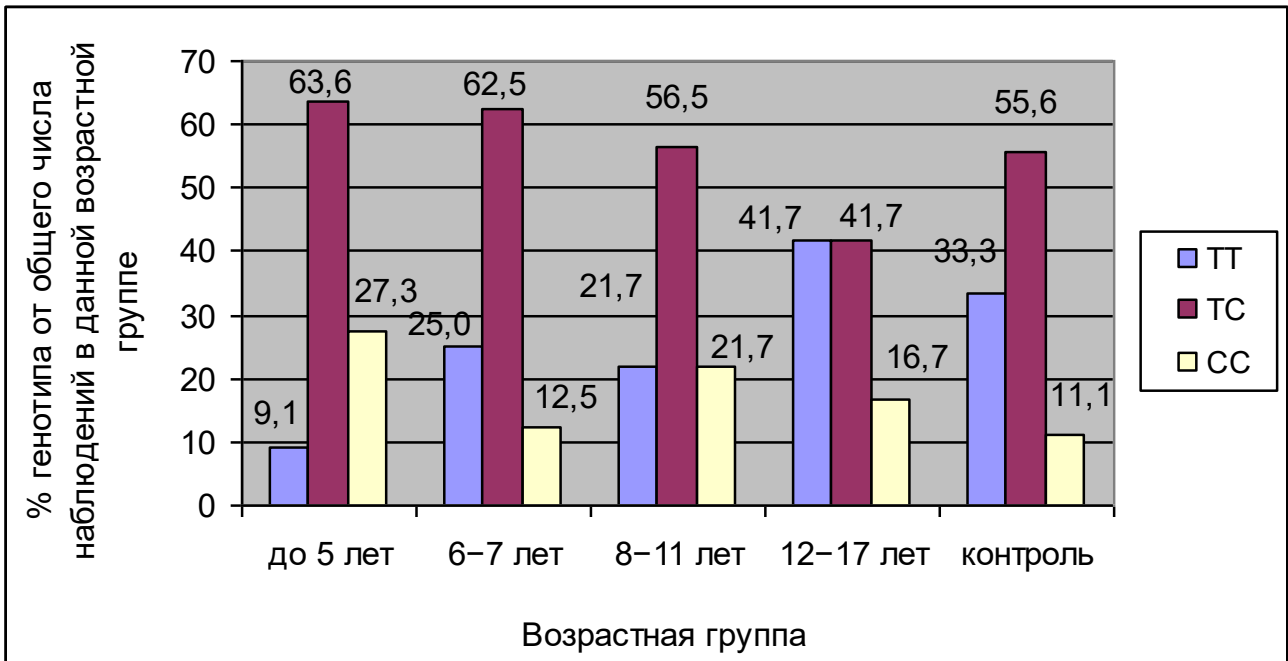


Рис. Частота встречаемости генотипов rs 4988235 (%) у детей, страдающих нарушениями ОДА, и в группе контроля

Данные, приведенные в диаграмме (рис.), свидетельствуют, что в возрастной группе до 5 лет наблюдается самая высокая доля генотипа CC по сравнению со всеми другими исследованными группами. Так, в группе до 5 лет доля генотипа CC достигает 27,3%, в то время как в группах 6–7, 8–11 лет и контроле это значение составляет 12, 21,7 и 16,7% соответственно. Таким образом, доля генотипа CC в группе детей, у которых нарушения ОДА проявились в возрасте до 5 лет, почти в 2,5 раза выше по сравнению с контрольной группой лиц без патологии, достигших 18-летия. Полученные данные позволяют предположить, что гомозиготный генотип CC вносит определенный вклад в формирование нарушений ОДА в раннем возрасте до 5 лет.

Доля гетерозиготных генотипов в группах детей, страдающих различными нарушениями ОДА, практически равна во всех возрастных группах и группе контроля. Это позволяет предположить рецессивный характер фенотипического эффекта полиморфизма rs 4988235 на признак раннего развития нарушений ОДА у детей и подростков.

Заключение. В результате проведенного исследования отмечено, 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 о компенсации фенотипического эффекта доминантного аллеля С даже в группах детей, страдающих сколиозом. Фенотипический эффект С аллеля, в случае декомпенсации его на уровне генома, наиболее часто проявляется в возрасте до 5 лет, а также в возрасте 6–11 лет.

Доля генотипа CC в группе детей, у которых нарушения ОДА проявились в возрасте до 5 лет, почти в 2,5 раза выше по сравнению с контрольной группой лиц без патологии, достигших 18-летия, что говорит в пользу определенного вклада гомозиготного генотипа CC в формирование нарушений ОДА в раннем возрасте до 5 лет.

Практически равная во всех возрастных группах детей, страдающих различными нарушениями ОДА, и группе контроля доля гетерозиготных генотипов наводит на мысль о рецессивном характере фенотипического эффекта полиморфизма rs 4988235 на признак раннего развития нарушений ОДА у детей и подростков.

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 в дальнейших этапах проекта за счет увеличения численности выборок.

Статья подготовлена при финансовой поддержке Министерства образования Республики Беларусь, ГР № 20201257.

ЛИТЕРАТУРА

1. <http://minzdrav.gov.by>.
2. Giampietro, P.F. Congenital and idiopathic scoliosis: clinical and genetic aspects / P.F. Giampietro, R.D. Blank, L.R. Cathleen [et al.] / Clin. Med. Res. – 2003. – Vol. 1, № 2. – P. 125–136. – Doi: 10.3121/cm.1.2.125.
3. Mantei, N. Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implications for biosynthesis, membrane anchoring and evolution of the enzyme / N. Mantei, M. Villa, T. Enzler, H. Wacker, W. Boll, P. James, W. Hunziker, G. Semenza // The EMBO Journal. – 1988. – Vol. 7, № 9. – P. 2705–2713.
4. Olds, L.C. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element / L.C. Olds, E. Sibley // Hum. Mol. Genet. – 2003. – Vol. 12, № 18. – P. 2333–2340.
5. Cilli, K. School screening for scoliosis in Sivas, Turkey / K. Cilli, G. Tezeren, T. Taş [et al.] // Acta Orthoptraumatol Turc. – 2009. – Vol. 43. – P. 426–443.
6. Рокицкий, П.Ф. Основы вариационной статистики для биологов / П.Ф. Рокицкий. – Минск: БГУ, 1961.
7. Айала, Ф. Современная генетика: в 3 т. / Ф. Айала, Дж. Кайгер. – М.: Мир, 1988. – Т. 3. – 335 с.

REFERENCES

1. <http://minzdrav.gov.by>.
2. Giampietro, P.F. Congenital and idiopathic scoliosis: clinical and genetic aspects / P.F. Giampietro, R.D. Blank, L.R. Cathleen [et al.] / Clin. Med. Res. – 2003. – Vol. 1, № 2. – P. 125–136. – Doi: 10.3121/cm.1.2.125.
3. Mantei, N. Complete primary structure of human and rabbit lactase-phlorizin hydrolase: implications for biosynthesis, membrane anchoring and evolution of the enzyme / N. Mantei, M. Villa, T. Enzler, H. Wacker, W. Boll, P. James, W. Hunziker, G. Semenza // The EMBO Journal. – 1988. – Vol. 7, № 9. – P. 2705–2713.
4. Olds, L.C. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element / L.C. Olds, E. Sibley // Hum. Mol. Genet. – 2003. – Vol. 12, № 18. – P. 2333–2340.
5. Cilli, K. School screening for scoliosis in Sivas, Turkey / K. Cilli, G. Tezeren, T. Taş [et al.] // Acta Orthoptraumatol Turc. – 2009. – Vol. 43. – P. 426–443.
6. Rokitski P.F. *Osnovy variatsionnoi statistiki dlia biologov* [Basics of Variation Statistics for Biologists], Minsk: BGU, 1961.
7. Aiala F., Keiger J. *Sovremennaya genetika v 3 t.* [Contemporary Genetics: in 3 Volumes], M.: Mir, 1988, (3), 335 p.

Поступила в редакцию 24.05.2022

Адрес для корреспонденции: e-mail: kolyuchka005@rambler.ru – Белая Е.В.