

УДК 616.71+577.21

¹ А.М. Айткулова, ^{1,2} А.Р. Акильжанова, ² Ж.М. Абилова, ³ З.С. Жуматова, ⁴ Г.А. Акильжанова¹РГП «Национальный центр биотехнологии» г. Астана,² АО «Назарбаев Университет» г. Астана,³№1 Городская поликлиника, г. Павлодар,⁴Центр перинатологии, г. Павлодар

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ALDH7A1 НА МИНЕРАЛЬНУЮ ПЛОТНОСТЬ КОСТНОЙ ТКАНИ И РАЗВИТИЕ ОСТЕОПОРОЗА У ЖЕНЩИН КАЗАХСТАНА

Аннотация

Остеопороз (ОП) характеризуется прогрессирующим снижением количества костного вещества в единице объема кости. Ацетальдегиддегидрогеназа может ингибировать пролиферацию остеобластов и снижать формирование костной ткани. В связи с этим несомненный интерес представляет изучение ассоциации полиморфизма гена ALDH7A1 с ОП среди женщин Казахстана. В исследование были включены 419 женщин в возрасте 21-84 лет, проходивших обследование в поликлиниках г. Павлодара и клинике КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова, г. Алматы. Всем участницам проведено определение минеральной плотности костей методом DEXA. Геномную ДНК выделяли из цельной крови. Генотипирование проводили с методом Real-time PCR с использованием специфических зондов TaqMan® SNP Genotyping Assay. По результатам МПКТ женщины были разделены на 2 группы: с низкой МПКТ (группа 153 остеопении и 76 остеопороз) и нормальной МПКТ (группа контроля, n=190). Анализ данных генотипирования показал достоверную ассоциацию (OR=1.7, С.И.= [1.57-5.02], p=0.0004) с риском развития ОП среди казашек, также выявил преобладание мутантного -29.2% генотипа в группе с ОП среди русских женщин, что говорит о связи с низкой МПКТ в данной группе. Таким образом, можно предположить, что ALDH7A1 является потенциальным генетическим маркером, способствующим риску развитию ОП и низкой МПКТ среди женщин Казахстана.

Ключевые слова: остеопороз, минеральная плотность костной ткани, генетический полиморфизм, ген ALDH7A1, женщины.

Введение

Хорошо известно, что остеопороз представляет большую социальную и медицинскую проблему для общества, потому что до появления первых переломов у больных не бывает почти никаких симптомов заболевания или боли. Социальная значимость изучения проблемы остеопороза определяется высокой частотой встречаемости данного заболевания и тяжестью его протекания.

Остеопороз по данным Всемирной Организации Здравоохранения вышел по значимости на четвертое место среди неинфекционных заболеваний после сердечно-сосудистой, онкологической патологии и диабета. В среднем до 40% женщин постменопаузального периода переносят, по крайней мере, один остеопорозный перелом [1]. В течение года после наиболее тяжелых переломов, например, шейки бедра, умирает каждый пятый больной, а из оставшихся в живых 50% пациентов становятся инвалидами.

В результате многочисленных эпидемиологических исследований было показано, что патогенез остеопороза на 15-25% обусловлен воздействием факторов окружающей среды и на 75-85% генетической предрасположенностью [2,3].

В ходе исследований, посвященных выяснению наследственных причин остеопороза, был идентифицирован ряд генов-кандидатов, которые можно разделить на пять основных категорий: (1) гены ответственные за гомеостаз кальция; (2) гены, мутации в которых приводят к гормональной дисфункции; (3) гены, белковые продукты которых входят в матрикс костной ткани; (4) гены ответственные за липопротеиновый обмен и (5) гены ответственные за метаболизм и регуляцию остеобластов и остеокластов [4].

Предполагается, что низкая минеральная плотность костей (МПКТ) и развитие остеопороза вызывается недостаточной или несбалансированной работой этих генов, число которых на данный момент исчисляется более чем тремя десятками, однако роль каждого гена в этиологии заболевания определена недостаточно четко [3,5]. Одним из таких генов является ген фермента ацетальдегиддегидрогеназы 1 типа (ALDH7A1).

Ген ALDH7A1 кодирует фермент суперсемейства ацетальдегид дегидрогеназы, который катализирует окисление различных альдегидов и субстратов. Эти ферменты играют особенно важную роль в защите клеток от токсичных веществ, о чем свидетельствует тот факт, что мутации и полиморфизмы в гене ALDH приводят к нарушениям процесса метаболизма альдегида и являются молекулярной основой предрасположенности к некоторым заболеваниям и нарушению обмена веществ [6,7]. Ацетальдегид, как было показано, ингибирует пролиферацию остеобластов и уменьшает образование костной ткани [8]. Имеются работы, где выявлена взаимосвязь ALDH7A1 с метастазом костей при раке. В работе предполагается, что ALDH7A1 влияет на процессы костной колонизации в процесс остеогенеза [9]. Кроме того, предыдущие исследования выявили, что полиморфизм гена ALDH2, другой член семейства ацетальдегид дегидрогеназы в значительной степени связан с остеопорозом [10]. Также полногеномный анализ ассоциации 11 568 лиц китайской и кавказской популяций, выявил что не смотря на межэтнические и межпопуляционные различия полиморфизм rs13182402 гена ALDH7A1, связан с переломом бедра остеопорозом и низкой МПКТ [11].

Поскольку ген ALDH7A1 является относительно новым маркером остеопороза, несомненный интерес

представляет изучение ассоциации полиморфизма гена ALDH7A1 с ОП среди женщин Казахстана.

Материалы и методы

Исследование было проведено с согласия Локальной этической комиссии РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК (выписка из протокола №2 от 12.03.12 г.). В исследование были включены 419 практически здоровых женщин в возрасте 21-84 лет, прошедшие обследование в поликлиниках г. Павлодара - 339 женщин и клинике КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова, г.Алматы - 80 женщин. Всем участницам объяснялись цель и задачи планируемого исследования, после чего они подписывали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Для оценки влияния факторов образа жизни разработаны специальные карты - анкеты, по которым все участницы были опрошены. Критерием исключения из исследования являлась сопутствующая патология, приводящая к развитию вторичного ОП.

Всем участникам проводилось определение минеральной плотности костей (МПКТ) методом DEXA – двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия. Исследования МПКТ поясничного отдела позвоночника были выполнены на двухэнергетическом рентгеновском денситометре QDR-4500/C (Hologic, США) на базе Областного диагностического центра г.Павлодара и на аппарате Comract-Diagnost фирмы Phillips на базе клиники КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова, г.Алматы. Диагностику остеопорозных состояний осуществляли согласно рекомендациям ВОЗ по Т-критерию. Результаты денситометрии выявили здоровых (Т-критерий>-1), женщин с остеопенией Т-критерий {-1;-2}, женщины с остеопорозом Т-критерий {-2;-3}.

По результатам МПКТ женщины были разделены на 2 группы: с низкой МПКТ (группа исследования 153 женщин с остеопенией и 76 с остеопорозом) и нормальной МПКТ (группа контроля, 190 женщин).

Забор крови производился в количестве 9 мл в специальные стерильные пробирки-вакутайнеры. Плазму и сыворотку крови отделяли для последующих биохимических исследований и хранили при (-80 °С) до анализа.

ДНК была выделена из венозной крови с использованием Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega, USA) в соответствии с протоколами

производителя с некоторой модификацией. Выделенную ДНК хранили в холодильной камере при температуре (-80 °С) до анализа. Количественно концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop1000.

Генотипирование проводили с методом Real-time PCR с использованием специфических зондов TaqMan® SNP Genotyping Assay.

Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводился с использованием пакета программ BioRad CFX Manager и TaqMan Genotyper Software.

Статистический анализ был проведен с помощью программы SPSS v.19.0. С помощью критерия χ^2 было определено соответствие частот встречаемости аллелей закону Харди-Вайнберга. Оценку достоверности различий по частотам генотипов между группами проводили по критерию χ^2 . Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для описания относительного риска развития заболевания online калькулятором <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. рассчитывали отношение шансов (OR). Как отсутствие ассоциации рассматривали OR=1, как положительную ассоциацию – OR>1 и OR<1– как отрицательную ассоциацию аллеля или генотипа с заболеванием (пониженный риск развития патологии). Доверительный интервал (CI) представляет собой интервал значений, в пределах которого с вероятностью 95% находится ожидаемое значение OR.

Результаты и обсуждение

В ходе обследования всех женщин по данным денситометрии сформированы две группы: группа с низкой МПКТ – 153 женщины с остеопенией, 76 женщин – с остеопорозом (средний возраст 57.3 ± 9.8 года), и женщины с нормальной МПКТ – группа контроля 190 человек, (средний возраст 42,5 ± 13.4 года).

Исследуемая и контрольная группы существенно отличались друг от друга по этническому происхождению ($p < 0,01$): 60.7% случаев имели азиатское и 39.3% имели европейское происхождения, в то время как в контрольной группе 42.3% имели азиатское происхождение и 57.7% - европейское происхождение. По сравнению с контрольной группой, группа женщин с остеопенией имела более высокое количество родов. В этой группе возраст наступления менархе и менопаузы был старше.

Таблица 1.

Клинико-лабораторная характеристика обследованных групп.

Параметры	Группа исследования, N = 229 n (%)	Контроль, N= 190 n (%)	p - значение
Возраст (лет)	57.3 ± 9.8 ^a	42,5 ± 13.4	<0.001
Этническое происхождение	Азиатское	139 (60.7)	80 (42.3)
	Европейское	90 (39.3)	110 (57.7)
			<0.01
Вес (kg)	66.7 ± 13.3	73.8 ± 13.6	0.34
Рост (m)	162.7 ± 6.2	160.4 ± 6.8	0.40
ИМТ/BMI (kg/m ²)	28.6 ± 5.2	25.3 ± 5.1	0.94
Курение	Да	27 (8.6)	41 (6.8)
	Нет	288 (91.4)	563 (93.2)
			0.397
Алкоголь	Да	14 (4.4)	35 (5.8)
	Нет	301 (95.6)	569 (94.2)
			0.387
Возраст наступления менархе	13.0 ± 1.0	12.8 ± 0.9	0.001
Количество родов	4.2 ± 2.6	3.0 ± 2.4	0.001
Возраст наступления менопаузы	48.2 ± 4.6	47.4 ± 5.0	0.03

Группа остеопении имела менее высокий вес и индекс массы тела относительно группы контроля, но разница была не значительной. Значительные различия существовали между исследуемой и контрольной группами по следующим характеристикам: возраст наступления менархе ($13,0 \pm 1,0$ лет по сравнению с $12,8 \pm 0,9$ лет), количество родов ($4,2 \pm 2,6$ по сравнению с $3,0 \pm 2,4$), а также возраст наступления менопаузы ($48,2 \pm 4,6$ лет по сравнению с $47,4 \pm 5,0$ лет). Никаких существенных различий не было

найдено между исследуемой и контрольной группами с точки зрения пропорции женщин употребляющих алкоголь (4,4% против 5,8%), курение (8,6% против 6,8%).

Биохимические исследования были проведены в лаборатории Университета г. Нагасаки (Япония).

Диетический и метаболический статус исследуемых групп анализировали путем определения уровня витамина B12, фолиевой кислоты, гомоцистеина, альбумина, креатинина, CRP, и кальция (таблица 2).

Таблица 2.

Биохимические данные.

Биохимические данные ^b	Группа исследования, N = 229 n (%)	Контроль, N= 190 n (%)	p-значение
Альбумин (g/dL)	4,3	4,6	0.004
Креатинин (mg/dL)	0,8	0,5	0.000
HDL-C (mg/dL)	44,0	54,0	0.000
LDL-C (mg/dL)	81,0	87,0	0.928
TG (mg/dL)	85,0	81,5	0.733
logTG	1,9	1,9	0.754
Ca (mg/dL)	9,1	9,5	0.808
HCY (nmol/mL)	16,2	14,5	0.011
VB12 (pg/mL)	301,0	323,0	0.076
FA (ng/mL)	2,8	2,9	0.019
CRP (mg/dL)	0,2	0,1	0.002
Лептин (ng/mL)	13,1	11,4	0.142
Адипонектин(mg/mL)	11,9	11,6	0.621
TC (mg/dL)	148,2	160,5	0.004
TC/HDL	3,6	3,0	<0.001
LDL/HDL	2,1	1,6	<0.001

Примечания:

1. b Все значения являются медианой.
2. Различия между случай-контроль парами по средним значениям были рассчитаны с помощью парного *t*-критерия Стьюдента.
3. Различия между случай-контроль парами по медианным значениям были рассчитаны с помощью U теста Манна-Уитни.
4. Различия между случай-контроль парами по дискретным переменным были рассчитаны с помощью теста χ^2 .

Как и ожидалось, значительно низкие уровни альбумина и более высокие уровни креатинина и C реактивного белка были обнаружены в группе остеопении по сравнению с контрольной группой, тогда как уровень витамина B12 и кальция значительно не различались в обеих группах. Отмечался дефицит фолиевой кислоты в обеих группах и гипергомоцистеинемия в группе исследования.

Липидный профиль показал значительно более низкие уровни HDL-C, и высокие TC/HDL и LDL/HDL соотношения, несмотря на снижение уровня общего холестерина в исследуемой группе по сравнению с контрольной группой. Отмечались относительно высокие уровни триглицеридов, но эти различия не были статистически значимыми. Никаких различий не было отмечено по уровням лептина и адипонектина между двумя группами.

Исследование полиморфизма rs13182402 гена ALDH7A1 среди казахстанских женщин показало, что в общей группе обследованных женщин мутантный аллель

AA наиболее часто встречался в группе с остеопенией и остеопорозом - среди казашек и русских – 37.5% и 29.2%, когда в группе с нормальной МПКТ 18.4% и 20.5% соответственно. В третьей группе куда вошли украинки, немки, татарки, азербайджанка, еврейка, авар, таджичка, болгарка, полька и башкирка – в группе с остеопенией и остеопорозом -27.3% по сравнению с группой здоровых лиц – 25%.

Гетерозиготный генотип GA встречался чаще у русских женщин с остеопенией и ОП, чем в группе здоровых русских. Среди казашек в группах с О+ОП и здоровых, достоверных различий в распределении частот гетерозиготного генотипа GA не выявлено (таблица 4).

Поскольку по данным литературы установлена роль мутантного AA и гетерозиготного GA аллелей в остеогенезе и нарушении костного метаболизма, эти данные показывают ассоциацию мутантного генотипа AA с низкой МПКТ у всех 3 исследованных групп женщин и гетерозиготного генотипа GA с низкой МПКТ у русских женщин.

Таблица 4.

Данные по частоте полиморфизмов гена ALDH7A1 среди разных групп обследования.

Название полиморфизма		Казашки, n=290 абс (%)		Русские, n=92 абс (%)		Другие, n=27 абс (%)	
ALDH7A1 rs13182402		Норма	О+ОП	Норма	О+ОП	Норма	О+ОП
Wild-type	GG	66.6%	48.3%	63.6%	54.2%	65.2%	72.7%
	GA	14.9%	14.2%	15.9%	16.6%	12.5%	0%
Mutant	AA	18.4%	37.5%	20.5%	29.2%	25%	27,3%
Примечание – О - остеопения, ОП – остеопороз							

Таблица 5.

Ассоциация полиморфизма rs13182402 гена ALDH7A1 с риском развития остеопороза среди женщин Казахстана.

Группа	Генотип G>A	Контроль n (%)	Исследуемая группа n (%)	OR	χ^2	P value
казашки	GG	n = 114 76(66.6)	n = 176 85 (48.3)	1.7	12.28	p=0.0004
	GA	17 (14.9)	25 (14.2)			
	AA	21(18.4)	66 (37.5)			
русские	GG	n = 44 28 (63.6)	n = 48 26(54.2)	1.3	1.05	p=0.3
	GA	7 (15.9)	8(16.6)			
	AA	9(20.5)	14(29.2)			
другие	GG	n = 16 10(62.5)	n = 11 8(72.7)	0.9	0.05	p=0.8
	GA	2(12.5)	0			
	AA	4 (25)	3(27.3)			

Так же выявлена достоверная ассоциация гена ALDH7A1 с риском развития остеопороза среди казашек OR =1.7, $\chi^2=12.28$, CI [1.57-5.02], p=0.0004.

Таким образом, можно предположить, что ALDH7A1 является потенциальным генетическим маркером, ассоциированный с низкой МПКТ и способствующим риску развитию ОП среди женщин-казашек.

Выводы

В данном исследовании выявлена ассоциация полиморфизма rs13182402 гена ALDH7A1 с остеопорозом у женщин казахской популяции. Так же выявлена ассоциация данного полиморфизма с низкой МПКТ у женщин, относящихся к европейской популяции, проживающих на территории Казахстана. Полученные данные могут служить основой для последующих исследований по определению генетических факторов риска развития ОП.

Внедрение в медицинскую практику Республики Казахстан новейшего способа прогнозирования на генетическом уровне остеопороза у носителей мутаций в генах регуляторах позволит проводить генетическое консультирование населения, стратификацию риска развития, прогнозирование и профилактику остеопороза.

Литература:

1. Audi L., Garcia-Ramirez M. & Carrascosa, A. Genetic determinants of Bone Mass // Hormone Research. - 1999. - № 51. - P. 105–123.

2. P. Jouanny, F. Guillemin, C. Kuntz et al. Environmental and genetic factors affecting bone mass. Similarity of bone density among members of healthy families // Arthritis Rheum. - 1995. - Vol. 38, № 1. - P. 61-67.

3. Ralston, S.H. The genetics of osteoporosis // Bone. 1999. - Vol. 25, № 1. - P. 85-86.

4. Niu T¹, Xu X. Candidate genes for osteoporosis. Therapeutic implications // Am J Pharmacogenomics. – 2001. - №1. - P. 11-19.

5. Ralston SH. Genetic control of susceptibility to osteoporosis // J Clin Endocrinol Metab. - 2002. - № 87. - P. 2460–6.

6. Satori A Marchitti, Chad Brocker, Dimitrios Stagos, and Vasilis Vasiliou Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily // Expert Opin Drug Metab Toxicol. - Jun 2008. - № 4. - P. 697–720.

7. Chad Brocker, Natalie Lassen, Tia Estey, Aglaia Pappa Aldehyde Dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) Is a Novel Enzyme Involved in Cellular Defense against Hyperosmotic Stress // J Biol Chem. – 2010. - № 285. - P. 18452–18463.

8. Giuliani N., Girasole G., Vescovi P.P. et al. Ethanol and acetaldehyde inhibit the formation of early osteoblast progenitors in murine and human bone marrow cultures. // Alcohol Clin Exp Res. - 199. - №23. - P.381–385.

9. Christel van den Hoogen, Geertje van der Horst, Henry Cheung, Jeroen T. Buijs, Rob C. M. Pelger, and Gabri van der Pluijm The aldehyde dehydrogenase enzyme 7A1 is functionally involved in prostate cancer bone metastasis // Clin Exp Metastasis. - Oct 2011. - № 28. - P. 615–625.

10. Yamaguchi J, Hasegawa Y, Kawasaki M, et al. ALDH2 polymorphisms and bone mineral density in an elderly Japanese population // Osteoporos Int.- 2006.- №17.- P. 908–913.

11. Guo Y., Tan L., Lei S.F., Yang T. et al. Genome-wide association study identifies ALDH7A1 as a novel susceptibility gene for osteoporosis // PLoS Genet. – 2010. - №1. - P. 1-8.

Түйін

ҚАЗАҚСТАН ӘЙЕЛДЕРІНДЕГІ СҮЙЕК ҰЛПАСЫНЫҢ МИНЕРАЛДЫ ТЫҒЫЗДЫҒЫ ЖӘНЕ ОСТЕОПОРОЗ ДАМУЫНА ALDH7A1 ГЕНІ ПОЛИМОРФИЗМІНІҢ ӘСЕРІ

¹ А.М. Айтқұлова, ^{1,2} А.Р. Ақылжанова, ² Ж.М. Абилова, ³ З.С. Жуматова, ⁴ Г.А. Ақылжанова

¹РГП «Ұлттық биотехнология орталығы» Астана қ,

² АО «Назарбаев Университеті» Астана қ,

³Павлодар қ, №1 поликлиникасы,

⁴Павлодар қ, Перинатология Орталығы

Остеопороз – сүйек көлемі бірлігінде сүйек заты мөлшерінің қарқынды төмендеуімен сипатталатын ауру. Ацетальдегиддегидрогеназа (ALDH) остеобласттар пролиферациясын ингибирлеп, сүйек ұлпасының қалыптасуын төмендетеді. Осыған байланысты ОП бар Қазақстан әйелдерінің арасында ALDH7A1 генінің полиморфизм қауымдастығын зерттеу сөзсіз қызығушылық тудырады. Зерттеуге Павлодар қ-сы емханаларында және Алматы қ-сы Асфендияров С.Д. атындағы ҚазҰМУ клиникасында тексеруден өткен 21-84 жас аралығындағы 419 әйел қатысты. Барлық қатысушылардың DEXA әдісімен сүйектің минералды тығыздығы анықталды. Ақпараттық келісім алынған соң биологиялық материал (қан) үлгілерін жинақтау жүргізілді, олардан геномдық ДНҚ бөліп алынды. Генотиптеуді арнайы зондтар TaqMan® SNP Genotyping Assay пайдаланып, Real-time PCR әдісімен жүргізілді. СМТТ нәтижелері бойынша әйелдер 2 топқа бөлінді: СМТТ төмен (153 остеопения және 76 ОП тобы) және қалыпты СМТТ (190 бақылау тобы). Генотиптеу деректерін талдау қазақтар арасындағы ОП даму қаупі бар сенімді қауымдастықты көрсетті (OR=1.7, C.I.= [1.57-5.02], p=0.0004), сонымен қатар орыс әйелдерінің арасындағы ОП бар топ генотипінің мутанттылығы 29.2% асып түсті, ол осы топтағы СМТТ төмендігімен байланысты. Осылайша, ALDH7A1 Қазақстан әйелдерінің арасындағы ОП даму қаупі мен төмен СМТТ ықпал ететін потенциалды генетикалық меркерлер болып табылады.

Негізгі сөздер: остеопороз, сүйек ұлпасының минералды тығыздығы, полиморфизм, ALDH7A1 гені, әйелдер

Summary

EFFECT OF POLYMORPHISM OF ALDH7A1 ON BONE MINERAL DENSITY AND OSTEOPOROSIS IN WOMEN OF KAZAHSTAN

¹ A.M. Aitkulova, ^{1,2} A.R. Akilzhanova, ² Zh.M. Abilova, ³ Z.S. Zhumatova, ⁴ G.A. Akilzhanova

¹RSE «National Center for biotechnology», Astana,

² AOE «Nazarbayev University», Astana,

³City Hospital #1, Pavlodar,

⁴ Perinatal Center, Pavlodar

Osteoporosis is a progressive bone disease that is characterized by a decrease in bone mass and density. Aldehyde dehydrogenase enzyme may inhibit the proliferation of osteoblast formation and decrease bone formation. In this regard study of the association of ALDH7A1 gene polymorphisms and osteoporosis among women in Kazakhstan is of great interest. The study included 419 women aged 21-84 years, undergoing tests in clinics of Pavlodar and KazNMU clinic named after SD Asfendiyarov in Almaty. Bone mineral density was measured in all patients by DEXA. Blood samples were collected and genomic DNA was isolated. Genotyping was performed with real-time PCR using TaqMan probes. According to the density test, women were divided into 2 groups: those with low bone density (153 cases of osteopenia and 76 cases of osteoporosis) and normal density (190 people). Analysis of the genotyping data showed a significant association (OR = 1.7, CI = [1.57-5.02], p = 0.0004) with the risk of osteoporosis in Kazakh women. Pre-dominance of the mutant genotype, 29.2% was also revealed in the group with osteoporosis among Russian women, indicating association with low bone density. Thus we can assume that ALDH7A1 is a potential genetic marker contributing to the risk of osteoporosis and low bone density among women in Kazakhstan.

Key words: osteoporosis, bone mineral density, polymorphism, ALDH7A1 gene, women.