

І.М. Пішель, О.О. Євтушенко, Ю.І. Леонов, Н.В. Григор'єва, Т.В. Орлик,
Д.В. Шитіков, В.В. Поворознюк, Г.М. Бутенко

Залежність мінеральної щільності кісткової тканини від $A^{-1082} \rightarrow G$ -поліморфізму гена інтерлейкіну-10 та $A^{-308} \rightarrow G$ -поліморфізму гена фактора некрозу пухлин α у жінок похилого віку

Визначався зв'язок між структурно-функціональними порушеннями кісткової тканини та наявністю $A^{-1082} \rightarrow G$ поліморфізму гена інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) та $A^{-308} \rightarrow G$ поліморфізму гена фактора некрозу пухлин α (ФНП- α). Дослідження проводили методом визначення точкового нуклеотидного поліморфізму (SNP) полімеразною ланцюговою реакцією. Не виявлено статистично значимого впливу поліморфізму гена ФНП- α $A^{-308} \rightarrow G$ на розвиток кісткової патології у жінок постменопаузного періоду. Пацієнтки в генотипі яких є гомозигота AA гена ІЛ-10 $A^{-1082} \rightarrow G$ мають більш низькі значення мінеральної щільності кісткової тканини (МЩКТ) порівняно з тими, у яких є алель G (GG/AG). Причому ця залежність спостерігалася відносно як до щільності кісткової тканини всього тіла, так і окремих ділянок скелета: поперекового відділу хребта, шийки стегна та зони Варда стегнової кістки. У жінок з поліморфізмом AA гена ІЛ-10 $A^{-1082} \rightarrow G$ виявлено також вірогідно вищий ризик виникнення низько енергетичних (остеопорозних) переломів. Це дає змогу проведення ранньої діагностики ризику виникнення остеопорозу. Аналіз поєднання поліморфізмів генів ІЛ-10 $-1082G/G$ -ФНП- α $-308G/G$ («анти-запальний генотип») не виявив зв'язку цього генотипу зі станом кісткової тканини, що свідчить про невисоку інформативність такої комбінації для діагностики структурно-функціонального стану кісткової тканини.

Ключові слова: поліморфізм генів, кісткова тканина, старіння, інтерлейкін-10, фактор некрозу пухлин α .

ВСТУП

Мінеральна щільність кісткової тканини (МЩКТ) у людини зменшується з віком. Це явище називається остеопенією і може призвести до розвитку остеопорозу, що має наслідком зменшення міцності кістки та схильність до переломів. Останнім часом остеопороз набув великого розповсюдження, особливо серед населення розвинутих країн, і став значною медичною і соціальною проблемою [35, 41].

Незважаючи на загальну тенденцію, механізми втрати кісткової тканини мають свої особливості та, залежно від етіології

процесу, можуть призводити до різної клінічної та гістологічної картини захворювання. За останні кілька років відбувся різкий прорив у розумінні патогенетичних механізмів розвитку остеопорозу. Встановлено, що в основі процесів інволюції кістки, індукованої віковими змінами, дефіцитом статевих гормонів або надміром глюкокортикоїдів, лежить не просто уповільнення її регенерації, а порушення збалансованості процесів нормального фізіологічного ремоделювання кісткової тканини [41].

Відомо, що процеси ремоделювання кісткової тканини та розвиток остеопорозу

© І.М. Пішель, О.О. Євтушенко, Ю.І. Леонов, Н.В. Григор'єва, Т.В. Орлик, Д.В. Шитіков, В.В. Поворознюк, Г.М. Бутенко

можуть регулюватися великою кількістю факторів різної етіології. До них відносяться статеві гормони, глюкокортикоїди [20, 25], інсулінподібні фактори росту [42], прозапальні цитокіни [1] тощо.

Окрім того, на основі аналізу сімейної патології була показана наявність генетичного контролю в розвитку патології. Згідно з даними генеалогічного обстеження, наявність остеопорозу у найближчих родичів як мінімум подвоює ризик розвитку цього захворювання. Встановлено також існування більш високого ризику розвитку остеопорозу у жінок порівняно з чоловіками незалежно від раси або країни проживання [36].

Спроби знайти гени, зміни в структурі яких були б ключовими факторами ризику розвитку остеопорозу та збільшення частоти переломів у старості, призвели до різноспрямованих результатів. Слід зазначити, що пошук маркерних генів проводили в декількох напрямках, розподілити які можна умовно на три великі групи:

- гени, які відповідають за синтез білків, що безпосередньо беруть участь у процесах метаболізму кістки (наприклад, білки кісткового матриксу);

- гени, які відповідають за синтез цитокінів, що беруть участь у регуляції процесів ремоделювання кістки (інтерлейкіни та фактора росту).

- гени, які відповідають за синтез гормонів та їх рецепторів.

Нашу увагу привернула друга група досліджень, в якій встановлені взаємовідносини поліморфізму генів цитокінів і ризику розвитку остеопорозу. Встановлено, що існує вірогідний зв'язок між поліморфізмом ФНП- α [3], рецептором остеопрогестерину [24], ІЛ-1 та антагоністом рецептора ІЛ-1 (ІЛ-1ra) [40], ІЛ-4, епідермальним і трансформуючим фактором росту β [23] та розвитком остеопорозу. Хоча, залежно від країни, в якій обстежували пацієнтів, дані можуть бути і протилежні [2]. Нами для аналізу взаємозв'язку поліморфізму генів

цитокінів і розвитку постменопаузного остеопорозу було обрано гени ФНП- α та ІЛ-10, які відіграють опозитну роль у розвитку запальних процесів, а також у регуляції балансу між активністю остеобластів та остеокластів, який лежить у основі підтримання процесів ремоделювання кісткової тканини [29, 39].

Показано, що у розвитку постменопаузного остеопорозу важливу регуляторну роль може відігравати поліморфізм промотору гена рецептора ФНП- α [26]. У дослідженні інших авторів показано, що, незважаючи на аналогічні значення МЦКТ шийки стегна, жінки з АА генотипом ФНП- α ($A^{-308} \rightarrow G$) мають більший ендокортикальний діаметр кістки ($P=0,03$) у порівнянні з GG генотипом та більшу міцність кісток ($P=0,003$). Серед 376 випадків перелому стегна за останні 12 років, у 22 % пацієнтів цієї групи було виявлено більш низький ризик перелому стегна (відносний ризик 0,78, 95 %, довірчий інтервал 0,63–0,96). Водночас поліморфізм $A^{-308} \rightarrow G$ не був пов'язаний зі зменшенням ризику виникнення переломів [27].

Даних щодо наявності зв'язку між поліморфізмом гена ІЛ-10 і розвитком патології кісткової тканини, нами знайдено не було. Водночас відомо, що G алель гена ІЛ-10 ($A^{-1082} \rightarrow G$) пов'язаний зі збільшеною тривалістю життя у чоловіків [33]. Аналіз комбінації генів ІЛ-10 та ФНП- α («антизапальний генотип»: ІЛ-10 $^{-1082}G/G$ – ФНП- $\alpha^{-308}G/G$) показав наявність такої самої залежності у чоловіків, що може свідчити про високу інформативність прозапальних маркерів у розвитку вікової патології. Тому для аналізу впливу поліморфізму обраних генів у розвитку вікової патології кісткової тканини нами було обрано дію окремих точкових мутацій у промоторах генів – ФНП- α $A^{-308} \rightarrow G$, та ІЛ-10 $A^{-1082} \rightarrow G$, які призводять до змін продукції цитокінів. Слід зазначити, що поліморфізм АА гена ФНП- α $A^{-308} \rightarrow G$ та поліморфізм GG гена ІЛ-10 $A^{-1082} \rightarrow G$ забезпечують високу продукцію відповід-

них цитокінів, а поліморфізм GG гена ФНП- α A⁻³⁰⁸→G та поліморфізм AA гена ІЛ-10 A⁻¹⁰⁸²→G – низьку [3, 43].

Взаємодія різних генів всередині геному, а також взаємодія геному людини і тварин з навколишнім середовищем є основними напрямками досліджень останніх років. Розуміння молекулярної фізіології ефектів певних генів можливо призведе до індивідуального підходу в діагностиці та лікуванні захворювання.

Метою нашого дослідження було визначення залежності між поліморфізмом генів ФНП- α A⁻³⁰⁸→G, ІЛ-10 A⁻¹⁰⁸²→G, їх можливою комбінацією та структурно-функціональним станом кісткової тканини у жінок постменопаузного періоду життя.

МЕТОДИКА

Обстежено 152 пацієнтки відділення захворювань опорно-рухового апарату клініки ДУ „Інститут геронтології АМН України”.

Критеріями виключення пацієнток з дослідження була наявність супутньої патології з боку ендокринної системи, яка може впливати на стан кісткової тканини та розвиток остеоартриту, серцево-судинна патологія (інфаркт міокарда в гострій і підгострій стадії, гострий і хронічний тромбофлебіт нижніх кінцівок, посттромбофлебітичний синдром тощо); захворювання сполучної тканини (ревматоїдний артрит, ревматизм, системний червоний вовчак, системна склеродермія, анкілозивний спондиліт тощо), порушення метаболізму сечової кислоти, злаякісні новоутворення в анамнезі, посттравматичний остеоартроз колінних суглобів.

Згідно з критеріями ВООЗ щодо остеопорозу, жінок поділяли на три групи: I – з нормальними показниками стану кісткової тканини ($T > -1$ SD), II – з остеопенією (T від $-1,5$ до $-2,5$ SD) та III – з остеопорозом ($T < -2,5$ SD).

Для аналізу зв'язку між поліморфізмом генів ФНП- α A⁻³⁰⁸→G, ІЛ-10 A⁻¹⁰⁸²→G та

наявністю переломів кісток в анамнезі було виділено підгрупи з переломами променевої кістки в типовому місці, рентгенологічно діагностованими деформаціями тіл хребців і малотравматичними переломами нижніх кінцівок у постменопаузі. Відбиралися тільки ті пацієнтки, в яких перелом стався внаслідок падіння з висоти їх зросту або нижче. Здорові жінки без переломів у анамнезі склали контрольну групу.

Анамнестичні дані включали наявність супутньої патології, характер становлення та згасання менструальної функції тощо. При збиранні анамнезу зважували на скарги пацієнтів, початкові прояви дистрофічно-деструктивних змін кісткової тканини, наявність переломів і травм у минулому, їх кількість і особливості механізмів виникнення. Заповнювалася спеціально розроблена анкета, в якій зазначалися відомі чинники ризику розвитку остеопорозу, наявність переломів в анамнезі, а також у близьких родичів (батька, матері), час настання менархе, менопаузи, тривалість постменопаузного періоду, наявність шкідливих звичок, фізична активність тощо.

Структурно-функціональний стан кісткової тканини оцінювали за допомогою двофотонної абсорбціометрії; використовували радіонукліди, що випромінюють фотони двох різних енергій. Перевагою цього методу є можливість кількісної оцінки МЩКТ в тих ділянках скелета, що оточені великими та нерівномірними масами м'яких тканин. Найкращий об'єкт для проведення дослідження є поперековий відділ хребта та проксимальні частини стегнових кісток, променева кістка. МЩКТ визначали з використанням двоенергетичного рентгєнівського денситометра «Prodigy» («GE Medical systems», Lunar, model 8743, 2005).

Для визначення поліморфізму генів 100 мкл гепаринізованої крові розчиняли у 300 мкл лізуючого розчину. Зразки зберігали при -70°C до виділення ДНК, яке проводили згідно з інструкцією набору для виділення „ДНК-сорб-А” («АмпліСенс», Росія).

Поліморфізм генів визначали за допомогою точкового нуклеотидного поліморфізму полімеразною реакцією (ПЛР-SNP), яка забезпечує визначення точкових мутацій через підбір двох типів праймерів, котрі відрізняються одним нуклеотидом.

Найменування гена	Послідовність	Довжина ампліфікованого фрагмента, bp
ФНП-α	C: 5'-TCT CGG TTT CTT CTC CAT CG F: 5'- ATA GGT TTT GAG GGG CAT GA R:5'- ATA GGT TTT GAG GGG CAT GG	184
ІЛ-10	C: 5'- CTT GGA TTA AAT TGG CCT TAG A F: 5'-ACT ACT AAG GCT TCT TTG GGA A R: 5'-СТА СТА AGG CTT CTT TGG GAG	194

Ампліфікаційну суміш готували з використанням реактивів фірми «Fermentas» (Канада). Кінцевий об'єм суміші для ампліфікації в кожному зразку був 25 мкл. Склад ампліфікаційної суміші: по 0,5 мкл (1 мкг/мкл) С та F (або R) праймерів відповідного гена, 2 мкл dNTP (2 мМ), 7 мкл DEPC-обробленої води, 10 мкл розчину досліджуваної ДНК, 5 мкл буфера для ПЛР (2,5 ммоль/л MgCl₂), 0,2 Од Таq-полімерази. Ампліфікацію проводили на термоциклері Corbett Research (Австралія). Послідовність використаних праймерів наведено у табл. 1. Ампліфікацію проводили за

такою програмою: 96°C – 1 хв; 96°C – 15 с, 65°C – 50 с, 72°C – 40 с (10 циклів); 96°C – 10 с, 60°C – 50 с, 72°C – 40 с (20 циклів). Аналіз проводили з допомогою електрофорезу у 2%-му агарозному гелі з бромистим етидієм. Наявність точкової мутації оцінювали за наявність продукту ампліфікації (рис. 1).

У представленому дослідженні методом ПЛР-SNP було вивчено вплив окремих точкових поліморфізмів у промоторах генів ФНП-α A⁻³⁰⁸→G та ІЛ-10 A⁻¹⁰⁸²→G, які призводять до змін продукції цитокінів. Частота виявлення мутацій в обстежених:

Назва гена (поліморфізму)	Варіант поліморфізму		
	Гомозигота 1	Гетерозигота	Гомозигота 2
ФНП-б A ⁻³⁰⁸ →G	AA: 7 (4,6%)	AG: 34 (22,4%)	GG: 111 (73,0%)
ІЛ-10 A ⁻¹⁰⁸² →G	AA: 43 (28,3%)	AG: 70 (46,1%)	GG: 39 (25,7%)

Слід зазначити, що гомозигота AA гена ФНП-α A⁻³⁰⁸→G та гомозигота GG гена ІЛ-

10 A⁻¹⁰⁸²→G забезпечують високу продукцію відповідних цитокінів, а гомозигота GG



Електрофореграма продуктів ампліфікації фактора некрозу пухлин б A⁻³⁰⁸→G (L – ледер, 1 – гомозигота (high expression), 2 – гетерозигота, 3 – гомозигота (low exp[ression]) та інтерлейкіна-10 A⁻¹⁰⁸²→G (4 – гетерозигота, 5 – гомозигота (low exp[ression]), 6 – гомозигота (high exp[ression])

гена ФНП- α A⁻³⁰⁸→G та гомозигота AA
гена ІЛ-10 A⁻¹⁰⁸²→G – низьку.

Статистичний аналіз результатів проводили за допомогою критерію t Стьюдента з використанням пакета програм Statistika 6,0 та програми SPSS v. 13.0 (SPSS, Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У табл. 1 наведено значення щодо загальноклінічних показників і показників структурно-функціонального стану кісткової тканини, які мають вірогідний зв'язок з наявністю комбінації з досліджуваних

Таблиця 1. Характеристика пацієнток, які мають різні генотипи фактора некрозу пухлин α A⁻³⁰⁸→G (M±SD)

Показник	Генотип		
	AA	AG	GG
Вік, роки	59,43±7,19 (P=0,92)	59,19±1,46	59,40±0,65
Тривалість менопаузи, роки	14,40±4,69 (P=0,65)	9,17±1,25	10,26±0,51
Маса, кг	76,40±4,85 (P=0,31)	78,76±3,12	75,20±1,39
Зріст, см	163,80±2,31 (P=0,34)	162,76±1,10	161,46±0,54
Індекс маси тіла, кг/м ²	28,46±1,93 (P=0,62)	29,58±0,99	28,88±0,53
Кількість переломів, %	40,0 (P=0,5)	44,1	45,7
Кількість переломів у жінок з тривалістю менопаузи понад 5 років	40,0 (P=0,98)	27,3	46,2
Характеристика перелому (остеопорозний/неостеопорозний)	100,0 (P=0,56)	72,7	64,3
Мінеральна щільність кісткової тканини всього тіла	0,96±0,08 (P=0,53)	0,98±0,03	0,91±0,02
T-критерій поперекового відділу хребта	-0,34±0,63 (P=0,11)	-0,22±0,24	-0,72±0,14
T-критерій шийки стегна	0,98±0,08 (P=0,37)	1,04±0,02	0,98±0,01
T-критерій зони Варда	-1,71±0,64 (P=0,19)	-1,26±0,18	-1,70±0,12
T-критерій трохантеру	0,90±0,08 (P=0,78)	0,88±0,02	0,84±0,01
T-критерій	-1,03±0,55 (P=0,64)	-1,14±0,12	-1,34±0,08
T-критерій	0,73±0,08 (P=0,55)	0,70±0,02	0,67±0,01
T-критерій	-1,40±0,64 (P=0,27)	-1,60±0,15	-1,82±0,09
T-критерій	0,81±0,07 (P=0,41)	0,82±0,03	0,76±0,02
T-критерій	-0,34±0,64 (P=0,13)	-0,30±0,23	-0,79±0,14

поліморфізмів гена ФНП- α $A^{-308} \rightarrow G$ у пацієнток. Жінки з різним генотипом не відрізняються за віком, тривалістю менопаузи, масою, зростом та індексом маси тіла. Ми проаналізували зв'язок між $A^{-308} \rightarrow G$ поліморфізмом гена ФНП- α та структурно-функціональним станом кісткової тканини у жінок в Україні. Нами не було виявлено жодного вірогідного зв'язку між різними генотипами ФНП- α $A^{-308} \rightarrow G$ гена та показниками структурно-функціонального стану кісткової тканини, можливо, через малу кількість пацієнтів, які мали генотип АА.

У табл. 2 та 3 наведено результати зв'язку загальноклінічних показників і наявності досліджуваних поліморфізмів гена ІЛ-10 $A^{-1082} \rightarrow G$ у пацієнток. Жінки з різним генотипом не відрізняються за віком, тривалістю менопаузи, масою, зростом та індексом маси тіла (див. табл. 2).

У наших дослідженнях виявлено вірогідний зв'язок між наявністю генотипу АА гена ІЛ-10 $A^{-1082} \rightarrow G$, щільністю кісткової тканини та частотою остеопорозних переломів. Встановлено, що у жінок з генотипом АА ІЛ-10 $A^{-1082} \rightarrow G$ в порівнянні з носіями G алеля (AG/GG) вірогідно нижчі значення Т-критерію та МЦКТ як усього

тіла, так і окремих ділянок – поперекового відділу хребта, шийки стегна та зони Варда (див. табл. 3).

Ризик остеопорозних переломів у жінок з генотипом АА ІЛ-10 $A^{-1082} \rightarrow G$ у порівнянні з носіями G алеля (AG/GG) відносно невисокий – становить 1,5 (95% СІ: 1,08-2,09), але вірогідний ($P < 0,04$), що свідчить про існування залежності між цими показниками.

Механізм виникнення патології кісткової тканини у людей з генотипом АА ІЛ-10 може бути спричинений зниженою продукцією ІЛ-10 клітинами імунної системи загалом або безпосередньо в мікрооточенні кісткової тканини. Відомо, що деякі прозапальні цитокіни, а саме: ІЛ-1, ФНП- α , ІЛ-6, ІЛ-11 стимулюють процеси резорбції кісткової тканини [14]. Причому всі вони відносяться до ряду прозапальних, та їх продукція з віком підвищується.

З літературних джерел відомо, що виникнення більшості залежних від віку патологій, таких, як атеросклероз, хвороба Альцгеймера, остеопороз, зумовлено розвитком хронічних запальних процесів і підвищенням продукції прозапальних цитокінів [4, 13, 19, 45]. Більшість з них стиму-

Таблиця 2. Характеристика пацієнток, які мають різні генотипи інтерлейкіна-10 $A^{-1082} > G$ (M \pm SD)

Показник	Генотип		
	AA	AG	GG
Вік, роки	58,88 \pm 6,34 (P=0,77)	59,84 \pm 7,86	59,69 \pm 6,02
Тривалість менопаузи, роки	10,60 \pm 6,52 (P=0,86)	10,88 \pm 7,32	10,08 \pm 8,0
Маса, кг	75,56 \pm 14,73 (P=0,49)	77,87 \pm 15,16	74,35 \pm 15,91
Зріст, см	162,16 \pm 5,02 (P=0,86)	161,59 \pm 6,10	161,57 \pm 5,92
Індекс маси тіла, кг/м ²	28,75 \pm 5,51 (P=0,39)	29,83 \pm 5,51	28,41 \pm 5,57
Кількість переломів, %	43,6 (P=0,69)	35,8	38,5
Кількість переломів у жінок з тривалістю менопаузи понад 5 років	50,0 (P=0,57)	40,4	37,5

люють активність остеокластів і процеси резорбції кісткової тканини, що призводить до розвитку вікового остеопорозу [47]. Розвиток патології може бути спричинений підвищенням вмісту катаболічних сигналів внаслідок перебігу хронічного запального процесу, та за відсутності будь-яких клініч-

них проявів захворювання призводити до апоптозу остеобластів і порушення процесів ремоделювання кісткової тканини [13, 34].

Остеопороз, як і інші вікові патології, має виражену генетичну залежність. У різних індивідумів вікові зміни щільності кісткової тканини значно відрізняються. Частково це

Таблиця 3. Характеристика стану кісткової тканини пацієнток, які мають різні генотипи інтерлейкіна-10 A⁻¹⁰⁸²→G (M±SD)

Показник	Генотип		
	AA	AG	GG
Відносна кількість низькоенергетичних (остеопорозних) переломів із загальної кількості переломів	87,5 (P=0,10)	61,9	53,3
Відносна кількість низькоенергетичних (остеопоротичних) переломів із загальної кількості переломів	87,5 (P=0,04)	При об'єднанні носіїв G (AG/GG) щодо AA 58,3	
Мінеральна щільність кісткової тканини всього тіла	1,04±0,09 (P=0,04)	1,10±0,11	1,09±0,11
	1,04± 0,09 (P=0,01)	При об'єднанні носіїв G (AG/GG) щодо AA 1,10± 0,11	
T-критерій	-1,09±1,11 (P=0,04)	-0,29±1,41	-0,40±1,34
поперекового відділу хребта	-1,09±1,11 (P=0,01)	При об'єднанні носіїв G (AG/GG) щодо AA -0,33±1,37	
	0,87±0,46 (P=0,003)	1,02±1,16	1,02±0,15
	0,87±0,46 (P=0,003)	При об'єднанні носіїв G (AG/GG) щодо AA 1,02±0,16	
T-критерій	-2,05±1,03 (P=0,01)	-1,40±1,30	-1,37±1,21
	-2,05±1,03 (P=0,003)	При об'єднанні носіїв G (AG/GG) щодо AA -1,39±1,26	
шийки стегна	0,78±0,35 (P=0,12)	0,87±0,15	0,87±0,12
	0,78±0,35 (P=0,04)	При об'єднанні носіїв G (AG/GG) щодо AA -0,87±0,14	
T-критерій	-1,44±0,77 (P=0,14)	-1,11±0,88	-1,20±0,84
	-1,44±0,77 (P=0,05)	При об'єднанні носіїв G (AG/GG) щодо AA -0,14±0,87	
зони Варда	0,59±0,38 (P=0,03)	0,70±0,15	0,71±0,13
	0,59±0,38 (P=0,009)	При об'єднанні носіїв G (AG/GG) щодо AA 0,71±0,14	
T-критерій	-1,99±0,93 (P=0,09)	-1,58±1,13	-1,54±0,97
	-1,99±0,93 (P=0,03)	При об'єднанні носіїв G (AG/GG) щодо AA -1,57±1,07	

зумовлено індивідуальними коливаннями у рівні продукції цитокінів. Таке припущення підтверджують дослідження Ferrari та співавт. [8], які показали, що поліморфізм гена ІЛ-6 впливає на ризик виникнення остеопорозу у жінок постменопаузного періоду життя. Схожі дані були отримані відносно поліморфізму генів ІЛ-1-β та ІЛ-1Ra, які пов'язані зі зниженням щільності кісткової тканини та розвитком остеопорозу кісток поперекового відділу хребта у жінок [5].

Відомо, що продукція прозапальних цитокінів залежить від вмісту естрогенів [46], а також регулюється протизапальними цитокінами, які продукують Т-клітини 2-го типу (Th2). Встановлено, що такі цитокіни

Th2-типу, як ІЛ-4 та ІЛ-10 подавляють продукцію ІЛ-1, ФНП-α та інших Th1-цитокінів, спричинюючи пригніченню процесів резорбції кісткової тканини [32, 39].

Таким чином, вплив гомозиготи AA гена ІЛ-10 A⁻¹⁰⁸²→G, наявність якої призводить до зниження продукції цього цитокіну в організмі, може впливати на процеси ремоделювання кісткової тканини за допомогою підвищення вмісту прозапальних цитокінів.

Як було зазначено вище, ІЛ-10 та ФНП-α відіграють опозитну роль у розвитку запальних процесів. Тому можна припустити, що однією з основних функцій ІЛ-10 є регулювання запального процесу, тоді як ФНП-α забезпечує інтенсивність і трива-

Таблиця 4. Характеристика пацієнток, які мають різні комбінації генотипів фактора некрозу пухлин α (ФНП-α) A⁻³⁰⁸→G та інтерлейкіну-10 (ІЛ-10) A⁻¹⁰⁸²→G (M±SD)

Показник	ІЛ-10-1082GG; ФНП-α -308GG	ІЛ-10-1082 AAAG; ФНП-α -308 AAAG;
Вік, роки	59,72±5,58 (P=0,84)	59,42±7,42
Тривалість менопаузи, роки	10,40±3,69 (P=0,65)	9,97±2,25
Маса, кг	75,10±16,02 (P=0,61)	76,68±15,06
Зріст, см	161,65±6,27 (P=0,86)	161,85±5,66
Індекс маси тіла, кг/м ²	28,69±5,70 (P=0,60)	29,27±5,48
Кількість переломів, %	43,3 (P=0,91)	38,4
Кількість переломів у жінок з тривалістю менопаузи понад 5 років, %	50,0 (P=0,28)	38,8
Відносна кількість низькоенергетичних (остеопорозних) переломів із загальної кількості переломів, %	61,5 (P=0,37)	73,7
Мінеральна щільність кісткової тканини всього тіла	0,93±0,12 (P=1,00)	0,93±0,13
поперекового відділу хребта	1,02±0,14 (P=0,40)	0,97±0,32
шийки стегна	0,87±0,12 (P=0,52)	0,84±0,25
зони Варда	0,70±0,12 (P=0,48)	0,66±0,27

лість його локального перебігу [17, 22].

Стимуляція клітин крові різних людей бактеріальним ліпополісахаридом *in vitro* призводить до продукції різної кількості ІЛ-10 та ФНП- α , що дає змогу припустити наявність їх генетичної регуляції з вірогідністю 75 та 60 % відповідно [16]. Індивідуальні відмінності у рівні продукції цих цитокінів можуть визначати тривалість перебігу запальних процесів.

Слід зазначити, що ізольована оцінка генотипів окремих генів цитокінів може призвести до результатів, які мають обмежене застосування. Тому що *in vivo* контроль за синтезом окремих цитокінів регулюється не тільки структурою самого гена, але й комплексом зовнішніх факторів, які включають в себе мережу про- та протизапальних цитокінів, гормонів тощо [10].

У нашому дослідженні не вдалося виявити будь-якого зв'язку між показниками структурно-функціонального стану кісткової тканини та можливими варіантами комбінацій гаплотипів генів, які вивчалися (табл. 4). Серед гаплотипів AA/GG і GG/AA досліджуваних генів вірогідної різниці у частоті виникнення переломів і МЩКТ також виявлено не було.

Таким чином, поліморфізм гена ФНП- α ($A^{-308} \rightarrow G$) не пов'язаний зі структурно-функціональними змінами стану кісткової тканини в українській популяції. У жінок з поліморфізмом AA гена ІЛ-10 $A^{-1082} \rightarrow G$ вірогідно нижчі показники МЩКТ. Це дає змогу проведення ранньої діагностики ризику виникнення остеопорозу.

И.М. Пишель, О.А. Евтушенко, Ю.И. Леонов, Н.В. Григорьева., Т.В. Орлик, Д.В. Шитиков, В.В. Поворозник, Г.М. Бутенко

ВЛИЯНИЕ $A^{-1082} \rightarrow G$ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-10 И $A^{-308} \rightarrow G$ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ФАКТОРА НЕКРОЗУ ОПУХОЛИ α НА ПЛОТНОСТЬ КОСТНОЙ ТКАНИ У ЖЕНЩИН ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА

Определялась связь между структурно-функциональными

нарушениями костной ткани и наличием $A^{-1082} \rightarrow G$ полиморфизма гена интерлейкина-10 (ИЛ-10) и $A^{-308} \rightarrow G$ полиморфизма гена фактора некроза опухолей α (ФНО- α). Исследования проводили методом SNP-полимеразной цепной реакции. Исследованиями не выявлено статистически значимого влияния полиморфизма гена ФНО- α $A^{-308} \rightarrow G$ на развитие костной патологии у женщин постменопаузального периода. Пациентки, в генотипе которых присутствует гомозигота AA гена Ил-10 $A^{-1082} \rightarrow G$ имеют более низкие значения плотности костной ткани (ПКТ) в сравнении с теми, у которых присутствует алель G (GG/AG). Эта зависимость наблюдалась по отношению как ПКТ всего тела, так и отдельных участков скелета: поясничного отдела позвоночника, шейки бедра и зоны Варда бедренной кости. Проведенными исследованиями установлено, что полиморфизм гена ФНП- α $A^{-308} \rightarrow G$ не связан со структурно-функциональными изменениями состояния костной ткани в украинской популяции. А у женщин с полиморфизмом AA гена ИЛ-10 $A^{-1082} \rightarrow G$ достоверно ниже ПКТ. Что дает возможность проведения ранней диагностики риска возникновения остеопороза. Анализ комбинации генов ИЛ-10 -1082G/G и ФНП- α -308G/G («антивоспалительный генотип») не выявил связи данного генотипа с положением костной ткани, что свидетельствует про невысокую информативность данной комбинации для диагностики структурно-функционального положения костной ткани.

Ключевые слова: полиморфизм генов, костная ткань, старение, интерлейкин-10, фактор некроза опухолей α .

I.M. Pishel, O.O. Yevtushenko, Yu.I. Leonov, N.V. Grygoryeva, T.V. Orlyk, D.V. Shytikov, V.V. Povoroznyuk, G.M. Butenko

THE ASSOCIATION OF $^{-1082}A \rightarrow G$ POLYMORPHISM OF IL-10 AND $^{-308}A \rightarrow G$ POLYMORPHISM OF TNF α GENES WITH BONE DENSITY IN ELDERLY WOMEN

We studied the association between disturbances of structure and function in bone tissue and ($^{-1082}A \rightarrow G$) polymorphism of IL-10 and ($^{-308}A \rightarrow G$) polymorphism of TNF α genes. SNP-polymerase cyclic reaction was used. The study failed to find significant influence of ($^{-308}A \rightarrow G$) TNF α polymorphism on the development of bone tissue pathology in postmenopausal women. The patients with AA genotype of $^{-1082}A/G$ IL-10 gene have significantly lower indices of bone density comparing with G allele carriers (GG/AG). This association remained true both for bone tissue density of whole body, and for separate parts of skeleton: lumbar spine, femur neck, Ward zone of hip bone. Our study indicates that ($^{-308}A \rightarrow G$) polymorphism of TNF α gene is not associated with structural-functional changes in bone tissue in Ukrainian population. However, there is strong evidence that women who carries the AA genotype of $^{-1082}A/G$ polymorphism of IL-10 gene have significantly lower bone tissue density. This indicates the potential

for predictive genetic testing of osteoporosis risk. Analyses of gene combination IL-10⁻¹⁰⁸²G/G and TNF α ⁻³⁰⁸G/G («anti-inflammatory genotype») did not show any significant association of this genotype with bone tissue characteristics, which shows low predictive value of this combination for diagnostics of structural-functional state of bone tissue.

Key words: gene polymorphisms, bone tissue, aging, IL-10, TNF.

Institute of Gerontology of AMS of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бутенко Г.М. Остеопороз и иммунная система // Проблемы остеологии. – 1999. – 2, №3. – С.23–28.
2. Bajnok E., Takacs I., Vargha P. et al. Lack of association between interleukin-1 receptor antagonist protein gene polymorphism and bone mineral density in Hungarian postmenopausal women // Bone. – 2000. – 27, № 3. – P.559–562.
3. Bayley J.P., Ottenhoff T.H., Verweij C.L. Is there a future for TNF promoter polymorphisms // Genes Immun. – 2004. – 5, № 1. – P.315–329.
4. Bruunsgaard H., Pedersen B.K. Age-related inflammatory cytokines and disease // Immunol. Allergy Clin. Nrth Am. – 2003. – 23, №1. – P.15–39.
5. Chen H.Y., Chen W.C., Wu M.C. et al. Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in postmenopausal women: correlation to bone mineral density and susceptibility to osteoporosis // Maturitas. – 2002. – 44, № 1. – P.49–54.
6. Duncan E.L., Brown M.A., Sinsheimer J. et al. Suggestive linkage of the parathyroid receptor type 1 to osteoporosis // J. Bone Miner. Res. – 1999. – 14, № 12. – P.1993–1999.
7. Eisman J.A. Genetics of osteoporosis // Endocrine Rev. – 2000. – 20, № 6. – P.788–804.
8. Ferrari S.L., Ahn-Luong L., Garnero P. et al. Two promoter polymorphisms regulating interleukin-6 gene expression are associated with circulating levels of C-reactive protein and markers of bone resorption in postmenopausal women // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2003. – 88, № 1. – P.255–259.
9. Ferrari S.L., Garnero P., Emond S. et al. A functional polymorphic variant in the interleukin-6 gene promoter associated with low bone resorption in postmenopausal women // Arthritis Rheum. – 2001. – 44, № 1. – P.196–201.
10. Fowler E., Eri R., Hume G. et al. TNF{alpha} and IL10 SNPs act together to predict disease behaviour in Crohn's disease // J. Med. Genetics. – 2005. – 42, № 2. – P.523–528.
11. Gallagher P.M., Lowe G., Fitzgerald T. et al. Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community acquired pneumonia // Thorax. – 2003. – 58, № 1. – P.154–156.
12. Giacconi R., Cipriano C., Albanese F.C.A. The 174G/C polimorphism of IL-6 is useful to screen old subjects at risk for atherosclerosis or to reach successful ageing // Exp. Gerontol. – 2004. – 39, № 4. – P.621–628.
13. Ginaldi L., De Martinis M., Monti D., Franceschi C. Chronic antigenic load and apoptosis in immunosenescence // Trends Immunol. – 2005. – 26, № 1. – P.79–84.
14. Ginaldi L., DiBenedetto M.C., DeMartinis M. Osteoporosis, inflammation and aging // Immunity & Ageing. – 2005. – 2, № 1. – P.14–27.
15. Gong M.N., Thompson B.T., Williams P.L. et al. Interleukin-10 polymorphism in position – 1082 and acute respiratory distress syndrome // Eur. Respir. J. – 2006. – 27, № 3. – P.674–681.
16. Gonzalez S., Rodrigo L., Martinez-Borra J. et al. TNF- α -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF- α production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease // Amer. J. Gastroenterol. – 2003. – 98, № 1. – P.1101–1111.
17. Haider A.S., Lowes M.A., Suñrez-Faricas M. et al. Identification of cellular pathways of «Type 1,» Th17 T cells, and TNF- and inducible Nitric Oxide Synthase-producing dendritic cells in autoimmune inflammation through pharmacogenomic study of Cyclosporine A in psoriasis // J. Immunol. – 2008. – 180, № 3. – P.1913–1920.
18. Hajeer A.H., Hutchinson I. Influence of TNF- β gene polymorphisms on TNF- α production and disease // Hum. Immunol. – 2001. – 62, № 4. – P.1191–1199.
19. Hirose K., Tomiyama H., Okazaki R. et al. Increased pulse wavevelocity associated with reduced calcaneal quantitative osteo-sono index: possible relationship between atherosclerosis and osteopenia // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2003. – 88, № 6. – P.2573–2578.
20. Hofbauer L.C., Gori F., Riggs B.L. et al. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis // Endocrinology. – 1999. – 140, № 5. – P.4382–4389.
21. Katagiri T., Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation // Oral. Dis. – 2002. – 8, № 1. – P.147–159.
22. Krishnamurthy P., Rajasingh J., Lambers E. et al. IL-10 Inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR // Circulat. Res. – 2009. – 104, № 1. – P.e9 – e18.
23. Langdahl B.L., Knudsen J.Y., Jensen H.K. et al. A sequence variation: 713-8delC in the transforming growth factor-beta 1 gene has higher prevalence in osteoporotic women than in normal women and is associated with very low bone mass in osteoporotic women and increased bone turnover in both osteoporotic and normal women // Bone. – 1997. – 20, № 1. – P.289–294.
24. Manolagas S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis // Endocrine Rev. – 2000. – 21, № 2. – P.115–137.

25. Manolagas S.C., Weinstein R.S. New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis // *J. Bone Miner. Res.* – 1999. – **14**, № 6. – P.1061–1066.
26. Mencej S., Albagha O.M.E., Janez Praelj. et al. Tumor necrosis factor superfamily member 11 gene promoter polymorphisms modulate promoter activity and influence bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis // *J. Mol. Endocrin.* – 2008. – **40**, № 1. – P.273–279.
27. Moffett S.P., Zmuda J.M., Oakley J.I. et al. Tumor necrosis factor- α polymorphism, bone strength phenotypes, and the risk of fracture in older women // *J. Clin. Endocrin. & Metabol.* – 2005. – **90**, № 6. – P.3491–3497.
28. Monneret G., Finck M.E., Venet F. et al. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration // *Immunol. Lett.* – 2004. – **95**, № 1. – P.193–198.
29. Nanes M.S. Tumor necrosis factor- β molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology // *Gene.* – 2003. – 321, № 1. – P.1 – 15.
30. Oberholzer A., Oberholzer C., Moldawer L.L. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug // *Crit. Care. Med.* – 2002. – **30**, № 1. – P. S58–S63.
31. Ota N., Hunt S.C., Nakajima T. et al. Linkage of human tumor necrosis factor-alpha to human osteoporosis by sib pair analysis // *Genes. Immun.* – 2000. – **1**, № 4. – P.260–264.
32. Owens J.M., Gallagher A.C., Chambers T.J. IL-10 modulates formation of osteoclasts in murine hemopoietic cultures // *J. Immunol.* – 1996. – **157**, № 2. – P.936–945.
33. Palmeri S., Lio D., Vaglica M. et al. Caruso Analysis of interleukin 10 (IL-10)-1082G/A single nucleotide polymorphism (SNP) genotypes in breast cancer (BC) patients (pts) and in >95 years old cancer free women // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – **23**, S 16. – P.9656–9664.
34. Poli, Balena R., Fattori E. et al. Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion // *EMBO J.* – 1994. – **13**, №10. – P.1189–1196.
35. Prevention and management of osteoporosis. – WHO: Geneva, 2003. – 192 p.
36. Ralston S.H. Genetic control of susceptibility to osteoporosis // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2002. – **87**, № 6. – P.2460–2466.
37. Reuss E., Fimmers R., Kruger A. et al. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors—a twin study // *Genes Immunol.* – 2002. – **3**, № 2. – P.407–413.
38. Roubenoff R. Catabolism of aging: is it an inflammatory process // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2003. – **6**, № 1. – P.295–299.
39. Sasaki H., Hou L., Belani A. et al. IL-10, but Not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo // *J. Immunol.* – 2000. – **165**, № 9. – P.3626–3630.
40. Schulte C.M., Dignass A.U., Goebell H. et al. Genetic factors determine extent of bone loss in inflammatory bowel disease // *Gastroenterology.* – 2000. – **119**, № 4. – P.909–1020.
41. Seeman E. Physiology of aging invited review: Pathogenesis of osteoporosis // *J. Appl. Physiol.* – 2003. – **95**, № 12. – P.2142–2151.
42. Shi X.M., Chang Z.J., Blair H.C. et al. Glucocorticoids induce adipogenesis of stromal cells by transcriptionally activating PPAR γ 2 // *Bone.* – 1998. – **23**, S6. – P.S454–S462.
43. Suarez A., Castro P., Alonso R. et al. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms // *Transplantation.* – 2003. – **75**, № 3. – P.711–717.
44. Takacs I., Koller DL., Peacock M. et al. Sib pair linkage and association studies between bone mineral density and the interleukin-6 gene locus // *Bone.* – 2000. – **27**, № 1. – P.169–173.
45. Wallin R., Wajih N., Greenwood G.T., Sane D.C. Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy // *Med. Res. Re* – 2001. – **21**, № 1. – P.274–301.
46. Weitzmann M.N., Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale // *J. Clin. Invest.* – 2006. – **116**, № 4. – P.1186–1194.
47. Yun A.J., Lee P.Y. Maladaptation of the link between inflammation and bone turnover may be a key determinant of osteoporosis // *Med. Hypotheses.* – 2004. – **63**, № 2. – P.532–537.

ДУ «Ін-т геронтології АМН України», Київ
E-mail: leonov@geront.kiev.ua

Матеріал надійшов до
редакції 19.03.2009