

## ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ ОСТЕОГЕНЕЗУ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ВАЛЬГУСНОЮ ДЕФОРМАЦІЄЮ ПЕРШОГО ПАЛЬЦЯ СТОПИ

Н.О. Гнатейко<sup>1</sup>, А.Я. Яцкевич<sup>1</sup>, І.Я. Шелемех<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

Кафедра травматології, ортопедії та ВПХ (зав. - проф. Ю.Я. Філь)

<sup>2</sup> Комунальна 8-а міська клінічна лікарня м. Львова (головний лікар - В.Р. Обаранець)

### Реферат

У роботі наведено дослідження алельних варіантів гену рецептора вітаміну D3 (VDR), який належить до генетичної сітки порушення остеогенезу. Використовуючи метод ампліфікації ДНК із допомогою полімеразної ланцюгової реакції проводили аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів, молекулярно-генетичні дослідження локусів гену VDR: *ApaI* в інтроні 8, *TaqI* в екзоні 9, *FokI* в 3' ділянці екзону 2. Встановлено розподіл генотипів у 47 осіб із сповільненою консолидацією кісток й у 35 осіб контрольної вибірки після остеотомії з приводу вальгусної деформації першого пальця.

**Ключові слова:** вальгусна деформація першого пальця, остеотомія, порушення консолидації, ген рецептора вітаміну D3, генетична схильність, аналіз ДНК, генетичний поліморфізм

### Abstract

THE MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF GENETIC FACTORS IN BONE CONSOLIDATION AMONG PATIENTS WITH HALLUX VALGUS

N.O. GNATEYKO<sup>1</sup>, A.Ya. YATSKEVYCH<sup>1</sup>,  
I.Ya. SHELEMEH<sup>2</sup>

<sup>1</sup> The Danylo Halytsky National Medical University in Lviv

<sup>2</sup> 8<sup>th</sup> Municipal City Hospital in Lviv

Nonunion is one of the main problems in modern medicine resulting in high treatment costs. The genetic component is the most important compared factor affecting bone consolidation. Even HLA-genotype can be a genetic factor related to slow bone consolidation. Previous reports have suggested that vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms, particularly the AA, BB, tt, and FF genotypes are associated with slow bone consolidation and osteoporosis. The spectrum of polymorphic variants of the VDR gene, which is suspected of being a genetic factor related to nonunion, has been studied. Such VDR gene loci as *ApaI* (intron 8), *TaqI* (exon 9), and *FokI* (3' region of exon 2) have been studied. The distributions of the *ApaI*, *TaqI*, and *FokI* allele variants of the VDR gene were studied in 35 unrelated normal and 47 patients with slow bone consolidation after osteotomy for hallux valgus. The genotypes AA, tt, and FF are supposed to cause loss of bone mass. In patients with slow bone consolidation and osteoporosis, the following VDR allele distributions were found: AA - 22%, Aa - 72%, aa - 6%; *TaqI*: TT - 41%, Tt - 46%, tt - 13%; *FokI*: FF - 35%, Ff - 48%, ff - 17%. In the control cohort, the results showed the

following distribution: AA - 40%, Aa - 57%, aa - 3%; *TaqI*: TT - 53%, Tt - 30%, tt - 17%; *FokI*: FF - 27%, Ff - 60%, ff - 13%.

**Key words:** hallux valgus, osteotomy, nonunion, VDR gene, genetic susceptibility, DNA analysis, genetic polymorphism

### Вступ

Вальгусна деформація першого пальця стопи (ВДПП) є однією із найчастіших ортопедичних деформацій. ВДПП різко погіршує якість життя хворого, супроводжується больовим синдромом, незадовільним косметичним ефектом, ускладнює користування взуттям. При значному розвитку патології виникає порушення функції ходи, трофічні зміни шкіри стоп [2].

На сьогодні консервативне лікування деформації є малоефективним. Для корекції ВДПП запропоновано значну кількість хірургічних втручань. Одним із найефективніших методів вважають корегуючу остеотомію І-плюснєвої кістки [2, 8].

Незважаючи на те, що пацієнтам необхідна корегуюча остеотомія І-ї плюснової кістки, багатьом хворим її не роблять через загрозу сповільненої консолидації І-ї плюснової кістки після операції, що супроводжується тривалою непрацездатністю та побутовою дезадаптацією. Причини порушення репараційного остеогенезу досліджені недостатньо, однією із них вважається спадкова схильність. Порушення кісткового метаболізму зумовлене недостатньою або незбалансованою функцією багатьох генів, роль кожного із них визначена недостатньо чітко [3].

До "генетичної сітки" порушення остеогенезу відносять низку генетичних локусів, а саме - гени рецепторів гормонів: естрогену, кальцитоніну, паратиреоїдного гормону [1]. Найбільш чіткі взаємодії встановлено при дослідженні гену рецептора вітаміну D3. Він відноситься до стероїдних рецепторів, що регулюють метаболізм кальцію у різних тканинах. Вітамін D3 та його активні метаболіти є головними чинниками гормональної системи регуляції фосфорно-кальцієвого обміну. Вони беруть участь у

процесі мінералізації кісткової тканини, у підтриманні гомеостазу кальцію в організмі, впливають на процеси ремоделювання кісток.

У зв'язку із цим є актуальним визначення генетичних чинників ризику порушення консолидації кісток у пацієнтів з ВДПП.

Мета роботи - вивчити генетичні чинники порушення репараційного остеогенезу та їх вплив на консолидацію фрагментів після корегуючої остеотомії I-ї плюснової кістки.

## Матеріал і методи

Проведено аналіз результатів лікування 82 пацієнтів із ВДПП стопи, які перебували на лікуванні у клініці протягом 11 років. Всі хворі працездатного віку від 35 до 45 рр. Пацієнтів оперовано з приводу фіксованих деформацій III ступеню [2] та виконано проксимальну корегуючу остеотомію I-ї плюснової кістки, капсулопластику I-го плюснемо-фалангового суглоба із резекцією екзостозу голівки плюснової кістки та мобілізацію сесамовидних кісток за класичними методами [8]. Із метою фіксації уламків фрагментів плюснової кістки використовували стержневі апарати. Виконано корекцію молотоподібних деформацій II, III пальців стопи 78 пацієнтам.

До контрольної групи ввійшли 35 хворих із тією ж патологією, яких оперовано аналогічним методом та у яких зрощення у ділянці остеотомії відбулося у плановані терміни.

Ми визначали терміни консолидації плюсневих кісток за рентгенологічними та клінічними ознаками (наявність больового синдрому та патологічної рухомості).

Усім хворим визначали генетичні маркери порушення остеогенезу: молекулярно-генетичним методом вивчали ген VDR, а саме його поліморфні локуси Ara I, Tag I, Fok I, наявність яких (генотип FF) може свідчити про схильність до порушень остеогенезу. Матеріалом для генетичного дослідження служило ДНК, виділене із лейкоцитів периферійної крові хворих. Усі пацієнти були поінформовані про суть дослідження та дали згоду для проведення забору проб крові. Проводили виділення та очищення ДНК методом ферментаційного розщеплення та подальшої фенольної екстракції. На наступних етапах дослідження проводили ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro*, використовуючи ме-

тод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Олігонуклеотидні праймери були синтезовані в Інституті біоорганічної хімії РАН (м. Москва, Росія). Послідовності праймерів для аналізу були надані Dr. Hong-Wen Deng (Osteoporosis Research Center, Creighton University, NE). Проводили розщеплення продуктів ПЛР ендонуклеазами рестрикції. Визначення специфічності продуктів ПЛР та аналіз рестрикційних фрагментів проводили шляхом електрофорезу у 2-3% агарному гелі.

Отримані результати піддавали обчисленню методами варіаційної статистики із визначенням критерію Пірсона ( $\chi^2$ ) та приймали стандартний для медично-біологічних досліджень рівень значущості 5% ( $p < 0,05$  при  $\chi^2 > 3,841$ ).

## Результати й обговорення

У дослідній групі було 47 пацієнтів, яких оперовано з приводу ВДПП зі застосуванням остеотомії I плюснової кістки із виявами сповільненої консолидації у ділянці остеотомії. У 9 (19,1%) хворих фіксатори демонтовано у терміни від 13 до 14 тижнів при наявності клінічних ознак зрощення із наступною фіксацією ортопедичним взуттям. Потребували фіксації 32 (68,1%) пацієнти до 16 тижнів, рентгенологічно консолидацію підтверджено у термін після 17 тижнів (рис. 1). У 6 (12,8%) хворих рентгенологічно консолида-

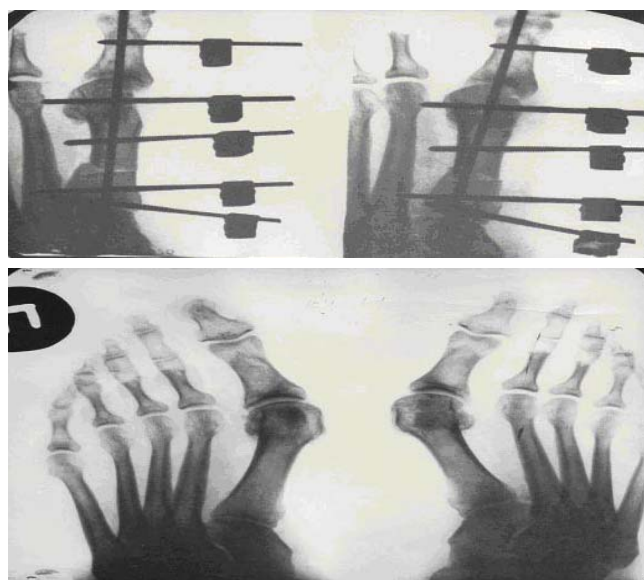


Рис. 1

Клінічний приклад: вальгусна деформація I пальця стопи III ст. На контрольній рентгенограмі через 16 тижнів після операції остеотомії I-ї плюснової кістки рентгенологічні ознаки зрощення фрагментів відсутні

Таблиця 1  
Аналіз поліморфізму локусу *ApaI* гену *VDR*

Генотип	Частота генотипу		$\chi^2$
	Група дослідження	Контрольна група	
AA	0.22	0.40	2,54
Aa	0.72	0.57	1,83
aa	0.06	0.03	0,37

Таблиця 2  
Аналіз поліморфізму локусу *Taq I* гену *VDR*

Генотип	Частота генотипу		$\chi^2$
	Група дослідження	Контрольна група	
TT	0.41	0.53	1,06
Tt	0.46	0.30	1,86
tt	0.13	0.17	0,19

Таблиця 3  
Аналіз поліморфізму локусу *Fok I* гену *VDR*

Генотип	Частота генотипу		$\chi^2$
	Група дослідження	Контрольна група	
FF	0.35	0.27	0,55
Ff	0.48	0.60	1,08
ff	0.17	0.13	0,05

цію не підтверджено але болу та патологічної рухомості у подвійний термін не виявлено.

Результати аналізу поліморфного локусу *ApaI* методом ПЛР наведено у табл. 1.

Присутність рестрикції *Apa I* гену *VDR* в обох алелях (генотип AA) є ознакою схильності до розвитку ОП. Цей генотип встановили у 22% пацієнтів зі сповільненою консолидацією кісток та у 40%, які входили у контрольну групу. Проте, ці відмінності не є статистично вірогідними. Не встановлено вірогідних відмінностей й у частотах генотипів Aa та aa. Результати аналізу поліморфного локусу *Taq I* наведено у табл. 2.

Отже, частоти гомозигот tt у групах, які ми досліджували, становили 13% та 17% і не відрізнялися між собою статистично істотно.

Аналіз поліморфного локусу *Fok I* методом ПЛР проведено 47 хворим на ВДППС із порушенням консолидації після остеотомії та 35 пацієнтам, що входили у контрольну групу. Результати аналізу наведено у табл. 3.

Присутність в обох алелях гену *VDR* сайту розпізнавання рестриктази *Fok I* (генотип FF), за джерелами літератури, є ознакою схильності до розвитку ОП та порушення регенераційного остеогенезу. Генотип FF визначали у досліджуваній групі значно частіше, порівняно із контрольною (табл. 3), відповідно, у 35% та 27% пацієнтів.

## Висновки

1. Із допомогою молекулярно-генетичних методів вивчено спектр та частоти генотипів поліморфних локусів *ApaI*, *TaqI* та *FokI* гену *VDR* серед осіб із сповільненою консолидацією кісток та у контрольній вибірці.
2. Проведене дослідження показало пряму кореляцію явищ порушення консолидації фрагментів плюснової кістки після остеотомії із приводу ВДППС з частотою виявлення генотипу FF.
3. Подальше вивчення методів молекулярно-генетичного аналізу та впровадження їх у алгоритм обстеження хворих є перспективним і може значно покращити підготовку та планування ортопедичних операцій зі застосуванням остеотомії.

## Література

1. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены "предрасположенности". Интермедика, Санкт-Петербург, 2000, 271 с.
2. Coughlin MJ. Hallux valgus: causes, evaluation, and treatment. Postgrad Med. 1984; 75: 174-178.
3. Eisman JA. Genetics of osteoporosis // Endocrine Reviews. 1999; 20 (6): 788 -804.
4. Lucotte G. Mercier G. Burckel A. The vitamin D receptor *FokI* start codon polymorphism and bone mineral density in osteoporotic postmenopausal French woman. Clinical Genetics 1999; 56(3); 221-224.
5. Obermayer-Pietsch B. Chararas C. Genetic background of osteoporosis // Acta Medica Austriaca 2000; .27 (1):18-22.
6. Poggi M. Aterini S. Lack of association between body weight, bone mineral density and vitamin D receptor gene polymorphism in normal and osteoporotic woman // Disease Markers 1999; 15(4): 221-227.
7. Ramalho AC. Lazaretti-Castro M. Fracture of the proximal femur: correlation with vitamin D receptor gene polymorphism. Brazilian Journal of Medical & Biological Research 1998; 31(7): 921-927.
8. Smith BW, Coughlin MJ. Treatment of hallux valgus with increased distal metatarsal articular angle: use of double and triple osteotomies. Foot Ankle Clin. Sep 2009; 14 (3): 369-82.
9. Vandevyver C. Wylin T. Cassiman JJ. Influence of the vitamin D receptor gene alleles on bone mineral density in postmenopausal and osteoporotic woman. Journal of Bone & Mineral Research 1997; 12(2): 241-247.
10. Zajickova K, Zofkova I, Bahbouh R, Krepelova A. Vitamin D receptor gene polymorphism, bone mineral density and bone turnover: *FokI* genotype is related to postmenopausal bone mass Physiology results 2002; 51(5): P. 501-50.