

*На правах рукописи*

*Каргина*

Каргина Ирина Геннадьевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПАТОГЕНЕЗА  
РАХИТА У ДЕТЕЙ**

**14.03.03 – патологическая физиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Чита – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

Доктор медицинских наук, доцент Щербак Владимир Александрович

**Официальные оппоненты:**

**Шолохов Леонид Федорович** - доктор медицинских наук, профессор  
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» заведующий лабораторией физиологии и патологии эндокринной системы, г. Иркутск

**Романцова Елена Борисовна** - доктор медицинских наук, профессор  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства Здравоохранения РФ, заведующая кафедрой детских болезней, г. Благовещенск

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «13» февраля 2020 г. в 11-00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.118.02 в ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ (672000, г. Чита, ул. Горького, 39а)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ (672000, г. Чита, ул. Горького, 39а) и на сайте: <http://chitgma.ru>

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 208.118.02  
доктор медицинских наук, доцент

Н.А. Мироманова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Актуальность проблемы и степень научной разработанности темы исследования.**

Рахит определяется как нарушение минерализации костной ткани, обусловленное временным несоответствием между потребностями растущего организма в фосфоре и кальции и недостаточностью систем, обеспечивающих их доставку в организм ребенка (Баранов А.А., 2018). Рахит является не только педиатрической, но и медико-социальной проблемой в связи с тем, что связанные с ним костные изменения в последующем могут предрасполагать к развитию других костных и внескостных нарушений. Выявленные нарушения абсорбции микроэлементов (кальция, фосфора и магния) приводят к развитию мышечной гипотонии, вегетативным дисфункциям, нарушениям моторики желудочно-кишечного тракта. Иммунологические нарушения, возникающие при рахите, предрасполагают к частым инфекционным заболеваниям, задерживают или полностью нарушают социальную адаптацию ребенка. В основе дальнейшего физиологического развития ребенка лежит адекватная профилактика и своевременная терапия рахита у младенцев, препятствующая отдаленным последствиям (Майлян Э.А., 2017).

В патогенезе рахита хорошо изучена роль ряда биохимических маркеров (Захарова И.Н. и др., 2014). Описаны факторы, свидетельствующие о генетической предрасположенности к развитию многих заболеваний, ассоциированных с полиморфизмом рецептора витамина D (Реушева С.В., 2013; Костик М.М., 2014). Согласно исследованиям последних лет, полиморфизмы генов рецептора витамина D и коллагена определяются при различных заболеваниях костной системы (Габруская Т., 2016; Мордовский В.С., 2016; Виссарионов С.В., 2017). Продемонстрировано значение аллельных вариантов полиморфизмов генов VDR:283 A>G (BsmI), VDR:2 A>G (Lys2Arg) [FokI], COL1A1: -1997 C>A, COL1A1: 1546 (6252) G>T [Sp1 S>s], RANKL C>T [rs 9594738], RANKL C>T [rs 9594759] при заболеваниях костной системы у детей (Мальцев С.В., 2012; Tamagno G., 2015; Lim L.M., 2015; Bao L., 2017). Однако значение данных генетических полиморфизмов в патогенезе рахита не исследовано.

Таким образом, хорошо изученными при рахите являются нарушения минерального и витаминного баланса. Вместе с тем, отдельные патогенетические механизмы развития рахита недостаточно исследованы. Так, не ясна роль генетических полиморфизмов рецептора витамина D, коллагена и гормонов, регулирующих фосфорно-кальциевый обмен в патогенезе рахита.

### **Цель исследования**

Установить биохимические и молекулярно-генетические закономерности изменений метаболизма костной ткани при рахите у детей.

### **Задачи исследования**

1. Исследовать концентрацию и активность маркеров метаболизма костной ткани при рахите – кальцитриола, паратиреоидного гормона, кальцитонина, остеопротегерина, С-концевого телопептида коллагена I типа, кислой фосфатазы, остеокальцина, кальция, фосфора, щелочной фосфатазы у детей в Забайкальском крае.

2. Определить частоту носительства SNP аллельных вариантов генов молекул, регулирующих метаболизм костной ткани – рецептора витамина D VDR:283 A>G (BsmI), VDR:2 A>G (Lys2Arg) [FokI], коллагена COL1A1: -1997 C>A, COL1A1: 1546 (6252) G>T [Sp1 S>s], остеопротегерина RANKL C>T [rs 9594738], RANKL C>T [rs 9594759].

3. Изучить концентрацию молекул метаболизма костной ткани при рахите в зависимости от варианта носительства SNP изучаемых генов: рецептора витамина D VDR:283 A>G (BsmI), VDR:2 A>G (Lys2Arg) [FokI], коллагена COL1A1: -1997 C>A, COL1A1: 1546 (6252) G>T [Sp1 S>s], остеопротегерина RANKL C>T [rs 9594738], RANKL C>T [rs 9594759].

4. Оценить роль маркеров метаболизма костной ткани и генов коллагена, рецептора витамина D и остеопротегерина в прогнозировании варианта течения рахита у детей.

### **Научная новизна**

Впервые описано первичное звено патогенеза рахита, которое включает носительство SNP генов коллагена - COL1A1: -1997 C>A и COL1A1: 1546 (6252) G>T [Sp1 S>s], а также изменение уровня С-концевого телопептида коллагена I типа сыворотки крови. Выявлена патогенетическая ось рахита, включающая SNP генов коллагена COL1A1: -1997 C>A и COL1A1: 1546 (6252) G>T [Sp1 S>s], концентрацию кальцитриола, С-концевого телопептида коллагена I типа и остеопротегерина.

Установлено, что наличие минорной аллели А гена COL1A1: -1997 C>A и аллельного варианта Т промотора гена COL1A1: 1546 (6252) G>T [Sp1 S>s] ассоциировано с развитием рахита у детей.

### **Теоретическое и практическое значение работы**

В исследовании представлены новые сведения о механизмах развития рахита. Полученные результаты расширяют имеющиеся представления о патогенезе рахита у детей. Установлена частота встречаемости SNP вариантов VDR:283 A>G (BsmI), VDR:2 A>G (Lys2Arg) [FokI], COL1A1: -1997 C>A, COL1A1: 1546 (6252) G>T [Sp1 S>s] среди здоровых резидентов Забайкальского края и у детей, больных рахитом, а также показано влияние SNP генов, регулирующих фосфорно-кальциевый обмен, на предрасположенность к рахиту.

Полученная информация об аллельных вариантах изученных полиморфизмов генов рецептора витамина D - VDR:283 A>G (BsmI), VDR:2 A>G (Lys2Arg) [FokI], коллагена - COL1A1: -1997 C>A, COL1A1: 1546 (6252) G>T [Sp1 S>s], остеопротегерина - RANKL C>T [rs 9594738], RANKL C>T [rs 9594759] может быть включена в генетический паспорт индивидуума и послужить основой для разработки новых подходов прогнозирования развития болезни, оценки риска и профилактики рахита у детей.

На основании полученных данных разработана модель прогнозирования рахита, основными составляющими которой являются SNP гена коллагена COL1A1: -1997 C>A и уровень интактного ПТГ в сыворотке крови.

### **Методология и методы исследования**

Проведено комплексное исследование 82 детей в возрасте от 3 месяцев до 2 лет, больных рахитом. В работе использовались лабораторные (генетические, иммунологические, биохимические) и статистические методы исследований. Методологической основой исследования явились работы отечественных и зарубежных авторов, изучавших механизмы развития и диагностику рахита у детей, в том числе включающие вопросы генетической предрасположенности в развитии нарушения обмена минеральных веществ. В соответствии с целью работы и поставленными задачами разработана программа необходимых исследований, в рамках которой применялся ряд методик:

1. Отбор в клинические группы исследования и контроль проводился на основании клинических и лабораторных данных.

2. Оценка уровня биохимических показателей (остеопротегерина, С-концевого телопептида коллагена I типа ( $\beta$ -CrossLaps), кальцитонина, остеокальцина, паратиреоидного гормона, кальция, фосфора. уровень щелочной и кислой фосфатаз) проведена в образцах крови обследуемого ребенка.

3. Определение полиморфизмов генов рецептора витамина D - VDR:283 A>G (BsmI) и VDR:2 A>G (Lys2Arg) [FokI], коллагена - COL1A1: -1997 C>A и COL1A1: 1546 (6252) G>T [Sp1 S>s], остеопротегерина - RANKL C>T [rs 9594738] и RANKL C>T [rs 9594759] проводилось методом ПЦР-диагностики в образцах крови обследуемого ребенка.

4. Для обработки и представления полученных результатов применялись методы статистического анализа: медианы с перцентильным отклонением [25-75] (Me и 25-75 перцентиль), критерий Манна-Уитни (U-тест), уравнение равновесия Харди-Вайнберга, критерий Пирсона ( $\chi^2$ ), отношение шансов (ОШ). Для прогнозирования рахита у ребенка проведен регрессионный анализ, в уравнение включались показатели со статистически значимым результирующим признаком.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Патогенетическая ось, включающая SNP варианты генов коллагена COL1A1: -1997 C>A и COL1A1: 1546 (6252) G>T [Sp1 S>s], кальцитриол, С-концевой телопептид коллагена I типа и остеопротегерин, играет роль в развитии рахита.
2. Полиморфизм генов коллагена COL1A1: -1997 C>A и COL1A1: 1546 (6252) G>T [Sp1 S>s] предрасполагает к развитию рахита. Присутствие генотипа AA гена коллагена COL1A1: -1997 C>A и аллельного варианта T гена COL1A1: 1546 (6252) G>T [Sp1 S>s] сопровождается высоким уровнем С-концевого телопептида коллагена I типа.
3. Уровень паратиреоидного гормона и генотип AA гена коллагена COL1A1: -1997 C>A обладают прогностической значимостью в развитии острого и подострого течения рахита у детей.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность результатов и выводов проведенного исследования в соответствии с поставленными задачами определяется достаточным объемом выполненного исследования, использованием современных методов вариационной статистики (параметрических и непараметрических) и регрессионного анализа.

Результаты работы доложены на XX Съезде педиатров России с международным участием «Актуальные проблемы педиатрии» (Москва, 2018); XXV Международном конгрессе детских гастроэнтерологов России и стран СНГ «Актуальные проблемы абдоминальной патологии у детей» (Москва, 2018); XVII межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Медицина завтрашнего дня», посвященной 65-летию Читинской государственной медицинской академии (Чита, 2018); конференции «Актуальные вопросы первичной медико-санитарной помощи детям и подросткам» (Чита, 2018); международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию образования Читинской государственной медицинской академии (Чита, 2018); XVII Российском конгрессе «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии» (Москва, 2018).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

### **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, характеристики методов исследования, главы собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и

списка используемой литературы (118 отечественных и 82 зарубежных источников). Работа иллюстрирована 30 таблицами, 6 рисунками, 2 клиническими примерами.

**Личный вклад автора** заключается в планировании научной работы, самостоятельном проведении анализа историй развития исследуемых, формировании опытных и контрольной групп, непосредственном участии в их клиническом обследовании. Соискателем самостоятельно проведен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме, интерпретация клинических, лабораторных и инструментальных данных, их систематизация, статистическая обработка с описанием полученных результатов, написание и оформление рукописи диссертации, публикаций по выполненной работе.

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты исследований по изучению биохимических маркеров и генетического полиморфизма молекул, участвующих в метаболизме костной ткани при рахите, внедрены в образовательный процесс кафедр патологической физиологии, пропедевтики детских болезней и педиатрии ФПК и ППС ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, а также в лечебно-диагностическую работу поликлинического подразделения №3 ГУЗ «Детский клинический медицинский центр» г. Читы.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

В работе соблюдены принципы Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association of Helsinki, 1964, редактированная в октябре 2013 г на 64-ой Генеральной Ассамблее ВМАЮ, Форталеза, Бразилия) и «Правила клинической практики Российской Федерации», утвержденными приказами Минздравом РФ от 19.03.2003 г. № 266. Диссертационное исследование прошло экспертизу локального этического комитета при ФГБОУ ВО «Читинской государственной медицинской академии» от 06.11.2015 г, протокол № 74.

Обследование детей проводилось в ГУЗ «Детский клинический медицинский центр» г. Читы в период с января 2015г. – по июнь 2017г. Исследование генетических полиморфизмов и биохимических показателей проведено в НИИ «Молекулярной медицины» ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Минздрава России.

**Дизайн.** Представленная работа является одномоментным контролируемым клиническим сравнительным исследованием по типу случай-контроль (рис. 1).



**Рисунок 1. Дизайн исследования.**

В ходе нашего исследования верификация диагноза «рахит» проводилась на основании клиничко-anamнестических данных согласно классификации С.О. Дулицкого, 1947 г. с изменениями от 2018 г. Родители пациентов проинформировались о цели и задачах работы, получено письменное согласие на проведение диагностических мероприятий их детям.

Критерии включения в группу детей с рахитом: доношенные дети в возрасте от 3 месяцев до 2 лет с манифестацией клинических признаков рахита (деформации грудной клетки, черепа, нижних конечностей, мышечная гипотония).

Критерии исключения: дети младше 3 месяцев и старше 2 лет, от матерей употребляющих психоактивные препараты, алкоголь, из социально-неблагоприятных условий, младенцы с пороками развития, с внутриутробной инфекцией, от многоплодной беременности, недоношенные, страдающие заболеваниями почек, печени, желудочно-кишечного тракта, с синдромом мальабсорбции, поражением кожных покровов, нарушением функции щитовидной и паращитовидных желез, гипотрофией, принимающие глюкокортикоиды, гепарин, противосудорожные препараты, фуросемид, фосфаты, магний, антациды, на основе алюминия.

Критерии включения в группу контроля: доношенные дети в возрасте от 3 месяцев до 2 лет без клинических и лабораторных признаков рахита.



**Клиническая характеристика групп наблюдения.** Все исследуемые клинической группы - дети из социально-адаптированных семей. Средний возраст пациентов с острым течением -  $7,9 \pm 4,6$  мес., с подострым -  $10,1 \pm 4,7$  мес. Все обследованные дети из группы контроля родились доношенными, с массой при рождении по IV-V центильным коридорам. На момент осмотра дети не имели других острых, либо хронических заболеваний. Все дети с *острым течением рахита легкой степени* имели поражения костной системы в виде размягчения швов и краев родничка. У всех детей данной группы отмечалась дисфункция центральной и вегетативной нервной систем в виде беспокойства, плаксивости, потливости головы, в особенности затылочной части, а также явления красного дермографизма. Нервно-психическое развитие у всех обследованных с острым течением легкой степени рахита соответствовало возрасту. Мышечный тонус умеренно снижен в конечностях у всех пациентов, преобладали запоры (72% детей).

Пациенты из *подгруппы рахита острого течения средней степени тяжести* имели нарушения со стороны костно-суставной системы: краниотабес (100%), задержка сроков прорезывания зубов (76% пациентов). Со стороны нервной системы у всех детей отмечались: быстрая утомляемость, сонливость, потливость головы, шеи, тела, красный дермографизм, симптомы задержки нервно-психического развития отмечены у 18% пациентов. У всех детей данной группы наблюдалось снижение мышечного тонуса в конечностях, гипотония мышц передней брюшной стенки - у 89% пациентов, запоры - у 84% детей.

Все пациенты *подгруппы с подострым течением легкой степенью тяжести рахита* имели поражение костно-суставной системы в виде гиперплазии лобных и затылочных бугров, выбухание надбровных дуг отмечено у 58% детей. Со стороны костно-суставной системы все пациенты группы обладали выраженным беспокойством, потливостью головы, в особенности затылочной части, а также стойким красным дермографизмом. Задержка нервно-психического развития зарегистрирована у 30% пациентов. Мышечный тонус снижен в конечностях у всех пациентов, преобладали запоры (90% детей).

Симптомами остеоидной гиперплазии характеризовалось поражение костно-суставной системы пациентов с подострым течением средней степенью тяжести рахита. Поражение нервной системы характеризовалось симптомами ее угнетения. Снижение мышечного тонуса в конечностях, мышцах передней брюшной стенки зарегистрировано у всех детей.

В целях соблюдения этических норм научного исследования проводился анализ внутри этнической выборки, межрасовое сравнение не проводилось. Дальнейшее наблюдение за детьми и контроль клинической картины и биохимических показателей осуществлялись участковыми педиатрами.

### **Лабораторные методы исследований**

**Определение уровня маркеров метаболизма костной ткани** осуществлялось методом твердофазного иммуноферментного анализа: уровень остеопротегерина определялся набором RayBio (США); С-концевой телопептид коллагена I типа - реагентами теста SEA892Hu 96 (США); уровень кальцитонина - с помощью набора Kit кальцитонина человека Biolabs (США). Уровень остеокальцина определялся с помощью Иммуноанализа Quantikine Human Osteocalcin. Паратиреоидный гормон (ПТГ) подсчитан с помощью набора для количественного определения концентрации интактного паратиреоидного гормона Access Intact PTH (США). Кальций определен колориметрическим методом набором Кальций-Витал (Россия), уровень фосфора - фотометрическим УФ-тестом (Россия); щелочной фосфатазы (ЩФ) в сыворотке крови - оптимизированным кинетическим методом (Россия); кислой фосфатазы (КФ) - набором реагентов для биохимических исследований производства Human GmbH (Германия).

**Определения уровня кальцитриола** осуществляли с помощью набора IDIA 1,25-дигидроксивитамин D EIA путем иммуноэкстракции.

**Определение полиморфизма генов** рецептора витамина D, коллагена, остеопротегерина осуществлялось методом ПЦР с использованием праймеров «ООО НПО ДНК-Технология» (г. Москва). Анализу подвергалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь», затем проводилась реакция амплификации с двумя парами аллель-специфичных праймеров.

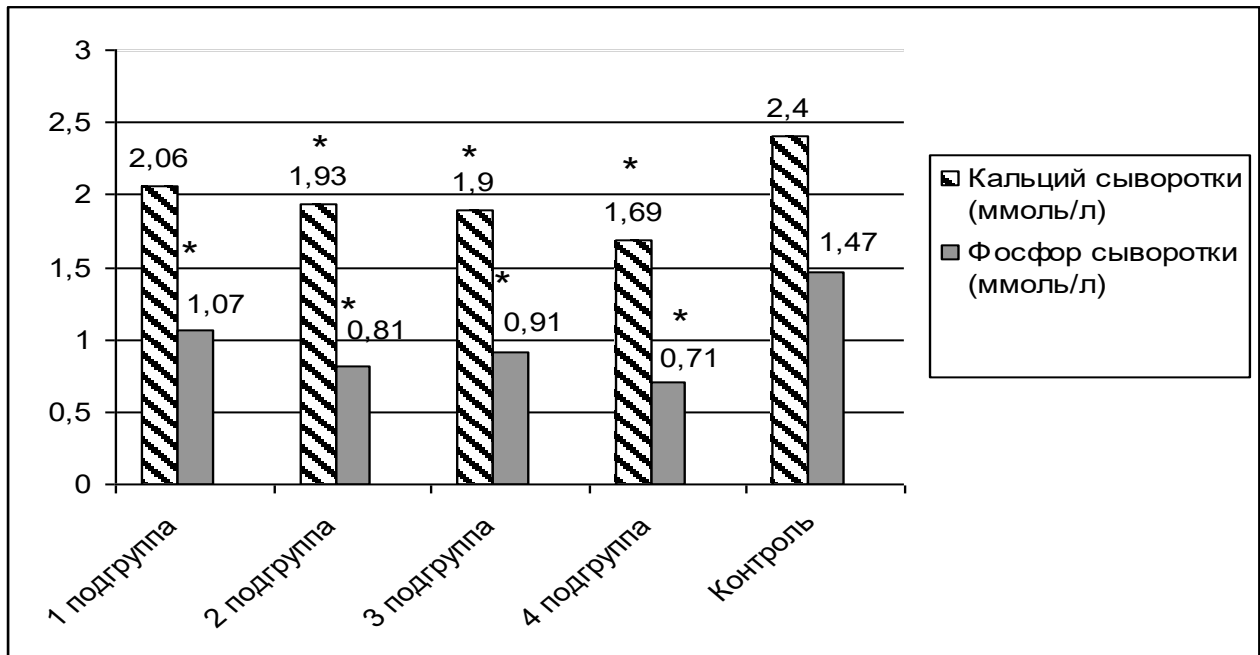
**Статистическая обработка полученных результатов** проводилась с использованием пакетов программ Microsoft Excel 2010, STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США). Вариационные ряды тестировались на нормальность распределения при помощи методов асимметрии и эксцессов. Количественные результаты исследования описывались с использованием медианы с перцентильным отклонением [25-75] (Me и 25-75 перцентиль). Сравнение двух несвязанных групп проводили критерием Манна-Уитни (U-тест). Для оценки равновесия соответствия распределений генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга и для сравнений распределений частот генотипов и аллелей в исследованных группах использовался  $\chi^2$  (Пирсона). Об ассоциации изучаемых аллелей и генотипов с предрасположенностью к рахиту судили по величине относительного риска заболеваний (ОР) и отношение шансов (ОШ). Границы 95% доверительного интервала (CI) вычисляли методом В. Woolf. Корреляционный анализ проводился по методу ранговой корреляции Спирмена. Значение уровня  $p < 0,05$  считалось статистически значимым.

Предсказания значений ряда зависимых переменных осуществлялось с помощью множественного регрессионного анализа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 1. Исследование маркеров метаболизма костной ткани в группах наблюдения

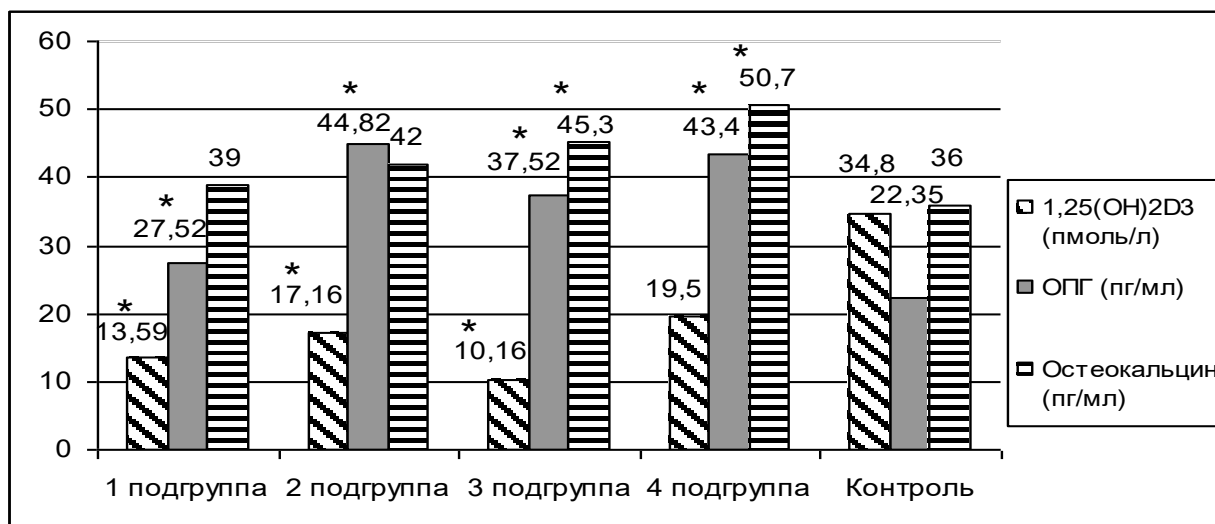
В ходе исследования на основании данных биохимических показателей крови, установлено, что концентрация кальция и фосфора сыворотки крови детей с рахитом ниже, чем в контрольной группе, независимо от степени и периода заболевания (рис. 2).



**Рисунок 2. Биохимические показатели обмена костной ткани при рахите в зависимости от течения и степени рахита**

Примечание: \* - уровень значимости различий приведен по сравнению со здоровыми при  $p < 0,05$ .

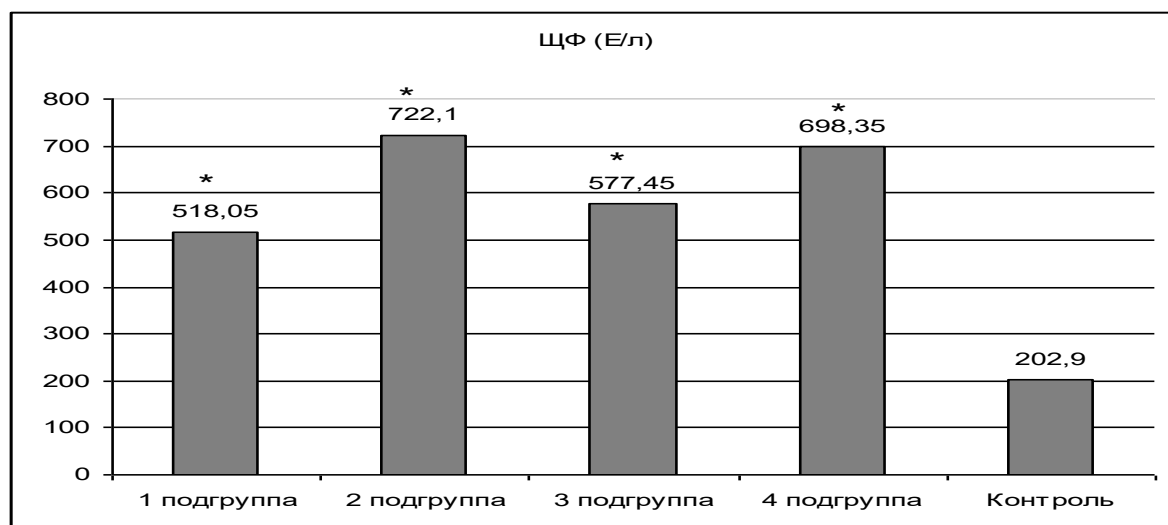
Концентрация кальцитриола снижена во всех группах детей с рахитом. Максимальное повышение уровня ОПГ наблюдается при среднетяжелой степени рахита. Уровень остеокальцина в группах с рахитом повышен значительно (рис. 3).



**Рисунок 3. Уровень кальцитриола при рахите в зависимости от течения и степени рахита**

Примечание: \* - уровень значимости различий приведен по сравнению со здоровыми при  $p < 0,05$ .

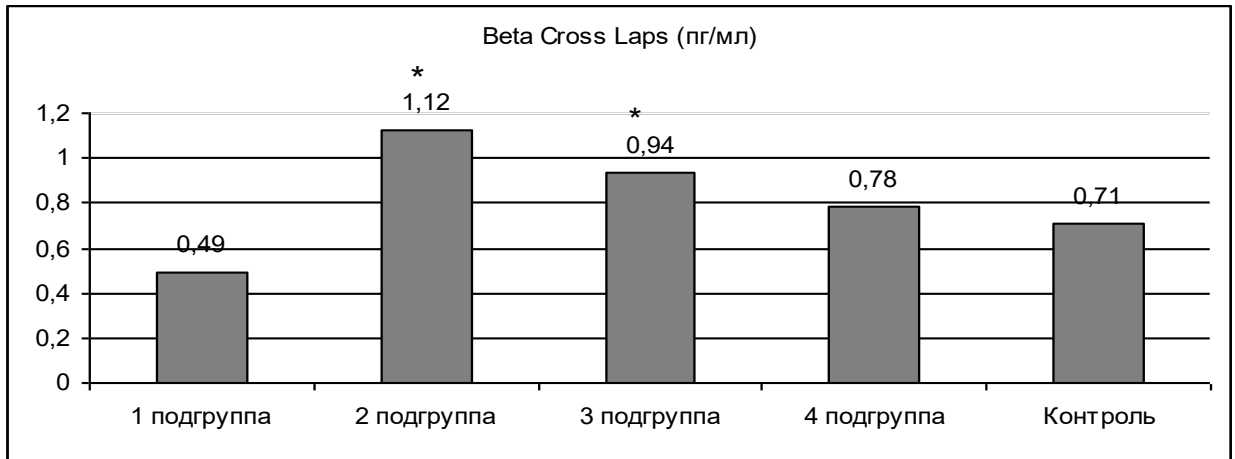
У всех детей больных рахитом наблюдалось увеличение активности ЩФ, что свидетельствует о процессе резорбции в костной ткани (рис. 4).



**Рисунок 4. Активность щелочной фосфатазы в зависимости от течения и степени рахита**

Примечание: \* - уровень значимости различий приведен по сравнению со здоровыми при  $p < 0,05$ .

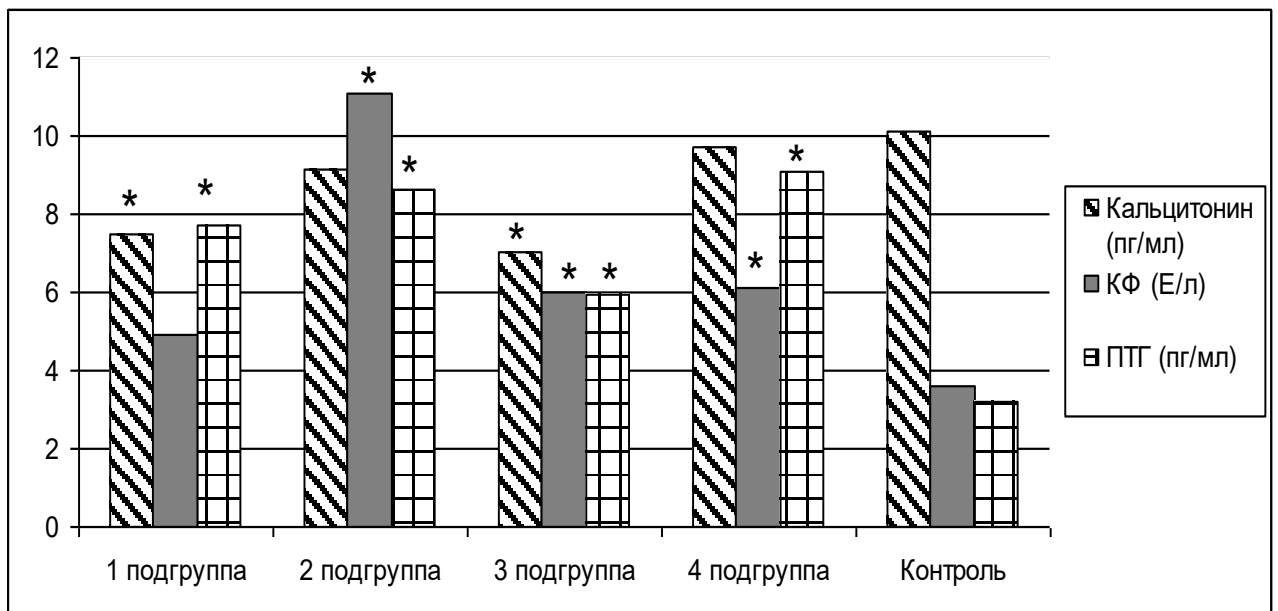
Повышение концентрации С-концевого телопептида коллагена I типа ( $\beta$ -Cross Laps) зарегистрировано при остром течении средней степени и подостром течении подгруппах детей с рахитом (рис. 5).



**Рисунок 5. Уровень С-концевого телопептидаколлагена I типа при рахите в зависимости от течения и степени рахита**

Примечание: \* - уровень значимости различий приведен по сравнению со здоровыми при  $p < 0,05$ .

Уровень кальцитонина значительно снижен в 1 подгруппе на 26% ( $p < 0,05$ ), в сравнении с группой контроля, что составляет 7,48 [3,84; 8,76] пг/мл. Активность КФ также повышена в сравнении с контрольной группой. ПТГ резорбирует костную ткань, являясь основным регулятором метаболизма. В 1 и 2 подгруппах в 2 раза ( $p < 0,05$ ) повышена концентрация ПТГ и составляет 7,70 [5,90; 9,50] пг/мл и 8,65 [5,20; 10,50] пг/мл, соответственно (рис. 6).



**Рисунок 6. Биохимические показатели обмена костной ткани при рахите в зависимости от течения и степени рахита**

Примечание: \* - уровень значимости различий приведен по сравнению со здоровыми при  $p < 0,05$ .

## 2. Исследование вариации генов метаболизма костной ткани

Анализ результатов в группах (табл. 1) показал, что дети – носители аллели А и генотипа АА (OR= 6,05, 95%, CI: 0,34-108,42, p=0,1) гена коллагена COL1A1: -1997 C>A среди пациентов с рахитом встречались чаще, по сравнению со здоровыми детьми. Мутантный генотип (АА) в группе контроля не выделен.

Таблица 1

### Распределение аллельных вариантов генов COL1A1: -1997 C>A

Генотипы и аллели	Частота вариации среди детей		P ( $\chi^2$ )
	Рахит, n=82	Группа контроля, n=26	
Генотип СС, n (%)	46 (56)	22 (84,6)	0,02 (7,43)*
Генотип СА, n (%)	28 (34,1)*	4 (15,4)	
Генотип АА, n (%)	8 (9,9)	0	
Аллель С, n (%)	74 (90,2)	26 (100)	0,004 (8,37)
Аллель А, n (%)	36 (43,9)	4 (15,4)	

Примечание: \* - уровень значимости различий приведен по сравнению со здоровыми при  $p < 0,05$ .

При распределении генотипов и частоты аллельных вариантов COL1A1:1546 (6252) G>T [Sp1 S>s] среди детей с рахитом и группы контроля (табл. 2), установлено значительное преобладание генотипа GG. Гетерозиготный мутантный аллель (GT) и гомозиготный мутантный аллель (TT) зарегистрирован в 29,3% и 2,4% случаев.

Таблица 2

### Распределение аллельных вариантов гена COL1A1:1546 (6252) G>T [Sp1 S>s] среди детей с рахитом и группы контроля

Генотипы и аллели	Частота генотипов и аллелей полиморфизма среди детей		P ( $\chi^2$ )
	Рахит, n=82	Группа контроля, n=26	
Генотип GG, n (%)	56 (68,5)*	20 (77)	0,54 (0,38)
Генотип GT, n (%)	24 (29,3)	5 (19,2)	
Генотип TT, n (%)	2 (2,4)	1(3,8)	
Аллель G, n (%)	80 (83)	25 (87)	0,56 (0,38)
Аллель T, n (%)	26 (17)	6 (13)	

Примечание:\* - уровень значимости различий приведен по сравнению со здоровыми при  $p < 0,05$ .

Носители аллели Т, как и варианта гена коллагена COL1A1:1546 (6252) G>T [Sp1 S>s], встречались во всех группах в равном соотношении. Отклонение от равновесия Харди – Вайнберга для полиморфизмов генов коллагена COL1A1: -1997 C>A и COL1A1:1546 (6252) G>T [Sp1 S>s] не выявлено (табл. 3).

Таблица 3

**Частота генотипов полиморфизма COL1A1 у детей с рахитом**

Полиморфизм	Генотип, абс. число	Частота генотипа	HWE	$\chi^2$ (df=1), p
1997 C>A	C/C-46	0,561	0,535	1,39, p=0,24
	C/A-28	0,341	0,393	
	A/A-8	0,098	0,072	
1546 (6252) G>T [Sp1 S>s]	G/G-26	0,6	0,58	0,09, p=0,76
	G/T-12	0,3	0,69	
	T/T-1	0,025	0,74	

Примечание:  $\chi^2$  (df=1). \* - отклонение от равновесия Харди- Вайнберга

Нами выявлен высокий риск развития события при появлении аллели А в генотипе гена коллагена COL1A1: -1997 C>A. Оценивая уровень С-концевого телопептида коллагена 1 типа выявлено повышение уровня пептида у носителей генотипа АА гена COL1A1: -1997 C>A (табл. 4).

Таблица 4

**Уровень С-концевого телопептида коллагена 1 типа (пг/мл) в зависимости от распределения аллельных вариантов COL1A1: -1997 C>A**

Группа	C/C	C/A	A/A
Рахит, n=82	0,51 [0,29; 0,99]	0,31 [0,18; 0,48]	0,66 [0,29; 0,69]*
Контроль, n=26	0,70 [0,21; 1,21]	1,12 [0,73; 1,51]	0

Примечание: \* - уровень значимости различий приведен по сравнению со здоровыми при  $p < 0,05$ .

При оценке влияния гена COL1A1:1546 (6252) G>T [Sp1 S>s] на уровень С-концевого телопептида коллагена 1 типа, нами установлено повышение уровня пептида при генотипе ТТ в группе пациентов, больных рахитом (табл. 5).

Таблица 5

**Уровень С-концевого телопептида коллагена 1 типа (пг/мл) в зависимости от генотипов полиморфизма COL1A1:1546 (6252) G>T [Sp1 S>s]**

Группа	G/G	G/T	T/T
--------	-----	-----	-----

Рахит, n=82	0,7 [0,33; 1,66]	0,56 [0,15; 1,62]	1,09 [0,88; 0,1,30]*
Контроль, n=26	0,98 [0,24; 1,66]	0,64 [0,57; 3,09]	0,76

Примечание: \* - уровень значимости различий приведен по сравнению со здоровыми при  $p < 0,05$ .

Таким образом, нами выявлен высокий риск развития события при появлении аллели А в генотипе коллагена COL1A1: -1997 C>A.

### 3. Корреляционный анализ биохимических маркеров при рахите

Нами выявлено наличие корреляции между лабораторными показателями минерального обмена и маркерами метаболизма костной ткани у детей с рахитом (табл. 6). Выявлена обратная слабая связь между концентрацией кальция и уровнем С-концевого телопептида коллагена I типа, обратная сильная связь между уровнем кальция и активностью щелочной фосфатазы. Прямая связь средней силы зарегистрирована между уровнем кальцитриола и содержанием кальция в сыворотке крови при подостром течении, между концентрацией кальция и уровнем кальцитонина.

Таблица 6

Коэффициенты корреляции между различными маркерами метаболизма костной ткани у детей с рахитом

Показатели	Витамин D-дефицитный рахит		Группа контроля
	Острое течение	Подострое течение	
Связь с уровнем 1,25(OH)2D3			
Остеокальцин	-0,23 $p > 0,05$	-0,13 $p > 0,05$	-0,011 $p > 0,05$
Кальций сыворотки крови	0,24 $p > 0,05$	<b>0,54 <math>p &lt; 0,05</math></b>	0,28 $p > 0,05$
Связь с уровнем кальция			
Кальцитонин	<b>0,51 <math>p &lt; 0,05</math></b>	<b>0,44 <math>p &lt; 0,05</math></b>	<b>0,08 <math>p &lt; 0,01</math></b>
С-концевой телопептид	<b>-0,30 <math>p &lt; 0,05</math></b>	-0,10 $p > 0,05$	-0,23 $p > 0,05$
Щелочная фосфатаза	<b>-0,71 <math>p &lt; 0,01</math></b>	<b>-0,80 <math>p &lt; 0,01</math></b>	-0,01 $p > 0,05$
Паратиреоидный гормон	-0,04 $p > 0,05$	<b>-0,40 <math>p &lt; 0,05</math></b>	-0,12 $p > 0,05$
Связь с уровнем остеокальцина			
Остеопротегерин	<b>0,34 <math>p &lt; 0,05</math></b>	<b>0,40 <math>p &lt; 0,05</math></b>	<b>0,36 <math>p &lt; 0,05</math></b>
Связь с уровнем паратиреоидного гормона			
Кислая фосфатаза	0,54 $p < 0,05$	0,18 $p > 0,05$	0,08 $p > 0,05$
Щелочная фосфатаза	0,07 $p > 0,05$	<b>0,46 <math>p &lt; 0,05</math></b>	<b>0,36 <math>p &lt; 0,05</math></b>

Примечание:  $p < 0,05$  – связь статистически значима.



Таким образом, установлено, что у здоровых детей в большинстве случаев, связи между маркерами метаболизма костной отсутствуют, однако они появляются у больных рахитом. Следовательно, такую связь необходимо считать патологической, играющей роль в развитии рахита.

#### **4. Многофакторная модель прогнозирования течения рахита у детей**

В настоящее время общепринятыми критериями диагностики рахита являются данные клинической картины заболевания, рентгенологические и биохимические параметры, к которым относятся кальций, фосфор сыворотки крови и щелочная фосфатаза. В результате исследования рахита установлены дополнительные диагностические маркеры - генетические полиморфизмы гена коллагена COL1A1: -1997 C>A, а также изменение уровней С-концевого телопептида коллагена I типа, остеопротегерина, остеокальцина, кальцитриола, кальцитонина.

Для исследования связей между несколькими независимыми переменными и зависимой переменной (развитие рахита) с целью создания медико-математической модели возможного прогнозирования течения заболевания применен многофакторный регрессионный анализ. В математическую модель было включено 11 показателей (биохимические показатели и данные генотипа). При составлении уравнения регрессии использовался пошаговый подход, включение дополнительных переменных происходило только в случае, если их добавление к уже отобранным факторам указывало на нарастание значимой прогностической мощности.

Результаты данного многофакторного регрессионного анализа показали, что наиболее близко связанными с возникновением рахита являются изменения уровня интактного ПТГ в сыворотке крови и носительство мутантного генотипа AA гена COL1A1: -1997 C>A (табл. 7).

**Прогностическое значение показателей в многофакторной модели течения  
рахита у детей**

	БЕТА	Ст.Ош.	В	Ст.Ош.	t(97)
Св.член			<b>0,520010</b>	<b>0,124746</b>	<b>4,16855</b>
COL1A1: -1997 C>A, генотип AA	<b>0,215837</b>	<b>0,096757</b>	<b>0,190148</b>	<b>0,085241</b>	<b>2,23071</b>
COL1A1: 1546 (6252) G>T [ Sp1 S>s], генотип AA	0,018579	0,093282	0,017734	0,089040	0,19917
RANKL C>T [rs 9594738], генотип TT	0,003858	0,120700	0,003454	0,108059	0,03197
RANKL C>T [rs 9594759], генотип TT	-0,039533	0,118388	-0,041965	0,125673	-0,33392
ОПГ	0,048292	0,098308	0,021601	0,043973	0,49123
С- концевой телопептид коллагена I типа	-0,126577	0,116839	-0,110136	0,101664	-1,08334
кальцитонин	0,149697	0,119298	0,128798	0,102643	1,25482
остеокальцин	0,013159	0,097512	0,011377	0,084310	0,13495
ПТГ	<b>0,233563</b>	<b>0,109888</b>	<b>0,207894</b>	<b>0,097811</b>	<b>2,12546</b>
Кислая фосфатаза	0,040421	0,125271	0,034568	0,107134	0,32267

Примечание: \*beta - регрессионный коэффициент;

При добавлении других показателей в дополнение к уже отобраным, нарастания значимой прогностической мощности не отмечалось.

Многофакторный регрессионный анализ представлен уравнением:

$$Y = a + b_1 \times X_1 + b_2 \times X_2 + \dots + b_p \times X_p,$$

где, Y – течение рахита;

a – суммарный коэффициент прогноза (СКП) для данного течения рахита;

b<sub>i</sub> – весовой коэффициент репрезентативной величины i;

X<sub>i</sub> – значение репрезентативного признака i.

Таким образом, уравнение регрессии для определения течения рахита имеет следующий вид:

$$Y = 0,520 + 0,215 \times [\text{генотип COL1A1: -1997 C>A}] + 0,234 \times [\text{Ин ПТГ}]$$

Примечание: Следует считать генотип AA гена COL1A1: -1997 C>A как «0», генотипы CA и CC гена COL1A1: -1997 C>A как «1».

Модель работает следующим образом: в правую часть формулы вносятся соответствующие показатели пациента, полученное число позволяет отнести пациента в определенную группу, соответствующую классификации рахита.

Таблица 8

**Количественная оценка прогноза особенностей течения рахита**

<b>Степень вероятности развития заболевания</b>	<b>Суммарный коэффициент прогноза</b>
Риск реализации заболевания:	
Подострое течение	0,5 – 5,0
Острое течение	> 5,0
Норма	< 0,5

Нами выбирались довольно строгие критерии включения регрессионных коэффициентов в математическую модель со значимостью  $p < 0,05$ , в связи с чем, все представленные в таблице 8 показатели, обладают независимой значимостью в прогнозировании течения заболевания.

При анализе прогностической модели, полученной в результате проведенного многофакторного регрессионного анализа, мы вычислили значение множественного коэффициента корреляции -  $R=0,44205673$ , что говорит о линейной зависимости между факторами влияния и откликом (течение рахита). Коэффициент детерминации ( $R^2$ )= $0,19541415$ , что свидетельствует о высокой степени соответствия регрессионной модели эмпирическим данным. Уровень значимости регрессионной модели  $p < 0,01543$ , что свидетельствует о высокой чувствительности и достоверности. Для построения уравнения регрессии коэффициент детерминации  $R^2 > 0,5$  и величина F-критерия (10,97) составила 2,355892 с уровнем значимости  $p < 0,05$ , что доказывает высокую чувствительность и достоверность данной модели. На основании полученных данных мы предлагаем концептуальную схему развития рахита с включением в нее основных звеньев патогенеза, маркеров метаболизма костной ткани и генетической составляющей (рис. 7).

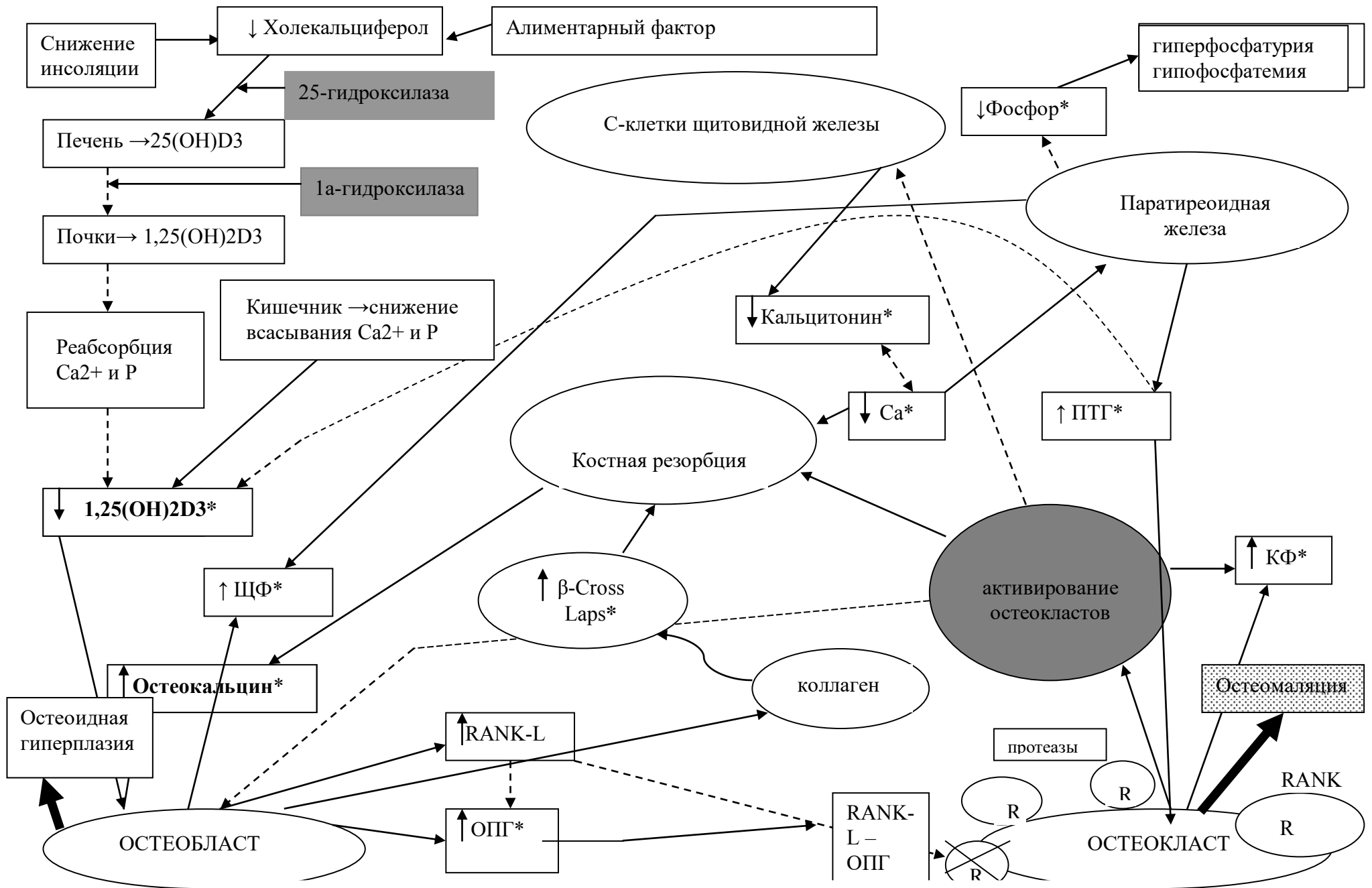


Рисунок 7. Концептуальная схема патогенеза рахита

Примечание: \* - собственные данные; - действие агониста, - - - - действие антагониста

## ВЫВОДЫ

1. Высокий уровень остеопротегерина, паратиреоидного гормона, С-концевого телопептида коллагена I типа, остеокальцина, кислой и щелочной фосфатаз наряду с низкой концентрацией кальцитриола, кальцитонина, кальция, фосфора регистрируются у детей в Забайкальском крае как при остром, так и подостром течении рахита.

2. Минорная аллель А гена коллагена COL1A1: -1997 C>A выявлена у 37,1% детей с острым течением и 28,6% с подострым течением. Гомозиготный генотип AA гена коллагена COL1A1: -1997 C>A зарегистрирован у 10,5% детей с острым течением и 9,1% детей с подострым течением рахита у детей Забайкальского края. В группе пациентов с рахитом аллель Т промотора гена COL1A1: 1546 (6252) G>T [Sp1 S>s] обнаружена у 25,5% пациентов с острым ( $p<0,05$ ) и у 23,6% детей с подострым течением ( $p<0,05$ ). Носительство аллели Т промотора гена COL1A1: 1546 (6252) G>T [Sp1 S>s] предрасполагает к развитию рахита.

3. У детей, больных рахитом, при носительстве генотипа AA гена коллагена COL1A1: -1997 C>A уровень С-концевого телопептида коллагена I типа на 25% выше в сравнении с носителями вариантов CC и CA, и на 43% выше при выявлении SNP варианта TT гена COL1A1:1546 (6252) G>T [Sp1 S>s].

4. Предрасполагающим фактором в развитии рахита у детей является сочетание носительства SNP варианта AA гена коллагена COL1A1: -1997 C>A и повышение уровня паратиреоидного гормона в сыворотке крови. При суммарном коэффициенте прогноза вероятного течения рахита  $Y>0,5$  возникает высокий риск развития острого течения заболевания. При коэффициенте прогноза  $Y=0,5-5,0$  реализуется риск развития подострого течения рахита.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи, опубликованные в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК

#### Минобрнауки РФ

1. Ремоделирование костной ткани при рахите у детей / И.Г. Каргина, В.А. Щербак, Н.М. Щербак, П.П. Терешков // Забайкальский медицинский вестник. – 2018. – № 1. – С. 98-104. – URL: <http://medacadem.chita.ru/zmv>. – (дата обращения: 10.04.2018).
2. Каргина И.Г. Комплекс остеопротегерин - кальцитонин в системе остеогенеза при рахите // Современные проблемы науки и образования. – 2019. – № 5. – С. 45-51. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29214>. – (дата обращения: 25.10.2019).

3. Каргина И.Г. Роль полиморфизма гена коллагена в патогенезе рахита / И.Г. Каргина, В.А. Щербак // ЭНИ Забайкальский медицинский вестник. – 2018. – № 2. – С. 98-104. – URL: <http://medacadem.chita.ru/zmv>. – (дата обращения: 29.05.2018).

**Публикации в прочих изданиях:**

1. Каргина И.Г. Современные представления о роли витамина D / И.Г. Каргина, В.А. Щербак // Российский педиатрический журнал. – 2016. – Т. 19, № 2. – С. 103-105.
2. Каргина И.Г. Уровень кальцитриола у детей с рахитом на территории Забайкальского края / И.Г. Каргина, В.А. Щербак, Н.М. Щербак // Актуальные проблемы педиатрии : сборник тезисов XX Съезда педиатров России с международным участием, Москва, 16-18 февраля 2018 г. – Москва, 2018. – С. 127.
3. Каргина И.Г. С-концевой телопептид коллагена I типа в развитии рахита // Медицина завтрашнего дня : материалы XVII межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 65-летию Читинской государственной медицинской академии, г. Чита, 17-20 апреля 2018 г. ; Читинская государственная медицинская академия. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2018. – С. 152-153.
4. Каргина И.Г. Роль кальцитонина и остеокальцина в развитии рахита у детей // Актуальные вопросы первичной медико-санитарной помощи детям и подросткам : материалы международной научно-практической конференции, г. Чита, 30 марта 2018 г. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2018. – С. 57-58.
5. Каргина И.Г. Роль полиморфных генов коллагена в возникновении рахита у детей г. Читы / И.Г. Каргина, В.А. Щербак // Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию образования Читинской государственной медицинской академии, г. Чита, 26 октября 2018 г. ; Читинская государственная медицинская академия. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2018. – С. 163-164.
6. Каргина И.Г. Паратиреоидный гормон в развитии рахита / И.Г. Каргина, Н.М. Щербак // Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины : материалы международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию образования Читинской государственной медицинской академии, г. Чита, 26 октября 2018 г. ; Читинская государственная медицинская академия. – Чита : РИЦ ЧГМА, 2018. – С.164-165.
7. Роль полиморфизма генов рецептора витамина D в патогенезе рахита / В.А. Щербак, И.Г. Каргина, Н.М. Щербак, Н.А. Хамина // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2018. – Т. 63, № 4. – С. 287.

8. The role of osteoprotegerin in the pathogenesis of rickets / V.A. Shcherbak, I.G. Kargina, P.P. Tereshkov, N.M. Shcherbak // World Summit of Pediatrics 4-Th edition, Madrid, 21-24 June 2018. – P. 38.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:**

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> - кальцитриол

ИФА - иммуноферментный анализ

КТ- кальцитонин

КФ- кислая фосфатаза

ОПГ- остеопротегерин

ПТГ- паратиреоидный гормон

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЩФ – щелочная фосфатаза

Са - кальций

Р - фосфор

β-CrossLaps- продукт деградации коллагена

VDR- Vitamin D-receptor

ОР (ОШ) - отношение шансов

ОР- относительный риск