

О.А. ГРОМОВА¹, д.м.н., профессор, И.Ю. ТОРШИН², к.ф.-м.н., В.Б. СПИРИЧЕВ³, д.б.н., профессор

¹ Ивановская государственная медицинская академия Минздрава России

² Московский физико-технический институт (государственный университет)

³ Научно-исследовательский институт питания, Москва

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ РЕЦЕПТОРА ВИТАМИНА D

УКАЗЫВАЕТ НА ШИРОКИЙ СПЕКТР ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРИМЕНЕНИЙ ВИТАМИНА D В ТЕРАПИИ

В настоящей работе представлены результаты полногеномного биоинформационного анализа взаимодействий рецептора витамина D с ДНК генома человека. Методами системно-биологического анализа проведен анализ биологических ролей белков, которые специфически ассоциированы с воздействием рецептора VDR. Систематизация биологических ролей витамина D указывает на широкие и ранее не изученные перспективы педиатрических применений препаратов витамина D для профилактики и терапии широкого круга заболеваний с периода внутриутробного развития и раннего детства.

Ключевые слова:

геномные эффекты витамина D

эпигенетика

дети

профилактика дефицита витамина D

ВВЕДЕНИЕ

Взгляд на витамин D как специфическое средство только для улучшения кальциевого обмена и профилактики рахита у детей давно ушел в прошлое. Воздействие витамина D не ограничивается регуляцией гомеостаза кальция и фосфора и также связано с комплексом иммуномодулирующих, нейропротекторных, противовоспалительных свойств, поддержанием баланса между жировой и мышечной тканями и др. Биологические роли витамина D постоянно уточняются.

Эффекты витамина D осуществляются посредством геномных и негеномных механизмов. Геномные механизмы опосредованы взаимодействиями рецептора витамина D (VDR) с геномной ДНК. Комплексного анализа всех возможных геномных эффектов витамина D до сих пор не проведено. Поэтому исследования воздействий рецепторов VDR с геномной ДНК (полногеномные анализы) имеют важное значение для комплексной оценки физиологического воздействия витамина D на здоровье человека.

Активация рецепторов VDR – наиважнейший способ реализации биологических эффектов витамина D. Наиболее биологически активным витамином D, активирующим рецепторы VDR, является кальцитриол (1,25-дигидроксивитамин D или «1,25(OH)2D»). Кальцитриол синтезируется из попадающего в организм холекальциферола (который правильней было бы называть *провитамин* D). Основные

процессы биотрансформации витамина D происходят в коже, печени и почках. В коже под действием ультрафиолетового облучения образуется витамин D3. В печени витамин D3, гидроксимируясь, превращается в 25-оксихолекальциферол (25-OH-D3) при посредстве 25-гидроксилазы. В почках при их нормальном функционировании 25-OH-D3 трансформируется в 1,25-диоксихолекальциферол (1,25-(OH)2D3), наиболее активную форму витамина. Эта активная форма витамина переносится в кровяном русле витамин-D-связывающим белком (VDDBP, *рис. 1*).

Рецептор витамина D, подобно стероидным и многим другим гормональным рецепторам, является фактором транскрипции, который регулирует экспрессию нескольких тысяч генов в геноме человека. Молекула рецептора включает витамин-связывающий и ДНК-связывающий домены (*рис. 2*). Специфические для VDR особенности структуры ДНК-связывающего домена VDR и определяют возможность взаимодействия VDR с ДНК. В настоящей работе представлены результаты полногеномного биоинформационного анализа взаимодействий рецептора витамина D с ДНК генома человека. Методами системно-биологического анализа проведен анализ биологических ролей белков, которые специфически ассоциированы с воздействием рецептора VDR.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полногеномное сканирование взаимодействий рецептора VDR с геномной ДНК. Для установления достоверных сайтов связывания рецепторов витамина D (VDR) в геноме человека в настоящей работе был проведен систематический анализ данных полногеномных исследований VDR, имеющихся в общем доступе в базе данных GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo). Эти сведения были получены с использованием технологии полногеномных иссле-

дований, известной как ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation sequencing) – секвенирование посредством иммунопреципитации хроматина [1].

Технология ChIP-seq осуществляется следующим образом. К выделенной ДНК генома человека добавляется рецептор VDR, и производится обратимая фиксация комплексов ДНК-VDR (например, посредством полимеризации формальдегида), так чтобы комплексы ДНК-VDR не разрушались при последующей термической и прочей обработке. Затем проводится ультразвуковая обработка фиксированных комплексов ДНК-VDR, при которой вся геномная ДНК распадается на фрагменты длиной 300–500 нуклеотидов. Вследствие предварительно проведенной фиксации связанные с белком VDR участки ДНК не фрагментируются.

Затем участки ДНК, связанные с VDR-рецепторами, выделяются с использованием высокоточных антител к белку VDR. Выделенная ДНК отделяется от антител и от VDR рецептора путем обращения фиксации комплексов

ДНК-VDR, экстракции ДНК и осаждения ДНК этанолом. Выделенные таким образом участки ДНК, которые взаимодействовали с молекулой рецептора VDR, подвергаются амплификации (т. е. увеличению количества копий ДНК) посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР). Потом проводится широкомасштабное секвенирование всех выделенных участков VDR-связывающей ДНК с использованием ДНК-микрочипов на Genome Analyzer II (Illumina) и устанавливается расположение секвенированных участков ДНК в геноме человека (версия генома человека «NCBI 36.3» или «hg18»).

В настоящей работе был выполнен анализ пяти выборок полногеномных экспериментов ChIP-seq, в которых проводился анализ взаимодействий VDR на лимфобластоидных клетках [2], моноцит-подобных клетках [3], клеток линий LS180 и LX2 звездчатых клетках [4]. Основной массив данных составили 8 полногеномных экспериментов (файлы GSM558630...GSM558637 в базе данных GEO), проведенных в работе [2].

На основе данных ChIP-seq из цитируемых выше полногеномных экспериментов и специально разработанного нами программного обеспечения были установлены расположения пиков связывания молекулы рецептора VDR на геномной ДНК. Расположение пиков устанавливалось посредством Фурье-фильтрации с параметром сглаживания, равным длине последовательности, считываемой каждой позицией ДНК-микрочипа (35 нуклеотидов). Далее была проведена комплексная функциональная характеристика установленных сайтов связывания VDR в геноме человека с использованием данных о близлежащих генах методами системно-биологического анализа.

Методы системно-биологического анализа. Списки генов, полученные в результате полногеномного сканирования сайтов связывания VDR, анализировались посредством разработанного нами метода функционального связывания [5] с использованием функциональных категорий стандартной аннотации генома человека. Метод анализа функциональных взаимосвязей – одна из информационных технологий современной биоинформатики. Данный метод основан на системном рассмотрении органов, тканей, клеток и их мельчайших компонентов – белков, ДНК, метаболитов (в т. ч. витаминов и других микронутриентов) в рамках фундаментальных основ молекулярной биологии и биохимии. Так, на основе информации

Рисунок 1. Гомеостаз витамина D

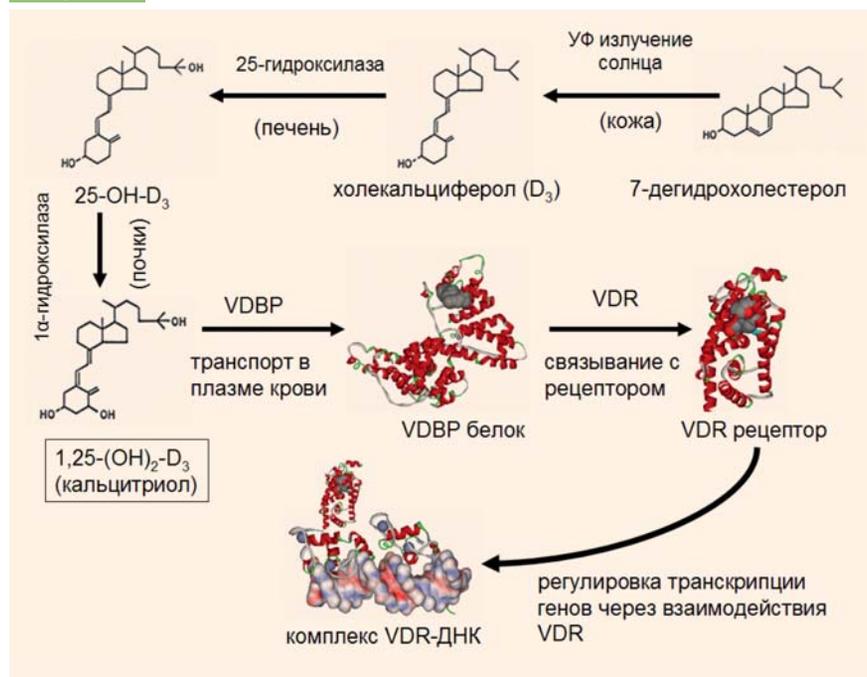
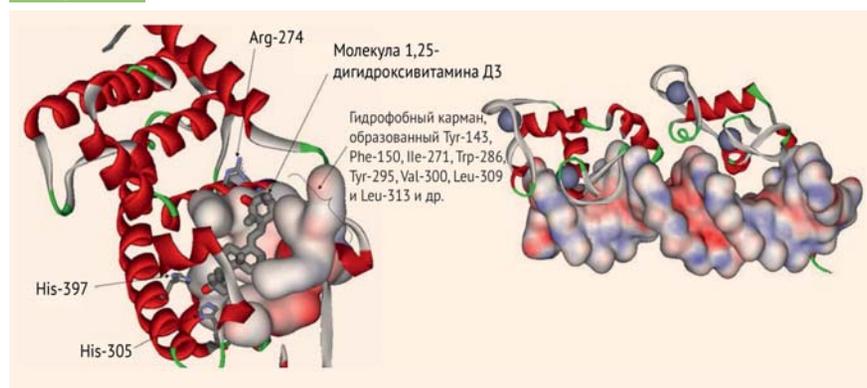


Рисунок 2. Пространственная структура рецептора витамина D (VDR)



определенной геномной ДНК синтезируется соответствующий белок, выполняющий строго очерченный круг специфических функций. Как мутации гена, так и дефициты кофакторов белка (ионов металлов – кальция, магния, цинка, витаминов группы В и др.) будут приводить к падению активности тех или иных белков и проявлению той или иной специфической клинической симптоматики (рис. 3).

Метод анализа функциональных взаимосвязей, соединяя данные различных уровней (данные о моногенных заболеваниях, биохимические данные о кофакторах белков, данные о клеточных ролях белков, симптоматике и критериях диагностики заболеваний и т. д.), позволяет систематически рассмотреть все возможные области воздействия VDR-рецепторов. В целом при использовании метода анализа функциональных взаимосвязей в соответствии с рисунком 3 для каждого белка протеома человека составляется последовательная цепь описаний:

- аминокислотная последовательность белка,
- список биохимически необходимых эссенциальных кофакторов белка (в т. ч. с указанием потребности ионов кальция для активности рассматриваемого белка),
- список моногенных заболеваний, связанных с полной или частичной потерей активности этого белка,
- список клеточных функций белка (по БД Gene Ontology, GO и др.),
- список отдельных симптомов заболеваний, список диагнозов по МКБ-10 и другая информация из баз данных.

Далее в этой базе данных выделяются гены, полученные в результате полногеномного сканирования сайтов связывания VDR, и проводятся последующие анализы их функций на основании статистических критериев. Для статистической обработки результатов исследования использовались методы математической статистики, включающие расчет числовых характеристик случайных величин, проверки статистических гипотез с использованием параметрических и непараметрических критериев,

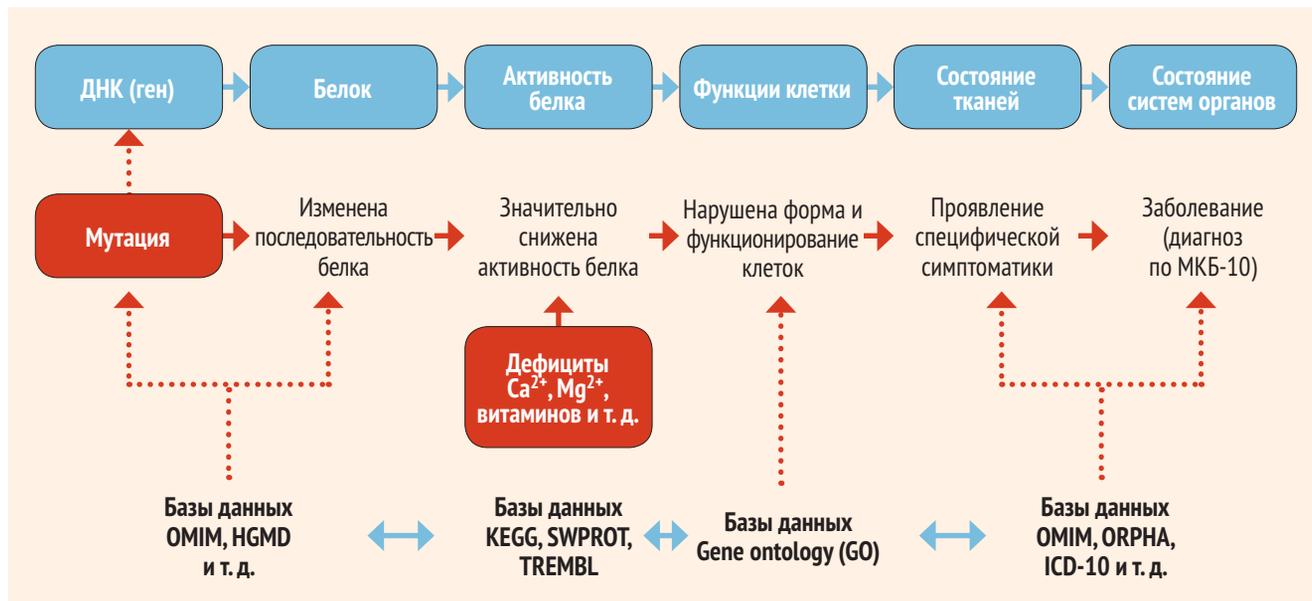
корреляционного и дисперсионного анализа. Сравнение прогнозируемых и наблюдаемых частот встречаемости исследуемых признаков проводилось с помощью критерия χ -квадрат, Т-критерия Вилкоксона – Манна – Уитни и теста Стьюдента. Для статистической обработки материала использовались электронные таблицы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного биоинформационного анализа было установлено расположение 25 343 сайтов связывания молекулы рецептора VDR в геноме человека. Из этого числа взаимодействий «VDR-геном» 6 925 сайтов связывания VDR были расположены вблизи того или иного гена (т. е. на расстоянии менее 1 000 нуклеотидных остатков от начала кодирующей области гена). Эти сайты связывания рецептора VDR были расположены вблизи 2 727 генов, из которых 2 441 ген был аннотирован (т. е. были известны биологические роли гена и соответствующего этому гену белка). Среднее расстояние сайта связывания VDR от начала кодирующей области гена (первый кодон белка) составило 532 ± 424 нуклеотида. Таким образом, значительное количество установленных сайтов связывания VDR располагаются в пределах известных промоторов генов (менее 1 000 нуклеотидов от точки начала транскрипции) и, следовательно, будут оказывать воздействие на процесс инициации генной экспрессии при взаимодействии с рецептором VDR.

Анализ внутриклеточной «адресации» белков, экспрессия генов которых регулируется рецептором VDR, показал, что витамин D преимущественно стимулирует экспрессию внутриядерных белков, т. е. белков, которые, как правило, взаимодействуют с геномной ДНК и участвуют в поддержании стабильности генома, инициации генной экспрессии и синтеза белка (рис. 4). Иначе говоря, витамин D – один из ключевых факторов поддержания

Рисунок 3. Основы системно-биологического подхода к анализу эффектов воздействия рецептора VDR



стабильности генома, так что при дефиците витамина D будет нарушаться экспрессия *всех* генов человека. Воздействие VDR на экспрессию белков митохондрий указывает на важность витамина D для *энергетического метаболизма клетки*, а воздействие VDR на экспрессию белков внеклеточной матрицы – на важность взаимосвязи витамина D с *метаболизмом соединительной ткани*.

Частотный анализ ключевых слов в описаниях генов, экспрессия которых регулируется рецептором VDR, показал, что с воздействием рецептора VDR на экспрессию генома человека специфически ассоциированы прежде всего белки 6 известных групп (табл. 1):

- белки типа «цинковый палец» (вовлечены в процессы генной экспрессии),
- митохондриальные белки,
- НАД дегидрогеназы (окислительно-восстановительные процессы),
- убиквитин-регулируемые белки (необходимы для контролируемой деградации отработанных белков на специальном клеточном механизме – протеасоме),
- интерлейкины (регулируют иммунитет и процессы воспаления),
- белки гомеостаза кальция.

Таблица 1. Группы конкретных белков, специфически ассоциированные с регуляцией экспрессии генов посредством рецептора VDR

Группа белков	v_1	v_0	О.Ш.	$P(\chi^2)$
Белки «цинковый палец»	0,054	0,032	1,67	10^{-38}
Митохондриальные белки	0,027	0,014	1,94	$2 \cdot 10^{-22}$
НАД дегидрогеназы	0,016	0,011	1,46	$2 \cdot 10^{-7}$
Убиквитин (протеасомная деградация)	0,011	0,008	1,47	$2 \cdot 10^{-5}$
Интерлейкины	0,004	0,003	1,45	0,044
Гомеостаз кальция	0,013	0,004	3,14	$2 \cdot 10^{-21}$

v_1 – частота встречаемости в выборке VDR-регулируемых белков, v_0 – общая частота встречаемости в геноме, О.Ш. – отношение шансов (v_1/v_0), $P(\chi^2)$ – достоверность ассоциации.

Упомянутая выше «специфичность» ассоциации этих белков с рецептором VDR подразумевает, что изменение уровней экспрессии этих белков является одним из *специфических эффектов воздействия именно витамина D*. Заметим, что белки, вовлеченные в гомеостаз кальция (с которым, как правило, ассоциируются эффекты витамина D), гораздо малочисленнее, чем белки митохондрий и белки типа «цинковый палец» (рис. 5).

Анализ показал, что молекула рецептора витамина D взаимодействует с ДНК 2 727 генов человека. Среди этих генов всего лишь 36 генов кодируют белки гомеостаза кальция. В таблице 2 приведены 15 из 36 кальций-зависимых белков, для которых были установлены соответствующие физиологические эффекты – регуляция артериального давления, эффектов инсулина и метаболизма

Рисунок 4. Внутриклеточная принадлежность белков, экспрессия генов которых регулируется рецептором VDR



соединительной ткани. Приведенные в таблице 2 данные показывают, что осуществление этих биологических эффектов витамина D зависит от наличия достаточных уровней кальция, т. к. перечисленные белки могут осуществлять свои биологические функции только в присутствии ионов кальция.

Посредством системно-биологического анализа были установлены и рубрицированы биологические роли белков, которые специфически ассоциированы с воздействием рецептора VDR (табл. 3, рис. 6). Установленные биологические роли могут быть сгруппированы под следующими рубриками:

- 1) **активация экспрессии генов и поддержание стабильности генома** (регуляция транскрипции генов, цикл деления клетки, ремонт ДНК, реструктурирование хромосомы, эпигенетическое ацетилирование гистонов),
- 2) **синтез белка** (связывание полиаденин-РНК, синтез белка, сплайсинг РНК, рибосомальный белок),
- 3) **деградация белка** (убиквитирование белков для деградации на протеасоме, белок протеасомы),
- 4) **поддержка иммунитета** (антивирусный иммунитет, активация синтеза интерферона I),
- 5) **регулировка эмбриогенеза** (активация сигнального каскада Wnt, дыхательная «цепь переноса электрона», регулирование транспорта глюкозы).

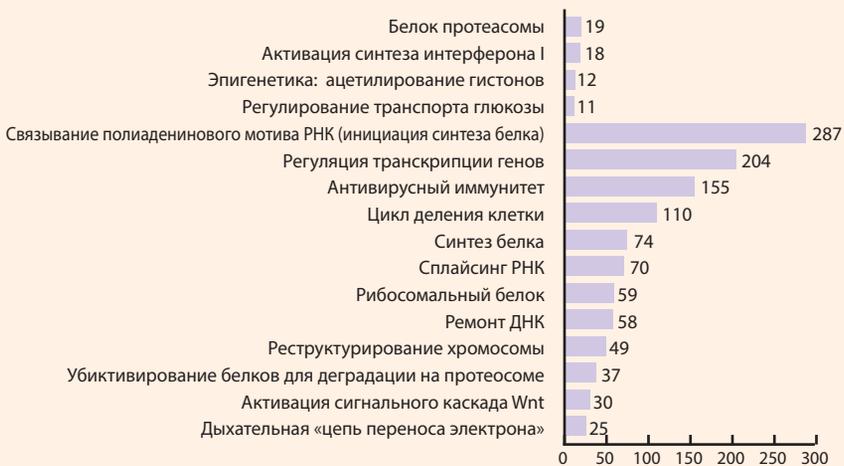
Заметим, что показатели статистической достоверности, приведенные в таблице 3, позволяют утверждать, что совокупность вышеперечисленных биологических ролей (рис. 6) специфична для воздействий именно витамина D, а не какого-либо произвольно взятого микронутриента.

Помимо рассмотренных выше белков, специфически регулируемых именно рецептором VDR, рецептор вита-

Рисунок 5. Группы белков, специфически регулируемых рецептором VDR



Рисунок 6. Биологические роли белков, специфически регулируемых рецептором VDR



мина D также оказывает воздействие и на другие белки (рис. 7). Хотя о специфичности ассоциации биологических ролей этих белков именно с витамином D говорить не приходится ($p > 0,05$), безусловно, воздействие рецептора VDR на сигнальные пути рецепторов нейротрофических и ростовых факторов (фактора роста нервов, фактора роста фибробластов, инсулина, трансформирующего фактора роста β , фактора роста эндотелия сосудов), регуляцию свертывания крови, эмбриональное развитие, сперматогенез и апоптоз является важным биологическим эффектом активации рецептора VDR (рис. 7).

Рассмотрение всех этих белков в рамках настоящей статьи не представляется возможным. Поэтому рассмо-

Таблица 2. Белки гомеостаза кальция, гены которых регулируются рецептором витамина D

Ген	Белок	Функция белка
Регуляция артериального давления		
ALOX5	5-липоксигеназа	Синтез лейкотриенов и противовоспалительных простаноидов из омега-3 ПНЖК
CALM1	Калмодулин	Сигнальный белок, активирует синтетазу оксида азота NO
GUCA2B	Активатор 2B гуанилатциклазы	Внутриклеточная передача сигнала от NO
NOS1 NOS3	Синтетаза оксида азота NO	Синтез NO из аргинина
PLA2G1B	Фосфолипазы A2	Синтез лейкотриенов и противовоспалительных простаноидов из омега-3 ПНЖК
Инсулинрезистентность, сахарный диабет		
DOC2B	Белок бета с двойным C2-подобным доменом	Сенсор уровней кальция в крови, регулирует слияние транспортных везикулов с клеточной мембраной, вовлечен в стимулируемую глюкозой секрецию инсулина
CAMK2G	Ca ²⁺ /кальмодулин-зависимая киназа	Регулирует передачу сигнала по Ca ²⁺ /кальмодулин-зависимым маршрутам, участвует в мышечном сокращении, формировании синапсов в ЦНС и секрецию инсулина в островках Лангерганса
CBL	Сигнальный белок CBL-C	Осуществляет передачу сигнала от рецептора инсулина
EEF2K	Киназа фактора элонгации 2	Регулирует синтез белка, участвует в передаче сигнала от рецептора инсулина
Метаболизм соединительной ткани (в т. ч. кости)		
ASPN	Белок 1, ассоциированный с периодонтальным лигаментом	Регулирует минерализацию периодонтального лигамента, принципиально важен для активности трансформирующего фактора роста. Генетические дефекты ассоциированы с повышенным риском остеоартрита и резорбции кости, приводят к патологии межпозвоночных дисков
DUOX2	Тироксидоксидаза	Синтезирует перекись водорода для синтетизируемых гормонов ферментов тиоредоксин-пероксидазы. Дефекты гена приводят к дисморфогенезу щитовидной железы и нарушениям структуры костей
FGFR1	Рецептор фактора роста фибробластов 1	Осуществляет биологические эффекты факторов роста фибробластов (ФРФ), в т. ч. ФРФ-23
SULF2	Внеклеточные сульфатазы	Удаляет сульфат-группы с глюкозаминового гелевой (протеин-гликановой) основы соединительной ткани (гепаран сульфат протеогликаны)
THBS3	Тромбоспондин 3	Белок клеточной адгезии, опосредует взаимодействия клеток с матрицей соединительной ткани кости. Связывает фибриноген, фибронектин, ламинин, коллаген типа V

трим несколько интересных, на наш взгляд, примеров: воздействие активированного рецептора VDR на (1) активность инсулиноподобного фактора роста, (2) фактор роста фибробластов, (3) трансформирующие факторы роста и (4) эпигенетические эффекты витамина D. Эти примеры интересны тем, что указывают на фундаментальные механизмы воздействия витамина D на рост и восстановление тканей (в частности, жировой, мышечной и соединительной).

Известно, что дети с дефицитом витамина D чаще страдают ожирением [6]. В развитии ожирения имеют значение нарушения активности **инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1)**, который поддерживает баланс между жировой и мышечной тканями [7]. При дефиците активности IGF жировая ткань начинает преобладать над мышечной, возникают атеросклеротические изменения.

Таблица 3. Биологические роли белков, которые специфически ассоциированы с воздействием рецептора VDR

Биологическая роль	v_1	v_0	О.Ш.	$P(\chi^2)$
Связывание полиаденин-РНК (инициация синтеза белка)	0,105	0,055	1,93	$3 \cdot 10^{-23}$
Регуляция транскрипции генов	0,075	0,061	1,23	0,041
Антивирусный иммунитет	0,057	0,030	1,87	$3 \cdot 10^{-11}$
Цикл деления клетки	0,040	0,020	2,01	$9 \cdot 10^{-10}$
Синтез белка	0,027	0,011	2,43	$3 \cdot 10^{-10}$
Сплайсинг РНК	0,026	0,012	2,11	$5 \cdot 10^{-7}$
Рибосомальный белок	0,022	0,008	2,88	$2 \cdot 10^{-11}$
Ремонт ДНК	0,021	0,014	1,57	0,018
Реструктурирование хромосомы	0,018	0,010	1,82	0,002
Убиквитирование белков для деградации на протеосоме	0,014	0,006	2,27	0,0002
Активация сигнального каскада Wnt	0,011	0,006	1,75	0,049
Дыхательная цепь переноса электрона	0,009	0,005	1,78	0,053
Белок протеасомы	0,007	0,003	2,51	0,005
Активация синтеза интерферона I	0,007	0,003	2,19	0,029
Эпигенетическое ацетилирование гистонов	0,004	0,001	3,18	0,006
Регулирование транспорта глюкозы	0,004	0,002	2,63	0,042

v_1 – частота встречаемости в выборке VDR-регулируемых белков, v_0 – общая частота встречаемости в геноме, О.Ш. – отношение шансов (v_1/v_0), $P(\chi^2)$ – достоверность ассоциации.

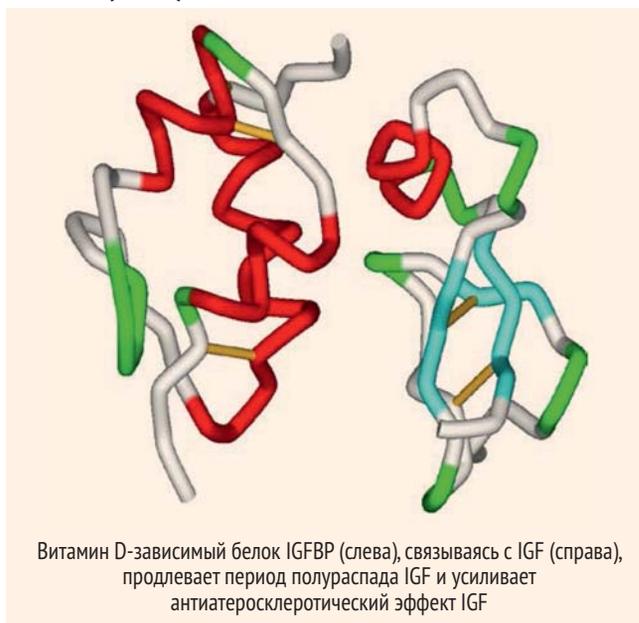
Рисунок 7. Биологические роли других белков, регулируемых рецептором VDR



Настоящий анализ показал, что активация рецептора VDR регулирует *синтез IGF-связывающего белка IGFBP4*, который необходим для стабилизации активной формы ростового фактора IGF-1. При достаточной обеспеченности витамином D условия для синтеза IGFBP4 оптимальны, что, следовательно, нормализует активность IGF-1 и поддерживает надлежащий баланс между жировой и мышечной тканями (рис. 8). В эксперименте снижение уровней биологической активности IGFBP4 увеличивает площадь атеросклеротических поражений сосудов [8, 9].

Дефициты соединительной ткани и рахит у детей ассоциированы с недостаточной биологической активностью

Рисунок 8. Пространственная структура комплекса инсулиноподобного фактора роста (IGF) с IGF-связывающим белком (IGFBP)



стью **факторов роста фибробластов (ФРФ)**, которые индуцируют деление остеобластов и других клеток соединительной ткани [10]. На сегодняшний день известно более 20 белков ФРФ, биологические эффекты которых осуществляются за счет взаимодействий с ФРФ-рецепторами 4 типов [11]. Проведенный нами анализ показал, что рецептор VDR регулирует транскрипцию фактора ФРФ-2 и ФРФ-рецептора *FGFR1OP2*. Например, и фактор ФРФ-2, и рецептор *FGFR1OP2* необходимы для осуществления процесса заживления ран [12, 13]. Хорошо известно, что у детей с дефицитом витамина D заживление ран кожи и органов, формирование костной мозоли существенно замедлены [14].

Трансформирующие ростовые факторы бета (ТРФβ) – секретируемые белки, которые регулируют деление и дифференцировку различных типов клеток соединительной ткани (фибробластов, кератиноцитов, остеоцитов, хондроцитов). Рецепторы ТРФβ контролируют воспаление, апоптоз, заживление ран [15], играют важную роль в морфогенезе фолликулов волос [16], участвуют в процессах поддержания структуры костей и других видов соединительной ткани [17, 18].

В настоящем анализе было установлено, что активированный рецептор витамина D регулирует экспрессию многочисленных генов, вовлеченных в осуществление биологических эффектов ростовых факторов ТРФβ – серин-треониновой киназы STRAP (ген STRAP), транскрипционных факторов *sp1* и *e2f4* (гены SP1 и E2F4), циклина T2 (ген CCNT2) и циклин-зависимой киназы 8 (ген CDK8), ТРФβ-активируемой киназы 1 (ген TAB1) и др. Без воздействия витамина D на экспрессию этих генов осуществление биологических эффектов ТРФβ будет существенно затруднено.

Таблица 4. Заболевания в номенклатуре МКБ-10, специфически ассоциированные с нарушениями активации рецептора VDR

Заболевание	v_1	v_0	О.Ш.	$P(\chi^2)$
Q87. ВПР, затрагивающие несколько систем	0,146	0,088	1,66	0,0064
G60. Наследственная и идиопатическая невропатия	0,114	0,025	4,50	$5 \cdot 10^{-18}$
G60.0. Болезнь Шарко – Мари – Тута	0,108	0,024	4,57	$3 \cdot 10^{-17}$
G11. Наследственная атаксия	0,070	0,032	2,17	0,0045
G31. Другие нейродегенеративные заболевания	0,038	0,007	5,61	$6 \cdot 10^{-8}$
E80. Порфирия	0,038	0,004	10,75	$2 \cdot 10^{-15}$
E77. Нарушения обмена гликопротеинов	0,032	0,012	2,62	0,028
G12. Спинальная мышечная атрофия	0,032	0,009	3,58	0,0011

v_1 – частота встречаемости в выборке VDR-регулируемых белков, v_0 – общая частота встречаемости в геноме, О.Ш. – отношение шансов (v_1/v_0), $P(\chi^2)$ – достоверность ассоциации.

Таблица 5. Симптомы, специфически ассоциированные с нарушениями активации рецептора VDR

Симптоматика	v_1	v_0	О.Ш.	$P(\chi^2)$
Дистрофия сетчатки глаза	0,086	0,033	2,60	$2 \cdot 10^{-5}$
Иммунодефицит	0,067	0,023	2,86	$4 \cdot 10^{-5}$
Ихтиоз	0,063	0,027	2,39	0,0018
Анемия	0,051	0,021	2,37	0,0084
Воспаление сетчатки глаза	0,048	0,014	3,40	$6 \cdot 10^{-5}$
Дистония	0,035	0,012	2,85	0,008

v_1 – частота встречаемости в выборке VDR-регулируемых белков, v_0 – общая частота встречаемости в геноме, О.Ш. – отношение шансов (v_1/v_0), $P(\chi^2)$ – достоверность ассоциации.

В соответствии с данными экспериментальных и клинических исследований регуляция рецептором витамина D этих белков сигнального каскада ТРФβ объясняет антипролиферативное и противовоспалительное действие 1,25-дигидроксивитамина D на кожу, поврежденную псориазом [15]. Дефицит витамина D и делеция гена рецептора витамина ухудшают заживление кожи после травмы вследствие нарушений активности сигнальных каскадов ТРФβ и, соответственно, нарушений активации макрофагов и снижения формирования грануляционной ткани [19].

Помимо описанных выше механизмов участия рецептора VDR в росте соединительной ткани и заживлении ран (ростовые факторы ФРФ и ТРФ), рецептор витамина D также регулирует экспрессию интерлейкинов, фактора некроза опухоли (ФНО-α) [20] и влияет на выработку таких антимикробных пептидов, как кателицидин (ген CAMP). Антимикробные пептиды являются эндогенными «антибиотиками», синтезируемыми для поддержки иммунитета кожи и других эпителиальных поверхностей [21]. 1,25-дигидроксивитамин D является основным регулятором экспрессии антимикробного пептида кателицидина в моноцитах и в эпидермальных кератиноцитах. Кателицидин, устраняя бактерии, способствует заживлению ран, восстановлению кожи при псориазе, розацеа и атопическом дерматите [22]. В частности, воздействие кальцитриол на кателицидин существенно уменьшает восприимчивость кожи к эпидермальным стрептококкам [23].

Перечисленные выше механизмы воздействия витамина D на рост и иммунитет соединительной ткани указывают, в частности, что *обеспеченность витамином D весьма важна для заживления поврежденной кожи*. Например, в исследовании группы пациентов с язвами на ногах была достоверно выявлена недостаточность витамина D: уровни витамина составили в среднем 17 нг/дл у пациентов с язвами и 28 нг/дл в группе пациентов без язв ($p = 0,018$) [24]. Дефицит витамина D во время периодонтальной хирургии отрицательно сказывается на результатах лечения, и статус пациента по витамину D может иметь решающее значение для послеоперационного заживления [25].

Важно отметить, что настоящий анализ позволил установить *эпигенетические эффекты витамина D*. Процесс

эпигенетического (т. е., в переводе с греческого, «надгенетического») наследования подразумевает наследование фенотипических признаков организма не посредством генетического кода в нуклеотидной последовательности ДНК, а за счет других механизмов (метилирование ДНК, ацетилирование ДНК-стабилизирующих белков-гистонов, наследование митохондрий яйцеклетки и др.).

Обычно считается, что среди витаминов эпигенетическими эффектами обладают только фолаты (необходимые для нормофизиологического метилирования ДНК). Полногеномный анализ связывания рецептора витамина D показал, что рецептор VDR может регулировать экспрессию 12 генов (рис. 6), вовлеченных в ацетилирование гистонов (специальных ДНК-стабилизирующих белков), т. е. в один из известных механизмов эпигенетического наследования. Данные 12 генов в основном кодируют различные компоненты белкового комплекса гистон ацетилтрансферазы – ДНК-метилтрансфераза-ассоциированный белок 1 (ген DNAP1), поликомб энхансер 1 (EPC1), элонгаторы ацетилтрансферазы 3 и 4 (гены ELP3, ELP4), белок E1A (ген EP400) и др. Нарушения экспрессии данных генов на фоне дефицита витамина D будут стимулировать развитие многочисленных пороков развития плода, затрагивающих различные системы организма (пороки развития скелета, почек, аномалии сердца и сосудов и др.).

Описанный выше спектр «специфических» (рис. 6) и «неспецифических» (рис. 7) биологических ролей белков, экспрессия генов которых регулируется рецептором VDR,

обуславливает не менее широкий спектр заболеваний. Проведенный полногеномный анализ позволил установить ряд заболеваний и соответствующих симптомов, которые специфически ассоциированы с нарушениями активации рецептора витамина D (табл. 4, 5, рис. 9). Результаты анализа позволяют предположить, что дефицит витамина D будет существенно утяжелять течение наследственной идиопатической невропатии (G60), в т. ч. болезни Шарко – Мари – Туа, наследственной атаксии (G11), спинальной мышечной атрофии (G12), а также порфирии (E80), нарушений обмена гликопротеинов (E77) и др.

Симптомы, перечисленные в таблице 5, встречаются при различных заболеваниях. Дефицит витамина D, снижая активацию рецептора VDR (и, следовательно, стимулируя нарушения экспрессии соответствующих генов), будет усугублять течение заболеваний, в клиническую картину которых входят дистрофические изменения и воспаление сетчатки глаза, ихтиозиформные изменения кожи, дистония мышц и анемия, иммунодефицит.

Таким образом, результаты полногеномного исследования значительно расширяют взгляд на геномные эффекты витамина D (т. е. те эффекты, которые осуществляются посредством взаимодействия витамина D с рецептором VDR). Учитывая, что описываемые геномные роли витамина D необычайно широки, обеспеченность витамином D играет принципиальное значение для осуществления оптимальной программы развития организма ребенка начиная еще с формирования зиготы. Очевидно, что уста-

АкваДетрим®
ЕДИНСТВЕННЫЙ В РОССИИ
ВОДНЫЙ РАСТВОР
ВИТАМИНА D₃¹

Водный раствор вит. D₃ всасывается в ЖКТ ребенка независимо от степени его зрелости и сопутствующей патологии^{2,3}

ОРГАНИЗАЦИЯ, ПРИНИМАЮЩАЯ ПРЕТЕНЗИИ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ АО «АКРИХИН» 142450, МОСКОВСКАЯ ОБЛАСТЬ, НОГИНСКИЙ РАЙОН, Г. СТАРАЯ КУПАВНА, УЛ. КИРОВА, 29. ТЕЛ./ФАКС: (495) 702-95-03

1 <http://grls.rosminzdrav.ru> по состоянию на сентябрь 2015
2 Инструкция по медицинскому применению Аквадетрим
3 Стенина О.И. «Гипокальциемическая тетания и рахит у детей первых двух лет жизни» //Практика педиатра, февраль 2013

Реклама

новленные геномные роли витамина D (рис. 10) значимы для эмбриогенеза, внутриутробного развития плода, развития организма в периоды раннего детства и подросткового возраста.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получена рубрикация всех известных к настоящему времени специфических биологических ролей витамина D. Результаты анализа указывают на эпигенетический потенциал витамина D, осуществляющийся посредством нормализации ацетилирования гистонов – специальных ДНК-стабилизирующих белков. Дефицит витамина D приводит к сниженной активности рецептора VDR, так что описываемые геномные роли витамина D осуществляются не в полной мере. В результате возникают нарушения строения не только костей, но и других систем органов, нарушается сложно сбалансированная иерархия активности факторов роста, иммунитет,

транспорт и переработка глюкозы, синаптическая передача сигнала, процессы детоксикации.

Проводимые в России крупномасштабные исследования указывают на необходимость проведения коррекции

Рисунок 9. Заболевания в номенклатуре МКБ-10 и соответствующие симптомы, специфически ассоциированные с нарушениями активации рецептора VDR

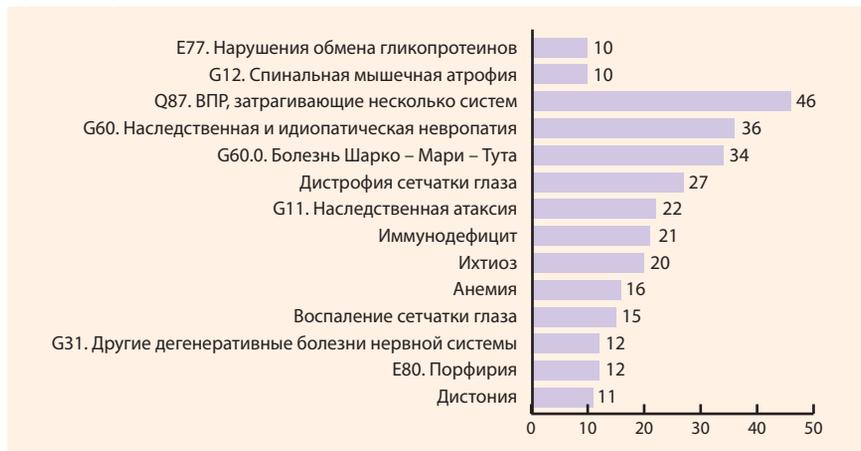
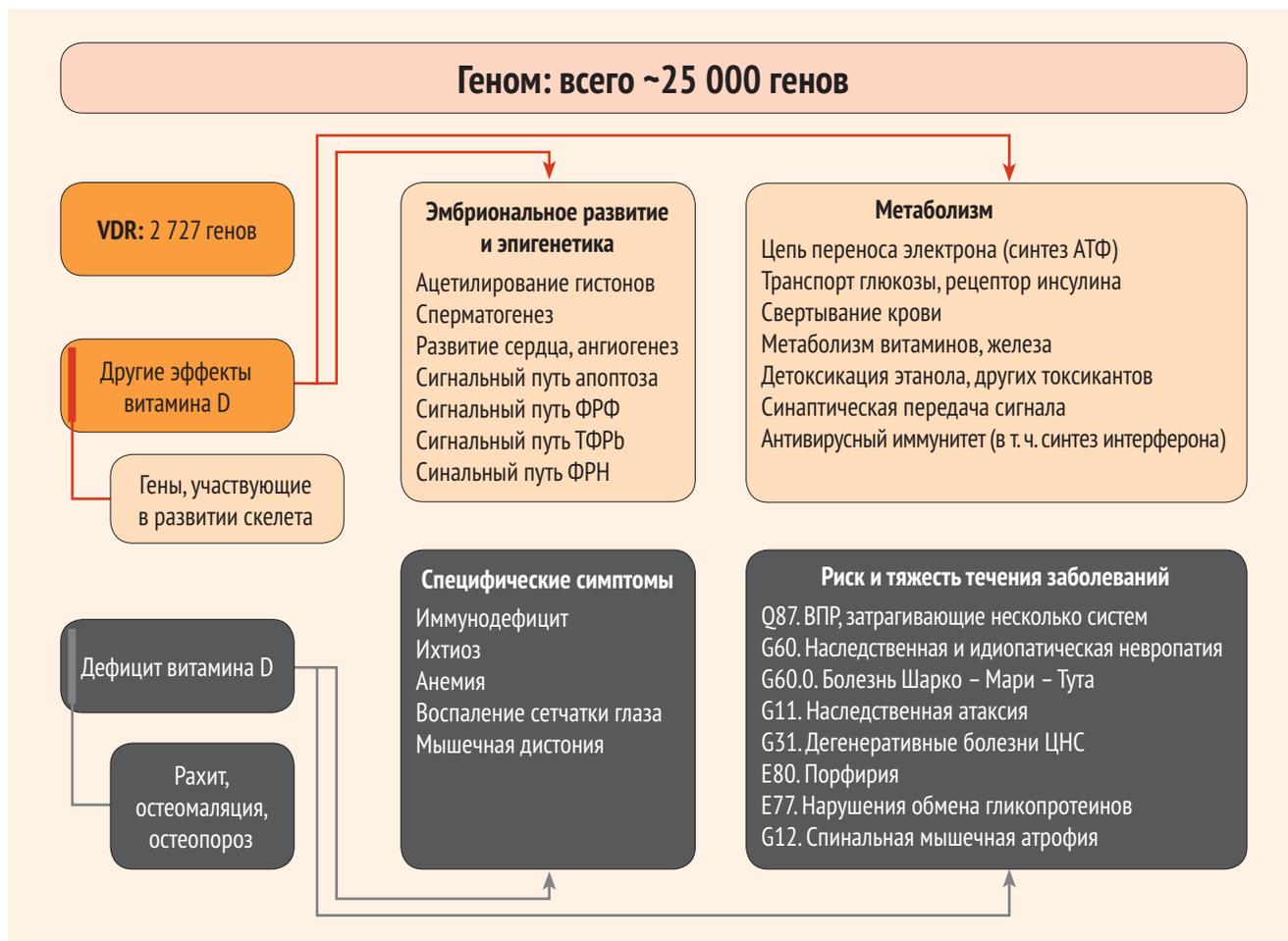


Рисунок 10. Геномные роли витамина D (по результатам полногеномного исследования рецептора VDR)



недостаточной обеспеченности витамином D детей различных возрастных групп. Так, в многоцентровом исследовании «Родничок» ($n = 1\ 230$) детей 2–3 лет дефицит витамина D (уровни 25-(OH)-D < 20 нг/мл) встречался у 35% детей до 6 мес., у 20% детей до 1 года, у 45% детей в возрасте 2 лет и у 62% детей в возрасте 3 лет [26]. Результаты исследования детей и подростков 7–14 лет из Центрального и Северо-Западного регионов России ($n = 790$) показали, что тяжелый дефицит (25-(OH)-D менее 10 нг/мл) встречался у 8% обследованных детей, выраженный (10–20 нг/мл) – у 44% обследованных, умеренный (25-(OH)-D 20 не превышает 30 нг/мл) – у 39% обследованных [27]. В обоих работах показано, что в любой из исследованных возрастных групп обеспечены витамином D (25-(OH)-D > 30 нг/мл) не более 10% детей.

Коррекция недостаточной обеспеченности детей витамином D должна осуществляться в достаточных дозах, длительными курсами. Проведенный ранее анализ результатов исследований по профилактическому применению витамина D у детей и подростков позволил сформу-

лировать ступенчатую схему профилактического дозирования витамина D в форме холекальциферола: детям до 4 мес. – 500 МЕ/сут (недоношенным – 800–1 000 МЕ/сут), детям в возрасте от 4 мес. до 4 лет – 1 000 МЕ/сут, 4–10 лет – 1 500 МЕ/сут, старше 10 лет – 2 000 МЕ/сут [29]. При этом дети должны получать витамин D непрерывно, с сентября по июнь, с использованием 50% дозы витамина для каждого возраста в летние месяцы (июль, август).

При проведении коррекции недостаточности витамина D следует стремиться к достижению значений 25(OH)D в диапазоне от 30 до 100 нг/мл. Именно при таких уровнях 25(OH)D в крови будут осуществляться рассмотренные в настоящей статье геномные эффекты витамина D и профилакироваться т. н. внекостные проявления дефицита витамина D у детей (сниженная резистентность к инфекции, ожирение и др.). Без проведения такой коррекции у детей будет наблюдаться не только развитие рахита, но и обширнейший круг отклонений развития и заболеваний, которые, как правило, ассоциируются с чем угодно, но только не с недостатком витамина D в организме ребенка.



ЛИТЕРАТУРА

- Johnson DS, Mortazavi A. Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science* 2007, 316: 1497–1502.
- Ramagopalan SV, Heger A, Berlanga AJ, Mauger NJ, Lincoln MR, Burrell A, Handunnetthi L, Handel AE. A ChIP-seq defined genome-wide map of vitamin D receptor binding: associations with disease and evolution. *Genome Res*. 2010, 20(10): 1352–60.
- Heikkinen S, Vaisanen S, Pehkonen P, Seuter S, Benes V, Carlberg C. Nuclear hormone 1 α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$ elicits a genome-wide shift in the locations of VDR chromatin occupancy. *Nucleic Acids Res*. 2011, 39(21): 9181–93.
- Ding N, Yu RT, Subramaniam N, Sherman MH, Wilson C, Rao R, Leblanc M. A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response. *Cell*. 2013, 153(3): 601–13.
- Torshin IYu. Sensing the change from molecular genetics to personalized medicine. Nova Biomedical Books, NY, USA, 2009, In Bioinformatics in the Post-Genomic Era series, ISBN 1-60692-217-0.
- Громова О.А., Торшин И.Ю., Лиманова О.А., Гришина Т.Р., Громов А.Н. Обеспеченность витамином D и метаболические нарушения: систематический анализ фундаментальных и доказательных исследований по проблемам избыточной массы тела и сахарного диабета. *Фарматека*, 2014 (20): 27–38.
- Garten A, Schuster S, Kiess W. The insulin-like growth factors in adipogenesis and obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2012, 41(2): 283–95.
- Conover CA, Mason MA, Bale LK, Harrington SC, Nyegaard M, Oxvig C, Overgaard MT. Transgenic overexpression of pregnancy-associated plasma protein-A in murine arterial smooth muscle accelerates atherosclerotic lesion development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010, 299(2): H284–91.
- Boldt HB, Bale LK, Resch ZT, Oxvig C, Overgaard MT, Conover CA. Effects of mutated pregnancy-associated plasma protein-a on atherosclerotic lesion development in mice. *Endocrinology*. 2013, 154(1): 246–52.
- Moursi AM, Winnard PL, Winnard AV, Rubenstrunk JM, Mooney MP. Fibroblast growth factor 2 induces increased calvarial osteoblast proliferation and cranial suture fusion. *Cleft Palate Craniofac J*. 2002, 39(5): 487–496.
- Zhang X, Ibrahim OA, Olsen SK. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem*. 2006, 281(23): 15694–700.
- Lee JG, Kay EP. FGF-2-induced wound healing in corneal endothelial cells requires Cdc42 activation and Rho inactivation through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006, 47(4): 1376–1386.
- Lin A, Hokujo A, Choi J, Nishimura I. Small cytoskeleton-associated molecule, fibroblast growth factor receptor 1 oncogene partner 2/wound inducible transcript-3.0 (FGFR1OP2/wit3.0), facilitates fibroblast-driven wound closure. *Am J Pathol*. 2010, 176(1): 108–21.
- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011, 96(7): 1911–30.
- Oyama N, Iwatsuki K, Satoh M, Akiba H, Kaneko F. Dermal fibroblasts are one of the therapeutic targets for topical application of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D $_3$: the possible involvement of transforming growth factor-beta induction. *Br J Dermatol*. 2000, 143(6): 1140–1148.
- Inoue K, Aoi N, Yamauchi Y, Sato T, Suga H, Eto H, Kato H, Tabata Y, Yoshimura K. TGF-beta is specifically expressed in human dermal papilla cells and modulates hair folliculogenesis. *J Cell Mol Med*. 2009, 13(11–12): 4643–56.
- Kinoshita A, Fukumaki Y, Shirahama S, Miyahara A, Nishimura G. TGF β 1 mutations in four new families with Camurati-Engelmann disease: confirmation of independently arising LAP-domain-specific mutations. *Am J Med Genet A*. 2004, 127A(1): 104–107.
- Loeys BL. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet*. 2005, 37(3): 275–81.
- Luderer HF, Nazarian RM, Zhu ED, Demay MB. Ligand-dependent actions of the vitamin D receptor are required for activation of TGF-beta signaling during the inflammatory response to cutaneous injury. *Endocrinology*. 2013, 154(1): 16–24.
- Szeto FL, Sun J, Kong J, Duan Y. Involvement of the vitamin D receptor in the regulation of NF-kappaB activity in fibroblasts. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007, 103(3–5): 563–6.
- Reinholz M, Schaubert J. [Vitamin D and innate immunity of the skin]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2012, 137(46): 2385–9.
- Segaert S. Vitamin D regulation of cathelicidin in the skin: toward a renaissance of vitamin D in dermatology? *J Invest Dermatol*. 2008, 128(4): 773–5.
- Muehleisen B, Bikle DD, Aguilera C, Burton DW, Sen GL, Deftos LJ, Gallo RL. PTH/PTHrP and vitamin D control antimicrobial peptide expression and susceptibility to bacterial skin infection. *Sci Transl Med*. 2012, 4(135): 135ra66.
- Burkiewicz CJ, Guadagnin FA, Skare TL, do Nascimento MM, Servin SC, de Souza GD. Vitamin D and skin repair: a prospective, double-blind and placebo controlled study in the healing of leg ulcers. *Rev Col Bras Cir*. 2012, 39(5): 401–407.
- Bashutski JD, Eber RM, Kinney JS, Benavides E, Maitra S, Braun TM, Giannobile WV, McCauley LK. The impact of vitamin D status on periodontal surgery outcomes. *J Dent Res*. 2011, 90(8): 1007–12.
- Захарова И.Н., Мальцев С.В., Боровик Т.Э. с соавт. Недостаточность витамина D у детей раннего возраста в России (результаты многоцентрового исследования – зима 2013–2014 гг.). *Педиатрия им. Г.Н. Сперанского*. 2014, 93 (2): 75–80.
- Торшин И.Ю., Громова О.А., Лиманова О.А. и др. Обеспеченность витамином D детей и подростков 7–14 лет и взаимосвязь дефицита витамина D с нарушениями здоровья детей. Анализ крупномасштабной выборки пациентов посредством интеллектуального анализа данных. *Педиатрия им. Г.Н. Сперанского*, 2015, 94 (2): 175–184.
- Описание Аквэдотрим. Энциклопедия РЛС http://www.rlsnet.ru/tn_index_id_24362.htm.
- Громова О.А., Торшин И.Ю., Захарова И.Н. и др. О дозировании витамина D у детей и подростков. *Вопросы современной педиатрии*, 2015, 14(1): 38–47.