

Е.В. Четина, К.А. Маслова, Н.В. Демин, М.Ю. Крылов, В.А. Мясоткин

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт ревматологии РАМН, Москва

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ДИФФЕРЕНЦИРОВКОЙ ОСТЕОБЛАСТОВ, И МАММАЛИАН TARGET OF RAPAMYCIN (mTOR) В КРОВИ БОЛЬНЫХ ОСТЕОПОРОЗОМ

Контакты: Елена Васильевна Четина etchetina@mail.ru

Цель — исследовать взаимосвязь минеральной плотности костной ткани (МПКТ) с экспрессией генов, ассоциированных с пролиферацией, выживанием и дифференцировкой клеток кости в периферической крови женщин в постменопаузальном периоде, больных остеопорозом (ОП).

Материал и методы. Обследованы 28 женщин в постменопаузе, больных ОП, и 17 сравнимых по возрасту здоровых женщин. МПКТ измеряли с помощью рентгеновской абсорбциометрии. Активность щелочной фосфатазы, содержание кальция и фосфора в крови определяли стандартными методами. РНК выделяли из периферической крови и использовали для определения уровня экспрессии генов в полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Результаты. У больных ОП женщин в постменопаузальном периоде наблюдалось значительное повышение экспрессии ATG1 (серин-треонин киназы, ответственной за формирование аутофагальных вакуолей) по сравнению со здоровым контролем, что свидетельствует о развитии аутофагии в клетках крови этих больных. Это сопровождалось значительным снижением экспрессии гена mTOR (мишени рапамицина у млекопитающих), регулятора белкового синтеза и пролиферации клеток, а также генов, ассоциированных с дифференцировкой остеобластов: трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (ТФР $\beta 1$), Runx 2 (относящегося к Runt-семейству транскрипционного фактора 2) и общей щелочной фосфатазы (ОЩФ), провоспалительных цитокинов фактора некроза опухоли α (ФНО α) и интерлейкина 1β (ИЛ 1β). Экспрессия генов mTOR, ТФР $\beta 1$, Runx2 и ИЛ 1β положительно коррелировала с МПКТ отдельных областей бедра. Напротив, экспрессия ATG1 и ОЩФ отрицательно коррелировала с МПКТ этой области и положительно — с МПКТ позвоночника. Хотя экспрессия исследованных генов не коррелировала с уровнем фосфора и кальция в сыворотке, экспрессия ТФР $\beta 1$ была положительно связана с активностью ОЩФ у женщин в постменопаузе с ОП.

Заключение. Потеря костной массы у больных ОП в постменопаузе сопровождается значительным увеличением экспрессии маркера аутофагии ATG1 и снижением экспрессии mTOR, что может указывать на ингибирование биосинтеза белка и пролиферации клеток, а также подавлением экспрессии генов, ассоциируемых с дифференцировкой остеобластов и провоспалительных цитокинов ФНО α и ИЛ 1β . Полученные данные по экспрессии генов могут быть использованы для поиска новых маркеров заболевания, тестируемых в периферической крови.

Ключевые слова: остеопороз, минеральная плотность костной ткани, аутофагия, mTOR, экспрессия генов, дифференцировка остеобластов

THE EXPRESSION OF GENES ASSOCIATED WITH OSTEOBLAST DIFFERENTIATION AND THE MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN (mTOR) IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH OSTEOPOROSIS

E.V. Chetina, K.A. Maslova, N.V. Demin, M.Yu. Krylov, V.A. Myakotkin

Research Institute of Rheumatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Contact: Elena Vasilyevna Chetina etchetina@mail.ru

Objective: to study an association of bone mineral density (BMD) with the expression of genes associated with the proliferation, survival, and differentiation of osteocytes in the peripheral blood of postmenopausal women with osteoporosis (OP).

Subjects and methods. Twenty-eight postmenopausal women with OP and 17 age-matched healthy women were examined. BMD was measured by X-ray absorptiometry. Alkaline phosphatase activity and calcium and phosphorus levels in the blood were determined by conventional methods. RNA was isolated from the peripheral blood and used to estimate the gene expression, by using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results. The postmenopausal women with OP were observed to have a significant increase in the expression of ATG1 (serine-threonine kinase that is responsible for the generation of autophagic vacuoles) as compared to the healthy controls, which suggests that autophagy develops in the blood cells of these patients. This was attended by a considerable reduction in the expression of the mTOR (the mammalian target of rapamycin) gene, a regulator of protein synthesis and cell proliferation, and in that of the genes associated with the differentiation of osteoblasts: transforming growth factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), Runx 2 (Runt-related transcription factor 2) and total alkaline phosphatase (TAP), and the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 1β (IL- 1β). The expression of mTOR, TGF- $\beta 1$, Runx2, and IL- 1β genes was positively correlated with BMD in individual areas of the hip. On the contrary, that of ATG1 and TAP was correlated negatively with BMD in this area and positively with that in the spine. Although the expression of the genes in question was not correlated with the serum levels of phosphorus and calcium, that of TGF- $\beta 1$ was positively related to TAP activity in postmenopausal women with OP.

Conclusion. In postmenopausal women with OP, bone loss is accompanied by a significant increase in the expression of the autophagy marker ATG1 and by a reduction in that of mTOR, which may be indicative of the inhibition of protein biosynthesis and cell proliferation and the suppression of the expression of the genes associated with the differentiation of osteoblasts and the proinflammatory cytokines TNF- α and IL- 1β . The obtained data on gene expression may be used to search for new disease markers tested in peripheral blood.

Key words: osteoporosis, bone mineral density, autophagy, mTOR, gene expression, osteoblast differentiation

Остеопороз (ОП) представляет собой заболевание, которое характеризуется низкой плотностью костной ткани, невысоким ее качеством, а также большой частотой переломов. Переломы, ассоциированные с ОП, становятся главной проблемой пожилых людей в связи с осложнениями, которые часто приводят к смерти пациентов старше 50 лет [1]. Устойчивость кости к переломам определяется массой кости, составом костного матрикса и его механическими свойствами. Большой вклад в прочность кости вносит ее минеральная плотность (МПКТ) [2]. В настоящее время не ясны молекулярные механизмы, лежащие в основе развития ОП. Однако недавно было сделано предположение, что они могут включать изменения в дифференцировке и функционировании остеобластов и остеокластов [3].

Фенотипические изменения в клетках костной ткани, ассоциированные с их дифференцировкой, включают экспрессию специфических генов и соответствующих им белков. При этом изменения экспрессии генов, связанные с дифференцировкой остеобластов, имеют три главные стадии: пролиферацию, развитие внеклеточного матрикса и минерализацию [4, 5]. Изначально активно пролиферирующие клетки экспрессируют гены, регулирующие клеточный цикл и рост клеток. К ним относится *Runx2* (относящийся к Runt-семейству транскрипционный фактор 2) остеобластов, который также контролирует экспрессию главных белков костного матрикса [6]. Созревание остеобластов связано с формированием костного матрикса в виде регулярно и плотно упакованных фибрилл коллагена и высокой степенью минерализации. На этом этапе механические свойства и состав костного матрикса регулируются трансформирующим фактором роста $\beta 1$ (ТФР $\beta 1$) [7, 8]. В дальнейшем снижение пролиферативной активности сопровождается усилением экспрессии ингибитора циклин-зависимых киназ *p21 (CIP1/WAF1) (p21)* и щелочной фосфатазы [9].

Поскольку дифференцировка остеобластов связана с синтезом различных белков, она может включать активацию сигнальных путей *mTOR* (мишени для рапамицина у млекопитающих). *mTOR* считается эволюционно консервативным центральным координатором фундаментальных биологических процессов, включающих продвижение по клеточному циклу, контроль трансляции и транскрипции, биогенез рибосом и аутофагию [10]. Недавно показано, что активация сигнального пути *mTOR* ассоциируется с повышением экспрессии *Runx2* и ТФР β в пре-osteoblastах [11, 12]. Напротив, подавление *mTOR* рапамицином ингибировало пролиферацию и дифференцировку остеобластов, что сопровождалось значительным снижением экспрессии специфичных для костной ткани генов — *Runx2*, остеокальцина, костного сиалопротеина и остериска, а также активности щелочной фосфатазы и способности к минерализации [11, 13]. Кроме того, подавление *mTOR* также сопровождалось развитием аутофагии у многих типов клеток [14, 15]. Аутофагия является физиологическим механизмом в клетках, посредством которого происходит деградация и рециклирование белков для поддержания адекватного уровня аминокислот с целью выживания при неблагоприятных условиях [16–19]. Она включает формирование в цитоплазме везикул, окруженных двойной мембраной, аутофагосом, что сопровождается увеличением экспрессии генов *ATG 1–15*

[20]. В дальнейшем в условиях гипераутофагии может происходить опосредуемая каспазами смерть клеток в результате апоптоза [21].

Усиление резорбции костной ткани при ОП связано с повышенным рекрутированием резорбирующих остеокластов. Регуляция трансляции белка посредством *mTOR* может также контролировать продолжительность жизни остеокластов, их резорбирующую активность и, таким образом, способна влиять на процессы обмена в костной ткани, поскольку три цитокина, ответственных за дифференцировку и функционирование остеокластов: фактор некроза опухоли α (ФНО α), RANKL (лиганд рецептора активации ядерного фактора каппа В) и макрофагальный колониестимулирующий фактор (МКСФ) — могут активировать *mTOR* как общую мишень [22].

Остеокласты могут происходить из циркулирующих моноцитов, содержащих значительное число Т-лимфоцитов [23, 24]. Изменения в распределении CD4+ и CD8+ подгрупп Т-лимфоцитов у женщин, больных ОП, по сравнению со здоровыми свидетельствуют о том, что Т-лимфоциты могут участвовать в процессах, способствующих потере костной ткани в постменопаузальный период [25]. Это также подтверждается отсутствием резорбции костной ткани, индуцированной удалением яичников у пу/пу (лысых) мышей, лишенных Т-лимфоцитов [26]. Кроме того, значение В-лимфоцитов в этиологии ОП было недавно отмечено при общем геномном исследовании по экспрессии генов в выборке США [27]. Поэтому мы предположили, что специфические изменения в экспрессии генов, участвующих в процессах пролиферации и дифференцировки клеток, а также их выживания, измеренные в периферической крови, могут отражать процессы, происходящие в костной ткани у больных ОП в постменопаузе.

Целью настоящего исследования было изучить взаимосвязь МПКТ с экспрессией генов, ассоциированных с пролиферацией, выживанием и дифференцировкой клеток кости в крови женщин в постменопаузальном периоде, больных ОП.

Материал и методы

Пациенты. В исследование были включены 28 женщин в период постменопаузы, которые лечились в поликлинике НИИР РАМН с ноября 2006 г. по март 2007 г. по поводу ОП. Средний возраст больных составил $66,1 \pm 7,2$ года (53–76 лет). Пациентки, имевшие заболевания, которые вызывают нарушения костного метаболизма, в том числе диабет, ревматоидный артрит, эндокринологические расстройства, были исключены. Контрольную группу составили 17 здоровых женщин в постменопаузе, средний возраст $61,0 \pm 12,2$ года (49–78 лет), не имевшие остеоартроза и не принимавшие лекарства, которые могли повлиять на метаболизм костной ткани. Исследовательский протокол был одобрен локальным этическим комитетом, информированное согласие было получено у всех участников исследования.

Инструментальные методы обследования. Измерения МПКТ позвоночника (L_1-L_{IV}) и проксимального отдела бедра проводили с помощью рентгеновской абсорбциометрии на приборе QDR-4500w (Hologic, США) в НИИР РАМН. Диагноз ОП основывался на рекомендациях ВОЗ [28]: Т-критерий $< -2,5$ SD (табл. 1).

Таблица 1

Средние значения МПКТ ($M \pm SD$) у больных ОП и здоровых доноров

Зона	Доноры	Т-критерий	Больные ОП	Т-критерий	p
Позвоночник (L _I –L _{IV})	1,052±0,06	0,064±0,62	0,712±0,06	-3,07±0,60	<0,001
Шейка бедра	0,857±0,06	0,064±0,59	0,584±0,08	-2,407±0,71	<0,001
Большой вертел	0,765±0,11	0,633±1,08	0,531±0,07	-1,703±0,74	<0,001
Межвертельная область	1,163±0,10	0,525±0,70	0,830±0,16	-1,696±1,05	<0,001
Треугольник Варда	0,727±0,10	-0,042±0,91	0,378±0,07	-2,839±1,24	<0,001
Бедренная кость (общая)	1,156±0,12	0,533±0,70	0,700±0,11	-1,853±1,11	<0,001

Биохимические маркеры обмена костной ткани. Образцы сыворотки собирали утром после 8-часового периода голодания. Сывороточные концентрации кальция (ммоль/л), фосфора (ммоль/л) и активность щелочной фосфатазы (ед/л) измеряли, используя стандартные фотометрические тесты в соответствии с рекомендациями производителя (DiaSys Diagnostic systems GmbH & Co, Германия).

Фракционирование клеток крови. Фракционирование клеток периферической крови проводили в градиенте плотности верографина-фикола по стандартной методике. В результате были получены фракции периферических мононуклеарных клеток (МКПК), тромбоцитов и гранулоцитов. Эритроциты лизировали в присутствии NH₄Cl в буфере, содержащем Трис-HCl, pH=7,2 [29].

Выделение общей РНК и обратная транскрипция (ОТ). Для исследований экспрессии генов общую РНК выделяли из цельной крови сразу после взятия крови, из сыворотки и изолированных клеточных элементов крови с помощью набора Ribo-zol-A («Хеликон», Россия) в соответствии с рекомендациями изготовителя. Реакцию ОТ проводили, используя набор Reverta («Хеликон», Россия) в соответствии с рекомендациями изготовителя.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Использовали готовые праймеры и зонды по методу TaqMan (Applied Biosystems Int.,

США): *mTOR* (Hs00234522_m1), *ТФР β1* (Hs99999918_m1), *Runx2* (Hs00231692_m1), общую щелочную фосфатазу (*ОЩФ*) (Hs00758162_m1), *ATG1* (Hs00177504_m1), *ФНО α* (Hs00174128_m1) и интерлейкин 1 (*ИЛ 1β*) (Hs00174097_m1). β-Актин служил геном домашнего хозяйства.

Количественную оценку уровней мРНК проводили на приборе 7300 (Applied Biosystems Int., США), как описано ранее [30].

Статистический анализ. Данные количественных экспериментов представлены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение. Анализы проводили в трех повторностях. Для статистической обработки результатов использовали непараметрический тест Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Экспрессия генов в периферической крови. В образцах периферической крови 28 больных ОП и 17 здоровых женщин измеряли экспрессию генов, связанных с пролиферацией клеток (*mTOR*) и их жизнеспособностью (*ATG1*). Кроме того, в тех же образцах измеряли экспрессию генов обмена костной ткани *ТФР β1*, *Runx2*, *ОЩФ* и цитокинов *ФНО α* и *ИЛ 1β* (рис. 1). Данные исследования выявили значительно более низкие уровни экспрессии *mTOR* (среднее 0,34±0,02), *ТФР β1* (среднее 0,29±0,03), *Runx2* (сред-

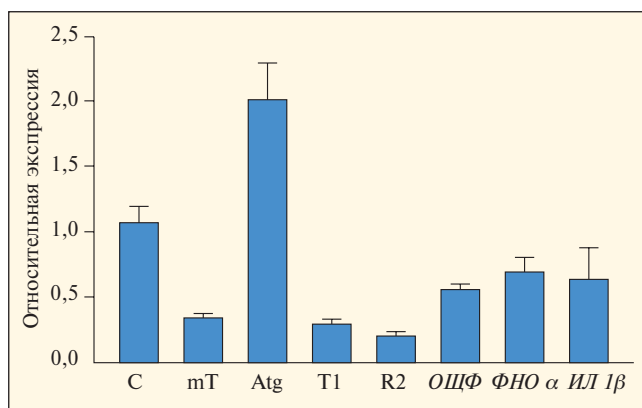


Рис. 1. Анализ экспрессии генов *mTOR* (*mT*), *ATG1* (*Atg*), *ТФР β1* (*T1*), *Runx2* (*R2*), *ОЩФ*, *ФНО α* и *ИЛ 1β* в периферической крови больных ОП по отношению к здоровым донорам (С) посредством ПЦР-РВ. Для всех генов различия со здоровыми донорами статистически достоверны

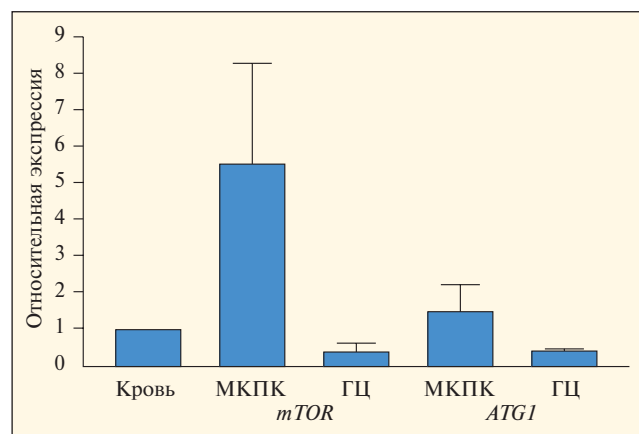


Рис. 2. Соотношение уровня экспрессии генов *mTOR* ($p=0,02$) и *ATG1* ($p=0,04$) во фракции МКПК и гранулоцитах (ГЦ). Нефракционированную периферическую кровь использовали в качестве контроля экспрессии генов

нее $0,21 \pm 0,03$) и *ОЩФ* (среднее $0,55 \pm 0,04$), *ФНО α* (среднее $0,70 \pm 0,09$), *ИЛ 1β* (среднее $0,64 \pm 0,23$) у больных ОП по сравнению со здоровыми женщинами ($p < 0,001$). Напротив, экспрессия *ATG1* у больных ОП (среднее $2,02 \pm 0,27$) была значительно повышена по сравнению с контролем ($p = 0,04$).

Экспрессия исследуемых генов в периферической крови, обусловленная активностью МКПК. Анализ экспрессии исследуемых генов в различных фракциях крови пациентов показал полное отсутствие экспрессии в сывотке крови, а также в безядерных клетках — эритроцитах и тромбоцитах. За экспрессию исследуемых генов в образце цельной крови ответственны преимущественно МКПК (рис. 2), поскольку в этих клетках она была значительно более высокой по сравнению с фракцией гранулоцитов. Уровень экспрессии исследуемых генов в МКПК превышал таковой в образце цельной крови вследствие активации клеток, происходящей в процессе фракционирования, что также отмечалось ранее в исследованиях других авторов [31].

Ассоциация экспрессии генов с МПКТ. Анализ бивариантных корреляций между экспрессией генов, исследуемых в данной работе, и МПКТ показал, что экспрессия *mTOR* положительно коррелировала с МПКТ в области большого вертела, тогда как экспрессия *ТФР $\beta 1$* , *Runx2* и *ИЛ 1β* коррелировала с МПКТ не только в этой зоне, но и в ряде других областей бедра (табл. 2; рис. 3). Напротив, экспрессия *ATG1* и *ОЩФ* отрицательно коррелировала с МПКТ ряда отделов бедра. Экспрессия *ОЩФ* положительно коррелировала с МПКТ позвоночника.

Ассоциация экспрессии генов с биохимическими маркерами метаболизма кости. Только экспрессия *ТФР $\beta 1$* положительно коррелировала с активностью щелочной фосфатазы ($r = 0,46$; $p = 0,017$). Бивариантные корреляции экспрессии других генов с маркерами сыворотки не достигли уровня статистической значимости (данные не приводятся).

Обсуждение. Т- и В-лимфоциты являются ключевыми регуляторами формирования, продолжительности жизни и активности остеокластов и остеобластов. Кроме того, иммунные клетки связаны с этиологией постменопаузального и сенильного ОП [25, 32]. Поэтому в нашем исследовании мы использовали периферическую кровь больных ОП в постменопаузе и соответствующего по возрасту здорового контроля для исследования изменения

экспрессии генов, относящихся к клеточной дифференцировке и метаболизму костной ткани.

Мы показали, что потеря костной массы сопровождается значительным снижением экспрессии генов, ассоциированных с дифференцировкой остеобластов, — *ТФР $\beta 1$* , *Runx2* и *ОЩФ* — в периферической крови больных ОП по сравнению со здоровыми донорами. Снижение экспрессии этих генов в связи с резорбцией кости ранее наблюдали в костной ткани. Так, более низкая экспрессия *ОЩФ* была отмечена у больных ОП по сравнению со здоровыми людьми в выборке из Венгрии [33]. Кроме того, исследования на животных показали ингибирование экспрессии *ТФР $\beta 1$* в костной ткани в связи с уменьшением МПКТ при недостатке эстрогенов [34, 35], а снижение экспрессии *Runx2* с последующей резорбцией кости наблюдали при кормлении грызунов розиглитазоном — агентом, резорбирующим кость [36]. Поэтому наблюдаемое нами снижение экспрессии *ТФР $\beta 1$* , *Runx2* и *ОЩФ* в периферической крови больных ОП может указывать на координацию экспрессии генов костного метаболизма в крови и костной ткани.

Наше предположение также подтверждается положительной корреляцией экспрессии генов в периферической крови с МПКТ ряда отделов бедра и позвоночника у исследуемых больных ОП.

Многие заболевания человека возникают, когда нарушается соотношение регуляции роста клеток (отношение клеточной массы к размеру) и их пролиферации (скорость клеточного деления) [37]. Резорбция кости также связана с фенотипическими изменениями клеток, она включает экспрессию специфических генов и синтез соответствующих белков. Поэтому при развитии ОП могут происходить нарушения сигнального пути *mTOR* — главного регулятора роста и пролиферации клеток [10]. Действительно, наши исследования показали значительное снижение экспрессии *mTOR* в крови больных ОП. Положительная корреляция экспрессии *mTOR* с МПКТ в области большого вертела также подтверждает его участие в резорбции кости при ОП. Это предположение подтверждается результатами исследований на животных, которые свидетельствуют о повышении активности сигнального пути *mTOR* при усилении костеобразования у крыс [38]. Напротив, длительное назначение животным ингибитора *mTOR* — FK506 — приводило к развитию ОП [39, 40]. Это сопровождалось подавлением экспрессии *Runx2* [41]. На-

Таблица 2

Коэффициенты корреляции Спирмена между экспрессией генов и МПКТ у больных ОП

Отделы/гены	<i>mTOR</i>	<i>ТФР $\beta 1$</i>	Относительная экспрессия генов <i>Runx2</i>	<i>ОЩФ</i>	<i>ATG1</i>	<i>ИЛ 1β</i>
Позвоночник				0,311 ($p = 0,001$)		
Шейка бедра		0,281 ($p = 0,005$)	0,273 ($p = 0,015$)	-0,473 ($p < 0,001$)		
Большой вертел	0,206 ($p = 0,030$)	0,276 ($p = 0,004$)	0,510 ($p < 0,001$)			0,268 ($p = 0,020$)
Межвертельная область		0,331 ($p < 0,001$)	0,307 ($p = 0,004$)			0,304 ($p = 0,012$)
Треугольник Варда			0,355 ($p = 0,001$)	-0,295 ($p = 0,002$)	-0,231 ($p = 0,037$)	
Бедренная кость		0,255 ($p = 0,009$)	0,354 ($p = 0,001$)			0,275 ($p = 0,023$)

Примечание. Представлены только статистически значимые результаты

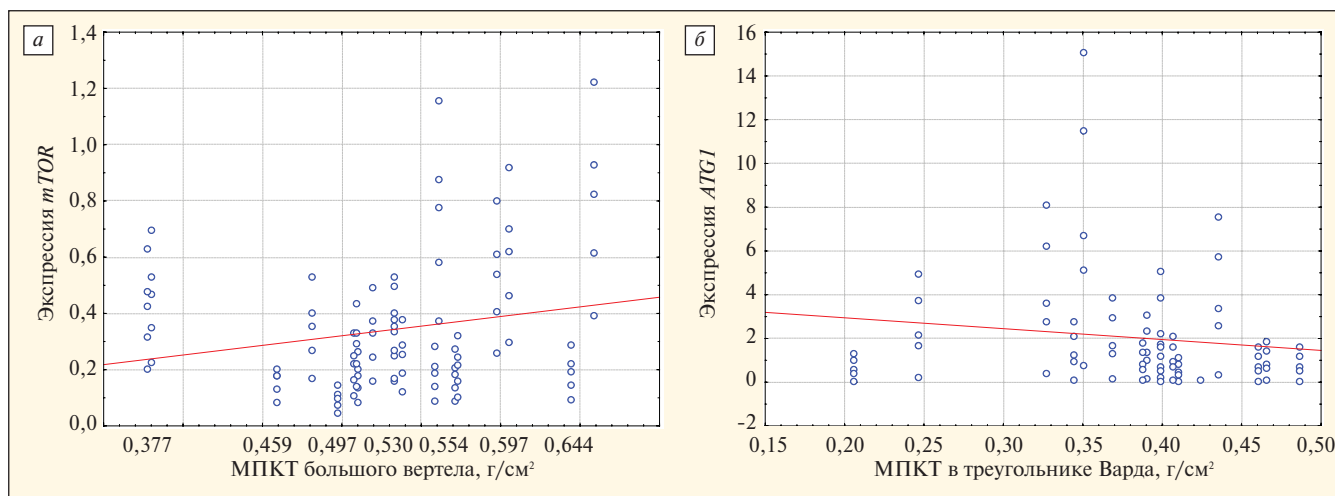


Рис. 3. Анализ линейной регрессии экспрессии генов *mTOR* (а) и *ATG1* (б) по отношению к β -актину в периферической крови больных ОП и значения их МПКТ в области большого вертела (а) и треугольника Варда (б)

конец, использование FK506 при иммуносупрессорной терапии людей сопровождалось тяжелой потерей костной ткани и переломами у 65% пациентов [42, 43].

Подавление экспрессии *mTOR* в периферической крови больных ОП в наших исследованиях сопровождалось также значительным повышением экспрессии гена *ATG1*. Об активации экспрессии генов, ассоциированных с аутофагией, при ОП до сих пор не сообщалось. Аутофагия связана с повышением жизнеспособности многих типов клеток [44]. Наши данные о повышении экспрессии генов аутофагии в крови больных ОП позволяют предположить вклад аутофагии в увеличение срока жизни остеокластов при ОП. Действительно, в опытах на животных наблюдали увеличение длительности жизни остеокластов, которое сопровождалось быстрой потерей костной ткани при индукции ОП глюкокортикоидами [45].

Заключение

Наши исследования показали, что развитие постменопаузального ОП сопровождается значительными мета-

болическими нарушениями не только в костной ткани, но и в клетках периферической крови. В данной статье мы впервые сообщаем о том, что в клетках крови больных ОП происходит значительное увеличение экспрессии гена *ATG1*, ответственного за их жизнеспособность. Это сопровождается значительным уменьшением экспрессии генов *mTOR*, *ТФР β 1* и *Runx2*, связанных с биосинтезом белка и активностью костного метаболизма. Положительная корреляция экспрессии этих генов с МПКТ позволяет предположить, что экспрессия этих генов в костной ткани больных ОП может изменяться аналогичным образом. Полученные данные по экспрессии генов больных ОП в периферической крови являются дополнением существующих знаний о механизмах развития ОП. Они могут быть использованы для разработки новых методов предотвращения потери костной ткани, а также для ранней диагностики ОП.

Работа осуществлена
при финансовой поддержке РФФИ
(проект № 09-04-01158-а)

ЛИТЕРАТУРА

- Colon-Emeric C.S., Saag K.G. Osteoporotic fractures in older adults. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006;20:695–706.
- Currey J.D. What determines the bending strength of compact bone? *J Exp Biol* 1999;202(Pt 18):2495–503.
- Hopwood B., Tsykin A., Findlay D.M., Fazzalari N.L. Gene expression profile of the bone microenvironment in human fragility fracture bone. *Bone* 2009;44:87–101.
- Stein G.S., Lian J.B., Owen T.A. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J* 1990;4:3111–23.
- Balint E., Lapointe D., Drissi H. et al. Phenotype discovery by gene expression profiling: mapping of biological processes linked to BMP-2-mediated osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 2003;89:401–26.
- Komori T. Regulation of bone development and maintenance by Runx2. *Front Biosci* 2008;13:898–903.
- Alliston T. TGF- β regulation of osteoblast differentiation and bone properties. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006;6:349–50.
- Stabellini G., Vertemati M., Locci P. et al. In vitro human osteoblast and extracellular matrix changes after transforming growth factor beta 1 treatment. *Pathology* 2005;37:347–54.
- Matsumoto T., Sowa Y., Ohtani-Fujita N. et al. p53-independent induction of WAF1/Cip1 is correlated with osteoblastic differentiation by vitamin D3. *Cancer Lett* 1998;129:61–8.
- Fingar D.C., Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 2004;23:3151–71.
- Singha U.K., Jiang Y., Yu S. et al. Rapamycin inhibits osteoblast proliferation and differentiation in MC3T3-E1 cells and primary mouse bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 2008;103:434–46.
- Patterson T.E., Sakai Y., Grabner M.D. et al. Exposure of murine cells to pulsed electromagnetic fields rapidly activates the mTOR signaling pathway. *Bioelectromagnetics* 2006;27:535–44.
- Tang C.H., Lu D.Y., Tan T.W. et al. Ultrasound induces hypoxia-inducible factor-1 activation and inducible nitric-oxide synthase expression through the integrin/integrin-linked kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway in osteoblasts. *J Biol Chem* 2007;282:25406–15.

14. Longo L., Platini F., Scardino A. et al. Autophagy inhibition enhances anthocyanin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2008;7:2476–85.
15. Goswami S.K., Das D.K. Autophagy in the myocardium: Dying for survival? *Exp Clin Cardiol* 2006;11:183–8.
16. Lleo A., Invernizzi P., Selmi C. et al. Autophagy: Highlighting a novel player in the autoimmunity scenario. *J Autoimmun* 2007;29:61–8.
17. Proud S.G. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur J Biochem* 2002;269:5338–49.
18. Starkman B.G., Cravero J.D., DelCarlo M. et al. IGF-1 stimulation of proteoglycan synthesis by chondrocytes requires activation of the PI 3-kinase pathway but not ERK MAPK. *Biochem J* 2005;389:723–9.
19. Kimura N., Tokunaga C., Dalai S. et al. A possible linkage between AMP-activated protein (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. *Genes Cells* 2003;8:65–79.
20. Lum J.J., DeBerardinis R.J., Thompson C.B. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:439–48.
21. Bell B.D., Leverrier S., Weist B.M. et al. FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:16677–82.
22. Glantschnig H., Fisher J.E., Wesolowski G. et al. M-CSF, TNF α and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death Differ* 2003;10:1165–77.
23. Matayoshi A., Brown C., DePersio J.F. et al. Human blood-mobilized hematopoietic precursors differentiate into osteoclasts in the absence of stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10785–90.
24. Colucci S., Brunetti G., Rizzi R. et al. T cells support osteoclastogenesis in an in vitro model derived from human multiple myeloma bone disease: the role of the OPG/TRAIL interaction. *Blood* 2004;104:3722–30.
25. Teitelbaum S.L. Postmenopausal osteoporosis, T cells, and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:16711–2.
26. Cenci S., Weitzmann M.N., Roggia C. et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α . *J Clin Invest* 2000;106:1229–37.
27. Xiao P., Chen Y., Jiang H. et al. In vivo genome-wide expression study on human circulating B cells suggests a novel ESR1 and MAPK3 network for postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2008;23:644–54.
28. World Health Organization Study Group. Assessment of fracture risk and its application for screening for postmenopausal osteoporosis. — Geneva: WHO, 1994.
29. Лимфоциты — методы. Под ред. Д. Клауса. М.: Мир, 1990;52–3.
30. Четина Е.В., ДиБатиста Д., Пул А.Р. Роль простагландина E2 в ингибировании разрушения коллагена суставного хряща больных остеоартрозом. *Науч-практич ревматол* 2009;3:18–21.
31. Batliwalla F.M., Baechler E.C., Xiao X. et al. Peripheral blood gene expression profiling in rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2005;6:388–97.
32. Rifas L., Arackal S. T cells regulate the expression of matrix metalloproteinase in human osteoblasts via a dual mitogen-activated protein kinase mechanism. *Arthr Rheum* 2003;48:993–1001.
33. Balla B., Kosa B.B., Kiss J.P. et al. Different gene expression patterns in the bone tissue of aging postmenopausal osteoporotic and non-osteoporotic women. *Calcif Tissue Int* 2007;82:12–26.
34. Gao Y., Qian W.-P., Dark K. et al. Estrogen prevents bone loss through transforming growth factor β signaling in T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:16618–23.
35. Finkelman R.D., Bell N.H., Strong D.D. et al. Ovariectomy selectively reduces the concentration of transforming growth factor beta in rat bone: implications for estrogen deficiency-associated bone loss. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:12190–3.
36. Ali A.A., Weinstein R.S., Stewart S.A. et al. Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology* 2005;146:1226–35.
37. Tee A.R., Blenis J. mTOR, translational control and human disease. *Seminars Cell Dev Biol* 2005;16:29–37.
38. Ford-Hutchinson A.F., Ali Z., Lines S.E. et al. Inactivation of Pten in osteo-chondroprogenitor cells leads to epiphyseal growth plate abnormalities and skeletal overgrowth. *J Bone Miner Res* 2007;22:1245–59.
39. Cvetkovic M., Mann G.N., Romero D.F. et al. The deleterious effects of long-term cyclosporine A, cyclosporine G, and FK506 on bone mineral metabolism in vivo. *Transplantation* 1994;57:1231–7.
40. Sass D.A., Bowman A.R., Yuan Z. et al. Alendronate prevents cyclosporin A-induced osteopenia in the rat. *Bone* 1997;21:65–70.
41. Sun L., Blair H.C., Peng Y. et al. Calcineurin regulates bone formation by the osteoblast. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:17130–5.
42. Epstein S., Shane E., Bilezikian J.P. Organ transplantation and osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 1995;7:255–61.
43. Epstein S., Inzerillo A.M., Caminis J. et al. Disorders associated with acute rapid and severe bone loss. *J Bone Miner Res* 2003;18:2083–94.
44. Neufeld T.P. Contribution of ATG1-dependent autophagy to mTOR-mediated cell growth and survival. *Autophagy* 2007;3:477–9.
45. Weinstein R.S., Chen J.R., Rowers C.C. et al. Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest* 2002;109:1041–8.

Поступила 23.03.2011