

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ, РАСТВОРИМОЙ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ, РЕЦЕПТОРА ЛИПОПРОТЕИНА НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ И ВИТАМИН Д- СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА КАК ВОЗМОЖНЫХ ГЕНОВ - КАНДИДАТОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ДЕТЕРМИНАЦИИ МИНЕРАЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ КОСТИ У ЖЕНЩИН В ПОСТМЕНОПАУЗЕ С ПЕРВИЧНЫМ ОСТЕОПОРОЗОМ

М.Ю.Крылов, В.А.Мякоткин, Л.И.Беневоленская
ГУ Институт ревматологии РАМН, Москва

Резюме

Изучен полиморфизм 4 генов, включая гены щелочной фосфатазы (ALPL), растворимой кислой фосфатазы (ACP1), рецептора липопротеина низкой плотности (LDLR) и витамин Д-связывающего белка (GC), продукты которых, возможно, принимают участие в процессах минерализации скелета, у женщин в постменопаузе с остеопорозом (ОП) и без него. Проведена оценка распределения частот генотипов и аллелей среди исследуемой и контрольной групп женщин. Изучена потенциальная связь их генотипов с минеральной плотностью костной ткани (МПКТ), измеренной с помощью двойной энергетической рентгеновской абсорбциометрии. Обнаружена достоверная ассоциация МПКТ шейки бедра с генотипами SS и 2F GC гена у женщин с ОП ($0,606 \pm 0,010$ и $0,654 \pm 0,020$ гр/см² соответственно, $p < 0,05$). Не обнаружено ассоциаций МПКТ с тринуклеотидным повтором гена ALPL, Arg105Gly полиморфизмом гена ACP1 и динуклеотидным повтором гена LDLR. Полученные данные подтверждают значимую роль генотипов гена GC в детерминации МПКТ шейки бедра среди женщин в постменопаузе с первичным ОП.

Ключевые слова: *остеопороз, гены-кандидаты, минеральная плотность кости*

Остеопороз (ОП) – хроническое системное заболевание скелета, характеризующееся снижением минеральной плотности костной ткани (МПКТ) и микроструктурной перестройкой костной ткани, приводящей в конечном счете к возрастающей хрупкости костей и высокому риску их переломов. Главной причиной возникновения переломов является

Среди большого числа генов-кандидатов, которые могут оказывать влияние на МПКТ, наиболее хорошо изучен ген рецептора витамина Д. Витамин Д является одним из предшественников кальций регулирующих гормонов организма, обеспечивающих всасывание кальция в кишечнике и его реабсорбцию в почках [1]. Перенос активных метаболитов витамина Д к соответствующим клеточным рецепторам осуществляется витамином Д- связывающим белком, ген которого (GC) обладает выраженным полиморфизмом.

Показано, что распределение генетических вариантов GC белка в разных популяциях объясняется действием естественного отбора и подтверждается функциональными различиями фенотипов GC белка в фиксации и транспорте производных витамина Д [2]. Один из них – каль-

цитриол [1,25(OH)₂D₃] играет важную роль в образовании и дифференцировке остеокластов из их предшественников – клеток гемопоэтического ряда. Через остеобласты он стимулирует активность остеокластов. Наибольшее влияние кальцитриол оказывает на дифференцировку остеобластов, модулируя в них экспрессию некоторых генов, включая коллаген I типа, костную щелочную фосфатазу, остеопонтин, остеокальцин [3,4], – маркеров ремоделирования костной ткани. В этой связи значительный резонанс вызвало исследование, проведенное М., Devoto et al. [5], которые выявили сцепление МПКТ с 1p36, 2p24-23 и 4q локусами в 7 больших семьях, используя традиционный метод пар сибсов. Известно, что в 4q локусе расположен ген GC белка, в локусе 2p – находится ген растворимой кислой фосфатазы I (ACP1), в локусе 1p – ген щелочной фосфатазы печени (ALPL), что дало нам основание предположить их возможное участие в детерминации МПКТ.

Согласно данным литературы, одним из наиболее информативных биохимических маркеров резорбции костной ткани является тартрат-резистентная кислая фосфатаза (ТРКФ), кодируемая геном ACP5.

Вследствие нестойкости и незначительного количества в сыворотке крови ТРКФ ее изучение связано с определенными трудностями. Кроме того, в настоящее время полиморфизм ACP5 гена не известен. Обойти это затруднение возможно с помощью изучения полиморфизма тесно сцеп-

ленного с ним гена рецептора липопротеина низкой плотности (LDRL), фланкирующего ген ACP5.

Настоящее исследование предпринято с целью изучения связи генотипических вариантов ряда новых кандидатных генов ALPL, ACP1, LDLR и GC, которые могут участвовать в остеогенезе костной ткани.

Материалы и методы

В исследование были включены 2 группы женщин, прошедших денситометрическое исследование в Центре профилактики остеопороза ГУ Института ревматологии РАМН. Одну из них составили женщины с установленным диагнозом ОП в возрасте от 56 до 79 лет (средний возраст $71,0 \pm 6,2$ г). В разных сериях опытов число исследованных женщин с ОП колебалось от 48 до 82 чел. Другую группу - контроля или сравнения составили женщины в том же возрастном интервале (средний возраст $69,0 \pm 5,6$ г), не имевшие ОП, число которых в разных опытах колебалось от 37 до 60 чел. МПКТ (в г/см²) поясничного отдела L1-L4 позвоночника и шейки бедренной кости измерялась с помощью двойной энергетической рентгеновской абсорбциометрии на аппарате QDR 4500 (Hologic). Диагноз ОП ставился с использованием критериев ВОЗ (1994).

Полиморфизм гена ALPL был изучен у 60 больных ОП и 39 контрольных лиц, полиморфизм гена ACP1 - у 48 больных ОП и у 37 лиц группы сравнения.

Полиморфизм гена LDLR, связанный с СА-динуклеотидным повтором, был изучен у 82 женщин с ОП и у 60 женщин группы сравнения. Полиморфизм GC гена был изучен у 70 женщин с ОП и у 51 женщины из группы контроля.

Геномная ДНК была выделена из крови обследованных лиц стандартным методом солевой экстракции [6].

Генотипирование ALPL гена

Для изучения полиморфизма ALPL гена, связанного с тринуклеотидным повтором, 0,05 - 0,1 мкг геномной ДНК были амплифицированы в 20 мкл ПЦР буферного раствора. В качестве праймеров были использованы следующие олигонуклеотиды: 5'-AGGATTCTG-GGAGACAGCAA-3' как прямой праймер и 5'-CAAGTCCCTCTCCAATGATC-3' - как обратный. Амплификация была проведена в течение 30 циклов со следующими параметрами: начальная денатурация - 94°C - 3 мин., последующая - 94°C - 1 мин., отжиг - 60°C - 1,5 мин., достройка - 72°C - 1 мин. и окончательная достройка - 72°C - 5 мин. в амплификаторе MC2 (фирма ДНК-Технология, Россия). Продукт амплификации ALPL гена, содержащий фрагмент ДНК размером 148 пар оснований (п.о.), подвергали вертикальному электрофорезу в 8% полиакриламидном геле и окрашивали этидиум бромидом.

Генотипирование ACP1 гена

Для анализа полиморфизма гена ACP1, связанного с точковой заменой (Arg>Gln) в 105 кодоне, использовали соответствующие праймеры: 5'-GCTCCCAAG-TAGTTCAATTTAGC-3' - как прямой праймер и 5'-GGATGTTTCAGAAGACCTAGCAG-3' - как обратный.

ПЦР проводили согласно условиям, описанным выше. Полученный продукт, размером 149 п.о., подвергали обработке TaqI эндонуклеазой (фирма MBI Fermentas, Литовская Республика) и затем электрофорезу в 3% агарозном геле. Отсутствие сайта рестрикции соответствовало аллелю ACP1*B, а наличие - аллелю ACP1*A.

Генотипирование LDLR гена

Для изучения полиморфизма LDLR гена, связанного с СА динуклеотидным повтором, 0,05 - 0,1 мкг геномной ДНК были амплифицированы в 20 мкл ПЦР буферного раствора. В качестве праймеров были использованы следующие олигонуклеотиды: 5'-CACTTTGTATATTGGTTGAACCTGT-3' - в качестве прямого праймера и 5'-CACTGAACAAAT-ACAGCAACCAGGG-3' - в качестве обратного. Амплификация была проведена в течение 30 циклов с теми же па-

раметрами, что были использованы для амплификации ALPL гена. Продукт амплификации динуклеотидного повтора LDLR гена содержал фрагмент ДНК размером 112 п.о., который подвергали вертикальному электрофорезу в 8% полиакриламидном геле и окрашивали этидиум бромидом.

Генотипирование GC гена

Полиморфизм 11 экзона GC гена, кодирующего витамин D-транспортный белок, был изучен с помощью ДНК типирования, описанного в работе A. Braun с соавт. [7], в нашей модификации и впервые примененного в отечественных исследованиях. В качестве праймеров были использованы олигонуклеотиды, фланкирующие 416 и 420 кодоны нуклеотидной последовательности 11 экзона GC гена: 5'-TTTTTCAGACTGGCAGAGCGAC-3' - в качестве прямого праймера и 5'-AAGAGGAGGTGAGTTTATG-GAAC-3' - в качестве обратного. ПЦР была осуществлена в течение 30 циклов согласно параметрам, изложенным выше. Часть полученного продукта амплификации размером 126 п.о. подвергали обработке рестриктазой Eco1301 (аналог ре-стриктазы StyI), а другую - рестриктазой BsuRI (аналог рестриктазы HaeIII) [фирмы MBI Fermentas, Литовская республика]. Продукты рестрикции анализировали с помощью вертикального электрофореза в 8% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием серебром.

Статистические методы

Различия в распределении частот генотипов определяли с помощью метода хи-квадрат, применяя в случае необходимости поправку Йетса, или точный критерий Фишера. Различия в средних значениях МПКТ позвоночника и бедра определяли с помощью критерия Стьюдента. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Результаты и обсуждение

Одним из маркеров образования костной ткани является костная щелочная фосфатаза (ЩФ), которая расщепляет органический фосфор до неорганического, увеличивает продукцию фосфата кальция и принимает участие в минерализации костной ткани [8,9]. В норме в сыворотке присутствуют три основных изоформы ЩФ: печеночная, костная и почечная. Печеночный и костный варианты ЩФ кодируются полиморфным геном ALPL, локализованным в локусе 1p36.1-34. Тканевые различия обоих ферментов связаны с модификациями, происходящими на посттрансляционном уровне. В ALPL гене обнаружены несколько полиморфизмов, различающихся своим разнообразием. Наиболее выраженный из них связан с тринуклеотидным повтором в С2 экзоне, который был изучен в настоящем исследовании.

Частотная характеристика генотипов и аллелей ALPL гена среди больных первичным постменопаузальным ОП и женщин контрольной группы представлена в табл. 1. Как видно из приведенных данных, характер распределения генотипов среди больных ОП значимо не отличался от такового в контрольной группе (хи-квадрат=0,37, $p=0,83$). Также не выявлено различий в частоте встречаемости аллелей 133 п.о. и 148 п.о. в двух сравниваемых группах.

Анализ показателей МПКТ позвоночника и шейки бедра в зависимости от генотипа гена ALPL не показал их достоверных различий, как среди больных, так и лиц группы контроля (табл. 2).

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что изученный полиморфизм гена ALPL не является информативным маркером остеогенеза и не связан с риском предрасположенности к ОП.

Анализ распределения частот генотипов и частот аллелей полиморфизма гена ACP1, связанного с ARG105GLN заменой, среди больных ОП и женщин группы сравнения (табл. 3) не выявил достоверных различий в частотах генотипов и аллелей между двумя изученными выборками (хи-квадрат = 0,71, $p=0,7$). У больных ОП прослеживается тен-

Таблица 1
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ
И АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ
ПЕЧЕНИ (ALPL) СРЕДИ БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНЫМ
ОП И ЛИЦ ГРУППЫ КОНТРОЛЯ

ГенALPL	Больные ОП n = 52 (%)	Контрольная группа n = 39 (%)
Генотипы (п.о.)		
133.133	16 (30,8)	10 (25,6)
133.148	26 (50,0)	20 (51,3)
148.148	10 (19,2)	9 (23,1)
Аллели		
133.133	58 (55,8)	40 (51,3)
148.148	46 (44,2)	38 (48,7)

По активности фенотипы АСР1 распределяются следующим образом: С > В > А. Частота аллеля А уменьшается с севера на юг и коррелирует с уменьшением частоты ОП по тому же вектору.

Анализ средних показателей МПКТ позвоночника и шейки бедра в зависимости от носительства определенных генотипов АСР1 гена среди больных ОП и в группе сравнения (табл. 4) не выявил достоверных различий в МПКТ изученных отделов костной системы в зависимости от АСР1 генотипа в обеих группах женщин. Таким образом, изучение полиморфизма АСР1 гена не установило ассоциаций исследованных генотипов с предрасположенностью к ОП и с генетической детерминацией процессов минерализации костной ткани.

Наиболее адекватным маркером резорбции костной ткани является концентрация ТРКФ, который кодируется геном АСР5, однако отсутствие полиморфизма в этом гене делает невозможным его изучение на молекулярном уровне. Определенным выходом из данного затруднительного положения может являться изучение полиморфизмов

Таблица 2
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СРЕДНИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МПКТ (М ± СОС)* ПОЗВОНОЧНИКА (ПОЗВ.)
И ШЕЙКИ БЕДРА (Ш.Б.) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА ГЕНА ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ ALPL
У БОЛЬНЫХ С ПЕРВИЧНЫМ ОП И В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ

ГенотипALPL	Больные ОП (n = 60)		Контрольная группа (n = 39)	
	МПКТ позв. (гр/см ²)	МПКТ ш.б. (гр/см ²)	МПКТ позв. (гр/см ²)	МПКТ ш.б. (гр/см ²)
133.133	0,725 ± 0,025	0,595 ± 0,016	1,052 ± 0,030	0,826 ± 0,020
133.148	0,720 ± 0,018	0,610 ± 0,015	1,029 ± 0,020	0,831 ± 0,010
148.148	0,722 ± 0,026	0,633 ± 0,022	1,077 ± 0,030	0,848 ± 0,020

*М ± СОС - средняя ± стандартная ошибка средней

денция снижения частоты генотипа АА и накопления генотипа ВВ по сравнению с женщинами контрольной группы.

Установлено, что одним из показателей активности процессов резорбции костной ткани является концентрация КФ, особенно ТРКФ. В настоящее время описано 5 изоформ КФ: растворимая эритроцитарная (ген АСР1), костная или тартрат-резистентная (ген АСР5), тромбоцитарная, селезеночная и простатическая. Высокие концентрации КФ могут тормозить процесс костеобразования, что способствует относительному усилению процессов резорбции. J.Dissing and H.Johnsen [10] предоставили доказательства молекулярных различий 3 основных аллелей АСР1 среди европеоидов АСР1*А, АСР1*В и АСР1*С, которые образуют 6 фенотипов (А, В, С, АВ, АС и ВС). Ген АСР1 расположен на 2 хромосоме в локусе р25. Кодирующие области АСР1*В и АСР1*С аллелей идентичны и различаются только на белковом уровне. Фенотип А отличается от фенотипа В единственной заменой в 105 кодоне (аргинин → глицин), которая и определяет полиморфизм этого гена.

Таблица 3
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ
И АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА РАСТВОРИМОЙ КИСЛОЙ
ФОСФАТАЗЫ (АСР1) СРЕДИ БОЛЬНЫХ
ПЕРВИЧНЫМ ОП И ЛИЦ ГРУППЫ КОНТРОЛЯ

Ген АСР1	Больные ОП n = 48 (%)	Контрольная группа n = 37 (%)
Генотипы		
АА	7 (14,6)	8 (21,6)
АВ	21 (43,7)	15 (40,5)
ВВ	20 (41,7)	14 (37,8)
Аллели		
А	35 (36,4)	31 (41,9)
В	61 (63,6)	43 (58,1)

Таблица 4
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СРЕДНИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МПКТ (М ± СОС)* ПОЗВОНОЧНИКА (ПОЗВ.)
И ШЕЙКИ БЕДРА (Ш.Б.) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА ГЕНА АСР1
У ЖЕНЩИН С ОП И В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ

Генотип АСР1	Больные ОП (n = 60)		Контрольная группа (n = 39)	
	МПКТ позв. (гр/см ²)	МПКТ ш.б. (гр/см ²)	МПКТ позв. (гр/см ²)	МПКТ ш.б. (гр/см ²)
АА	0,753 ± 0,030	0,641 ± 0,020	1,027 ± 0,030	0,840 ± 0,020
АВ	0,706 ± 0,020	0,607 ± 0,010	1,031 ± 0,010	0,824 ± 0,010
ВВ	0,723 ± 0,020	0,630 ± 0,010	1,080 ± 0,030	0,842 ± 0,010

*М ± СОС - средняя ± стандартная ошибка средней

Таблица 5
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ
И АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА LDLR СРЕДИ БОЛЬНЫХ
ПЕРВИЧНЫМ ОП И ЖЕНЩИН ГРУППЫ КОНТРОЛЯ

Ген LDLR	Больные ОП n = 82 (%)	Контрольная группа n = 60 (%)
Генотипы (п.о.)		
106.106	34 (41,5)	26 (43,3)
106.108	6 (7,3)	8 (13,3)
106.112	31 (37,8)	19 (3,7)
108.112	6 (7,3)	4 (6,7)
112.112	5 (6,1)	3 (5,0)
Аллели		
106	105 (64,0)	79 (65,8)
108	12 (7,3)	12 (10,0)
112	47 (28,6)	29 (24,2)

ного скелета в двух группах постменопаузальных женщин в зависимости от LDLR генотипов (табл. 6).

Распределение частот генотипов и аллелей GC гена среди женщин в постменопаузе с первичным ОП и среди женщин адекватного возраста контрольной группы (табл. 7) показало наличие флюктуации по частотам определенных генотипов. В частности, среди женщин с ОП выявлено накопление генотипов FF и 2S и дефицит генотипа 2.2 по сравнению с контрольной группой.

Однако по всем генотипам распределение частот в сравниваемых группах статистически значимо не отличались (хи-квадрат=2,63 при 5 d.f., p=0,76). Анализ средних показателей МПКТ позвоночника и бедра в зависимости от генотипа GC гена в тех же группах женщин (табл. 8) установил, что наиболее низкие значения МПКТ позвоночника отмечаются среди носителей генотипа FF как среди здоровых лиц, так и больных ОП. Эта закономерность практически сохраняется и для МПКТ шейки бедра. При

Таблица 6
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СРЕДНИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МПКТ (M±COC)* ПОЗВОНОЧНИКА И ШЕЙКИ БЕДРА
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА ГЕНА РЕЦЕПТОРА LDLR
У ЖЕНЩИН С ПЕРВИЧНЫМ ОП И ЛИЦ ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ

Генотип LDLR	Больные ОП (n = 82)		Контрольная группа (n = 60)	
	МПКТ позв. (гр/см ²)	МПКТ ш.б. (гр/см ²)	МПКТ позв. (гр/см ²)	МПКТ ш.б. (гр/см ²)
106.106	0,727 ± 0,014	0,619 ± 0,016	1,012 ± 0,016	0,828 ± 0,013
106.108	0,713 ± 0,050	0,616 ± 0,025	1,053 ± 0,037	0,837 ± 0,016
106.112	0,722 ± 0,018	0,612 ± 0,011	1,063 ± 0,029	0,851 ± 0,022
108.112	0,747 ± 0,024	0,616 ± 0,034	0,996 ± 0,035	0,805 ± 0,007
112.112	0,726 ± 0,015	0,667 ± 0,038	1,099 ± 0,042	0,814 ± 0,011

*M ± COC - средняя ± стандартная ошибка средней

генов, расположенных вблизи гена ACP5. Одним из них является ген LDLR, полиморфизм которого связан с СА-динуклеотидным повтором. Анализ указанного полиморфизма, по нашему мнению, может помочь в оценке значимости ACP5 гена для прогнозирования возникновения ОП. В таблице 5 приведены частотные характеристики генотипов и аллелей гена LDLR в основной и контрольной группах исследованных женщин. Как видно из таблицы, среди больных ОП отмечается почти 2-х кратный дефицит генотипа 106/108 п.о. по сравнению с контролем (OR=0,51), что может указывать на меньший риск развития ОП для носителей данного генотипа по сравнению с другими генотипами. Однако этот показатель не достигает 95% уровня значимости, в целом распределение генотипов и аллелей гена LDLR в основной и контрольной группах статистической достоверностью не отличалось (хи-квадрат=1,8 при 4 d.f., p=0,7). Не было выявлено значимых различий в средних показателях МПКТ в обеих изученных областях кост-

Таблица 7
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ И АЛЛЕЛЕЙ
ГЕНА ВИТАМИН Д ТРАНСПОРТНОГО БЕЛКА (GC)
СРЕДИ ЖЕНЩИН С ПЕРВИЧНЫМ ОП
И ГРУППЫ КОНТРОЛЯ

Ген GC	Больные ОП n = 70 (%)	Контрольная группа n = 51 (%)
Генотипы		
FF	5 (7,1)	2 (3,9)
SS	12 (17,1)	9 (17,7)
2.2	2 (2,8)	3 (5,9)
FS	16 (22,8)	16 (31,4)
2S	25 (35,7)	14 (27,4)
2F	10 (14,3)	7 (13,7)
Аллели		
F	36 (25,7)	27 (26,5)
S	65 (46,4)	48 (47,0)
2	39 (27,9)	27 (26,5)

Таблица 8
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СРЕДНИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МПКТ (M±COC)
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА GC ГЕНА
У ЖЕНЩИН С ПЕРВИЧНЫМ ОП И ЛИЦ ГРУППЫ КОНТРОЛЯ

Генотип ALPL	Больные ОП (n = 70)		Контрольная группа (n = 51)	
	МПКТ позв. (гр/см ²)	МПКТ ш.б. (гр/см ²)	МПКТ позв. (гр/см ²)	МПКТ ш.б. (гр/см ²)
FF	0.672 ± 0.020	0.618 ± 0.020	1.052 ± 0.030	0.826 ± 0.020
SS	0.757 ± 0.030	0.606 ± 0.010*	1.029 ± 0.020	0.831 ± 0.010
2.2	0.748 ± 0.002	0.585 ± 0.010	1.077 ± 0.030	0.848 ± 0.020
FS	0.674 ± 0.020	0.614 ± 0.020	1.032 ± 0.020	0.837 ± 0.010
2S	0.726 ± 0.020	0.630 ± 0.010	1.037 ± 0.030	0.816 ± 0.010
2F	0.739 ± 0.030	0.654 ± 0.020*	1.045 ± 0.030	0.865 ± 0.040

M ± COC - средняя ± стандартная ошибка средней

* p < 0,05 генотип SS против генотипа 2F

этом различия в МПКТ были получены только в группе женщин с ОП. Наибольшее значение МПКТ шейки бедра было найдено у больных с генотипом 2F и наименьшее у больных с генотипом SS ($0,654 \pm 0,01$ и $0,606 \pm 0,01$ г/см² соответственно, $p < 0,05$).

Анализ показателей МПКТ поясничного отдела позвоночника среди женщин с ОП выявил ассоциацию с SS и FS генотипами GC гена. Больные с генотипом SS имели более высокую МПКТ позвоночника по сравнению с больными, имеющими генотип FS ($0,755 \pm 0,033$ и $0,674 \pm 0,018$ г/см² соответственно, $p = 0,056$), однако показатель достоверности в этом случае не достигал 95% уровня значимости. Можно предположить, что SS, 2F и FS генотипы имеют определенные функциональные различия в фиксации и транспортировке активных метаболитов витамина Д. По-

лученные для гена GC предварительные результаты нуждаются в дальнейшем подтверждении на более обширных выборках женщин с ОП и, возможно, откроют новые перспективы дальнейшего использования нового GC маркера для изучения предрасположенности к данному заболеванию. Данные о связи генотипов гена, кодирующего витамин Д транспортный белок с показателями МПКТ, полученные нами впервые, вместе с уже известными полиморфизмами гена рецептора витамина Д (FokI, BsmI, ApaI и TaqI) целесообразно учитывать как дополнительные факторы риска при скрининге населения с целью выявления лиц, предрасположенных к ОП.

Работа имела финансовую поддержку РФФИ, грант N 00-04-49340

ЛИТЕРАТУРА

1. Haussler M.R., Whitfield G.K., Haussler C.A. et al. The nuclear vitamin D receptor: Biological and molecular regulatory properties revealed. *J. Bone Miner. Res.*, 1998, 3, 325-339.
2. Coppenhaver D., Knappers F., Schidlow D. et al. Serum concentrations of Vitamin D-binding Protein (Group-Specific Component) in Cystic Fibrosis. *Hum. Genet.*, 1981, 4, 339-403.
3. Шварц Г.Я. Витамин Д. D-гормон и альфакальцидол: молекулярно-биологические и фармакологические аспекты действия. *Остеопороз, остеопен.*, 1998, 3, 2-6.
4. Martin T.J. and Dempster D.W. Bone structure and cellular activity. In: *Osteoporosis*, edited by J.C. Stevenson and R. Lindsay. Chapman & Hall Medical. London, 1998, 1-28.
5. Devoto M., Shimoya K., Caminis J. et al. First-stage autosomal genome screen in extended pedigrees suggest genes predisposing to low bone mineral density on chromosomes 1p, 2p and 4q. *Europ. J. Hum. Genet.*, 1998, 6, 151-157.
6. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 1988, 16, 12-15.
7. Braun A., Bichlmaier R., Cleve H. Molecular analysis of the gene for the human vitamin D-binding protein (group-specific component): allelic differences of the common genetic GC types. *Hum. Genet.* 1992, 89, 401-406.
8. Calvo M.S., Eyre D.R., Gundberg C.M. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocrine Rev.* 1996, 17(4), 333-363.
9. Ericsen E.F., Brixen K., Charles P. New markers of bone metabolism: clinical use in bone disease. *Europ. J. Endocrinol.*, 1995, 132, 251-263.
10. Dissing J., Johnsen H.H., Sensabaugh G.F. Human red cell acid phosphatase (ACP1): the amino acid sequence of the two isozymes Bf and Bs encoded by the ACP1*B allele. *J. Biol. Chem.* 1991, 226, 20619-20625.

Поступила 17.12.03

Abstract

M.Yu. Krylov, V.A. Myakotkin, L.I. Benevolenskaya

Analysis of alkaline phosphatase, soluble acid phosphatase, low density lipoprotein and vitamin D binding protein gene polymorphisms as possible gene-candidates participating in mineral bone density determination in women with primary osteoporosis in postmenopause

Objective. To investigate the distribution of alkaline phosphatase (ALPL), acid phosphatase I (ACP1), receptor lipoprotein low density (LDLR) and vitamin D binding protein (GC) genotypes in osteoporotic and nonosteoporotic postmenopausal women and the possible associations these genotypes with bone mineral density (BMD).

Material and methods. In this study ALPL, ACP1, LDLR and GC genotypes were determined by polymerase chain reaction (PCR) or PCR-RFLP analysis.

Results. We observed significant the associations between BMD of the femoral neck and SS and 2F GC genotypes ($0,696 \pm 0,010$ and $0,654 \pm 0,020$ gr/cm², $p < 0,05$) but not with lumbar spine in the osteoporotic women. The associations weren't observed between ALPL, ACP1, LDLR genotypes and BMD.

Conclusion. These new data showed important role of the GC gene in determination of bone mineral density of the femoral neck in postmenopausal women with osteoporosis.

Key words: *osteoporosis, gene-candidates, bone mineral density*