

В.А. Мякоткин, М.Ю. Крылов, И.А. Гусева, Е.В. Четина,  
Н.В. Торопцова, О.А. Никитинская, Е.Ю. Самаркина, Л.И. Беневоленская

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

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ОСТЕОПОРОЗУ У ЖЕНЩИН В ПОСТМЕНОПАУЗЕ В МОСКВЕ

**Контакты:** Валерий Андреевич Мякоткин [epid@iramn.ru](mailto:epid@iramn.ru)

На выборках, включавших от 150 до 265 здоровых женщин в постменопаузе из контрольной группы и от 175 до 269 больных остеопорозом (ОП), изучены полиморфизмы 21 гена, участвующего в процессах ремоделирования костной ткани. Установлено, что генотипами чувствительности к ОП в московской выборке женщин в постменопаузе являются: генотип CT гена белка 5, родственного семейству рецепторов липопротеинов низкой плотности (LRP5), генотип GG гена лептина (LEP), генотип XX гена эстрогенового рецептора  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), генотип Ff гена рецептора витамина D (VDR), генотип HH гена  $\alpha 1$  полипептидной цепи коллагена 2-го типа и генотип GG гена ароматазы (CYP19).

Выявлена комплементарность взаимодействия ряда генов относительно формирования чувствительности к ОП. Так, носительство сочетанных генотипов CTxx генов LRP5/ER $\alpha$ ; CTGG генов LRP5/CBFA; CCGA генов TGF $\beta$ 1/CYP19; CCAA генов TGF $\beta$ 1/OPG повышает риск возникновения ОП в 7, 7, 4, 1; 6, 2 и 2, 7 раза соответственно.

Генотипами, повышающими риск возникновения остеопоротических переломов позвоночника, являлись: AG полиморфизма -163A/G гена OPG; TT полиморфизма 509C $\rightarrow$ T гена TGF $\beta$ 1; BB полиморфизма BsmI гена VDR (OR=4,9; 3,9; 4,4 соответственно). Генотипом риска остеопоротических переломов другой локализации являлся генотип AG полиморфизма A19G гена LEP (OR= 2,6).

**Ключевые слова:** генетический полиморфизм, взаимодействие генов, остеопороз, постменопауза

**MOLECULAR GENETIC TESTING OF OSTEOPOROSIS SUSCEPTIBILITY IN POSTMENOPAUSAL WOMEN IN MOSCOW**  
V.A. Myakotkin, M.Yu. Krylov, I.A. Guseva, E.V. Chetina, N.V. Toroptsova, O.A. Nikitinskaya, E.Yu. Samarkina, L.I. Benevolenskaya  
Research Institute of Rheumatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

**Contact:** Valery Andreyevich Myakotkin [epid@iramn.ru](mailto:epid@iramn.ru)

Polymorphisms of 21 genes involved in the processes of bone remodeling were studied on samples of 150 to 265 postmenopausal healthy women in a control group and those of 175 to 269 patients with osteoporosis (OP). In a Moscow sample of postmenopausal women, the genotypes of OP susceptibility were found to be the CT genotype of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene, the GG genotype of the leptin (LEP) gene, the XX genotype of the estrogen receptor  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) gene, the Ff genotype of the vitamin D receptor (VDR) gene, the HH genotype of the  $\alpha 1$  polypeptide chain of type II collagen gene and the GG genotype of the aromatase (CYP19) gene. The interaction of a number of genes to develop OP susceptibility was ascertained to be compliant. For example, the carriage of the CTxx genotypes of the LRP5/ER $\alpha$  genes, the CTGG genotypes of the LRP5/CBFA genes, the CCGA genotypes of the TGF $\beta$ 1/CYP19 genes, and the CCAA genotypes of the TGF $\beta$ 1/OPG genes increases a risk for OP by 7.7, 4.1, 6.2, and 2.7 times, respectively.

The genotypes increasing the risk of spinal osteoporotic fractures were AG of 163A/G polymorphism in the osteoprotegerin (OPG) gene, TT of 509C $\rightarrow$ T polymorphism in the TGF $\beta$ 1 gene, and BB of BsmI polymorphism in the VDR gene (OR = 4.9, 3.9, and 4.4, respectively). The genotype of a risk for osteoporotic fractures at other sites was AG of A19G polymorphism in the LEP gene (OR = 2.6).

**Key words:** genetic polymorphism, gene interaction, osteoporosis, postmenopause

Скелет – метаболический орган, обладающий способностью к постоянной регенерации в течение всей жизни, сбалансированно осуществляемой специализированными костными клетками – остеобластами и остеокластами. Остеокласты ответственны за резорбцию старой костной ткани, тогда как остеобласты строят новый костный матрикс с последующей его минерализацией [1]. Процесс ремоделирования костной ткани включает следующие этапы: активация, резорбция, реверсия, формирование и покой. Сущность стадии активации заключается в подготовке участка кости к резорбции, которая реализуется с вовлечением остеобластов, остеокластов, моноцитов, системных и местных гуморальных факторов. Стадия резорбции характеризуется разрушением старой костной ткани, осуществляемым остеокластами [2]. Остеопороз, вероятно, возникает в результате дисбаланса между процессами костной резорбции и костеобразования, следствием чего являются уменьшение минеральной плотности костной ткани (МПКТ) и нарушение ее микроархитектоники,

что приводит к возникновению спонтанных переломов костей при минимальных средовых воздействиях [3].

Многочисленными исследованиями, проведенными во многих научных центрах, было показано, что пик костной массы и скорость ее потери на 60–80% детерминированы генетическими факторами. Одновременно в этих же исследованиях было выявлено наличие значимых средовых факторов риска в отношении заболеваемости остеопорозом (ОП), что свидетельствует о мультифакторной природе этого заболевания [4].

Мультифакторная природа предрасположенности к остеопорозу предполагает наличие как минимум нескольких генов чувствительности, определенные менее благоприятные генотипические аллельные сочетания которых (компаунды) могут обуславливать разбалансированность процессов костного ремоделирования и существенное снижение нормы реакции костной ткани на неблагоприятные средовые факторы, в связи с чем у таких лиц имеется значительно большая вероятность заболеть ОП.

ОП проявляется в основном в пожилом и старческом возрасте, поэтому следует ожидать, что чувствительность к нему определяется «нормальными» (т. е. селективно-нейтральными) аллелями генов, которые не ограничивают репродукцию особи, вследствие чего не подпадают под воздействие элиминирующего отбора и достаточно широко распространены в популяции.

Вопросы идентификации генов, принимающих участие в формировании подверженности болезням с наследственным предрасположением, к которым относится и ОП, в медицинской генетике всегда были крайне важны вследствие высокой распространенности этих заболеваний в популяции и их большой социальной значимости.

В связи с вышесказанным для выявления генетических механизмов формирования чувствительности к ОП необходимо тестировать одновременно несколько функционально связанных между собой кандидатных генов, т. е. определенную их сеть. Результаты тестирования разработанного нами одного из возможных вариантов такой сети представлены в данной статье.

### Материал и методы

Критерии включения больных первичным ОП в исследование: женщины 50–65 лет в постменопаузе с показателями МПКТ  $\leq -2,5$  SD в соответствии с критериями ВОЗ: МПКТ  $L_1-L_{IV} \leq -2,5$  SD ( $<0,772$  г/см<sup>2</sup>) и/или МПКТ шейки бедра  $\leq -2,5$  SD ( $<0,572$  г/см<sup>2</sup>). МПКТ была изучена на денситометре Hologic QDR4500. SNP полиморфизмы генов определялись с помощью методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) и полиморфизмов длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ).

В качестве кандидатных генов чувствительности к ОП были изучены полиморфизмы 21 гена, в том числе: эстрогеновых рецепторов *ESR $\alpha$* , *ESR $\beta$* , цитохромов *CYR17* и *CYR19*,  $\alpha$ 1- и  $\alpha$ 2-полипептидных цепей коллагенов 1-го и 2-го типов

(*COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1*), лептина (*LEP*) и его рецептора (*LEPR*), интерлейкина 1 и его рецептора (*1B* и *1RN*), фактора некроза опухолей  $\alpha$  (*TNF $\alpha$* ), остеопротегерина и лиганда остеопротегерина (*OPG* и *OPGL*), кор-связывающего фактора A1 (*CBFA1*), трансформирующего фактора роста  $\beta$ 1 (*TGF $\beta$ 1*), белка 5, родственного белкам семейства рецепторов липопротеинов низкой плотности (*LRP5*), костного морфогенного белка 4 (*BMP4*), остеопонтина (*SPP1*), моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 (*MCP1*) и BsmI и FokI полиморфизмы гена рецептора витамина D (*VDR*), в той или иной степени функционально связанных между собой и принимающих участие в процессах костного ремоделирования.

Всего обследовано и протестировано по соответствующим полиморфизмам генов от 175 до 269 женщин в постменопаузе, больных ОП, и от 150 до 265 здоровых женщин в состоянии постменопаузы в качестве контроля. Результаты клинического обследования и изучения генетических маркеров больных ОП и здорового контроля внесены в соответствующие базы данных.

### Результаты

На основании проведенного молекулярно-генетического тестирования вышеуказанных генов генотипами чувствительности к ОП в московской выборке женщин в постменопаузе являются (табл. 1): генотип СТ гена белка 5, родственного семейству рецепторов липопротеинов низкой плотности (*LRP5*), генотип GG гена лептина (*LEP*), генотип XX гена эстрогенового рецептора  $\alpha$  (*ER $\alpha$* ), генотип Ff гена рецептора витамина D (*VDR*), генотип HH гена  $\alpha$ 1-полипептидной цепи коллагена 2-го типа и генотип GG гена ароматазы (*CYP19*).

Среди больных ОП (табл. 2) более низкие средние значения МПКТ позвоночника  $L_1-L_{IV}$  отмечались у носителей генотипов XX и Xx (0,704 и 0,707 г/см<sup>2</sup> соответственно) XbaI полиморфизма гена *ER $\alpha$*  и ff (0,696 г/см<sup>2</sup>) FokI полиморфизма гена *VDR*, а более высокие – у носителей генотипов xx (0,737 г/см<sup>2</sup>) и Ff (0,732 г/см<sup>2</sup>). Различия между генотипами XbaI полиморфизма статистически достоверны ( $p=0,008$  и  $p=0,023$ ), так же как и различия между генотипами по FokI полиморфизму ( $p=0,027$ ). У женщин в постменопаузе из здорового контроля значимых генотипических различий по МПКТ позвоночника не выявлено. В то же время среди женщин из здорового контроля выявлены достоверные различия между средними значениями МПКТ позвоночника ( $p=0,014$ ) и шейки бедра ( $p=0,023$ ) у лиц с генотипом GA по сравнению с обладательницами генотипа AA гена *CYP19*. Такая же закономерность выявлена и у больных ОП, однако данные статистически не достоверны, поэтому можно лишь констатировать наличие тренда в сторону снижения показателей МПКТ как позвоночника, так и шейки бедра у носителей генотипа GA.

Установлено, что женщины, больные постменопаузальным ОП, носители генотипа риска GG A19G полиморфизма гена *LEP* и генотипа СТ С(740)Т полиморфизма гена *LRP5*

Таблица 1

Особенности распределения генотипов кандидатных генов чувствительности у больных ОП и в контрольной выборке

Гены и полиморфизмы	Генотипы	Частота генотипов, %		OR + CI	p
		больные ОП	контроль		
<i>LRP5</i> C(740)T	CC	74,7	86,3	0,45 (0,25<OR<0,82) 2,1 (1,2<OR<3,8)	0,007 0,005
	CT	25,3	13,1		
	TT	0,0	0,6		
<i>LEP</i> A(19)G	GG	31,0	21,8	1,6 (0,95<OR<2,73)	0,06
	AG	50,8	54,7		
	AA	18,1	23,4		
<i>ER<math>\alpha</math></i> XbaI	XX	18,4	25,0	1,55 (1,0<OR<2,3)	0,023
	Xx	53,3	42,4		
	xx	28,2	32,6		
<i>VDR</i> FokI	FF	29,3	38,4	1,9 (1,2<OR<3,1)	0,005
	Ff	50,6	34,8		
	ff	20,1	26,8		
<i>COL2A1</i> HindIII	HH	47,4	36,1	1,6 (1,0<OR<2,5)	0,03
	Hh	51,4	63,3		
	hh	1,1	0,5		
<i>CYP19</i> G(Val180)A	GG	31,5	23,4	1,5 (0,99<OR<2,3)	0,046
	GA	51,2	48,5		
	AA	18,1	28,0		

Примечание. OR – Odds ratio (отношение преобладаний или отношение шансов); CI – доверительный интервал.

имели в среднем более низкие значения МПКТ шейки бедра по сравнению с больными – носителями генотипов AG, AA и CC, однако различия между средними достоверны только при 6% и 7% уровнях значимости, в связи с чем в отношении средних значений МПКТ с уверенностью можно констатировать только наличие определенного тренда в сторону уменьшения показателей МПКТ у лиц с генотипами риска по ОП. Среди женщин контрольной группы наличие такого тренда не выявлено.

В то же время среди женщин контрольной группы выявлены статистически достоверные различия ( $p=0,033$ ) по средним значениям МПКТ шейки бедра между носительницами генотипов XX (0,819 г/см<sup>2</sup>) и xx (0,859 г/см<sup>2</sup>); между обладательницами генотипов FF (0,822 г/см<sup>2</sup>); Ff (0,870 г/см<sup>2</sup>) и ff (0,835 г/см<sup>2</sup>) ( $p=0,005$  и  $p=0,047$  соответственно), тогда как у больных ОП эти различия были менее выражены и недостоверны.

Не выявлено статистически значимых генотипических различий по средним величинам МПКТ позвоночника и шейки бедра у больных ОП и в контрольной выборке здоровых женщин в постменопаузе по полиморфизмам C(740)T гена *LRP5* и HindIII гена *COL2A1*. Согласно классической мультифакторной модели наследственный компонент формируется вследствие взаимодействия ряда генов, каждый из которых в отдельности обладает незначительным эффектом, но их суммарная кумулятивная результирующая, наряду со средовыми факторами, обуславливает возникновение заболевания.

В связи с этим представляло интерес оценить на нашем материале эффект межгенного взаимодействия ряда изученных генов на формирование подверженности ОП и на вариабельность показателей МПКТ. Анализ эффекта взаимодействия сочетанных SNP генотипов на подверженность ОП представлен в табл. 3 и 4.

Статистически значимые сочетания генотипов выявлены для полиморфизмов генов *XbaI ERα/C(740)T LRP5*; *G(-2415)A CBFA/C(740)T LRP5*; *CYP19/C(-509)T TGFβ* и *C(-509)T TGFβ/A(163)G OPG*, частота встречаемости которых у больных ОП существенно отличалась от таковой среди женщин контрольной группы ( $\chi^2=16,6$ ,  $p=0,003$ ;  $\chi^2=13,3$ ,  $p=0,005$ ;  $\chi^2=66,7$ ,  $p<0,0001$  и  $\chi^2=29,3$ ,  $p=0,0001$  соответственно). Обращает на себя внимание, что основу этих компаундов составляют два гена: *LRP5* и *TGFβ*. Носительство сочетанного генотипа ххСТ генов *XbaI/LRP5* повышает риск возникновения ОП более чем в 7 раз ( $OR=7,7$ ;  $p=0,0002$ ; ДИ 2,1< $OR<33,3$ ). Примечательно, что по отдельности показатели отношения шансов ( $OR$ ) для носителей генотипа хх *XbaI* полиморфизма гена *ERα* составили 0,81, а для генотипа СТ гена *LRP5* – 2,1. При анализе сочетанных генотипов генов *CBFA/LRP5* среди больных ОП отмечалось накопление числа носителей генотипа AGCT (13,1%) по сравнению с женщинами контрольной группы (3,6%). Риск заболеть ОП в постменопаузальном периоде для женщин – носителей генотипа AGCT в 4 раза

превышал априорный ( $OR=4,1$ ;  $p=0,002$ ; ДИ 1,5< $OR<11,8$ ). Следует отметить, что по отдельности для носителей генотипа AG гена *CBFA* риск возникновения ОП составил 1,1, а для носителей генотипа СТ гена *LRP5* – 2,1. Следовательно, в плане формирования чувствительности к ОП эти гены взаимодействуют между собой кумулятивно, причем базовым генотипом является генотип СТ *LRP5*, определяющий усиление эффекта генотипов хх *XbaI* гена *ERα* и AG гена *CBFA*.

Аналогично вышеприведенным данным, среди больных ОП выявлено накопление генотипов GACC и AA2CC из 9 возможных компаундов генов *CYP19/TGFβ1*, носительство которых увеличивает риск возникновения ОП в 6 и 5,5 раза ( $OR$  GACC=6,2;  $p<0,000001$ ; ДИ 2,7< $OR<14,4$  и  $OR$  AACC=5,5;  $p=0,0005$ ; ДИ 1,9< $OR<17,0$  соответственно). В то же время наличие генотипов GATT и AATT снижает риск ОП для их обладателей в 2 и 5 раз (соответственно  $OR$  GATT=0,2;  $p=0,00015$ ; ДИ 0,09< $OR<0,5$  и  $OR$  AATT=0,2;  $p=0,003$ ; ДИ 0,06< $OR<0,6$ ). Что касается сочетанных генотипов генов *TGFβ/OPG*, то среди больных ОП отмечались более высокая частота встречаемости генотипа CCAA и более низкая частота носительства генотипа TТАА (34,3 и 6,1% против 16,0 и 30,9% в контроле соответственно). Риск возникновения ОП у обладателей генотипа CCAA превышал таковой для носителей других генотипов в 2,7 раза ( $OR=2,7$ ;  $p=0,005$ ; ДИ 1,26< $OR<6,0$ ). У носителей генотипа TТАА  $OR=0,14$  при  $p=0,0001$  и ДИ 0,05< $OR<0,40$ , т. е. у данных индивидуумов риск возникновения остеопороза снижен в 7 раз по сравнению с априорным.

Примечательно, что показатели отношения шансов для носителей генотипов GA и AA гена *CYP19*, генотипа AA гена *OPG* составляли 1,1; 0,53 и 0,9 соответственно, а для обладателей генотипов CC и TT гена *TGFβ* – 1,26 и 0,78, т. е. при взаимодействии этих генов отмечается отчетливый кумулятивный эффект в отношении как повышения чувствительности к ОП, так и усиления протективного действия

Таблица 2

Средние значения показателей МПКТ позвоночника и шейки бедра в зависимости от носительства генотипов чувствительности к ОП

Гены	Генотипы	МПКТ, г/см <sup>2</sup> (средние ± SD)			
		позвоночника		шейки бедра	
		больные ОП	контроль	больные ОП	контроль
<i>LRP5</i>	CC	0,719±0,08	0,996±0,11	0,621±0,08	0,839±0,08
	CT	0,725±0,10	0,984±0,07	0,595±0,08	0,927±0,10
	TT	0 человек	1 человек	0 человек	1 человек
<i>LEP</i>	GG	0,719±0,009	1,031±0,02	0,598±0,01	0,855±0,01
	AG	0,711±0,007	1,022±0,01	0,620±0,01	0,832±0,01
	AA	0,712±0,01	1,035±0,02	0,622±0,01	0,846±0,01
<i>ERα</i>	XX	0,704±0,01	0,991±0,012	0,623±0,01	0,819±0,01
	Xx	0,707±0,01	0,994±0,011	0,610±0,01	0,843±0,01
	xx	0,737±0,01	0,993±0,013	0,618±0,01	0,859±0,01
<i>VDR</i>	FF	0,713±0,01	0,969±0,01	0,605±0,01	0,822±0,01
	Ff	0,732±0,01	1,002±0,01	0,627±0,008	0,870±0,01
	ff	0,696±0,01	0,989±0,01	0,613±0,01	0,835±0,01
<i>COL2A1</i>	HH	0,719±0,01	1,000±0,01	0,613±0,01	0,856±0,01
	Hh	0,723±0,01	0,988±0,01	0,611±0,01	0,835±0,01
	hh	0,743±0,06	0,894±0,13	0,588±0,06	0,848±0,09
<i>CYP19</i>	GG	0,708±0,01	0,995±0,01	0,608±0,01	0,838±0,01
	GA	0,719±0,01	0,976±0,01	0,616±0,01	0,833±0,01
	AA	0,712±0,01	1,019±0,01	0,621±0,01	0,867±0,01

при носительстве соответствующих генотипов. При этом ведущим в компаунде *CYP19/TGFβ1*, так же как и в компаунде *TGFβ1/OPG*, является ген *TGFβ1*: наличие аллеля С этого гена в двойной дозе существенно усиливает эффект генотипов GA и GG гена *CYP19* и AA гена *OPG*, тогда как присутствие в двойной дозе аллеля Т значительно ослабляет эффект в отношении формирования предрасположенности к ОП генотипов чувствительности обоих генов.

Различия по частоте -163A/G *OPG*, -509C→Т *TGFβ1*, BsmI *VDR* генотипов (табл. 5) между больными ОП с наличием или отсутствием переломов позвоночника статистически значимы (p=0,002; p=0,054; p=0,025 соответственно). В то же время практически нет различий в распределении этих генотипов среди больных ОП без переломов по сравнению с контролем. Риск возникновения перелома позвоночника у больных ОП при наличии генотипа AG -163A/G полиморфизма гена *OPG* составил 6,3 (при ДИ 1,7<OR<24,7; p=0,001), а при носительстве генотипа GG – 7,9 (при ДИ 0,7<OR<80,2; p=0,02). Наличие в генотипе аллеля G повышает риск возникновения остеопоротического перелома позвоночника в 6,7 раза (OR=6,7, p=0,0004; ДИ 1,8<OR<23,9). С другой стороны, наличие генотипа AA снижает риск возникновения остеопоротического перелома позвоночника у больных ОП в 6,6 раза

(OR=0,15, ДИ 0,044<OR<0,54; p=0,0004). Следовательно, генотипы AG и GG -163A/G полиморфизма гена *OPG* являются маркерами повышенного риска возникновения остеопоротических переломов, в то же время эти полиморфизмы не являются маркерами предрасположенности к заболеваемости ОП. Среди носителей генотипа AG отмечались более низкие средние значения МПКТ позвоночника и шейки бедра по сравнению с носителями других генотипов, однако данные статистически не достоверны. Не выявлено связи между показателями МПКТ и возникновением переломов позвоночника. Можно лишь отметить тенденцию к наличию более низких средних показателей МПКТ во всех точках измерения у больных ОП с переломами по сравнению с больными без переломов, однако различия (за исключением точек Inter troch, p=0,04 и Ward, p=0,017) статистически не достоверны.

Риск возникновения перелома позвоночника у больных ОП при наличии генотипа TT -509C→Т полиморфизма гена *TGFβ1* превышал априорный в 4 раза (OR=3,96; p=0,018 при ДИ 1,0<OR<15,4). Примечательно, что носители генотипа риска TT имели достоверно более низкие средние значения МПКТ L<sub>1</sub>–L<sub>IV</sub> и шейки бедра как среди больных ОП, так и в контрольной группе. Риск возникновения перелома позвоночника у больных ОП при наличии генотипа BB BsmI

полиморфизма гена *VDR* составил 4,4 (p=0,007 при ДИ 1,25<OR<15,9). В то же время генотипы -509C→Т, -163A/G и BsmI полиморфизмов генов *TGFβ1*, *OPG* и *VDR* не являются маркерами чувствительности к ОП.

В отличие от переломов позвонков L<sub>1</sub>–L<sub>IV</sub>, склонность к возникновению остеопоротических переломов другой локализации не ассоциируется с возрастом, ростом, массой тела и индексом массы тела. Статистически значимая связь выявлена только с генотипами A19G полиморфизма гена *LEP*. Различия в частоте встречаемости A19G генотипов гена лептина среди больных ОП с переломами и без переломов статистически достоверны (p=0,014), носительство генотипов, в состав которых входит аллель G (AG и GG), увеличивает риск возникновения перелома в 2,6 раза (p=0,0036; ДИ 1,3<OR<5,4), а наличие гомозиготного генотипа AA во столько же раз снижает риск переломов (OR=0,38; p=0,0035; ДИ 0,18<OR<0,77).

### Обсуждение

Тестирование сети функционально связанных между собой кандидатных генов чувствительности позволило выявить ряд генов, принимающих участие в детерминации предрасположенности к ОП, вариабельности показателей МПКТ и склонности к остеопоротическим переломам. Генами чувствительности к ОП являются *ERα*, *VDR*, *LEP*, *COL2A1*, *CYP19* и *LRP5*. Однако их роль в формировании чувствительности к ОП не столь

Таблица 3

Оценка значимости влияния ассоциированных с ОП сочетанных генотипов (компаундов) генов *ERα (XbaI)/LRP5 (C740T)*, *CBFA G(-2415)T/LRP5 (C740T)*, *CYP19/TGFβ (C509T)*, *TGFβ (C509T)/OPG (A163G)* на подверженность ОП

Генотипы XbaI	СС		Генотипы LRP5 CT		TT	
	больные ОП	контроль	больные ОП	контроль	больные ОП	контроль
XX	16,8% (27)	18,3% (32)	1,9% (3)	3,4% (6)	0	0
Xx	37,9% (61)	45,7% (80)	11,8% (19)	8,0% (14)	0	0,6% (1)
xx	20,0% (32)	22,3% (39)	<b>11,8% (19)</b>	<b>1,7% (3)</b>	0	0

  

Генотипы CBFA	СС		Генотипы LRP5 CT		TT	
	больные ОП	контроль	больные ОП	контроль	больные ОП	контроль
GG	51,0% (74)	55,3% (93)	11,7% (17)	10,1% (17)	0	0,6% (1)
GA	20,0% (29)	26,2% (44)	<b>13,1% (19)</b>	<b>3,6% (6)</b>	0	0
AA	2,7% (4)	4,2% (7)	1,4% (2)	0	0	0

  

Генотипы CYP19	СС		Генотипы TGFβ (C509T) CT		TT	
	больные ОП	контроль	больные ОП	контроль	больные ОП	контроль
GG	5,4% (8)	4,7% (8)	17,7% (26)	11,8% (20)	2,7% (4)	8,9% (15)
GA	<b>25,8% (38)</b>	<b>5,3% (9)</b>	18,4% (27)	20,1% (34)	<b>5,4% (8)</b>	<b>20,7% (35)</b>
AA	<b>14,3% (21)</b>	<b>2,9% (5)</b>	7,5% (11)	13,0% (22)	<b>2,7% (4)</b>	<b>12,4% (21)</b>

  

Генотипы TGFβ (C509T)	AA		Генотипы OPG AG		GG	
	больные ОП	контроль	больные ОП	контроль	больные ОП	контроль
CC	<b>34,3% (34)</b>	<b>16,0% (13)</b>	7,1% (7)	2,5% (2)	1,0% (1)	0
CT	33,3% (33)	32,1% (26)	9,1% (9)	4,9% (4)	3,0% (3)	1,2% (1)
TT	<b>6,1% (6)</b>	<b>30,9% (25)</b>	6,1% (6)	9,9% (8)	0	2,5% (2)

Примечание. В скобках – число больных.

значима (показатели OR варьировали от 1,5 до 2,1), чего следовало ожидать в теории при соответствии наследования предрасположенности к остеопорозу мультифакторной модели.

В то же время выявлен отчетливый кумулятивный эффект в отношении генотипических компаундов сочетаний генов *LRP5/ERα*; *LRP5/CBFA1*; *TGFβ/CYP19*; *TGFβ/OPG*, что также следует из теоретических предсказаний мультифакторной модели [6].

Эстрогены играют важную роль в костном обмене, их недостаток приводит к потере костной массы. Эстрогены воздействуют на костную ткань посредством связывания со своими специфическими рецепторами *ERα* и *ERβ*, которые экспрессируются в остеобластах и остеокластах. Кроме того, действие эстрогенов на костный метаболизм может быть и опосредованным, так как они контролируют синтез многих местных факторов, регулирующих костный обмен; в частности, они ингибируют синтез лиганда остеопротегерина (ген *OPGL*) и индуцируют синтез остеопротегерина (ген *OPG*), являющихся элементами *RANK* – *NFκB* сигнального пути [7]. Белок *RANKL* (ген *OPGL*) является лигандом активатора ядерного фактора *RANK*, с которым связывается в клетках – предшественниках остеокластов. Такая индукция *NFκB* сигнального пути стимулирует дифференциацию, созревание и активацию клеток – предшественников остеокластов. Остеопротегерин (ген *OPG*) – растворимый член семейства *TNF*, секретируемый преостеобласт/стромальными клетками, блокирует взаимодействие *RANKL/RANK*, выступая в качестве ловушки (ложного рецептора) для *RANKL*. В процессе дифференциации *RANKL* действует как регулятор костной резорбции, тогда как *OPG* – как повышающий регулятор остеокластов, в связи с тем что довольно долго развитие остеокластов не стимулируется *RANKL*. Многие кальцитропные гормоны и цитокины индуцируют костную резорбцию путем ингибирования выработки *OPG* и стимулирования продукции *RANK*. В то же время эстрогены и *TGF-1* индуцируют выработку *OPG*, результатом которой является снижение костной резорбции. Показано, что продукция мРНК остеопротегерина снижается с возрастом. Мутации в гене *OPG* вызывают ювенильную болезнь Педжета – аутомно-рецессивное заболевание, характеризующееся остеопенией, переломами и деформациями скелета [8–10].

Превращение *C19*-стероидов в эстрогены катализируется ароматазой 19 (ген *CYP19*). Показано, что вызванная разного рода мутациями инактивация гена ароматазы ассоциируется с низкими значениями МПКТ. Выявлен протективный эффект ожирения на ОП и снижение МПКТ у женщин в постменопаузе, связанный, по-видимому, с тем, что жировая ткань служит основным периферическим субстратом для синтеза эстрогенов, способствующих пролиферации и дифференциации преадипоцитов [11, 12]. Лептин (ген *LEP*) супрессирует специ-

Таблица 4

Показатели отношения шансов (OR) возникновения ОП в зависимости от носительства сочетанных генотипов риска (компаундов)

Генотипы	Компаунды			
	<i>ERα/LRP5</i>	<i>CBFA1/LRP5</i>	<i>CYP19/TGFβ</i>	<i>OPG/TGFβ</i>
Генотипы	xxCT OR=7,7 xx OR=0,8	GGCT OR=4,1 GG OR=1,1	GACC OR=6,2 AACC OR=5,5 GA OR=1,1 AA OR=0,53	AACC OR=2,7 AA OR=0,9
	CT C(740)T <i>LRP5</i> OR=2,1		CC C(509)T <i>TGFβ</i> OR=1,26	

ческие биохимические реакции, которые способствуют дифференциации адипоцитов и накоплению липидов. Концентрация лептина в крови в 2–3 раза выше у женщин, чем у мужчин. Лептин напрямую влияет на остеогенез, связываясь с лептиновыми рецепторами на стволовых клетках костного мозга. В результате стволовые клетки костного мозга дифференцируются в остеобласты, а адипогенез ингибируется. В остеобластах и стволовых клетках костного мозга лептин стимулирует секрецию остеопротегерина, блокируя секрецию *RANKL*, в связи с чем тормозится дифференциация остеокластов из моноцитов. Следует отметить, что эстрогены взаимодействуют с лептином и могут подавлять его экспрессию. Помимо прямого позитивного эффекта на дифференциацию остеобластов, лептин может оказывать влияние на ремоделирование костной ткани, ингибируя экспрессию *OPGL* и стимулируя экспрессию *OPG*. При исследовании 130 молодых девушек с анорексией была выявлена повышенная распространенность переломов и низкая МПКТ [13].

Витамин D является одним из главных регулирующих факторов фосфорно-кальциевого обмена, продукции паратиреоидного гормона, костного ремоделирования (активируя сбалансированную продукцию остеобластов и остеокластов) и минерализацию костной ткани. Воздействие витамина D реализуется через специфические рецепторы (*VDR*), которые регулируют экспрессию соответствующих генов-мишеней. На настоящий момент в гене *VDR* выявлены *BsmI*, *ApaI*, *TaqI*, *FokI* ПДРФ, полиморфизм в промоторном регио-

Таблица 5

Генотипы чувствительности возникновения остеопоротических переломов

Гены и полиморфизмы	Генотипы	Больные ОП, %		Контроль, %
		с переломами	без переломов	
Остеопоротические переломы позвоночника L <sub>I</sub> –L <sub>IV</sub>				
<i>OPG</i> -163A/G	AA	37,5	79,8	79,5
	AG	50,0	16,8	17,0
	GG	12,5	3,4	3,4
<i>TGFβ1</i> -509C→T	CC	40,0	43,9	41,5
	CT	30,0	46,3	44,9
	TT	30,0	9,7	13,6
<i>VDR</i> BsmI	BB	47,4	16,9	19,1
	Bb	31,6	44,1	40,4
	bb	21,0	39,0	40,4
Остеопоротические переломы другой локализации				
<i>LEP</i> A19G	GG	33,1	28,3	21,8
	AG	54,9	45,3	54,7
	AA	12,0	26,4	23,4

не гена *VDR*, который имеет сайт связывания с транскрипционным фактором *Cdx-2* и длинный/короткий полиморфизм *FokI* обусловлен заменой Т-основания на С-основание в сайте инициации трансляции этого гена. Синтезируемый АСГ-вариантом (F-аллель) протеин на три аминокислоты короче, чем синтезируемый АТГ-вариантом (f-аллель). Показано, что белок с более короткой аминокислотной последовательностью в 1,7 раза активнее, чем белок с более длинной аминокислотной последовательностью. В результате проведенных исследований было установлено, что женщины с ff-генотипом имели более низкие значения МПКТ шейки бедра по сравнению с женщинами с FF-генотипом. Женщины – носительницы ff-генотипа имели более высокий уровень N-геплопептида коллагена 1-го типа (показателя интенсивности костной резорбции) по сравнению с носительницами FF-генотипа [14, 15].

Протеин 5, родственник белку рецептора липопротеинов низкой плотности, функционирует как трансмембранный корецептор для белков канонического Wnt-сигнального пути, который играет важную роль в дифференциации и пролиферации разного рода клеток, в том числе остеобластов и остеокластов. Мутации в различных областях ДНК-последовательности гена *LRP5* обуславливают возникновение аутосомно-рецессивного синдрома раннего псевдоглиомного остеопороза и аутосомно-доминантного синдрома увеличенной костной массы, что подтверждает значимую роль гена *LRP5* в регуляции процессов костного ремоделирования [16, 17].

Трансформирующий фактор роста TGF  $\beta$ 1 богато представлен в скелетной ткани, где он входит в состав костного матрикса в неактивной, латентной форме. Активация TGF  $\beta$ 1 происходит в процессе резорбции костной ткани остеокластами. Ген *TGF  $\beta$ 1* является двойным регулятором как процессов резорбции, так и костеобразования, воздействуя

на соответствующие последовательности генов-мишеней. Показано, что резорбционные качества остеокластов могут быть активированы TGF  $\beta$ 1 в бахромчатой зоне в кислой среде. С другой стороны, активация TGF  $\beta$ 1 снижает экспрессию RANK и повышает экспрессию OPG в остеобластах. Ослабление взаимодействия RANKL/RANK приводит к ингибции дифференциации и активации остеокластов. Помимо этого, TGF  $\beta$ 1 стимулирует пролиферацию и дифференциацию остеобластов, а также их хемотаксис, что ускоряет процессы образования новой костной ткани [18, 19].

Ген *CBFA1* (син. *RUNX*) является специфическим транскрипционным фактором, индуцирующим пролиферацию и дифференциацию остеобластов. Через соответствующие структуры в промоторной части генов остеокальцина, остеопротегерина,  $\alpha$ 1-полипептидной цепи коллагена 1-го типа и щелочной фосфатазы он индуцирует их экспрессию и усиливает костеобразование. С другой стороны, ген *CBFA1* отвечает за индукцию экспрессии гена *TCIRG1* (Т-клеточного иммунного регулятора 1), который, в свою очередь, воздействуя на ген *RANKL*, способствует усилению процессов резорбции костной ткани. Таким образом, ген *CBFA1* через усиление или ослабление экспрессии соответствующих генов при воздействии определенных средовых факторов может стимулировать усиление процессов костеобразования, тогда как при других средовых условиях – усиление процессов резорбции костной ткани [20, 21].

Таким образом, в результате проведенной работы выявлен ряд полиморфизмов изученных генов, являющихся маркерами чувствительности к остеопорозу, к снижению показателей минеральной плотности кости и остеопоротическим переломам, которые могут быть использованы в практической медицине для прогнозирования вероятности возникновения этих патологических состояний.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Frost H.M. Dynamics of bone remodeling. In: Frost H.M. (ed.). Bone Biodynamics. Boston, 1964;315–33.
2. Денисов-Никольский Ю.И., Докторов А.А., Матвейчук И.В. Структура и функция костной ткани в норме. Руководство по остеопорозу. М.: Бинум. Лаборатория знаний, 2003;56–76.
3. Ralston S.H., de Crombrughe B. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes Development* 2006;20:2492–506.
4. Janssens K., van Hul W. Molecular genetics of too much bone. *Hum Mol Genet* 2002;11:2385–93.
5. Wergedal J.E., Veskovic K., Minea H. et al. Patients with Van Buchem disease, an osteosclerotic genetic disease, have elevated bone formation markers, higher bone density, and greater derived polar moment of inertia than normal. *J Clin Endocrinol Metabol* 2003;88:5778–83.
6. Cavalli-Sforza L.L., Bodmer W.F. The Genetic of Human Population. San Francisco: W.H. Freeman and Co., 1971;508–634.
7. Deroo J.J., Korach R.S. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 2006;116:561–70.
8. Courtois G., Gilmore T.D. Mutations in the NF- $\kappa$ B signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* 2006;25:6831–43.
9. Kong Y.Y., Yoshida H., Sarosi I. et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397:315–23.
10. Kong Y.-Y., Feige U., Sarosi I. et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402:304–9.
11. Heine P.A., Taylor J.A., Iwamoto G.A. et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Nat Acad Sci USA* 2000;97:12729–34.
12. McTernan P.G., Anderson L., Anwar A. et al. Glucocorticoid regulation of P450 aromatase activity in human adipose tissue: gender and site differences. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1327–36.
13. Kennedy A., Gettys T.W., Watson P. et al. The metabolic significance of leptin in humans: gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity and energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1293–300.
14. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2001;22:477–501.
15. Garnero P., Munoz F., Borel O. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with the risk of fractures in postmenopausal women, independently of bone mineral density. The OFELY study. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4829–35.
16. Westendorf J.J., Kahler R.A., Schroeder T.M. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 2004;341:19–39.
17. Krishnan V., Bryant H.U., MacDougald O.A. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006;116:1202–9.
18. Massague J., Chen Y.G. Controlling TGF- $\beta$ 1 signaling. *Genes Dev* 2000;14:627–44.
19. Ten Dijke P., Hill C.S. New insights into TGF- $\alpha$ -Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004;29:265–73.
20. Vaughan T., Pasco J.A., Kotowicz M.A. et al. Alleles of RUNX2/CBFA1 gene are associated with differences in bone mineral density and risk of fracture. *J Bone Miner Res* 2002;17:1527–34.
21. Vaughan T., Reid D.M., Morrison N.A., Ralston S.H. RUNX2 alleles associated with BMD in Scottish women; interaction of RUNX2 alleles with menopausal status and body mass index. *Bone* 2004;34:1029–36.

Поступила 4.10.10