

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка значимости полиморфизмов генов *LRP5, BMP4, TGFβ1* при постменопаузальном остеопорозе

В.А. Мякоткин, М.Ю. Крылов, А.Ю. Казеева, К.А. Маслова, Н.В. Торопцова,
О.А. Никитинская, Л.И. Беневоленская
ГУ Институт ревматологии РАМН, Москва

Резюме

Выборку больных первичным постменопаузальным остеопорозом (ОП) составили 180 жен. (ср. возраст $67,5 \pm 7,8$ лет) и 118 жен. в постменопаузе без ОП и остеопении в качестве контроля (ср. возраст $63,8 \pm 8,1$ лет). Выявлено увеличение частоты носительства генотипа СТ гена *LRP5* ($OR = 2,2$; $p = 0,005$) и определенное накопление генотипа АА гена *BMP4* и генотипа СС гена *TGFβ1* среди больных ОП по сравнению с контролем, однако различия статистически не значимы. Среди больных ОП отмечается накопление компаундов СТСС (комбинация генов *LRP5* и *TGFβ1*) и СТАV (комбинация генов *LRP5* и *BMP4*), наличие которых повышает риск возникновения заболевания в 4 ($p = 0,0004$) и 2,5 ($p = 0,035$) раза соответственно. Показано наличие ассоциаций между *LRP5* и *TGFβ1* ($r = 0,26$; $p = 0,001$), между полиморфизмами этих генов и уровнем щелочной фосфатазы ($r = 0,22$; $p = 0,004$ и $r = 0,16$; $p = 0,04$ соответственно), между полиморфизмом гена *BMP4* и концентрацией остеопротегерина в сыворотке крови ($r = 0,2$; $p = 0,016$). Выявлены ассоциации между комбинированными генотипами *LRP5/TGFβ1* и МПКТ шейки бедра ($r = 0,20$; $p = 0,014$); *LRP5/BMP4* и МПКТ трохантера ($r = 0,16$; $p = 0,055$). Более низкие средние значения МПК шейки бедра и трохантера отмечены у носителей генотипов СТ гена *LRP5*, ТТ гена *TGFβ1* и VV гена *BMP4*.

Ключевые слова: *LRP5* – ген белка 5, родственного белкам семейства рецептора липопротеинов низкой плотности

BMP4 – ген костного морфогенетического белка 4

TGFβ1 – ген трансформирующего фактора роста бета 1

OPG – остеопротегерин

RANKL – лиганд рецептора активатора ядерного фактора каппа В

Компаунд – комбинация генотипов двух генов, локализованных на разных хромосомах

Остеопороз (ОП) является метаболическим заболеванием костей, основным звеном патогенеза которого является дисбаланс между интенсивностью процессов костеобразования и резорбции кости при постоянном физиологическом remodelировании костной ткани на протяжении жизни.

Одним из фенотипических проявлений изменения качества кости является показатель минеральной плотности костной ткани (МПКТ), определяемый с помощью денситометрии. Как показано в многочисленных семейных, близнецовых и популяционных исследованиях, по своему генезу ОП является мультифакториальным заболеванием, в формирование предрасположенности к которому существенный вклад вносят как средовые, так и генетические факторы, причем вклад последних, по разным оценкам, колеблется от 60% до 80%. Это послужило основанием для изучения полиморфизмов целого

ряда генов, принимающих участие в процессах костного ремоделирования и являющихся кандидатами на роль генов чувствительности к первичному постменопаузальному ОП.

К их числу относят гены белка 5, родственного белкам семейства рецептора липопротеинов низкой плотности (*LRP5*), костного морфогенетического белка 4 (*BMP4*) и трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (*TGF\beta 1*).

Предпосылками, заставившими обратить внимание на ген *LRP5* в качестве одного из генов ремоделирования костной ткани и кандидатного гена чувствительности к ОП, явились результаты изучения двух Менделирующих, достаточно редких заболеваний – рецессивно наследуемого синдрома псевдоглиомного ОП, клиническими проявлениями которого являются раннее начало тяжелого ОП со склонностью к переломам, сочетающегося с врожденной слепотой вследствие непрозрачности стекловидного тела [1], и аутосомно – доминантного синдрома высокой минеральной плотности кости (по последней классификации – асимптоматичный остеопетроз) [2]. Было показано, что причиной возникновения этих патологий являются мутации в гене *LRP5*, который, в свою очередь, служит рецептором *Wnt / \beta – catenin* сигнального пути.

В серии ранее проведенных исследований было показано, что *Wnt / \beta – catenin* сигнальный путь играет ключевую роль в пролиферации и дифференциации различного рода клеток, воздействуя на гены – мишени через различные сигнальные молекулы. Кроме того, сравнительно недавно была установлена важная роль *Wnt / \beta – catenin* сигнального пути в регуляции дифференциации и функции остеобластов, в формировании костного скелета и его прочности, достижении пика костной массы. Показано, что белок *LRP5* образует комплекс с Frizzled рецептором (также являющимся составным элементом *Wnt / \beta – catenin* сигнального пути), который через цитоплазматические компоненты передает *Wnt* сигнал на $\beta – catenin$, который аккумулируется и перемещается из цитоплазмы в ядро, в результате чего активируется транскрипция многих генов – мишеней *Wnt / \beta – catenin* сигнального пути, в число которых наряду с другими входят ген остеокальцина (*BGP*) и гены костных морфогенетических белков 2 и 4 (*BMP2* и *BMP 4*) [3].

Семейство костных морфогенетических белков относится к суперсемейству трансформирующих факторов роста β (*TGF \beta*). В настоящий момент идентифицировано 9 костных морфогенетических белков, все из них задействованы в процессах хряще – и костеобразования. *BMP4* является чрезвычайно важным регуляторным белком, который индуцирует развитие мезодермы, формирование зубов и конечностей, костеобразование и репарацию переломов. Показано, что *BMP4* снижает секрецию андростендиона и 17 – альфагидроксипрогестерона на 50%, но в 3 раза повышает продукцию прогес-

терона. Стероидогенные эффекты *BMP4* сходны с эффектами актина, другого члена суперсемейства трансформирующих факторов роста β . Помимо вышесказанного, белок *BMP4* является лигандом *TGF\beta 1* сигнального пути, через который он индуцирует транскрипцию гена *RUNX2* (родственный runt транскрипционный фактор 2), имеющего важное значение в регуляции процессов костного ремоделирования [4]. *TGF\beta 1* богато представлен в скелетной ткани, где он входит в состав костного матрикса. В ходе проведенных исследований было показано, что *TGF\beta 1* является двойным регулятором как процессов резорбции, так и костеобразования. Так, резорбционные свойства остеокластов активируются *TGF\beta 1* в кислой среде бахромчатой зоны. С другой стороны, активация *TGF\beta 1* снижает экспрессию *RANK* (активатор ядерного фактора *kB*) и повышает экспрессию остеопротегерина (*OPG*) в остеобластах.

Помимо этого, *TGF\beta 1* стимулирует пролиферацию и дифференциацию остеобластов, а также их хемотаксис, что ускоряет процессы образования новой костной ткани [5].

Белок *RANKL* (синоним – *OPGL*) является лигандом для *RANK*, экспрессируется на поверхности преостеобласт/стромальных клеток и связывается с *RANK* в клетках – предшественниках остеокластов. Такая индукция *NFkB* сигнального пути стимулирует дифференциацию, созревание и активацию клеток – предшественников остеокластов. *OPG* является растворимым членом семейства факторов некроза опухолей (*TNF*), секретируется преостеобласт/стромальными клетками, блокирует *RANKL/RANK* взаимодействие, действуя в качестве ловушки (ложного рецептора) для *RANKL*. В процессе дифференциации *RANKL* действует как индуктор костной резорбции, тогда как *OPG* – как регулятор, повышающий процессы костеобразования. Ослабление взаимодействия *RANKL/RANK* приводит к ингибции дифференциации и активации остеокластов [6].

Приведенные выше научные данные явились предпосылками для выбора в качестве кандидатных генов чувствительности к ОП генов *LRP5*, *BMP4*, *TGF\beta 1*, тестирование полиморфизмов которых было проведено в настоящем исследовании.

Материал и методы

В исследование были включены 180 жен. в естественной постменопаузе, русской национальности, проживающих в Москве и Московской области, в возрасте от 46 до 87 лет (ср. возраст $67,5 \pm 7,8$ лет) с диагностированным постменопаузальным ОП. В группу контроля вошли 118 жен. в постменопаузе, также проживающих в Москве и Московской области, в возрасте от 45 до 84 лет (ср. возраст $63,8 \pm 8,1$ года), согласно данным *DEXA* не имеющих ОП и остеопении.

Минеральную плотность костной ткани (МПКТ)

определяли методом двухэнергетической рентгеновской денситометрии (DEXA) на аппарате QDR 4500 (Hologic) в ГУ Институт ревматологии РАМН. МПКТ измеряли в области поясничных позвонков L₂-L₄, шейки бедра, трохантера, области Ward и определяли общий показатель (total BMD). Диагностику ОП осуществляли согласно рекомендациям ВОЗ (1994г.) по Т-критерию, т.е. в стандартных отклонениях (SD) от нормативных показателей пиковой костной массы (ПКМ) у здоровых женщин. Величина SD до -1 расценивалась как норма, от -1 до -2,5 SD – как остеопения, ниже -2,5 SD как ОП.

Геномная ДНК была экстрагирована из клеток венозной крови каждого пациента с использованием солевого метода и обработкой протеиназой К с последующей экстракцией NaCl. Полиморфизмы длины рестриктных фрагментов (ПДРФ) генов *LRP5* [C → T (N740N), рестриктаза VspI], *TGFβ1* [C – 509T, рестриктаза Bse21I] и *BMP4* [A – 152V, рестриктаза AsuI] были изучены с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и вертикального электрофореза в агарозном геле. Продукты амплификации проверяли в 1,5% агарозном геле со стандартным маркером молекулярного веса “100 bp DNA Ladder” (Сибэнзим).

Для получения более устойчивой оценки частот генотипов и компаундов изученных генных полиморфизмов в контрольную выборку постменопаузальных женщин (118 чел.) были добавлены аналогичные данные 57 девочек – подростков в возрасте 17 – 18 лет, протестированных по тем же полиморфизмам. До суммирования этих данных была проведена оценка на однородность этих выборок по частотам генотипов и компаундов. Статистически значимых различий по частотам ПДРФ генотипов среди постменопаузальных женщин и девочек – подростков не выявлено [*LRP5* C→T (N740N) $\chi^2 = 3,6$ d.f. = 2 p = 0,16; *BMP4* $\chi^2 = 2,6$ d.f. = 2 p = 0,29; *TGFβ1* C – 509T $\chi^2 = 3,47$ d.f. = 2 p = 0,18], что позволило объединить эти выборки. В то же время коэффициенты корреляции и генотипические средние по функциональным и биохимическим параметрам в контрольной группе рассчитывались только на основании данных, полученных при обследовании 118 постменопаузальных женщин с нормальными показателями МПКТ.

Результаты

Распределение генотипов изученных вероятных кандидатных генов чувствительности к ОП среди больных и в контрольной группе представлено в табл. 1. Статистически значимые различия по частоте встречаемости *LRP5* генотипов по сравнению с контролем выявлены у больных ОП ($\chi^2 = 6,5$; p = 0,011), среди которых отмечается повышение частоты гетерозиготного генотипа СТ и снижение частоты носительства гомозиготного генотипа СС. Наличие у индивида генотипов СТ или СС повышает вероятность заболевания в 2,2 раза или

Таблица 1
ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТИПОВ КАНДИДАТНЫХ ГЕНОВ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У БОЛЬНЫХ ОП И В КОНТРОЛЬНОЙ ВЫБОРКЕ

Гены	Гено-типы	Частота генотипов		OR + CI	p
		ОП	Контроль		
<i>LRP5</i>	СС	74,8%	86,3%	0,45 (0,25<OR<0,82)	0,007
	СТ	25,1%	13,1%	2,2 (1,2<OR<4,0)	
	ТТ	0,0%	0,6%		0,005
		N = 167	N = 175		
<i>TGFβ</i>	СС	45,9%	39,5%	1,3 (0,8<OR<2,1)	0,25
	СТ	43,4%	45,4%		0,24
	ТТ	10,7%	15,1%	0,67 (0,33<OR<1,38)	
		159	152		
<i>BMP4</i>	AA	35,9%	27,9%	1,4 (0,9<OR<2,3)	0,09
	AV	44,4%	54,1	0,68 (0,45<OR<1,0)	0,06
	VV	19,7%	18,0%		
		N = 223	N = 172		

OR – Odds ratio (отношение преобладаний или отношение шансов), CI – доверительный интервал

уменьшает шансы заболеть ОП в 2 раза соответственно. Распределение *BMP4* и *TGFβ* генотипов в целом среди больных ОП статистически значимо не отличалось от такового в контрольной группе постменопаузальных женщин без ОП (p = 0,14 и p = 0,36 соответственно). В то же время следует отметить определенное накопление генотипа AA гена *BMP4* и генотипа СС гена *TGFβ* среди больных ОП по сравнению с контролем, однако различия были статистически не значимы (OR = 1,4; p = 0,09 и OR = 1,3; p = 0,25 соответственно). Параллельно выявлен условно «протективный» эффект для носителей генотипа AV гена *BMP4* и генотипа ТТ гена *TGFβ*, наличие которых у индивидов снижает риск возникновения ОП в обоих случаях в 1,5 раза (оценки также не достигают 5% уровня значимости).

Учитывая тот факт, что протестированные нами гены функционально связаны между собой в процессах ремоделирования костной ткани, для оценки значимости их взаимодействия в формировании чувствительности к ОП были проанализированы частоты комбинированных генотипов (компаундов) *LRP5/TGFβ1*, *LRP5/BMP4* и *BMP4/TGFβ1* среди больных ОП и в контрольной группе постменопаузальных женщин (табл. 2).

Среди больных ОП значимое увеличение частоты носительства по сравнению с контролем отмечается только для компаундов СТСС (комбинация генов *LRP5* и *TGFβ1*) и СТАV (комбинация генов *LRP5* и *BMP4*), наличие которых повышает риск возникновения заболевания в 4 и 2,5 раза соответственно. Эти риски выше индивидуальных рисков для носителей генотипов СТ (OR = 2,2); СС (OR = 1,3) и AV (OR

Таблица 2
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КОМБИНИРОВАННЫХ
ГЕНОТИПОВ (КОМПАУНДОВ) КАНДИДАТНЫХ ГЕНОВ
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У БОЛЬНЫХ ОП
И В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ

Комбина- ции генов	Ком- паун- ды	Частоты компа- ундов		OR + CI	p
<i>LRP5/ TGFB1</i>	CTCC	17,9%	5,1%	4,1 (1,7<OR<10,1)	0,0004
	ССТТ	9,3%	13,3%	0,67 (0,31<OR<1,4)	p > 0,1
<i>LRP5/ BMP4</i>	CTAV	11,2%	4,8%	2,5 (0,98<OR<6,4)	0,035
	ССАУ	35,4%	49,1%	0,57 (0,36<OR<0,91)	0,01
<i>BMP4/ TGFB1</i>	ААСТ	16,8%	12,0%	1,5 (0,74<OR<3,0)	p > 0,1
	АУТТ	3,2%	8,0%	0,38 (0,17<OR<0,86)	0,07
		N = 151	N = 158		
		N = 155	N = 150		

= 0,68) в отдельности, т.е. можно констатировать наличие определенного кумулятивного эффекта при взаимодействии указанных выше генотипов генов *LRP5* и *TGFB1*, *LRP5* и *BMP4* в компаундах. Что касается компаундов – «протекторов» ССТТ и ССАУ, то отчетливого кумулятивного эффекта в отношении показателя OR не отмечается, в то время как в компаунде АУТТ генотипы АУ и ТТ взаимодействуют между собой как синергисты (OR = 0,38), что адекватно снижению вероятности заболевания ОП для носителей этого компаунда в 2,6 раза).

Представляло несомненный интерес проанализировать ассоциированность генотипов и компаундов изученных полиморфизмов с рядом лабораторных, антропометрических и биохимических показателей, оценить силу их влияния на варибельность этих параметров среди больных ОП и в контрольной группе. Результаты анализа представлены в табл. 3. Обращает на себя внимание, что среди изученных генов между собой ассоциированы только полиморфизмы генов *LRP5* и *TGFB1*, тогда как полиморфизм гена *BMP4* не ассоциируется с полиморфизмами ни первого, ни второго генов. Однако их генотипы в компаундах взаимодействуют между собой в определенной степени однонаправлено и зачастую взаимно усиливают корреляции с рядом изученных параметров. Так, ассоциации МПКТ шейки бедра по отдельности с *LRP5* и *TGFB1* генотипами мало значимы, тогда как при комбинации генотипов этих генов сила ассоциации увеличивается ($r = 0,2$) и превышает 5% уровень достоверности. Аналогичным образом эта закономерность присуща и корреляции между МПКТ трохантера и компаундами генов *LRP5* и *BMP4* (возрастание коэффициентов корреляции от $r = 0,09$ и $r = 0,12$ соответственно до 0,16 при p, лишь незначительно превышающем 5% уровень значимости).

В связи с выявленными корреляциями был проанализирован характер распределения усредненных

Таблица 3
ОЦЕНКА АССОЦИИРОВАННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМОВ
ИЗУЧЕННЫХ КАНДИДАТНЫХ ГЕНОВ К ОП С РЯДОМ
АНТРОПОМЕТРИЧЕСКИХ И ЛАБОРАТОРНЫХ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ

Гены и компаунды	Признаки и гены	Коэффициенты корреляции (r)	p
<i>LRP5</i>	Ген <i>TGFB1</i>	0,26	0,0014
	Ген <i>BMP4</i>	0,07	0,37
	Щелочная фосфатаза	0,22	0,004
	Рост	0,16	0,044
<i>TGFB1</i>	МПКТ шейки бедра	0,12	0,11
	МПКТ трохантера	0,09	0,27
<i>BMP4</i>	Ген <i>BMP4</i>	0,05	0,5
	Щелочная фосфатаза	0,16	0,04
	Рост	0,04	0,62
	МПКТ шейки бедра	0,13	0,11
<i>LRP5/ TGFB1</i>	Рост	0,22	0,001
	OPG (ng/l)	0,2	0,016
	МПКТ трохантера	0,12	0,12
<i>LRP5/ BMP4</i>	МПКТ шейки бедра	0,20	0,014
	Щелочная фосфатаза	0,20	0,013
<i>LRP5/ BMP4</i>	Рост	0,24	0,002
	RANKL (ng/L)	0,22	0,03
	МПКТ трохантера	0,16	0,055

абсолютных значений ассоциированных показателей с носительством того или иного генотипа или компаунда у больных ОП (табл. 4) и в контрольной группе постменопаузальных женщин (табл.5). Как видно из представленных в таблицах данных, результаты проведенного анализа не вполне однозначны. Так, среди больных ОП носители генотипа риска СТ гена *LRP5* имели в среднем более низкие значения МПКТ шейки бедра и трохантера нежели носители условно протективного генотипа СС, что соответствует общепринятой в настоящий момент патогенетической теории. В то же время содержание в сыворотке крови щелочной фосфатазы (биохимического маркера костеобразования) и RANKL (биохимического маркера интенсивности костной резорбции) выявляли противоположную закономерность и свидетельствовали о более интенсивных процессах костеобразования и менее выраженных – костной резорбции среди носителей генотипа риска СТ по сравнению с обладателями генотипа СС.

Аналогичным образом более низкие значения МПКТ шейки бедра и трохантера выявлены не среди носителей генотипов риска СС и АА соответственно генов *TGFB1* и *BMP4*, а среди носителей условно протективных генотипов ТТ и ВУ. Такого же рода закономерности выявляются и при анализе этих же показателей применительно к носительству соответствующих компаундов, что не вполне соответствует ожидаемым теоретическим представлениям. В целом, обладатели компаундов риска имели в

Таблица 4

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОТИПИЧЕСКИХ СРЕДНИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПОЛИМОРФИЗМАМИ КАНДИДАТНЫХ ГЕНОВ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У БОЛЬНЫХ ОП

Ассоциированные признаки	Средние значения показателя ± SD			
	Гены и их генотипы	Компаунды генотипов		
МПКТ шейки бедра (г/см ²)	<i>LRP5</i>	<i>TGFβ1</i>	<i>LRP5/TGFβ1</i>	
	CC –	CC –	CTCC –	
	0,621±0,08	0,617±0,09	0,612±0,08	
	CT –	CT –	CCCC –	
	0,596±0,08	0,626±0,06	0,624±0,09	
		TT –	CCTT –	
		0,555±0,07	0,558±0,06	
p	CC vs CT	CC vs TT	CTCC vs CCTT	
	p = 0,08	p = 0,01	p = 0,04	
		CT vs TT	CCCC vs CCTT	
		p = 0,002	p = 0,02	
МПКТ трохантера (г/см ²)	<i>LRP5</i>	<i>BMP4</i>	<i>LRP5/BMP4</i>	
	CC –	AA –	CTAV –	
	0,553±0,07	0,558±0,08	0,534±0,1	
	CT –	AV –	CCAV –	
	0,540±0,1	0,549±0,08	0,555±0,08	
		VV –	CCVV –	
		0,527±0,07	0,522±0,06	
p	Различия н / д	Различия н / д	Различия н / д	
	Концентрация сывороточной щелочной фосфатазы	<i>LRP5</i>	<i>TGFβ1</i>	<i>LRP5/TGFβ1</i>
		CC –	CC	CTCC –
174,7±57,2		-189,1±60,0	207,4±43,1	
CT –		CT –	CCCC –	
	201,8±57,2	165,5±48,2	183,9±67,9	
		TT –	CCTT –	
		164,6±61,6	164,1±69,8	
p	CC vs CT	CC vs CT	CTCC vs CCTT	
	p < 0,0000	p = 0,01	p = 0,02	
		<i>BMP4</i>	<i>LRP5/BMP4</i>	
		AA –	CTAV –	
		170,6±63,7	195,4±41,7	
		AV –	CCAV –	
		169,8±62,2	169,0±64,7	
		VV –	CTAA –	
		192,0±50,7	211,0±77,4	
		Различия н / д	Различия н / д	
Сывороточная концентрация OPGL (ng/L)	<i>LRP5</i>	<i>BMP4</i>	<i>LRP5/BMP4</i>	
	CC –	AA –	CTAV –	
	0,409±1,11	0,474±1,32	0,18±0,21	
	CT –	AV –	CCAV –	
	0,320±0,79	0,236±0,44	0,29±0,57	
		VV –	CCAA –	
		0,236±0,63	0,72±1,73	
p	Различия н / д	Различия н / д	Различия н / д	

среднем более высокие показатели МПКТ шейки бедра и трохантера нежели обладатели компаундов – протекторов. Примечательно, что в основном такого же рода закономерности присущи и носителям этих же генотипов и компаундов в контрольной группе постменопаузальных женщин без ОП.

Таблица 5

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОТИПИЧЕСКИХ СРЕДНИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ С ПОЛИМОРФИЗМАМИ КАНДИДАТНЫХ ГЕНОВ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ

Ассоциированные признаки	Средние значения показателя ± SD		
	Гены и их генотипы		Компаунды генотипов
	<i>LRP5</i>	<i>TGFβ1</i>	<i>LRP5/TGFβ1</i>
МПКТ шейки бедра	CC –	CC –	CTCC –
	±0,06	0,847±0,07	0,844±0,07
	CT –	CT –	CCCC –
	0,838±0,06	0,837±0,07	0,866±0,07
		TT –	CCTT –
		0,821±0,05	0,826±0,07
	<i>LRP5</i>	<i>BMP4</i>	<i>LRP5/BMP4</i>
МПКТ трохантера	CC –	AA –	CTAV –
	0,747±0,08	0,751±0,1	0,797±0,09
	CT –	AV –	CCAV –
	0,769±0,08	0,753±0,07	0,750±0,06
		VV –	CCVV –
		0,733±0,06	0,728±0,06
	<i>LRP5</i>	<i>TGFβ1</i>	<i>LRP5/TGFβ1</i>
Концентрация сывороточной щелочной фосфатазы	CC –	CC –	CTCC –
	177,8±88,1	175,5±105,4	184,0±106,1
	CT –	CT –	CCCC –
	153,0±85,0	183,4±77,7	184,0±106,1
		TT –	CCTT –
		176,4±74,3	163,2±65,5
		<i>BMP4</i>	<i>LRP5/BMP4</i>
		AA –	CTAV –
		188,4±52,5	170,9±103,1
		AV –	CCAV –
		168,8±102,8	170,9±103,1
		VV –	CCVV –
		196,2±84,5	196,2±84,4

Более того, более выраженная потеря минеральной плотности кости отмечается не среди носителей генотипов риска генов *LRP5*, *TGFβ1* и *BMP4*, а среди носителей генотипов – протекторов, хотя эта потеря достаточно однотипна среди обладателей разных генотипов (табл. 6).

Обсуждение

Следует отметить, что роль генов *LRP5*, *BMP4* и *TGFβ1* в формировании предрасположенности к ОП на настоящий момент малоизучена. В большей степени исследована взаимосвязь полиморфизмов этих генов с МПКТ в выборках здоровых лиц. Так, показана ассоциация полиморфизма A1330V (обуславливающего замену аланина на валин в положении 1330) гена *LRP5* с МПКТ и переломами [7]. Эти же авторы показали, что аддитивное взаимодействие между A1330V полиморфизмом *LRP5* гена и 1062V полиморфизмом гена *LRP6* увеличивает склонность к переломам. В нашем исследовании популяционные частоты генотипов изученных полиморфизмов генов *LRP5*, *BMP4* и *TGFβ1* существенно не отличаются от таковых в европеоидных популяциях [8]. В нашей выборке

Таблица 6
ОЦЕНКА ИЗМЕНЧИВОСТИ НЕКОТОРЫХ
ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ И ЛАБОРАТОРНЫХ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НОСИТЕЛЬСТВА
ГЕНОТИПОВ *LRP5*, *TGFβ1* И *BMP4* ГЕНОВ У БОЛЬНЫХ
ОП ПО СРАВНЕНИЮ С КОНТРОЛЕМ

При- знаки	Изменение средних генотипических показателей у больных по сравнению с контролем		
	Гены и генотипы		Компаунды ге- но- типов
	<i>LRP5</i>	<i>TGFβ1</i>	<i>LRP5/TGFβ1</i>
МПКТ шейки бедра	СС – на 26,2%	СС – на 27,1%	СТСС – на 27,5%
	СТ – на 29,0%	СТ – на 25,2%	СССС – на 27,9%
		ТТ – на 32,4%	ССТТ – на 32,4%
	<i>LRP5</i>	<i>BMP4</i>	<i>LRP5/BMP4</i>
МПКТ трохан- тера	СС – на 26,0%	АА – на 25,7%	СТАВ – на 33,0%
	СТ – на 29,8%	АВ – на 27,1%	ССАВ – на 26,0%
		ВВ – на 28,1%	ССВВ – на 39,5%
	<i>LRP5</i>	<i>TGFβ1</i>	<i>LRP5/TGFβ1</i>
Ще- лочная фос- фатаза сыво- ротки крови	СС – на 1,7%	СС – на 7,8%	СТСС – н / детект. (1)
	СТ – на 32,0%	↑	СССС – практи- чески идентичны
	↑	СТ – на 9,8%	ССТТ – активес- ки идентичны
		↓	
		ТТ – на 6,7%	
		<i>BMP4</i>	<i>LRP5/BMP4</i>
		АА – на 9,8%	СТАВ – н /детект. (2)
	АВ – прак. иден.	ССАВ – практи- чески идентичны	
	ВВ – на 2,0%	ССВВ –	

больных ОП полиморфизмы генов *LRP5* и *TGFβ1* практически не ассоциированы с переломами ($r = 0,05$ и $r = 0,02$ соответственно), тогда как полиморфизм гена *BMP4* в определенной мере определяет склонность к переломам ($r = 0,12$; $p = 0,07$). В то же время в компаундах составляющие их ПДРФ генотипы по отношению к МПКТ взаимодействуют между собой преимущественно аддитивно, т.е. в целом полученные нами данные не противоречат результатам, установленным на выборках европеоидных популяций.

С другой стороны, Z. Zhang с соавт. [9] обследовали 647 здоровых постменопаузальных китайок, которые были протестированы по полиморфизмам Q89R, N740N и A1330V *LRP5* гена. Авторы показали, что в их выборке Q89R и N740N полиморфизмы ассоциированы с МПКТ шейки бедра, тогда как корреляций A1330V полиморфизма с МПКТ не выявлено. Обращает на себя внимание тот факт, что частоты генотипов полиморфизма N740N разительно отличались как от наших данных, так и данных по европеоидным популяциям: в нашей выборке больных ОП и в контрольной группе доминирующим генотипом является СС, а минорным – ТТ, тогда как в китайской популяции, наоборот: доминантный генотип – ТТ (66,9%), а минорный – СС (2,0%). В китайской популяции лица с ТТ генотипом имели более высокие показатели МПКТ,

чем лица с генотипами СТ+СС, тогда как в наших выборках более высокие значения МПКТ имели лица – носители генотипа СС.

В недавно проведенных исследованиях было показано, что гены семейства *BMP* могут быть вовлечены в формирование подверженности к ОП. В частности, U. Styrkarsdottir с соавт. [10] была выявлена повышенная частота мутации, обуславливающей замену в 37 кодоне аминокислоты аланин на серин (Ser37Ala) в белке *BMP2*, среди больных ОП в исландской и датской выборках постменопаузальных женщин. Помимо этого было установлено, что замена аланина на валин в положении 152 костного морфогенетического белка 4 (ген *BMP4*) ассоциируется с низкой МПКТ, в связи с чем, по мнению авторов, этот полиморфизм может рассматриваться как маркер чувствительности к ОП [11].

В настоящий момент в гене *TGFβ1* идентифицированы полиморфизмы G-1639A; C-1348T; G-800A; C-509T; T29C; G74C; C788T; T241C и ряд других, локализованных в разных областях этого гена. F. McGuigan с соавт. [12] были изучены G-800A; C-509T; T29C; G74C; C788T полиморфизмы гена *TGFβ1* у 2975 британских женщин. Частота генотипов C-509T полиморфизма, по данным авторов, составила: СС – 51,8%; СТ – 39,9%; ТТ – 8,3%, что сопоставимо с генотипическими частотами этого полиморфизма в нашей выборке. Авторами не выявлено ассоциаций МПКТ различной локализации и биохимическими маркерами костного ремоделирования (резорбции и костеобразования) ни с одним из изученных полиморфизмов в отдельности. В то же время гаплотипический анализ показал наличие достоверных ассоциаций между носительством определенного гаплотипа с МПКТ шейки бедра и склонностью к возникновению переломов. Примечательно, что в состав гаплотипа риска входил аллель С С-509Т полиморфизма, повышенная частота гомозиготного носительства которого у больных ОП выявлена и в нашем исследовании. В. L. Langdahl с соавт. [13] на датской когорте здоровых женщин установили, что более высокие значения МПКТ шейки бедра ассоциированы с носительством ТТ генотипа, в то время как в нашем исследовании они присущи обладателям генотипа СС как среди больных ОП, так и здоровых лиц. Однако среди японских женщин, так же как и в нашей работе, более высокие значения МПКТ шейки бедра ассоциированы с носительством СС генотипа [14]. Интересно отметить, что концентрация белка *TGFβ1* зависит от дозы аллеля: у ТТ гомозигот он в два раза выше, чем у гетерозигот СТ, если в качестве референтного базового уровня взята концентрация белка у СС гомозигот [15].

Подобного рода расхождение свидетельствуют о популяционно – специфическом характере выявленных взаимосвязей и лишней раз подтверждают мультифакториальный генез ОП.

В нашем исследовании различия по усреднен-

ным генотипическим биохимическим показателям и МПКТ в большинстве случаев не достигают 5% уровня значимости, поэтому уверенно можно говорить только о выявленных тенденциях. Однако в совокупности полученные в нашей работе результаты позволяют сделать предварительное предположение, нуждающееся в дальнейшем изучении, о том, что МПКТ, по – видимому, является не

единственной и не исчерпывающей фенотипической характеристикой подверженности к ОП.

Кроме того, можно констатировать, что в изученной нами выборке из московской популяции постменопаузальных женщин гены костного ремоделирования *LRP5*, *BMP4* и *TGFβ1* принимают участие в формировании предрасположенности к ОП.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gong Y., Slee R.B., Fukai N. et al. LDL receptor-related protein 5 (*LRP5*) affects bone accrual and eye development. *Cell*, 2001, 107, 513-523.
2. Little R.D., Carulli J.P., Del Mastro R.G. et al. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am. J. Hum. Genet.*, 2002, 70, 11-19.
3. Krishan V., Bryant H.U., McDougald O.A. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *JCI*, 2006, 116, 1202 – 1209.
4. Canalis E., Economides A., Gazzeito E. Bone Morphogenetic Proteins, Their Antagonists, and the Skeleton. *Endocrine Reviews*, 2003, 24, 218 – 235.
5. Janssens K., ten Dijke P., Janssens S., Wim Van Hul. Transforming Growth Factor – β 1 to the bone. *Endocrine Reviews*, 2005, 26, 743 – 774.
6. Bezerra M.C., Carvalho J.F., Procopowitsch A.S., R.Pereira R.M. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2005, 38, 161 – 170.
7. van Meurs J.B., Rivadeneira F., Jhamai M. et al. Common genetic variation of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6 genes determines fracture risk in elderly white men. *J. Bone Miner. Res.*, 2006, 21, 141–150.
8. Zofkova I., Hill M., Zajickova K. Association of C/T Polymorphism in the *LRP5* Gene with circulating follicle stimulating hormone in Caucasian postmenopausal women. *Physiol. Res.*, 2007, 56, 735 – 739.
9. Zhang Z., Qin Y., He I. et al. Association of polymorphisms in low density receptor – related protein 5 gene with bone mineral density in postmenopausal Chinese women. *Acta Pharmacol. Sinica*, 2005, 26, 1111 – 1116.
10. Styrkarsdottir U., Cazier J.-B., Kong A. et al. Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to *BMP2*. *PLoS Biol.*, 2003, 1, E69.
11. Ramesh B.L., Wilson S.G., Dick I.M. et al. Bone mass effects of a *BMP4* gene polymorphism in postmenopausal women. *Bone*, 2005, 36, 555–561.
12. McGuidan F.A.E., Macdonald H.M., Bassiti A. et al. Large – scale population – based study shows no association between common polymorphisms of the *TCRB1* gene and BMD women. *J. Miner. Res.*, 2007, 22, 195 – 202.
13. Langdahl B.L., Carstens M., Stenkjaer L., Eriksen E.F. Polymorphisms in the transforming growth factor type 1 gene and osteoporosis. *Bone*, 2003, 32, 297 – 310.
14. Yamada Y., Miyauchi A., Takagi J. et al. Association of C–509 → T polymorphism, alone or in combination with the T869–C polymorphism, of the transforming growth factor – beta 1 gene with bone mineral density and genetic susceptibility to osteoporosis in Japanese women. *J. Mol. Med.*, 2001, 79, 149 – 156.
15. Grainger D.J., Heathcote K., Chiano M. et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type 1. *Hum. Mol. Genet.*, 1999, 8, 93 – 97.

Поступила 19.06.07

Abstract

V.A. Myakotkin, M.Y. Krylov, A.Y. Kaseeva, K.A. Maslova, N.V. Toroptsova, O.A. Nikitinskaya

Assessment of genes *LRP5*, *BMP4*, *TGFβ1* polymorphisms significance in postmenopausal osteoporosis

180 women with primary postmenopausal osteoporosis (OP) (mean age $67,5 \pm 7,8$ years) were included. 118 postmenopausal women without osteoporosis and osteopenia (mean age $63,8 \pm 8,1$ years) formed control group. Higher frequency of *LRP5* gene CT genotype was revealed in pts with OP in comparison with control (OR=2,2; p=0,005). Tendency to increase of gene *BMP4* AA genotype and gene *TGFβ* CC genotype was found in pts with OP in comparison with control. But the difference was not statistically significant. OP pts showed accumulation of CTCC (gene *LRP5* and *TGFβ1* combination) and CTAV (gene *LRP5* and *BMP4* combination) compounds increasing risk of the disease by a factor of 4 (p=0,0004) and 2,5 (p=0,035) respectively. Association was revealed between *LRP5* and *TGFβ1* (r=0,26; p=0,001), between polymorphisms of these genes and alkaline phosphatase level (r=0,22; p=0,004 and r=0,16; p=0,04 respectively), between gene *BMP4* polymorphisms and serum osteoprotegerin concentration (r=0,2; p=0,016). Combined *LRP5/TGFβ1* genotype was associated with femur neck BMD (r=0,20; p=0,014) and *LRP5/BMP4* – with trochanter BMD (r=0,16; p=0,055). Carriers of gene *LRP5* CT genotype, gene *TGFβ1* TT genotype and gene *BMP4* VV genotype had lower mean BMD values in femur neck and trochanter.

Key words: *polymorphism, LRP5, BMP4, TGFβ1, genes, postmenopausal osteoporosis*