

# Ассоциация полиморфизма T(861-20)C трансформирующего фактора роста (ТФР) $\beta 1$ с минеральной плотностью кости и экспрессией гена ТФР $\beta 1$ при постменопаузальном остеопорозе

Е.В. Четина, М.Ю. Крылов, Н.В. Демин, О.А. Никитинская, Е.А. Короткова, Н.В. Торопцова, К.А. Маслова, Л.И. Беневоленская, В.А. Мякоткин

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт ревматологии» РАМН, Москва

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

**Контакты:** Елена Васильевна Четина  
etchetina@mail.ru

**Contact:** Elena Vasilyevna Chetina  
etchetina@mail.ru

Поступила 10.03.2011

**Цель** – исследовать механизмы участия полиморфизма T(861-20)C гена трансформирующего фактора роста (ТФР)  $\beta 1$  в резорбции костной ткани при постменопаузальном остеопорозе (ОП).

**Материал и методы.** Проанализировано 158 ДНК женщин в постменопаузе, больных ОП, и 89 ДНК здоровых женщин сопоставимого возраста в полимеразной цепной реакции (ПЦР) в ассоциации с анализом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). Минеральную плотность костной ткани (МПКТ) оценивали посредством двухэнергетической рентгеновской адсорбциометрии. Активность щелочной фосфатазы и уровней кальция и фосфора в сыворотке определяли по стандартным биохимическим протоколам. Общую РНК выделяли из периферической крови 32 больных ОП и 39 здоровых доноров и использовали ее для исследования в ПЦР в режиме реального времени.

**Результаты.** Не обнаружено значительных различий в частоте отдельных аллелей и генотипов между группой больных ОП и контрольными донорами. Частота минорной аллели T составляла 0,27. Обнаружена значительная корреляция полиморфизма T(861-20)C гена ТФР  $\beta 1$  с низкой МПКТ позвоночника ( $r=0,18$ ;  $p=0,025$ ) у русских больных ОП. При введении поправки на возраст (Z-score) МПКТ у носителей генотипа CC оказалась значительно ниже, чем у носителей генотипов CT и TT. Это сопровождалось более низкими уровнями экспрессии гена ТФР  $\beta 1$  в периферической крови носителей CC-генотипа ( $n=10$ ) по сравнению с объединенной группой носителей двух других генотипов ( $n=22$ ) в группе больных ОП ( $p=0,03$ ). У здоровых женщин – носителей CC-генотипа ( $n=18$ ) – не наблюдалось изменения экспрессии гена ТФР  $\beta 1$  по сравнению с объединенными представителями двух других генотипов ( $n=21$ ). В целом в группе больных ОП наблюдали значительно более низкую экспрессию гена ТФР  $\beta 1$  по сравнению со здоровым контролем ( $p=0,04$ ).

**Заключение.** Ассоциация генотипа (861-20)CC гена ТФР  $\beta 1$  с пониженной МПКТ позвоночника у больных ОП сопровождается пониженной экспрессией гена ТФР  $\beta 1$ . Поэтому выявление полиморфизма T(861-20)C гена ТФР  $\beta 1$  может служить предиктором развития ОП, а у носителей генотипа (861-20)CC можно ожидать более тяжелой формы заболевания.

**Ключевые слова:** постменопаузальный остеопороз, минеральная плотность кости, однонуклеотидный полиморфизм, трансформирующий фактор роста  $\beta 1$ , экспрессия генов в крови

## ASSOCIATION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR (TGF) $\beta 1$ T(861-20)C POLYMORPHISM WITH BONE MINERAL DENSITY AND TGF $\beta 1$ GENE EXPRESSION IN POSTMENOPAUSAL OSTEOPOROSIS

E.V. Chetina, M.Yu. Krylov, N.V. Demin, O.A. Nikitinskaya, E.A. Korotkova, N.V. Toroptsova, K.A. Maslova, L.I. Benevolenskaya, V.A. Myakotkin

**Objective:** to study the mechanism for the involvement of TGF $\beta 1$  T(861-20)C in bone resorption in postmenopausal osteoporosis (OP).

**Material and methods.** DNA from 158 postmenopausal women and patients with OP and from 89 healthy age-matched women was examined by polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. Bone mineral density (BMD) was estimated by dual-energy X-ray absorptiometry. Standard biochemical protocols were used to detect alkaline phosphatase activity and calcium and phosphorus levels in serum. Total RNA was isolated from the peripheral blood of 32 patients with OP and 39 healthy donors and used for real-time PCR study.

**Results.** No significant differences were found in the frequency of individual alleles and genotypes between the OP group and control donors. The minor T allele frequency was 0.27. There was a significant correlation of TGF $\beta 1$  T(861-20)C polymorphism with low lumbar spine BMD ( $r=0.18$ ;  $p=0.025$ ) in Russian patients with OP. Age-adjusted (Z-score) BMD in CC genotype carriers turned to be significantly lower than that in CT and TT genotype carriers. This was accompanied by lower TGF $\beta 1$  gene expression in the peripheral blood of CC genotype carriers ( $n=10$ ) as compared to the combined group of carriers of two other genotypes ( $n=22$ ) in the OP group ( $p=0.03$ ). No changes in TGF $\beta 1$  gene expression were seen in healthy women who were CC genotype carriers ( $n=18$ ) as compared to the combined representatives of two other genotypes ( $n=21$ ). Overall, the OP group exhibited significantly lower TGF $\beta 1$  gene expression than the healthy controls ( $p=0.04$ ).

**Conclusion.** The association of TGF $\beta 1$  (861-20)CC genotype with lower lumbar spine BMD in patients with OP is attended by decreased TGF $\beta 1$  gene expression. Therefore, TGF $\beta 1$  T(861-20)C polymorphism may be a predictor for the development of OP and the more severe form of the disease may be expected in (861-20)CC genotype carriers.

**Key words:** postmenopausal osteoporosis, bone mineral density, single nucleotide polymorphism, transforming growth factor  $\beta 1$ , blood gene expression in blood

Остеопороз (ОП) — заболевание костной ткани, которое характеризуется ее низкой минеральной плотностью (МПКТ) и нарушением микроархитектуры. Это приводит к повышенной хрупкости костей и увеличивает риск переломов, которые у пожилых больных обычно происходят в телах позвонков, бедре и голени [1, 2]. Изменения костной ткани при ОП являются следствием дисбаланса скорости образования кости и ее резорбции.

Генетические факторы играют важную роль в патогенезе ОП [3]. В настоящее время имеются сведения о наследственном характере изменений МПКТ и идентифицирован ряд генов-кандидатов, которые ассоциируют с потерей костной ткани при ОП в различных популяциях [4]. Полиморфизмы генов трансформирующего фактора роста (ТФР)  $\beta 1$ , коллагена 1-го типа, рецептора витамина D, эстрогеновых рецепторов 1 и 2, морфогенетического белка 4 и белка, относящегося к рецептору липопротеина низкой плотности 5, влияющие на МПКТ при ОП, были ранее обнаружены у русских больных в периоде постменопаузы [5–10].

*ТФР  $\beta 1$*  считается одним из главных генов-кандидатов, ответственных за качество костной массы и риск переломов [11]. Этот белок продуцируется остеобластами и содержится в значительных количествах в матриксе кости. Он высвобождается в процессе резорбции кости и активируется при подкислении среды резорбирующими остеокластами [12, 13]. ТФР  $\beta 1$  участвует как в ремоделировании кости взрослых индивидов, так и в развитии скелета. Этот ростовой фактор необходим для пролиферации и дифференцировки, а также продукции матрикса остеобластами [14, 15]. Кроме того, ТФР  $\beta 1$  считается медиатором действия эстрогенов на костную ткань [16] при апоптозе остеокластов, что приводит к уменьшению резорбции кости [17]. В то же время пониженные концентрации ТФР  $\beta 1$  вследствие недостатка эстрогенов могут благоприятствовать развитию ОП у женщин в постменопаузе [18, 19].

Мутации гена *ТФР  $\beta 1$*  приводят к болезни Камюрати–Эндельмана (БКЭ), которая связана с усилением обменных процессов в кости и остеосклерозом в диафизах трубчатых костей. Недавние исследования показали, что при БКЭ слабая аффинность ингибиторного ассоциированного пептида к зрелому ТФР  $\beta 1$  вызывает активацию сигнального пути SMAD [20]. Напротив, недостаточная продукция ТФР  $\beta 1$  приводит к уменьшению массы костной ткани, что наблюдается у мышей с мутацией в гене *ТФР  $\beta 1$*  [21]. В опытах на животных показано, что уровни мРНК *ТФР  $\beta 1$*  в трабекулах статистически достоверно коррелируют с МПКТ. Это дополнительно свидетельствует в пользу утверждения о том, что масса кости регулируется количеством ТФР  $\beta 1$  [22, 23].

Несколько однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) гена *ТФР  $\beta 1$*  оказались ассоциированными с МПКТ [24]. Они расположены в промоторе гена *ТФР  $\beta 1$*  и потенциально могут влиять на сродство транскрипционных факторов [25]. Кроме того, ОНП гена *ТФР  $\beta 1$*  локализованы в экзонах, например в сигнальном пептиде, и могут обеспечивать внутриклеточный транспорт или эффективность экспорта предшественника ТФР  $\beta 1$ , если полярные аминокислоты заменяются на неполярные в его гидрофобном центре [26, 27]. Интронные полиморфизмы (полиморфизмы, расположенные в области интрона — участка ДНК, который является частью гена,

но не содержит информации о последовательности аминокислот белка) гена *ТФР  $\beta 1$*  могут приводить к криптическому сплайсингу (сплайсинг в сайте, где может наблюдаться интрон-экзонный сплайсинг, когда изменен обычный сайт сплайсинга) или влиять на стабильность РНК [25, 26].

Полиморфизм T(861-20)C гена *ТФР  $\beta 1$*  локализован в 5-м интроне [25, 28]. Показано, что этот ОНП связан с пониженной костной массой в нескольких европеоидных популяциях, однако он отсутствует у китайцев [24, 25, 28]. В то же время этот полиморфизм не влияет на показатели ультразвукового исследования кости. Это означает, что ОНП T(861-20)C гена *ТФР  $\beta 1$*  влияет в большей степени на МПКТ, чем на структуру кости [28]. Функциональное значение интронного полиморфизма T(861-20)C гена *ТФР  $\beta 1$*  в настоящее время неясно. Предполагалось, что этот полиморфизм может влиять на количество продуцируемого белка, хотя данный ОНП не локализован в сайте сплайсингового донора или акцептора (границы сплайсинга называются соответственно их расположению в интроне: левая граница, называемая донорной, находится на левом конце интрона, а правая граница — акцепторная — располагается на другом его конце) [25].

Одним из подходов к изучению биологической функции ОНП является измерение сывороточной концентрации белков, кодируемых соответствующим полиморфным геном. При исследовании близнецов оказалось, что генетические факторы ответственны за 54% сывороточного ТФР  $\beta 1$  [29]. Некоторые исследования показали значительную ассоциацию генотипов гена *ТФР  $\beta 1$*  с МПКТ и сывороточными уровнями ТФР  $\beta 1$  в случае T29C ОНП в популяции немецких доноров в постменопаузе, а также двух других полиморфизмов гена *ТФР  $\beta 1$*  (T29C и T869C) у здоровых японских женщин в постменопаузе [25, 30]. Между тем никакой корреляции полиморфизма T(-509)C, находящегося в промоторе гена *ТФР  $\beta 1$* , с МПКТ не было обнаружено у женщин-близнецов из Великобритании, хотя этот ОНП ассоциировался с сывороточными уровнями ТФР  $\beta 1$  [29, 31]. Кроме того, ассоциация полиморфизма T869C гена *ТФР  $\beta 1$*  с МПКТ и переломами в популяции доноров Австралии, находящихся в состоянии постменопаузы, не зависела от сывороточных уровней этого ростового фактора [32].

Недавние исследования указывают на возможность интракринального механизма действия ТФР  $\beta 1$  (действие цитокинов внутри клетки-продуцента, при котором происходит связывание цитокинов со специфическими внутриклеточными рецепторами) [20]. Так, мутации в гене *ТФР  $\beta 1$*  могут вызывать изменения секреции и внутриклеточной аккумуляции ТФР  $\beta 1$  с последующим изменением транскрипционного ответа. Кроме того, влияние ОНП гена *ТФР  $\beta 1$*  на его экспрессию недавно было показано при подавлении транскрипции ТФР  $\beta 1$  при связывании AP1 с (-509)C аллелью [33].

Исследования полиморфизмов, ассоциированных с МПКТ и экспрессией генов у больных ОП, немногочисленны. Одно полногеномное исследование клеток, подобных остеобластам, у двух пар монозиготных близнецов, больных ОП, дискордантных по МПКТ, и одной конкордантной пары с ОП показало несколько различающихся по экспрессии генов, которые потенциально уча-

ствуют в физиологических процессах костной ткани, а именно – интерлейкин 1 $\beta$  и колониестимулирующий фактор 1 [34]. Другое исследование постменопаузальных больных ОП Северной Испании выявило значительное снижение уровней экспрессии ароматазы – гена, ассоциированного с синтезом эстрогенов и связанного с увеличением риска переломов [35]. Поэтому мы предположили, что исследование экспрессии гена *TFR  $\beta$ 1* может служить средством выяснения молекулярного механизма ассоциации его полиморфизмов с изменениями МПКТ у больных ОП.

В данной работе мы показываем, что полиморфизм T(861-20)C гена *TFR  $\beta$ 1* ассоциирован с МПКТ в области позвоночника у русских больных ОП в постменопаузе. Кроме того, он также способен влиять на экспрессию гена *TFR  $\beta$ 1* в крови больных ОП. Пониженная экспрессия гена *TFR  $\beta$ 1* ассоциируется с более низкой МПКТ у носителей генотипа (861-20)CC, больных ОП, что может указывать на более высокий риск потери костной массы.

### Материал и методы

**Пациенты.** В исследование включены 247 неродственных женщин в периоде постменопаузы – пациенток поликлиники или проходивших лечение в ФГБУ «НИИР» РАМН в период между февралем 2002 г. и мартом 2007 г. Исследование включало 158 больных ОП. Больные с нарушениями, которые могут влиять на метаболизм кости, включая сахарный диабет 2-го типа, заболевания почек, ревматоидный артрит, заболевания щитовидной и паращитовидной желез, были исключены из этого исследования. 89 здоровых доноров сопоставимого возраста, не имеющих серьезных заболеваний, в том числе остеоартроза, не принимающих лекарства, влияющие на метаболизм кости или кальция, были приглашены из Москвы. Протокол был утвержден местным этическим комитетом, от всех участников получено информированное согласие.

Экспрессии генов исследовалась у 32 неродственных русских больных ОП в постменопаузе, посещавших поликлинику ФГБУ «НИИР» РАМН между ноябрем 2006 г. и мартом 2007 г. Средний возраст больных ОП составлял 66,1 $\pm$ 7,2 года (от 53 до 76 лет). 39 сопоставимых по возрасту доноров (средний возраст 61,0 $\pm$ 12,2 года – от 49 до 78 лет) использовали в качестве группы контроля.

**Измерение МПКТ.** МПКТ измеряли с использованием рентгеновской двухэнергетической адсорбциометрии (QDR-4500w, Hologic, США) в ФГБУ «НИИР» РАМН. Инструмент запрограммирован для измерения МПКТ в области позвоночника (L<sub>1</sub>–L<sub>4</sub>), головки бедра, большого и малого вертела и общего бедра (г/см<sup>2</sup>). Коэффициенты варьирования при денситометрии были <2%. Диагноз ОП основан на критериях, рекомендованных ВОЗ: T-критерий <-2,5 SD [1]. МПКТ выражали как Z-критерий (отношение действительной МПКТ к ожидаемому среднему значению в популяции, сопоставимой по возрасту). МПКТ L<sub>1</sub>–L<sub>4</sub> в контрольной группе составляла >80% от средней для молодых взрослых лиц.

**Генотипирование гена *TGF  $\beta$ 1*.** Кровь (5 мл) собирали в пробирки с ЭДТА. Геномную ДНК выделяли из клеток периферической крови методом высаливания [36]. Для анализа полиморфизма длины рестриционных фрагментов (ПДФ) гена *TFR  $\beta$ 1* использовали сайт рестрикции BstFNI [25]. Для амплификации фрагмента размером

240 н.п. были использованы последовательности праймеров: прямой праймер 5'-ATG GTG GTA GCC CCT CCC T-3' и обратный праймер 5'-GCA TCT CGT AGC CCG GTG G-3'. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе MiniCycler (PTC-150, MJ Research Inc., США) в общем объеме 25  $\mu$ l, содержащем 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 мМ Tris HCl (pH 8,8), 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ М каждого dNTP (dATP, dCTP, dGTP и dTTP), 0,2  $\mu$ М каждого праймера, 1,2 ед. Taq DNA полимеразы и 100 нг геномной ДНК. 35 циклов ПЦР включали денатурацию (94 °C, 1 мин), отжиг (62 °C, 1 мин) и синтез (72 °C, 5 мин). Продукт амплификации переваривали эндонуклеазой BstFNI (Сибэнзим, Новосибирск, Россия). Рестриционные фрагменты 202 н.п. и 38 н.п. выявляли, когда сайт рестрикции присутствовал.

**Биохимические маркеры.** Образцы крови собирали утром после 8 ч голодания. Сывороточные концентрации кальция (ммоль/л), фосфора (ммоль/л) и активность щелочной фосфатазы (Ед/л) измеряли, используя стандартные фотометрические методы в соответствии с рекомендациями производителя (DiaSys Diagnostic Systems GmbH&Co, Холзгейм, Германия).

**Выделение РНК, реакция обратной транскрипции (ОТ) и количественная ПЦР в реальном времени.** РНК выделяли из свежей крови и проводили реакцию обратной транскрипции, как описано ранее [37]. Экспрессию гена *TFR  $\beta$ 1* посредством количественной ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием набора TaqMan (Hs9999918\_m1; Applied Biosystems Int., США), как описано ранее [37].  $\beta$ -Актин использовали в качестве эндогенного контроля.

**Статистический анализ.** Количественные данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Различия в демографических данных, экспрессию генов и МПКТ между группами больных ОП и донорами и после стратификации в соответствии с генотипами анализировали с использованием t-теста Манна–Уитни. Различия в распределении частоты генотипов между этими группами сравнивали с помощью  $\chi^2$ -теста Пирсона. Различия по антропометрическим данным и МПКТ между генотипами оценивали путем анализа вариантов (ANOVA). Статистически значимым считали  $p < 0,05$ .

### Результаты

**Характеристика пациентов.** В табл. 1 представлены данные о 158 больных ОП и 89 здоровых донорах, которые принимали участие в исследовании. Значительных различий по возрасту, содержанию фосфора в сыворотке и активности щелочной фосфатазы между больными ОП и донорами не наблюдалось. Между тем больные ОП имели значительно более высокие уровни кальция в сыворотке, меньшие массу тела и индекс массы тела (ИМТ), а также более низкие значения МПКТ в области позвоночника, отделах бедра и общей МПКТ по сравнению со здоровыми донорами.

**Распределение аллелей и генотипов гена *TFR  $\beta$ 1*.** Результаты генотипирования полиморфизма T(861-20)C гена *TFR  $\beta$ 1* больных ОП и доноров представлены в табл. 2. Частоты генотипов для исследуемого полиморфизма в обеих группах соответствовали распределению Харди–Вайнберга. Не наблюдалось статистически достоверных различий по частоте распределения аллелей между больными ОП и донорами: 69,0% больных ОП и 72,9% до-

**Таблица 1** Сравнение антропометрических данных, минеральной плотности костной ткани (МПКТ) и кальциево-фосфорного обмена в сыворотке в группах здоровых и больных ОП русских женщин (M ± SD)

Признаки	Здоровые (n=89)	Больные ОП (n=158)	p
Возраст, годы	65,6±6,9	67,0±8,6	0,33
Масса тела, кг	82,3±13,9	63,8±11,0	<0,001
Рост, см	159,6±12,1	156,4±7,4	0,016
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	31,7±5,5	25,8±3,9	<0,001
МПКТ, г/см <sup>2</sup>			
позвоночника	1,027±0,08	0,724±0,07	<0,001
шейки бедра	0,832±0,06	0,616±0,07	<0,001
большого вертела	0,746±0,07	0,556±0,07	<0,001
бедра (общая)	1,015±0,09	0,751±0,11	<0,001
Кальций, ммоль/л	2,34±0,12	2,41±0,14	<0,001
Фосфор, ммоль/л	1,12±0,17	1,17±0,86	0,59
Щелочная фосфатаза, У/л	176,5±84,0	174,9±52,0	0,90

норов имели по крайней мере одну аллель С, поэтому в популяции здоровых русских частота аллели С была наиболее высока, как и в популяциях Дании и Канады (74 и 53% соответственно) [25, 38]. Кроме того, генотип СС среди русских доноров обнаружен у 50% индивидов, что также близко к значению этого параметра в популяции Дании (50%) [25]. Поэтому распределение генотипов полиморфизма T(861-20)C гена *TGF β1* сходно в популяциях России и Дании. Редкий генотип ТТ найден у 5,1% русских больных ОП и у 4,5% доноров.

**Влияние генотипов гена *TGF β1* на МПКТ.** В наших исследованиях отмечена положительная корреляция между полиморфизмом T(861-20)C гена *TGF β1* и МПКТ позвоночника ( $r=0,18$ ;  $p=0,025$ ) у больных ОП (см. табл. 2). После учета возраста (Z-критерий) МПКТ у носителей генотипа (861-20)СС оказалась значительно ни-

же, чем в случае других генотипов. Уменьшение средней МПКТ позвоночника у носителей генотипа ТТ по сравнению с носителями генотипов СТ и СС составляло 4,0 и 7,0 соответственно.

Между тем не наблюдалось значительной разницы МПКТ отделов бедра между носителями генотипа СС и других генотипов в группе больных ОП.

**Влияние генотипов гена *TGF β1* на антропометрические и биохимические маркеры.** Мы не обнаружили значительных различий по ИМТ, росту, массе тела, возрасту, а также по концентрации кальция и фосфора в сыворотке и активности щелочной фосфатазы у больных ОП с различными генотипами (см. табл. 2). Напротив, здоровые носители генотипа СС имели значительно более низкие уровни активности щелочной фосфатазы в сыворотке, по сравнению с носителями генотипа СТ.

**Таблица 2** Антропометрические данные, МПКТ и биохимические маркеры пациентов с различными генотипами полиморфизма T(861-20)C гена *TGF β1* в группах здоровых и больных ОП русских женщин (M±SD)

Показатель	Здоровые (n=89)			Больные ОП (n=158)		
	СС	СТ	ТТ	СС	СТ	ТТ
Число пациентов, n (%)	45 (50,6)	40 (44,9)	4 (4,5)	68 (43,0)	82 (51,9)	8 (5,1)
Возраст, годы	66,6±6,2	66,8±7,3	63,4±6,5	67,2±8,6	66,8±8,7	70,0±6,5
Масса тела, кг	84,4±16,6	80,6±12,5	88,5±8,7	64,2±11,5	63,4±10,8	64,4±6,4
Рост, см	157,6±16,8	161,2± 6,3	164,5±6,4	155,8±8,7	157,1±6,0	157,0±6,4
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	33,0±6,1	30,5±4,5	33,2±0,7	26,1±4,5	25,5±3,5	26,0±0,7
МПКТ L <sub>1</sub> -L <sub>4</sub> , г/см <sup>2</sup>	1,025±0,073	1,031±0,096	1,012±0,073	0,707±0,075	0,735±0,076	0,756±0,012
Z-критерий L <sub>1</sub> -L <sub>4</sub> (p=0,037)	1,606±0,953	1,653±1,115	1,295±0,598	-1,25±0,911 (p=0,05)	-0,950±0,840* (p=0,05)	-0,368±1,423*
МПКТ шейки бедра, г/см <sup>2</sup>	0,834±0,068	0,831±0,064	0,827±0,044	0,640±0,072	0,611±0,087	0,623±0,055
Z-критерий шейки бедра	1,411±0,726	1,389±0,629	1,232±0,430	-0,517±0,718	-0,525±0,809	-0,232±0,496
МПКТ большого вертела, г/см <sup>2</sup>	0,749±0,063	0,752±0,074	0,749±0,063	0,556±0,079	0,555±0,079	0,574±0,027
Z-критерий большого вертела	1,496±0,971	1,640±0,876	1,460±0,449	-0,315±0,872	-0,327±0,821	0,064±0,254
МПКТ бедренной кости (общая), г/см <sup>2</sup>	1,018±0,095	1,011±0,097	1,028±0,066	0,754±0,105	0,746±0,103	0,767±0,041
Z-критерий бедренной кости	1,715±0,804	1,676±0,776	1,782±0,659	-0,273±0,969	-0,264±0,826	0,094±0,378
Кальций, ммоль/л	2,33±0,14	2,34±0,10	2,38±0,16	2,41±0,14	2,40±0,15	2,45±0,05
Фосфор, ммоль/л	1,13±0,19	1,11±0,16	1,11±0,14	1,19±0,90	1,16±0,85	1,07±0,13
Щелочная фосфатаза, У/л	151,8±62,7	197,3±100,0* (p=0,036)	205,3±12,0	182,3±50,4	167,2±53,3	174,8±52,2
Частота аллелей:						
Т		0,271			0,274	
С		0,729			0,726	

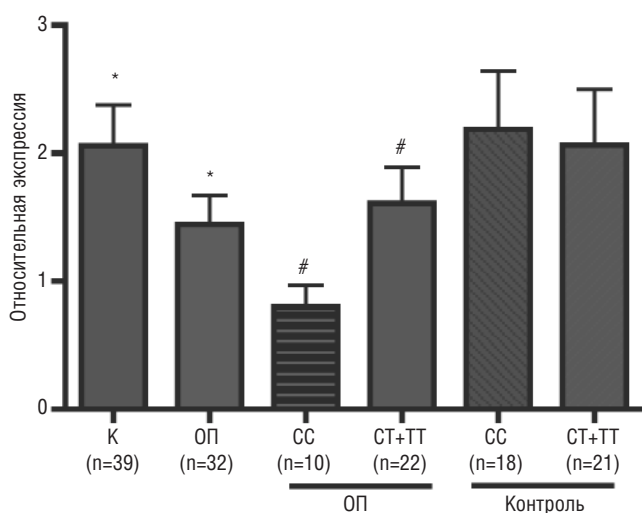


**Влияние генотипов *TFR β1* на экспрессию гена.** Экспрессию гена *TFR β1* определяли в образцах РНК, выделенной из крови 32 больных ОП и 39 здоровых доноров. Эти исследования показали значительно более низкие уровни экспрессии гена *TFR β1* ( $p=0,04$ ) у больных ОП по сравнению с донорами (см. рисунок). Поскольку генотип ТТ, ассоциируемый с более высокой МПКТ, встречался редко как у исследованных больных ОП, так и в контрольной группе, для последующих расчетов мы разделили всех индивидов на две подгруппы в зависимости от присутствия или отсутствия аллели Т. В группах больных ОП носители аллели Т (или генотипов ТТ и СТ) имели статистически достоверно более высокие уровни экспрессии гена *TFR β1* по сравнению с носителями генотипа СС ( $p=0,03$ ). Вместе с тем не наблюдалось различий в экспрессии гена *TFR β1* у носителей разных генотипов в контрольной группе.

### Обсуждение

Костная ткань человека содержит высокие концентрации *TFR β1*. Значительные количества *TFR β1* продуцируются остеобластами, которые ответственны за уровни этого ростового фактора в сыворотке, а секреция его другими клетками сравнительно невелика [39]. Кроме того, считается, что концентрация маркеров кости является отражением общей скорости обмена кости, поскольку она обратно пропорциональна скорости потери костной ткани [40, 41]. Поэтому повышенные уровни *TFR β1* могут потенциально положительно влиять на массу кости, уменьшая ее резорбцию [25]. В этом отношении значительно более низкая экспрессия гена *TFR β1* в крови русских больных ОП по сравнению с сопоставимыми по возрасту донорами, которая наблюдалась в данном исследовании, может указывать на снижение продукции *TFR β1*, обусловленное заболеванием.

Оценка биологической значимости полиморфизмов генов, ассоциированных с МПКТ, у больных ОП важна, поскольку позволяет понять взаимоотношения геномной структуры и функции. В данном исследовании



Экспрессия гена *TFR β1* в крови больных остеопорозом (ОП) и здоровых лиц контрольной группы (К), а также носителей генотипов СС и СТ + ТТ полиморфизма Т(861-20)С гена *TFR β1* в обеих выборках. Статистически значимые различия обозначены символами \* (между ОП и К) и # (между СС и СТ + ТТ)

выявлено, что полиморфизм Т(861-20)С гена *TFR β1* коррелирует с МПКТ у русских больных ОП в постменопаузе. При этом генотип (861-20)СС гена *TFR β1* ассоциировался с пониженной МПКТ позвоночника в группе больных ОП. Аналогичная ассоциация ранее обнаружена у больных ОП в Дании, где генотип (861-20)ТТ ассоциировался с повышенной массой костной ткани и имел протективное значение в отношении переломов. При этом носители генотипа (861-20)ТТ имели более высокую МПКТ позвоночника и отделов бедра по сравнению с носителями других комбинаций генотипов [25]. Кроме того, в группе женщин-близнецов из Великобритании генотип (861-20)СС также ассоциировался с понижением костной массы в области шейки бедра, но не позвоночника [28]. Поэтому наличие генотипа (861-20)СС гена *TFR β1* может указывать на риск развития ОП у его носителей.

В наших исследованиях экспрессии гена *TFR β1* у больных ОП и доноров мы использовали образцы периферической крови, поскольку они более удобны для исследования, чем образцы костной ткани. Кроме того, недавно отмечалось, что Т-лимфоциты и их продукты являются главными регуляторами формирования, продолжительности жизни и активности остеобластов и остеокластов. Эти клетки также связывают с этиологией постменопаузального ОП, а также потерей костной ткани, ассоциированной с эндокринными нарушениями [42, 43]. Более того, недавно на основании полногеномного исследования экспрессии генов *in vivo* в когорте из США отмечалось значение В-лимфоцитов в этиологии ОП [44].

В наших исследованиях обнаружена значительно более низкая экспрессия гена *TFR β1* у носителей генотипа (861-20)СС по сравнению с носителями аллели Т у больных ОП. Более того, это ассоциировалось с пониженной МПКТ у носителей генотипа (861-20)СС, больных ОП. Поэтому пониженная экспрессия гена *TFR β1* в крови больных ОП потенциально может быть связана с пониженной концентрацией этого ростового фактора в костной ткани. Это подтверждается исследованиями, которые показали снижение концентрации *TFR β1* и его мРНК в кости при недостатке эстрогенов у животных, тогда как сам недостаток эстрогенов ассоциировался с потерей костной ткани как при овариэктомии, так и при постменопаузальном ОП [23, 30, 31, 45, 46]. Следовательно, будучи индикатором развития ОП, генотип (861-20)СС гена *TFR β1* может также указывать на более тяжелую форму заболевания у его носителей. Поэтому наши результаты позволяют предположить, что полиморфизм Т(861-20)С гена *TFR β1* может быть использован для выявления лиц группы риска в отношении развития ОП.

В целом, наши результаты выявили ассоциацию генотипа (861-20)СС гена *TFR β1* с пониженной МПКТ позвоночника у русских больных ОП в постменопаузе. Это сопровождается значительно более низкой экспрессией гена *TFR β1* в крови у носителей генотипа (861-20)СС по сравнению с носителями аллели Т у больных ОП. Поэтому выявление полиморфизма Т(861-20)С гена *TFR β1* может служить предиктором развития ОП, а у носителей генотипа (861-20)СС можно ожидать более тяжелой формы заболевания.

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

## ЛИТЕРАТУРА

- World Health Organization Study Group. Assessment of fracture risk and its application for screening for postmenopausal osteoporosis. Geneva: WHO, 1994.
- Colon-Emeric C.S., Saag K.G. Osteoporotic fractures in older adults. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006;20:695–706.
- Patel M.S., Rubin L.A., Cole D.E. Genetic determinants of peak bone mass. In: *The osteoporosis Primer*. Ed. by J.E. Henderson, D. Goltzman. Cambridge: Cambridge University Press, 2000;131–46.
- Kung A.W., Huang Q.Y. Genetic and environmental determinants of osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007;7:26–32.
- Heller H.A., Salzano F.M., Barrantes R. et al. Intra- and intercontinental molecular variability of an Alu insertion in the 3' untranslated region of the LDLR gene. *Hum Biol* 2004;76:591–604.
- Крылов М.Ю., Короткова Т.А., Мякоткин В.А., Беневоленская Л.И. Аллельные полиморфизмы щелочной фосфатазы, растворимой кислой фосфатазы и витамин Д-связывающего белка при постменопаузальном остеопорозе. *Тер арх* 2004;5:61–6.
- Тагиева А.Н., Сметник М.З., Сухих В.П., Крылов М.Ю. Функциональная роль полиморфизмов генов рецептора витамина Д, эстрогенового рецептора (ER) цепи альфа 1 коллагена I типа (COL1A1) при постменопаузальном остеопорозе. *Мед ген* 2005;4:90–5.
- Battila J., Fagundes N.J., Heller A.H. et al. Alu insertion polymorphisms in Native Americans and related Asian populations. *Ann Hum Biol* 2006;33:142–60.
- Мякоткин В.А., Крылов М.Ю., Казеева А.К. и др. Роль полиморфизмов генов LRP5, VMP4 и TGF1 при постменопаузальном остеопорозе. *Науч-практич ревматол* 2008;3:8–15.
- Маслова К.А., Крылов М.Ю., Торощова Н.В. и др. Полиморфизмы генов эстрогеновых рецепторов  $\alpha$  и  $\beta$  при постменопаузальном остеопорозе. *Науч-практич ревматол* 2008;3:16–21.
- Cohen M.M. Jr. TGF-beta/Smad signaling system and its pathologic correlates. *Am J Med Genet A* 2003;116:1–10.
- Oreffo R.O.C., Mundy G.R., Seyedin S.M., Bonewald L.F. Activation of the bone-derived latent TGF $\beta$  complex by isolated osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;158:817–23.
- Oursler M.J. Osteoclast synthesis and secretion and activation of latent transforming growth factor  $\beta$ . *J Bone Miner Res* 1994;9:443–52.
- Bonewald L.F. Transforming growth factor- $\beta$ . In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A. (eds). *Principles of Bone Biology*. San Diego, CA, USA: Academic Press, 1996;647–59.
- Noda M., Camilliere J.J. In vitro stimulation of bone formation by transforming growth factor- $\beta$ . *Endocrinology* 1989;124:2991–4.
- Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996;11:1043–51.
- Hughes D.E., Dai A., Tiffie J.C. et al. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- $\beta$ . *Nat Med* 1996;2:1132–6.
- Ashcroft G.S., Dodswoth J., van Boxtel E. et al. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF $\beta$ 1 levels. *Nat Med* 1997;3:1209–15.
- Ongphiphadhanakul B., Chanprasertyotin S., Payattikul P. et al. Association of a G2014A transition in exon 8 of the estrogen receptor- $\beta$  gene with postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis Int* 2001;12:1015–9.
- Janssens K., ten Dijke P., Ralston S.H. et al. Transforming growth factor  $\beta$ 1 mutations in Camurati-Endelmann disease lead to increased signaling by altering either activation or secretion of the mutant protein. *J Biol Chem* 2003;278:7718–24.
- Geiser A.G., Zeng Q.Q., Sato M. et al. Decreased bone mass and bone elasticity in mice lacking the transforming growth factor- $\beta$  gene. *Bone* 1998;23:87–93.
- Lindberg M.K., Moverare S., Eriksson A.-L. et al. Identification of estrogen-regulated genes of potential importance for the regulation of trabecular bone mineral density. *J Bone Miner Res* 2002;17:2183–95.
- Yamada Y. Association of polymorphisms of the transforming growth factor- $\beta$ 1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis. *Pharmacogenetics* 2001;11:765–71.
- Lau H.H., Ho A.Y.Y., Luk K.D.K., Kung A.W.C. Transforming growth factor- $\beta$ 1 gene polymorphisms and bone turnover, bone mineral density and fracture risk in Southern Chinese women. *Calcif Tissue Int* 2004;74:516–21.
- Langdahl B.L., Carstens M., Stenkjaer L., Eriksen E.F. Polymorphisms in the transforming growth factor-beta1 gene and osteoporosis. *Bone* 2003;32:297–310.
- Benson S.A., Hall M.N., Silhavy T.J. Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* 1985;54:101–34.
- Verner K., Schatz G. Protein translocation across membranes. *Science* 1988;241:1307–13.
- Keen R.W., Snieder H., Molloy H. et al. Evidence of association and linkage disequilibrium between a novel polymorphism in the transforming growth factor beta 1 gene and hip bone mineral density: a study of female twins. *Rheumatology* 2001;40:48–54.
- Grainger D.J., Heathcote K., Chiano M. et al. Genetic control of the circulating concentrations of transforming growth factor-beta1. *Hum Mol Genet* 1999;8:93–7.
- Hinke V., Seck T., Clanet C., Scheidt-Nave C. et al. Association of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) T<sup>29</sup> → C gene polymorphism with bone mineral density (BMD), changes in BMD, and serum concentrations of TGF $\beta$ 1 in a population-based sample of postmenopausal German women. *Calcif Tissue Int* 2001;69:315–20.
- Grainger D.J., Percival J., Chiano M., Spector T.D. The role of serum TGF-beta isoforms as potential markers of osteoporosis. *Osteoporosis Int* 1999;9:398–404.
- Dick I.M., Devine A., Li S. et al. The T869C TGFbeta polymorphism is associated with fracture, bone mineral density, and calcaneal quantitative ultrasound in elderly women. *Bone* 2003;33:335–41.
- Shah R., Hurley C.K., Posch P.E. A molecular mechanism for the differential regulation of TGF-beta1 expression due to the common SNP-509-T (C.-1347C>T). *Hum Genet* 2006;120:461–9.
- Mak Y.T., Hampson G., Beresford J.N., Spector T.D. Variations in genome-wide gene expression in identical twins – a study of primary osteoblast-like culture from female twins discordant for osteoporosis. *BMC Genetics* 2004;5:14–21.
- Riancho J.A., Valero C., Naranjo A. et al. Identification of an apromate haplotype that is associated with gene expression and postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;92:660–5.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988;16:12–5.
- Четина Е.В., ДиБаттиста Д., Пул А.Р. Роль простагландина E2 в ингибировании разрушения коллагена суставного хряща больных остеоартрозом. *Науч-практич ревматол* 2009;3:18–24.
- Tzakas P., Wong B.Y., Logan A.G. et al. Transforming growth factor beta-1 (TGF $\beta$ 1) and peak bone mass: Association between intragenic polymorphisms and quantitative ultrasound of the heel. *BMC Musculoskelet Disord* 2005;6:29–39.
- Hering S., Jost C., Schulz H. et al. Circulating transforming growth factor-beta1 (TGFbeta1) is elevated by extensive exercise. *Eur J Appl Physiol* 2002;86:406–10.
- Rosen C.J. Endocrine disorders and osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 1997;9:355–61.
- Garnero P. Biochemical markers of bone turnover: recent data and avenues for the future. *Rev Rhum Engl Ed* 1999;66:538–42.
- Teitelbaum S.L. Postmenopausal osteoporosis, T cells, and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:16711–12.
- 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.
- Xiao P., Chen Y., Jiang H. et al. In vivo genome-wide expression study on human circulating B cells suggest a novel ESR1 and MAPK3 network for postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2008;23:644–54.
- Finkelmann 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.
- Ikeda T., Shigeno C., Kasai R. et al. Ovariectomy decreases the mRNA levels of transforming growth factor-beta 1 and increases the mRNA levels of osteocalcin in rat bone in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;194:1228–33.