

## Содержание

Список членов авторского коллектива .....	4
Список условных сокращений и обозначений .....	5
Введение .....	7
<b>Современное состояние проблемы остеопороза .....</b>	<b>9</b>
Строение, функции и ремоделирование костной ткани .....	15
Этиология и патогенез остеопороза .....	24
Генетические факторы регуляции костного метаболизма и генетические аспекты развития остеопороза .....	32
<b>Анализ результатов полногеномного исследования ассоциаций генов, как ключ к альтернативному пониманию патогенеза остеопороза .....</b>	<b>36</b>
Гены коллагена I типа цепь $\alpha$ -1 (COL1A1) .....	46
Ген рецептора эстрогена альфа (ESR1) .....	50
Ген рецептора кальцитонина (CALCR) .....	53
Ген рецептора витамина D (VDR) .....	58
<b>Оценка значимости генов-кандидатов в риске развития остеопороза и остеопении .....</b>	<b>66</b>
Оценка значимости гена COL1A1 к риску развития остеопороза и остеопении .....	66
Оценка значимости гена ESR1 к риску развития остеопороза и остеопении .....	69
Оценка значимости гена CALCR к риску развития остеопороза и остеопении .....	71
Оценка значимости гена VDR к риску развития остеопороза и остеопении .....	74
Оценка результатов секвенирования гена VDR .....	77
Оценка значимости гомеостаза кальция к риску развития остеопороза .....	77
<b>Заключение .....</b>	<b>79</b>
<b>Список используемой литературы .....</b>	<b>81</b>

## Гены коллагена I типа цепь $\alpha$ -1 (COL1A1)

Название «коллаген» используется как общий термин для белков, образующих характерную тройную спираль трех полипептидных цепей, и все члены семейства коллагена образуют эти надмолекулярные структуры во внеклеточном матриксе, хотя их размер, функция и распределение в тканях значительно различаются. До сих пор было описано 26 генетически отличных коллагеновых типов.

Процесс синтеза и созревания коллагена – сложный многоэтапный процесс, начинающийся в клетке и заканчивающийся в межклеточном матриксе, включает в себя целый ряд посттрансляционных изменений:

- гидроксирование пролина и лизина с образованием гидроксипролина (Hyp) и гидроксилизина (Hyl);
- гликозилирование гидроксилизина;
- частичный протеолиз – отщепление «сигнального» пептида, а также N- и C-концевых пропептидов [98, с. 188-196];
- образование тройной спирали;

После трансляции, про- $\alpha$ 1 цепь и про- $\alpha$ 2 цепь переносятся в эндоплазматический ретикулум, где начинается процесс инициации образования тройной спирали (про) коллагена I типа. Уровень секреции протейна гена COL1A1 варьирует в зависимости от внутри и внеклеточной локализации (рис. 18) (табл. 3).

В процессе спирализации необходимо обязательное присутствие посттрансляционных белков (CRTAP, СуРВ, РЗН1), а наличие мутации в генах (CRTAP, LEPRE1, PPIB), кодирующих данные белки, приводит к возникновению заболевания.

После транспорта проколлагена I типа в комплекс Гольджи и последующего экзоцитоза в экстрацеллюлярный матрикс и отщепления C- и N- пропептидов образуется коллаген I типа (рис. 18). Далее происходит образование ковалентных связей (cross-linking) между трехспиральными единицами коллагена I типа, образуются множественные коллагеновые фибриллы, которые формируют коллагеновые фибры, важнейший протеин органической части костной ткани [187, с. M110.006718 – 1-12].

Коллаген синтезируется и поставляется в межклеточный матрикс почти всеми клетками (фибробластами, хондробластами, остеобластами, одонтобластами, цементобластами, кератобластами и др.).

В связи с тем, что около половины всех протеинов коллагена находятся в тканях скелета, а остальные 40% в дерме и 10% в строме внутренних органов, то нарушение синтеза коллагена сопровождается

патологией, не только костно-суставной системы, но и мягких тканей и внутренних органов. Это неизбежно отражается на состоянии тканей челюстно-лицевой области. Нарушение нормального соотношения  $\alpha$ 1 и  $\alpha$ 2 цепей приводит к нарушению структуры коллагенового волокна, а именно – образованию гомотримеров вместо обычных гетеротримеров, следствием чего является нарушение процессов минерализации костного матрикса.

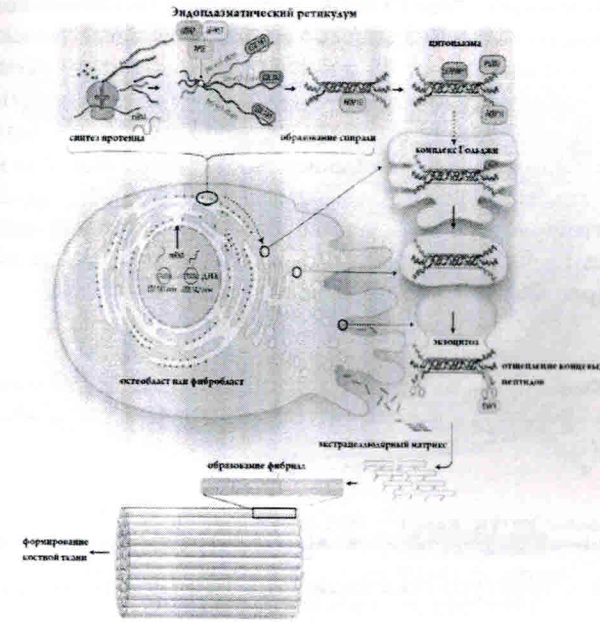


Рисунок 18. Биосинтез коллагена I типа и его посттрансляционная модификация [199, с. 1470-1481].

Изменения в синтезе коллагена, связанные с мутацией в генах, а также с нарушениями в процессах трансляции и пост-трансляционной модификации, сопровождаются появлением дефектных по структуре волокон коллагена [86, с. 2987–2992].

Молекула коллагена представляет собой гетеродимер, состоящий из двух  $\alpha$ 1(I)- и одной  $\alpha$ 2(I)-цепи, которые кодируются генами COL1A1 и COL1A2 соответственно. Ген COL1A1 (альфа-1 цепь коллагена I типа) располагается на длинном плече хромосомы 17 (17q21.33), (рис. 19).

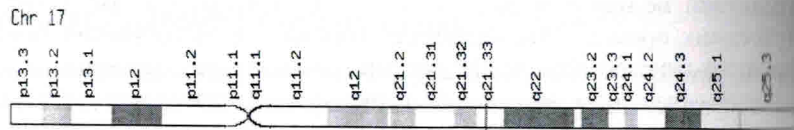


Рисунок 19. Геномная локализация гена COL1A1 [250]

Протяженность гена COL1A1 составляет 18 т.п.н. и содержит 52 экзона. Экзоны от 6 до 49 кодируют альфа-спиральный домен. В основном эти экзоны составляют 45 п.н. и 54 п.н. или же множественные 45 п.н. или 54 п.н. В процессе транскрипции образуются две РНК 5,8 т.п.н. и 4,8 т.п.н., отличающиеся своей некондиционной последовательностью на 3'-конце и приводящие к возникновению одного белка 140 кДа.

Этот ген кодирует  $\alpha 1$ -цепь коллагена типа I, который первоначально синтезируется как белок-предшественник, имеющий дополнительные пептидные последовательности (пропептиды) на обоих концах молекулы (рис. 20).

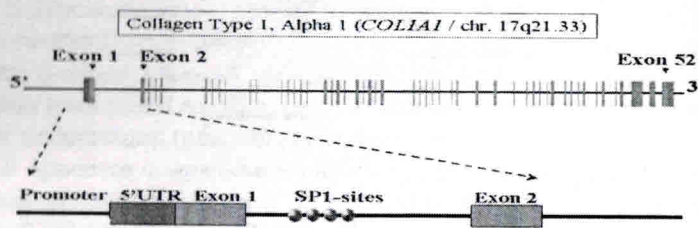


Рисунок 20. Структура гена коллагена 1-го типа  $1\alpha$ -цепи (COL1A1)

Они должны быть удалены протеолитическими ферментами для получения зрелого белка, который представляет собой фибриллу, формирующую коллаген большинства соединительных тканей.

Продукт экспрессии гена COL1A1 играет ключевую роль в регуляции МПКТ. В гене COL1A1 обнаружен ряд полиморфных маркеров, которые показали ассоциацию со снижением МПКТ в разных популяциях [80, с. 288; 81, с. 301-309; 107, с. 383-390; 127, с. 564-575; 173, с. 2492-2506; 174, с. 629-662; 175, с. 15-24] (рис. 21; табл. 3)

Sp1- полиморфизм локализован в интронной области гена COL1A1, а -1997G/T полиморфизм в промоторной области. Эти полиморфизмы, расположенные в нетранслируемых областях гена, определяют степень связывания (аффинность) с рядом наиболее важных транскрипционных факторов, участвующих в костном метаболизме.

Наличие указанных полиморфных генотипов сопровождается повышенной транскрипционной активностью, ускорением синтеза коллагена, что приводит к нарушению нормального соотношения (2:1)  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  цепей коллагена I типа, что в свою очередь приводит к нарушению костной минерализации, а также костной прочности. [53, с. 65-81; 54, с. 240-246; 121, с. 2729-2738; 200, с. 5068-5074].

Однако, последующие исследования вышеуказанного полиморфизма, выполненные в различных популяциях, показали противоречивые результаты о его влиянии на остеопоротические изменения, в том числе в различных участках скелета.

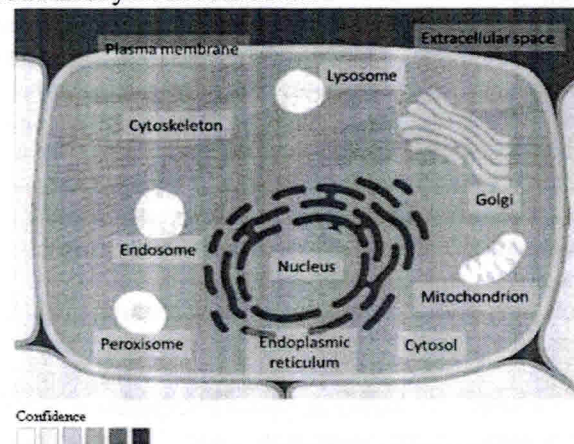


Рисунок 21. Содержание COL1A1 в субклеточных элементах [230]

Примечание: чем выше интенсивность окраски (как показано внизу слева на рисунке), содержание альфа-1 цепи коллагена первого типа (COL1A1)

Таблица 3

Содержание COL1A1 в субклеточных элементах

Органеллы	Уровень секреции
Внеклеточное пространство	5
Эндоплазматический ретикулум	5
Цитоскелет	3
Ядро	3
Цитозоль	3
Плазматическая мембрана	2
Аппарат Гольджи	2
Лизосома	1

Таким образом, по мнению авторов, исследование гена COL1A1 считается наиболее информативным, поскольку позволяет оценить риск развития остеопороза, вероятность осложнений и соответственно дифференцированно провести профилактические мероприятия [43, с. 30; 9, с. 75-84; 153, с. 711-717].

## Ген рецептора эстрогена альфа (ESR1)

Одним из наиболее важных показателей, определяющих состояние костной ткани и набора пиковой массы костной ткани, являются эстрогены. Причем как дефицит, так и избыток эстрогенов отражается на функции костной ткани. Основной причиной ускорения процесса потери костной массы у женщин постменопаузального возраста является дефицит эстрогена. Это в свою очередь приводит к повышенной подверженности костей к низкоэнергетическим переломам, вызванным незначительным воздействием [92, с. 9035-9048]. Эти выводы подтверждаются положительным эффектом назначения эстрогенов, что связывают с наличием на поверхности основных клеток костной ткани – остеобластов и остеоцитов - рецепторов к эстрогену [154, с. 699-712].

В целом эстрогены активируют дифференцировку костномоделирующих единиц (ранних остеобластов), тормозят костную резорбцию (ингибируют активность остеокластов) и стимулируют образование коллагена в кости. Понижение уровня эстрадиола смещает баланс метаболизма костной ткани в сторону костной резорбции и потери костной массы и у женщин, и у мужчин [67, с. 84-92; 161, с. 147-155].

Также эстрогены способны увеличивать синтез некоторых, обладающих защитным действием на МПКТ, цитокинов, стимулировать пролиферацию и активность остеобластов и тормозить их апоптоз [130, с. 576-581; 48, с. 84-92]. Имеются сведения о способности эстрогенов стимулировать экспрессию гена рецепторов к витамину D (1,25(OH)<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) [204, с. 180-188].

Впервые в 1988 году была выявлена экспрессия эстрогеновых рецепторов (ЭР) клетками костной ткани: остеобластами, остеокластами, остеоцитами и хондроцитами.

Влияние эстрогенов на костную ткань опосредовано их связыванием со специфическими рецепторами, локализующимися в цитоплазме и ядре клетки. Эстрогеновые рецепторы принадлежат к суперсемейству ядерных гормональных рецепторов и являются лиганд-индуцируемыми факторами транскрипции [162, с. 811-823].

Различают два основных типа эстрогеновых рецепторов ESR-α и ESR-β, имеющих отличия в аминокислотной последовательности, ко-

торые кодируются разными генами, что обуславливает различия в их функциональности. Сигнальный импульс этих двух рецепторов имеет диаметрально противоположную направленность при их связывании с эстрогеном в сайте AF-1. Так, сигналы, исходящие от ESR-α активируют, а от ESR-β, напротив ингибируют транскрипцию гена эстрогена [109, с. 213-225].

Согласно международной базе данных Entrez Gene и HGNC, ген рецептора эстрогена ESR1 локализован на хромосоме 6 в области 6q25-27 (6q25.1-q25.2) (рис. 22). Ген рецептора эстрогена ESR2 расположен на четырнадцатой хромосоме (6q25.1 и 14q).

Гены ESR1 и ESR2 широко представлены в различных типах тканей: в ткани яичника, молочных желез, в гипоталамусе, костной ткани, однако имеются некоторые различия в характере их экспрессии [109, с. 213-225, 113, с. 2105-2114; 190, с. 296-308; 203, с. 12696-12705]. Ген ESR1 осуществляет регуляцию функции рецептора ER-α, который расположен, преимущественно в остеокластах, остеобластах и стромальных клетках. Имеются данные, указывающие на преобладание ESR-α в кортикальном слое, а ESR-β в трабекулярной части кости.

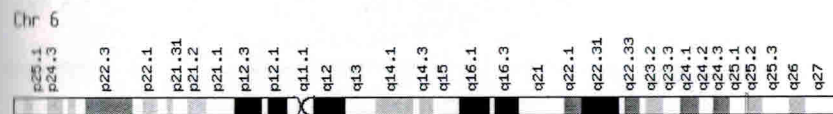


Рисунок 22. Геномная локализация гена ESR1 [231]

В состав гена рецептора эстрогена входит 8 экзонов (рис. 23). Некоторым из данных экзонов уделяется особое значение в гормональной чувствительности клетки или ее отсутствию. Различный эффект наблюдается в зависимости от того, взаимодействует ли рецептор с агонистом или антагонистом (антиэстрогеном). Этим можно объяснить избирательность реакции различных тканей на одни и те же модуляторы рецепторов эстрогена.

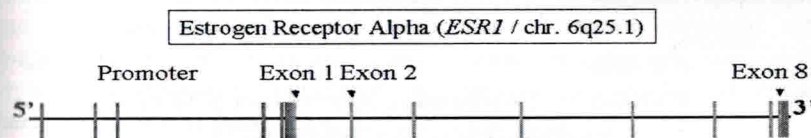


Рисунок 23. Ген рецептора эстрогена-α ESR-α [234]

Содержание эстрогена- $\alpha$  (ESR1) в субклеточных элементах

Органеллы	Уровень секреции
Плазматическая мембрана	5
Ядро	5
Аппарат Гольджи	5
Цитозоль	3
Внеклеточное пространство	2
Цитоскелет	2
Митохондрии	2
Пероксисомы	2
Эндоплазматический ретикулум	2
Лизосомы	2
Эндосомы	1

Продуктом деятельности гена ESR1 является протеин, получивший официальное наименование ESR1\_HUMAN, P03372.

Уровень секреции (экспрессии) рецептора гормона эстрогена (протеина ESR1\_HUMAN, P03372) варьируется в зависимости от внутри- и внеклеточной локализации (рис. 24) (табл. 4).

В целом молекулярные механизмы действия эстрогенов на костную ткань и, в частности, значимость рецепторов эстрогена и полиморфизма генов, кодирующих их синтез несмотря на многочисленные исследования, требуют продолжения исследований [12, с. 41-46; 109, с. 213-225; 190, с. 296-308].

### Ген рецептора кальцитонина (CALCR)

Как известно в патогенезе остеопороза значительную роль играет кальцитонин, КТ, представляющий собой гормон пептидной природы, который вырабатывается парафолликулярными клетками щитовидной железы. Связывание гормона приводит к повышению концентрации сАМР в клетках. Подобное действие, возможно, также имеет место в яичниках женщин и семенниках мужчин.

Так, известно, что концентрация данного гормона снижается при дефиците эстрогенов, что особенно важно, учитывая их значение в развитии остеопороза.

Данная избирательность эстрогеновых рецепторов (ESR) определяется и тем, вызывают ли упомянутые изменения активизацию и приведение их в состояние «готовности к действию» или же, напротив, неспособность рецептора связываться с коактиваторами. Высвобождение рецептора эстрогена из комплекса с белком теплового шока (hsp90) под влиянием лиганда активизирует его способность взаимодействовать со специфическими ДНК-последовательностями (стероидчувствительными элементами). Связывание hsp90 с ESR, способно влиять на процессы регуляции транскрипции. ESR представляет собой транскрипционный фактор, индуцируемый возникновением в среде эстрогена.

Исследователями была выявлена точечная мутация в гене ESR, приводящая к потере функциональных свойств рецептора эстрогена, что ведет к потере костной массы [99, с. 307-320], а также данный эффект был подтвержден у нокаутных по данному гену мышей у которых наблюдалась потеря массы костной ткани [128, с. 3449-3457]. Напротив, непосредственные реакции эстрогена, так называемые негеномные действия, вероятно, включают цитоплазматические ESR и/или другие рецепторы эстрогенов на клеточной мембране.

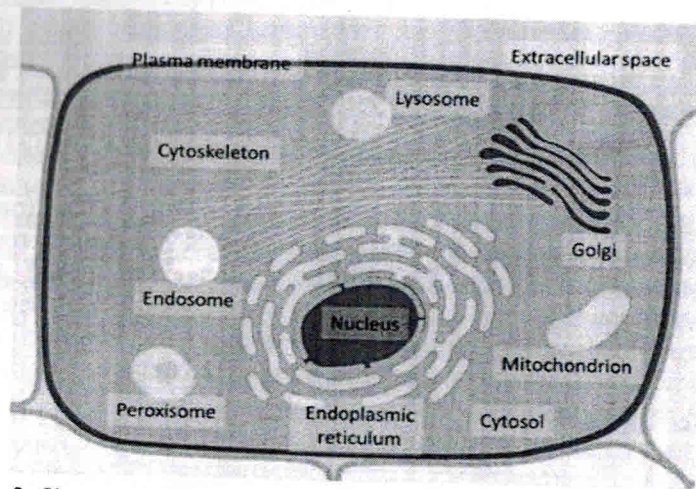


Рисунок 24. Содержание эстрогена- $\alpha$  (ESR1) в субклеточных элементах [231]

**Примечание:** чем выше интенсивность окраски (как показано внизу слева на рисунке), тем выше содержание рецептора эстрогена- $\alpha$  (ESR1)

Усиленная секреция КТ происходит при повышении ионов кальция в крови, одновременно снижая активность имеющихся остеокластов и подавляя образование новых, уменьшая, таким образом, вымывание кальция из костного матрикса. Также КТ уменьшает реабсорбцию кальция в почечных канальцах (рис. 25).

Таким образом, в норме КТ тормозит резорбцию костной массы и высвобождение из нее кальция и фосфата. Действие КТ опосредовано через специфические рецепторы, близкие по структуре к рецепторам паратгормона и секретина (рис. 26).

Рецептор кальцитонина обнаружен на остеокластах, в почках, и некоторых частях мозга. Одна из полиморфных мутаций в гене рецептора КТ (CALCR) ассоциирована с достоверным снижением костной массы у постменопаузальных женщин [214, с. 165-172].

По данным авторов, изучавших частоту распределения мутантного аллеля гена CALCR, не наблюдалось достоверных различий в частоте выявления полиморфного аллеля в группе с остеопорозом, в сравнении с контролем (условно-здоровыми лицами).

## Паращитовидные железы

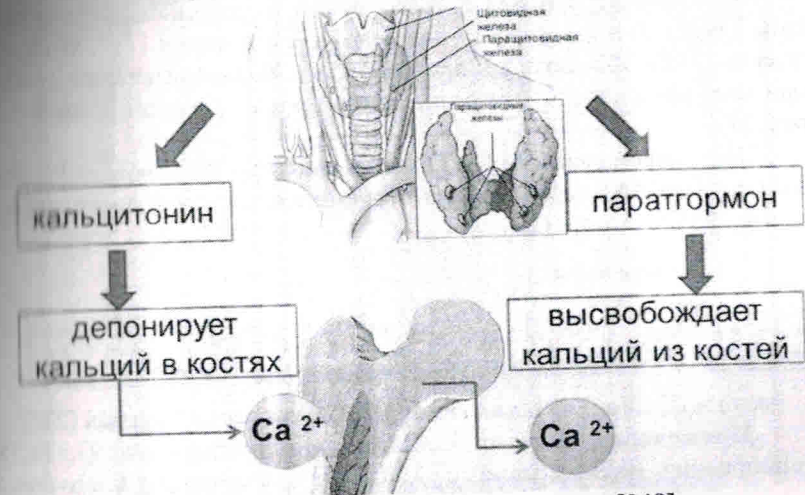


Рисунок 26. Действие кальцитонина [248]

Однако исследователями высказываются предположения о значении данной мутации в регуляции биологической активности КТ. [39, с. 28-34: 157, с. 23-28]. Данные предположения подтверждаются наблюдениями. Так, по данным литературы, МПКТ позвонков у лиц женского пола с генотипом Т/Т статистически достоверно ниже, чем среди женщин с генотипом Т/С и С/С.

По мнению ряда авторов, полиморфный вариант гена CALCR участвует в регуляции биологической активности кальцитонина, что подтверждается выявлением корреляционной зависимости между понижением МПКТ позвонков у женщин и обнаружением определенного гомозиготного варианта (Т/Т) генотипа данного гена, относительно гетерозиготного варианта (С/Т) и гомозиготного (С/С).

При этом частота встречаемости С-аллеля гена CALCR уменьшается с Востока на Запад. Так, если в Японии частота встречаемости аллеля С данного гена может достигать 90% [157, с. 23-28], то, например, в Италии величина данного показателя не превышает 42%. [73, с. 612-618]. Исследователями выявлено, что у женщин в Италии встречаемость протективного аллеля С значительно ниже, чем у женщин в Азии. [1, с. 1-528]. По сведениям авторов, исследовавших распределение Т-аллеля гена, CALCR среди обследованных пациентов с тяжелым течением остеопороза из Северо-западного региона России достигает

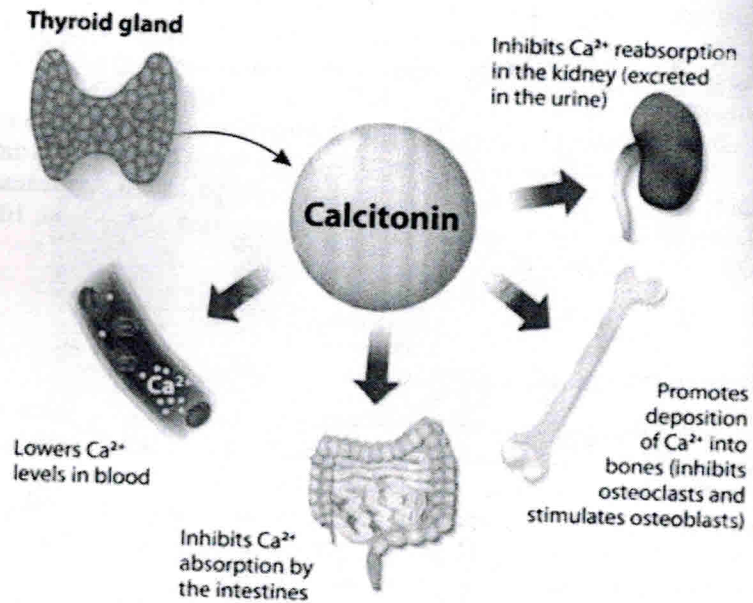


Рисунок 25. Влияние кальцитонина на различные органы-мишени [249]