



М.В. Москаленко^{1,2},
М.В. Асеев¹, С.М. Котова³,
В.С. Баранов¹

¹ НИИ АГ им. Д.О. Отта РАМН, Санкт-Петербург; ² Санкт-Петербургский государственный университет; ³ Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И.И. Мечникова

✿ Методом ПДРФ проанализированы частоты аллелей генов *Coll1a1*, *VDR* и *CALCR* у 174 неродственных представителей Северо-Западного региона России и у 70 пациенток с тяжелым остеопорозом (ТО). При анализе гена *Coll1a1* выявлено достоверное повышение частоты функционально неполноценного (ФН) аллеля *s* в группе ТО ($50,0 \pm 5,9\%$) ($p < 0,0001$) по сравнению с таковой в популяции ($17,5 \pm 4,9\%$). Частота ФН аллеля *t* гена *VDR* в группе ТО составила $51,4 \pm 5,9\%$ и была достоверно ($p < 0,001$) выше, чем в популяции $32,6 \pm 4,9\%$. При исследовании гена *CALCR* не было выявлено достоверных отличий ($p > 0,05$) частоты ФН аллеля *T* в группе ТО ($84,4 \pm 4,9\%$) по сравнению с таковой в популяции ($73,8 \pm 3,9\%$). Согласно полученным данным, анализ аллелей генов *Coll1a1* и *VDR* позволяет осуществлять раннее выявление лиц с наследственной предрасположенностью к остеопорозу и, таким образом, делает возможным профилактику этого заболевания.

✿ **Ключевые слова:** генетическая предрасположенность, полиморфизм, ассоциация, остеопороз, ген *Coll1a1*, ген *VDR*, ген *CALCR*, коэффициент соотношения шансов (odds ratio — OR).

АНАЛИЗ АССОЦИАЦИИ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ *COL1A1*, *VDR* И *CALCR* С РАЗВИТИЕМ ОСТЕОПОРОЗА

ВВЕДЕНИЕ

Остеопороз — одно из частых мультифакториальных заболеваний, характеризующееся потерей костной массы, изменением микро- и макроархитектоники костей, нарушением процессов минерализации, резорбции и ремоделирования костной ткани [32]. В структуре остеопороза ведущее место занимает тяжелый остеопороз (ТО), развивающийся не редко в сочетании со многими хроническими заболеваниями, такими как нервная анорексия, общее недоедание, эндометриоз, миома, почечная дисфункция, с заболеваниями, приводящими к частичной или полной неподвижности [9, 11]. Важнейшим критерием в диагностике ТО является оценка минеральной плотности костной ткани (МПКТ). Последняя определяется как индивидуальными генетическими особенностями, так и различными экзогенными факторами, такими как прием системных гормональных препаратов, питание, физическая активность, курение, злоупотребление алкоголем и др. [9, 11, 45]. В пользу генетической природы заболевания свидетельствуют половые и расовые различия в частоте и проявлениях остеопороза, семейная предрасположенность к переломам, высокая конкордантность заболевания у монозиготных близнецов [6, 17, 37, 39].

Существенный вклад в изучение наследственных факторов остеопороза внесли работы по идентификации генов, вовлеченных в процесс остеогенеза. Среди многих генов, участвующих в регуляции метаболизма костной ткани, особенно важная роль принадлежит генам рецептора витамина D (*VDR3*), рецептора кальцитонина (*CALCR*) и гену $\alpha 1$ цепи коллагена I типа (*Coll1a1*). Ассоциации развития остеопороза с различными аллельными вариантами этих генов посвящены многочисленные исследования [4, 5, 18, 19, 24, 25, 29, 33, 35, 44].

Подобных молекулярно-генетических исследований остеопороза в России, насколько нам известно, не проводилось. Задача данной работы: сравнить частоты полиморфных аллелей и соответствующим им генотипов по генам *Coll1a1*, *VDR* и *CALCR* у больных остеопорозом и в популяции Северо-Западного региона России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались образцы ДНК, выделенной из ядер лимфоцитов крови 70 пациенток с ТО, полученных из Санкт-Петербургской академии профилактической медицины, а также образцы ДНК 174 здоровых неродственных индивидуумов Северо-Западного региона России в качестве популяционного

контроля. Минеральную плотность костной ткани определяли с использованием обычной рентгенографии, позволяющей выявить степень деминерализации костной ткани при уровне более 30%. Согласно рекомендациям ВОЗ (1994) Т-критерий, т. е. стандартное отклонение (SD) от нормативных показателей пиковой костной массы здоровых людей, у таких пациентов составил менее чем $-3,5$ SD.

Типы изученного полиморфизма генов *Coll1a1*, *VDR* и *CALCR*, последовательности олигопраймеров и размеры амплифицированных фрагментов приведены в табл. 1. Реакционная смесь для амплификации объемом 25 мкл включала 15 нМ каждого праймера, 67 мМ трис-НСl, рН 8,8, 16,6 мМ сульфата аммония, 6,7 мМ MgCl₂, 6,7 мкМ ЭДТА, 10 мМ меркаптоэтанол, 170 мкг BSA, 1,0 мМ каждого dNTP и 1 е.а. Таq-ДНК-полимеразы (ООО «СибЭнзим», г. Новосибирск). Для амплификации использовали программируемый термоциклер фирмы «Perkin Elmer», Cetus (США). После предварительной денатурации ДНК (10 минут при 98°C) проводили 28 циклов амплификации в режиме для гена *Coll1a1*: денатурация образовавшихся дуплетных структур при 96°C — 30 сек, гибридизация ДНК с праймерами (отжиг праймеров) и синтез последовательности, комплементарной матричной ДНК (элонгация) при 68°C — 20 сек; для гена *VDR*: денатурация при 94°C — 1 мин, отжиг праймеров при 58°C — 1 мин и элонгация при 72°C — 1 мин и 30 сек, и заключительный этап синтеза при 72°C — 10 мин; для гена *CALCR*: денатурация при 94°C — 1 мин, отжиг праймеров при 55°C — 1 мин и элонгация при 72°C — 1 мин и 30 сек, и заключительный этап синтеза при 72°C — 10 мин. Продукты амплификации подвергали гидролизу соответствующими эндонуклеазами рестрикции: *ApaI* — для гена *Coll1a1* (полученные фрагменты — 235 п.о. и 20 п.о.), *TaqI* — для гена *VDR* (полученные фрагменты — 248 п.о. и 112 п.о.) и *AluI* — для гена *CALCR* (полученные фрагменты — 120 п.о. и 108 п.о.). Расщепление ДНК проводили согласно рекомендациям фирмы изготовителя (ООО «СибЭнзим», г. Новосибирск). Полноту гидролиза оценивали по результатам электрофореза в 6% полиакриламидном геле с последующей окраской этидиумбромидом и визуализацией в проходящем УФ свете.

Для статистического анализа использован стандартный метод χ^2 (программа GraphPad InStat). В случае наличия

достоверных отличий между контролем и исследуемой группой применяли коэффициент соотношения шансов (odds ratio — OR) [28]. Значение OR рассчитывали по формуле: $OR = a/b \cdot d/c$, где *a* — число индивидуумов с наличием данного маркера у исследуемой группы; *b* — число индивидуумов с отсутствием данного маркера исследуемой группы; *c* — число индивидуумов с наличием данного маркера у контроля; *d* — число индивидуумов с отсутствием данного маркера у контроля. Соотношение шансов указано с 95% интервалом. Границы доверительного интервала вычисляли по формулам: $OR_{min} = OR(1 - 1,96/\sqrt{\chi^2})$ и $OR_{max} = OR(1 + 1,96/\sqrt{\chi^2})$. В данной работе значение OR показывает, во сколько раз вероятность наличия данного генотипа у больных превышает вероятность его наличия в контрольной группе, то есть во сколько раз выше вероятность иметь заболевание при наличии определенного генотипа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты анализа частот генотипов и аллелей генов *Coll1a1*, *VDR* и *CALCR* представлены в таблицах 2, 3 и 4 соответственно. Как следует из полученных данных, частота функционально неполноценного (ФН) аллеля *s* гена *Coll1a1* в группе больных тяжелым остеопорозом (ТО) оказалось почти в три раза выше ($50,0\% \pm 5,9$) по сравнению с таковой в популяции ($17,5\% \pm 4,9$) ($\chi^2 = 51,96$; $df = 1$, $p < 0,0001$) (табл. 2). Распределение соответствующих генотипов в популяции Северо-Западного региона России соответствовало распределению Харди-Вайнберга ($\chi^2 = 0,017$; $df = 1$, $p > 0,05$). В то же время частоты генотипов *SS*, *Ss* и *ss* в группе ТО составили 32,9, 34,3,4 и 32,9% соответственно и достоверно отличались от таковых в популяции Северо-Западного региона России (67,8, 29,3 и 2,9%; $\chi^2 = 50,07$; $df = 2$, $p < 0,0001$) (табл. 2). При этом у пациентов с ТО частота ФН генотипа *ss* достигала 32,9% и более чем в 11 раз превысила популяционный уровень (2,9%) (табл. 2).

Сходные данные получены и в отношении распределения частот генотипов и аллелей гена *VDR*. Так, частота ФН аллеля *t* в группе ТО оказалась достоверно выше популяционной ($32,6\% \pm 4,9$) ($\chi^2 = 13,06$; $df = 1$, $p < 0,001$) и составила ($51,4\% \pm 5,9$) (табл. 3). Распределение генотипов *TT*, *Tt* и *tt* в популяции Северо-Западного региона

Таблица 1

Характеристика генов *Coll1a1*, *VDR* и *CALCR*; структуры олигопраймеров, используемых для их изучения

Ген	Локализация гена	Изученный полиморфизм гена	Размер амплифицированного фрагмента	Структура праймера
<i>COL1A1</i>	17q21.3-q22	G→T мутация в регуляторной области гена	255 п.о.	5'-TAACTTCTGGACTATTTGCGGACT-3' 5'-GTCCAGCCCTCATCCGGGCC-3'
<i>VDR</i>	12p12-q14	T→C мутация в 9 экзоне	360 п.о.	5'-GATGATCCAGAAGCTAGCCGACCT-3' 5'-GCAACTCCTCATGGCTGAGGTTCT-3'
<i>CALCR</i>	7q21.3	T→C мутация в кодирующей 3'-области гена в позиции 1377	228 п.о.	5'-CTCAGTGTACACGATACTGTG-3' 5'-ATTCACTGGAACCAGCGTTGG-3'

Таблица 2

Распределение генотипов и частот аллелей гена *Coll1a1* в популяции и у больных тяжелым остеопорозом

Группы и количество индивидуумов (n)	Частоты аллелей, %		χ^2 ; df=1	Частоты генотипов, %			χ^2 ; df=2
	S	s		SS	Ss	ss	
Популяционная выборка (n=174)	82,5±2,2	17,5±4,9	51,96	67,8	29,3	2,9	50,07
Больные тяжелым остеопорозом (n=70)	50,0±5,9	50,0±5,9	p<0,0001	32,9	34,3	32,9	p<0,0001

Таблица 3

Распределение генотипов и частот аллелей гена *VDR* в популяции и у больных тяжелым остеопорозом

Группы и количество индивидуумов (n)	Частоты аллелей, %		χ^2 ; df=1	Частоты генотипов, %			χ^2 ; df=2
	T	t		TT	Tt	tt	
Популяционная выборка (n=138)	67,4±3,4	32,6±4,9	13,06	45,7	43,5	10,9	15,50
Больные тяжелым остеопорозом (n=70)	48,6±6,1	51,4±5,9	p<0,001	18,6	60,0	21,4	p<0,001

Табл. 4

Распределение генотипов и частот аллелей гена *CALCR* в популяции и у больных тяжелым остеопорозом

Группы и количество индивидуумов (n)	Частоты аллелей, %		χ^2 ; df=1	Частоты генотипов, %			χ^2 ; df=2
	T	C		TT	TC	CC	
Популяционная выборка (n=84)	73,8±3,9	26,2±6,6	2,34	53,6	40,5	6,0	3,35
Больные тяжелым остеопорозом (n=32)	84,4±4,9	15,6±11,5	p>0,05	68,8	31,3	0,0	p>0,05

России соответствовало распределению Харди–Вайнберга ($\chi^2=0,008$; $df=1$, $p>0,05$). В то же время частоты генотипов TT, Tt и tt у больных ТО равнялись 18,6, 60,0 и 21,4% соответственно и достоверно отличались от таковых в популяции Северо-Западного региона России (45,7, 43,5 и 10,9%; $\chi^2=15,50$; $df=2$, $p<0,001$) (табл. 3). Важно отметить трехкратное снижение частоты нормальных гомозигот TT на фоне удвоенной частоты ФН генотипа tt в группе ТО по сравнению с аналогичными показателями частот в популяционной (табл. 3).

Частота ФН аллеля T гена *CALCR* в популяции (73,8%±3,9) и в группе с ТО (84,4%±4,9) достоверно не отличались ($\chi^2=2,34$; $df=1$, $p>0,05$) (табл. 4). Частоты генотипов TT, TC и CC в популяции соответствовали распределению Харди–Вайнберга ($\chi^2=0,095$; $df=1$, $p>0,05$). Интересно отметить, что распределение этих генотипов у больных ТО слегка отличалось от популяционного (68,8, 31,3, 0,0 и 53,6, 40,5, 6,0% соответственно; $\chi^2=3,35$; $df=2$, $p>0,05$), за счет увеличения в группе ТО частоты генотипа TT и отсутствия пациентов с генотипом CC (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты доказывают наличие достоверной ассоциации функционально неполноценных аллелей, по крайней мере, двух исследованных генов: гена рецептора витамина D (*VDR*) и гена коллагена (*Coll1a1*) с развитием остеопороза. Важно отметить, что отсутствие четкой ассоциации с ТО аллельных вариантов гена *CALCR* не снижает интереса к изучению данного полиморфизма. Не исключено, что дальнейшие молекулярно-

генетические исследования этого гена позволят получить более объективную информацию о природе и механизме действия рецептора кальцитонина, как одного из важных регуляторов кальциевого метаболизма и его связи с патогенезом остеопороза.

Согласно полученным данным, частота ФН аллеля s гена *Coll1a1* в популяции Северо-Западного региона России достоверно не отличается от таковой в популяциях многих европейских стран (Голландия, Дания, Англия, Чехия, Швеция, Греция, Бельгия и Франция) [3, 4, 7, 12, 25, 26, 29, 41, 42, 43]. Достоверные отличия отмечаются только для популяций Италии ($\chi^2=29,94$; $df=1$, $p<0,0001$) и Испании ($\chi^2=3,96$; $df=1$, $p<0,05$) [4, 7]. Вместе с тем обращает на себя внимание наличие определенной тенденции к снижению частоты ФН аллеля s в восточно-европейских популяциях (Россия и Чехия) [2, 43]. Так, если для населения Западной Европы характерна частота s аллеля в пределах 18–21%, то в Центральной и Восточной Европе (у славян) она снижается до 13–17%. Максимальная частота s аллеля в Европе отмечена в популяциях Италии и Греции [7, 12]. Интересно, что в некоторых популяциях Азии (Япония и Южная Корея) этот аллель встречается еще реже или вообще отсутствует [20, 34]. Это доказывает наличие определенного градиента в распределении ФН аллеля гена *Coll1a1* с Запада на Восток, а при анализе для популяций Испании, Швеции и Бельгии ассоциация не выявлена [3, 4, 29]. Интересно, что аналогичный западно-восточный и северо-южный градиент отмечен и в распределении многих других генов, например гена муковисцидоза (*CFTR*), гена, определяющего чувствительность к вирусу ВИЧ (*CCR5*) [1].

Частота ФН аллеля *t* гена *VDR* в популяции Северо-Западного региона России (32,6%), как следует из наших данных, достоверно не отличается от таковой в популяции Дании и Англии [22, 27]. Достоверные отличия отмечены для популяций Франции ($\chi^2=14,74$; $df=1$, $p<0,001$), Словении ($\chi^2=11,01$; $df=1$, $p<0,001$), Испании ($\chi^2=4,13$; $df=1$, $p<0,05$), Греции ($\chi^2=5,10$; $df=1$, $p<0,05$) и Англии (Саутгемптон) ($\chi^2=11,87$; $df=1$, $p<0,001$) [10, 14–16, 31]. Согласно многочисленным данным, в странах Европы частота аллеля *t* варьирует от 32 до 48%, а частота гомозигот по ФН *t* аллеля от 10 до 23%. Важно отметить, что для чернокожих американцев частота ФН аллеля *t* гена *VDR* составляет 14–17% [9, 12], в то время как в популяциях восточной Азии (Китая и Южной Кореи) она равна 4–8% [12]. Частота *tt* гомозигот у чернокожих равна 5%, а у жителей восточной Азии только 1–3%. Согласно нашим данным, частоты гомозигот *tt* и аллеля *t* в популяции Северо-Западного региона России близки к средневропейским показателям [1]. В то же время интересно отметить, что в большинстве популяций Европы не было выявлено ассоциации *t* аллеля гена *VDR* с низкой МПКТ и риском развития остеопороза.

Наши данные свидетельствуют не только о популяционных особенностях аллельных частот генов *Coll1a1* и *VDR*, но и о популяционных различиях в ассоциации ФН аллелей этих генов с развитием остеопороза. Так, согласно результатам многочисленных исследований, проведенных в Европе, и собственным данным распределение аллелей изучаемых генов, особенно гена *Coll1a1*, обнаруживает особенности, характерные для популяций Европы. Эти межпопуляционные различия свидетельствуют о сложности и многокомпонентности генной сети метаболизма костной ткани и позволяет предположить наличие многих других генов, кроме генов *Coll1a1*, *VDR* и *CALCR*, аллели которых ассоциированы с развитием остеопороза.

Для определения возможных путей влияния функционально неполноценных аллелей генов *VDR* и *Coll1a1* на развитие остеопороза уместно рассмотреть, каковы молекулярно-биохимические механизмы действия изучаемых генов в процессах остеогенеза. Коллаген типа I является мажорным белком костей. Его аминокислотная структура кодируется генами *Coll1a1* и *Coll1a2*. Механизм, при котором полиморфизм в регуляторной области гена *Coll1a1* предрасполагает к развитию остеопороза, еще не достаточно изучен. Однако известно, что аллель *s* имеет почти в два раза большее сродство (аффинность) к транскрипционному фактору *Sp1* по сравнению с *S* аллелем [21]. Увеличение степени аффинности приводит к двукратному усилению транскрипции α_1 цепей проколлагена (белкового продукта гена *Coll1a1*) с последующим изменением соотношения α_1 и α_2 белковых цепей в молекуле коллагена и образованием гомотримера только из α_1 цепей [30]. Биохимические анализы образцов кости *Ss* гетерозигот указывают на уменьшение прочности и из-

менение состава костной ткани по сравнению с таковой у *SS* гомозигот. Возможно, что наличие патологического гомотримерного коллагена I типа приводит к изменению его четвертичной структуры с последующим нарушением минерализации костного матрикса [38].

В настоящее время признано, что витамин D и его активные метаболиты являются главными компонентами системы, регулирующей фосфорно-кальциевый обмен. Они участвуют в минерализации костной ткани, в поддержании гомеостаза кальция и через ядерный рецептор витамина D могут влиять на процессы ремоделирования костей. Как ядерный рецептор, белковый продукт гена *VDR* играет роль посредника в передаче биологического сигнала 1,25-дигидроксивитамина D_3 ($1\alpha,25(OH)_2D_3$ -кальцитриол), влияя таким путем на экспрессию различных генов-мишеней [36]. Изучаемая нами мутация приводит к замене изолейцина на метионин в 9 экзоне ($T \rightarrow C$) в белке ядерного рецептора витамина D, следствием чего является образование функционально неактивного рецептора, возможно, приводящего к нарушению гомеостаза кальция в организме [23]. Действительно, при анализе района 3'-конца гена *VDR* у двух индивидуумов, гомозиготных по генотипам *tt* и *TT*, было найдено еще несколько различий в нуклеотидной последовательности этого района [33]. В опыте по трансфекции клеток костной ткани фрагментами кДНК гена *VDR*, содержащими разные генотипы (*TT*, *Tt*, *tt*), были обнаружены функциональные различия в активности рецепторов витамина D [8].

Таким образом, изучаемые нами гены непосредственно вовлечены в процессы остеогенеза, хотя биомеханизмы их действия различны. Рецептор витамина D влияет на уровень гормональной регуляции остеогенеза, тогда как коллаген сам является важной составной частью костной ткани.

Распределение аллелей в изучаемых группах позволяет рассчитать коэффициент соотношения шансов, показывающий, во сколько раз выше вероятность развития остеопороза при наличии неблагоприятного генотипа. У пациентов, гомозиготных по ФН аллелю *t* гена *VDR*, вероятность развития остеопороза увеличивается более чем в 2,1 раза [95% CI: 1,4–3,3]. Если пациент является гомозиготным по ФН аллелю *T* гена *CALCR*, эта вероятность возрастает в 2 раза [95% CI: 0,9–4,1], а по ФН аллелю *s* гена *Coll1a1* вероятность возрастает в 4,7 раза [95% CI: 3,1–7,2].

В заключение хотелось бы отметить, что несмотря на то, что изучению ассоциации аллелей генов *Coll1a1* и *VDR* и остеопороза посвящено большое количество работ, имеющиеся данные не позволяют сделать окончательный вывод о роли этих генов в развитии остеопороза. Характер такого воздействия может варьировать и в зависимости от других неблагоприятных факторов. Несомненно, особый интерес для генетического тестирования наследственной предрасположенности к остеопорозу представляют пациенты, гомозиготные по функционально неполноценным

аллелям двух генов *Coll1a1* и *VDR3*. Важно подчеркнуть, что определение гомозигот по функционально неполноценным аллелям *s* или *t* генов *Coll1a1* и *VDR* перспективно в целях раннего досимптоматического выявления лиц группы высокого риска по развитию остеопороза.

Работа выполнена при поддержке гранта CRDF «Молекулярно-биологические основы здоровья человека и окружающей среды Северо-Запада России» (№ ST-012-0) и гранта для поддержки научно-исследовательской работы аспирантов высших учебных заведений Минобразования России 2003 г. (№ Г-07-47).

Литература

1. Баранов В.С., Баранова Е.В., Иващенко Т.Э., Асеев М.В. Геном человека и гены «предрасположенности». Введение в предиктивную медицину. — СПб.: Интермедика, 2000.
2. Москаленко М.В., Асеев М.В., Зазерская И.Е., Котова С.М., Иващенко Т.Э., Баранов В.С. Анализ ассоциации аллелей гена *Coll1a1* с развитием остеопороза // Генетика. — Т. 38, №11. — С. 1443-1447.
3. Aerssens J., Dequeker J., Peeters J., Breemans S., Broos P., Boones S. Polymorphisms of the *VDR*, *ER* and *COL1A1* genes and osteoporotic hip fractures in elderly postmenopausal women // Osteoporos Int. — 2000. — Vol. 11. — P. 583-91
4. Alvarez L., Oriola J., Jo J., Ferro T., Pons F., Peris P., Guanabens N., Duran M., Monegal A., Martinez de Osaba M.J., Riveru-Fillat F., Ballesta A.M. Collagen type I alpha 1 gene Sp1 polymorphism in premenopausal women with primary osteoporosis: improved detection of Sp1 binding site polymorphism in the collagen type 1 gene // Clin Chem. — 1999. — Vol. 45 (6). — P. 904-6
5. Audi L., Garcia-Ramirez M., Carrascosa A. Genetic determinants of bone mass // Horm Res. — 1999. — Vol. 51 (3). — P. 105-23
6. Barthe N. Basse-Cathalinat B Measurement of Bone mineral density in mother-daughter pairs for evaluating the family influence on bone mass acquisition: A GRIQO survey // Osteoporos Int. — 1998. — Vol. 8 (4). — P. 379-84
7. Braga V., Mottes M., Mirandola S., Lisi V., Malerba G., Sartori L., Bianchi G., Gatti D., Rossini M., Bianchini D., Adami S. Association of *CTR* and *COL1A1* alleles with BMD values in Peri- and Postmenopausal women // Calcif Tissue Int. — 2000. — Vol. 67. — P. 361-366
8. Brown M., Eisman J. The genetics of osteoporosis: Future diagnostic Possibilities // Clin Lab Med. — 2000. — Vol. 20 (3). — P. 527-47
9. Copper G.S. Umbach DM Are vitamin D receptor Polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis // J. Bone Miner Res. — 1996. — Vol. 11. — P. 1841-9
10. Dennison E.M., Arden N.K., Keen R.W., Syddall H., Day I.N. Spector T.D., Cooper C. Birthweight, vitamin D receptor genotype and the programming of osteoporosis // Paediatr Perinat Epidemiol. — 2001. — Vol. 15 (3). — P. 211-9
11. Eastell R., Reid D.M., Compston J., Cooper C., Fogelman I., Francis R.M., Hay S.M., Hosking D.J., Purdie D.W., Ralston S.H., Reeve J., Russell R.G., Stevenson J.C. Secondary prevention of osteoporosis: when should a non-vertebral fracture be a trigger for action? // QJM. — 2001. — Vol. 94 (11). — P. 575-97
12. Efstathiadou Z., Tsatsoulis A., Ioannidis J.P. Association of collagen Ialpha 1 Sp1 polymorphism with the risk of prevalent fractures: a meta-analysis // J. Bone Miner Res. — 2001. — Vol. 16 (9). — P. 1586-92.
13. Eisman J.A. Genetics of osteoporosis // Endocr Rev. — 1999. — Vol. 20(6). — P. 788-804.
14. Fernandez E., Fibla J., Betriu A., Piulats J.M., Almirall J., Montoliu J. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and relative hypoparathyroidism in patients with chronic renal failure // J. Am Soc Nephrol. — 1997. — Vol. 8 (10). — P. 1546-52.
15. Fountas L., Moutsatsou P., Kastanias I., Tamouridis N., Tzanela M., Anapliotou M., Sekeris C.E. The contribution of vitamin D receptor gene polymorphisms in osteoporosis and familial osteoporosis // Osteoporos Int. — 1999. — Vol. 10 (5). — P. 392-8.
16. Garnero P., Arden N.K., Griffiths G., Delmas P.D., Spector T.D. Genetic influence on bone turnover in postmenopausal twins // J Clin Endocrinol Metab. — 1996. — Vol. 81(1). — P. 140-6.
17. Grainge M.J., Coupland C.A., Cliffe S.J., Chilvers C.E., Hosking D.J. Association between a family history of fractures and bone mineral density in early postmenopausal women // Bone. — 1999. — Vol. 24 (5). — P. 507-12.
18. Grant S.F., Reid D.M., Blake G., Herd R., Fogelman I., Ralston S.H. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene // Nat Genet. — 1996. — Vol. 14 (2). — P. 203-5.
19. Hampson G., Evans C., Pettit R.J., Evans W.D., Woodhead S.J., Peters J.R., Ralston S.H. Bone mineral density, collagen type 1 alpha 1 genotypes and bone turnover in premenopausal women with diabetes mellitus // Diabetologia. — 1998. — Vol. 41 (11). — P. 1314-20.
20. Han K.O., Moon I.G., Hwang C.S., Choi J.T., Yoon H.K., Min H.K., Han I.K. Lack of an intronic Sp1 binding-site polymorphism at the collagen type I alpha 1 gene in healthy Korean women // Bone. — 1999. — Vol. 24 (2). — P. 135-7.
21. Hobson E., Dean V., Grant S.F.A., Ralston S.H. Functional effects of a polymorphism of collagen (I) alpha 1 gene (*Coll1A1*) in osteoporosis // J. Med Genet. — 1998. — Vol. 35. Suppl. — P. 32.
22. Houston L.A., Grant S.F., Reid D.M., Ralston S.H. Vitamin D receptor polymorphism, bone mineral density, and osteoporotic vertebral fracture: studies in a UK population // Bone. — 1996. — Vol. 18 (3). — P. 249-52.
23. Hustmyer F.G., Deluca H.F., Peacock M. Apa1, Bsm1, EcoRV and TaqI polymorphisms at human vitamin D receptor gene locus in Caucasians, Blacks and Asians // Hum Mol Genet. — 1993. — Vol. 2. — P. 487.
24. Hustmyer F.G., Liu G., Johnston C.C., Christian J., Peacock M. Polymorphism at an Sp1 binding site of *COL1A1* and bone mineral density in premenopausal female twins and elderly fracture patients // Osteoporos Int. — 1999. — Vol. 9 (4). — P. 346-50.
25. Keen R.W., Woodford-Richens K.L., Grant S.F., Ralston S.H., Lanchbury J.S., Spector T.D. Association of polymorphism at the type I collagen (*COL1A1*) locus with reduced bone mineral density increased fracture risk and increased collagen turnover // Arthritis Rheum. — 1999. — Vol. 42 (2). — P. 285-90.
26. Langdahl B.L., Ralston S.H., Grant S.F., Eriksen E.F. An Sp1 binding site polymorphism in the *COL1A1* gene predicts osteoporotic fractures in both men and women // J. Bone Miner Res. — 1998. — Vol. 13 (9). — P. 1384-9.
27. Langdahl B.L., Gravholt C.H., Brixen K., Eriksen E.F. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and bone mass, bone turnover and osteoporotic fractures // Eur J. Clin Invest. — 2000. — Vol. 30 (7). — P. 608-17.
28. Lau J., Ioannidis J.P., Schmid C.H. Quantitative synthesis in systematic reviews // Ann Intern Med. — 1997. — Vol. 127 (9). — P. 820-6.
29. Liden M., Wilen B., Ljunghall S., Melhus H. Polymorphism at the Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene does not predict bone mineral density in postmenopausal women in Sweden // Calcif Tissue Int. — 1998. — Vol. 63 (4). — P. 293-5.
30. Mann V., Hobson E.E., Li B., Stewart T.L., Grant S.F., Robins S.P., Aspden R.M., Ralston S.H. A *COL1A1* Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality // J. Clin Invest. — 2001. — Vol. 107 (7). — P. 899-907.
31. Marc J., Prezelj J., Komel R., Kocijancic A. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with bone mineral density in Slovenian

- postmenopausal women // *Gynecol Endocrinol.* — 2000. — Vol. 14 (1). — P. 60–4.
32. Melton L.J., Atkinson E.J., O. Fallon W.M., Wahner H.W., Riggs B.L. Long-term fracture prediction by bone mineral assessed at different skeletal sites // *J. Bone Miner Res.* — 1993. — Vol. 8. — P. 1227–33.
33. Morrison N.A., Qi J.C., Tokita A., Kelly P.J. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles // *Nature.* — 1994. — Vol. 367. — P. 284–287.
34. Nakajima T., Ota N., Shirai Y., Hata A., Yoshida H., Suzuki T., Hosoi T., Orimo H., Emi M. Ethnic difference in contribution of Sp1 site variation of COL1A1 gene in genetic predisposition to osteoporosis // *Calcif Tissue Int.* — 1999. — Vol. 65 (5). — P. 352–3.
35. Nakamura M., Zhang Z.Q., Shan L., Hisa T., Sasaki M., Tsukino R., Yokoi T., Kaname A., Kakudo K. Allelic variants of human calcitonin receptor in the Japanese population // *Hum Genet.* — 1997. — Vol. 99 (1). — P. 38–41.
36. Ozono K., Liao J., Kerner S.A., Scott R.A., Pike J.W. The vitamin D responsive element in the human osteocalcin gene. Association with a nuclear proto-oncogene enhancer // *J. Biol. Chem.* — 1990. — Vol. 265 (35). — P. 21881–8.
37. Ralston S.H. The genetics of osteoporosis // *Bone.* — 1999. — Vol. 25 (1). — P. 85–6.
38. Ralston S.H. Genetic control of susceptibility to osteoporosis // *J. Clin Endocrinol Metab.* — 2002. — Vol. 87(6). — P. 2460–6.
39. Seeman E., Hopper J.L., Bach L.A., Cooper M.E., Parkinson E., McKay J., Jerums G. Reduced bone mass in daughters of women with osteoporosis // *N. Engl. J. Med.* — 1989. — Vol. 320 (9). — P. 554–8.
40. Uitterlinden A.G., Burger H., Huang Q., Yue F., McGuigan F.E., Grant S.F., Hofman A., van Leeuwen J.P., Pols H.A., Ralston S.H. Relation of alleles of the collagen type I alpha1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women // *N. Engl. J. Med.* — 1998. — Vol. 338 (15). — P. 1016–21.
41. de Vernejoul M., Haguenaer D., Cohen-Solal M.E., Beaudreuil J. Polymorphism of collagen I and vertebral osteoporosis: no association // *J. Bone Miner Res.* — 1997. — Vol. 12. Suppl. — S. 489.
42. Weichertova M., Stepan J.J., Michalska D., Haas T., Pols H.A., Uitterlinden A.G. COL1A1 polymorphism contributes to bone mineral density to assess prevalent wrist fractures // *Bone.* — 2000. — Vol. 26 (3). — P. 287–90.
43. Wood R.J., Fleet J.C. The genetics of osteoporosis: vitamin D receptor polymorphisms // *Annu Rev Nutr.* — 1998. — Vol. 18. — P. 233–58.
44. Yeap S.S., Beaumont M., Bennett A., Keating N.A., White D.A. Genetic and environmental factors affecting bone mineral density in large families // *Postgrad Med J.* — 1998. — Vol. 74. — P. 872.
45. Zmuda J.M., Cauley J.A., Danielson M.E., Wolf R.L., Ferrell R.E. Vitamin D receptor gene polymorphisms bone turnover and rates of bone loss in older African-American women // *J Bone Miner Res.* — 1997. — Vol. 12 (9). — P. 1446–52

The analysis of association between Col1a1, VDR and CALCR genes and development of osteoporosis

M.V. Moskalenko, M.V. Aseev, S.M. Kotova, V.S. Baranov

¹ Ott Institute of Obstetrics and Gynecology, Russian Academy of Medical Sciences, St-Petersburg, Russia

² Department of Genetics and Breeding, St. Petersburg State University, St-Petersburg, Russia

³ St. Petersburg State Medical Academy, St-Petersburg, Russia

☼ THE SUMMARY: The allele rates of VDR, Col1a1 and CALCR genes in 174 non-related individuals Northwest Russian population and in 70 patients with severe osteoporosis (SO) were investigated by PCR-RFLP method. The frequency of functionally abnormal allele t of VDR gene in a group of SO patients was 51,4±5,9%, and it was significantly higher (p<0,001) than this one in population (32,6±4,9%). Analysis of Col1a1 gene proved significant preponderance (p<0,0001) of functionally abnormal allele s in SO patients (50,0±5,9%) compared to its average frequency in population (17,5±4,9%). No significant differences (p>0,05) between frequencies of functionally abnormal T allele of CALCR gene in SO (84,4±4,9%) patients and its average frequency in population were recorded (73,8±3,9%). Thus, according to our data clear-cut association between functionally abnormal alleles of VDR and Col1a1 genes and osteoporosis manifestation is established. Prospects and prognostic values of VDR and Col1a1 genes alleles s and t molecular testing for presymptomatic identification of women at high risk of osteoporosis in postmenopausal age are discussed.

☼ KEY WORDS: genetic susceptibility, polymorphism, association, osteoporosis, Col1a1 gene, VDR gene, CALCR gene, odds ratio.