

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.2

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ *MTHFR* И *GSTM1*
С РАЗВИТИЕМ ГЛЮКОКОРТИКОИД-ИНДУЦИРОВАННОГО
ОСТЕОПОРОЗА У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

© 2012 г. О. А. Гра^{1,2*}, М. В. Москаленко³, Н. А. Филимонова¹, И. А. Баранова⁴, А. С. Глотов⁵,
С. А. Суржиков¹, О. В. Королева⁶, И. В. Голденкова-Павлова², Т. В. Наседкина^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991

³Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии
Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, 191024

⁴Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению
и социальному развитию, Москва, 117997

⁵Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта
Российской академии медицинских наук, Санкт-Петербург, 199034

⁶Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, Москва, 119071

Поступила в редакцию 09.02.2011 г.

Принята к печати 20.06.2011 г.

Поиск и изучение факторов риска развития глюкокортикоид-индуцированного остеопороза, как одного из наиболее частых и тяжелых осложнений длительной терапии бронхиальной астмы системными глюкокортикоидами, является важным направлением профилактической медицины. В представленной работе с помощью аллель-специфичной гибридизации на биочипе определены частоты генотипов и аллелей восьми генов-кандидатов глюкокортикоид-индуцированного остеопороза у 137 больных бронхиальной астмой, длительное время принимавших системные глюкокортикоиды. При анализе полиморфизма гена *MTHFR* 677C>T выявлена статистически значимая ассоциация между генотипами по данному гену и показателями минеральной плотности проксимального отдела бедренной кости по Z-критерию у больных, получавших системные глюкокортикоиды (ANOVA Краскела–Уоллиса, $p = 0.0013$). Помимо этого, при анализе инсерционно-делеционного полиморфизма гена *GSTM1* обнаружено, что носители “нулевого” генотипа *GSTM1* имеют более низкие показатели Z-критерия, чем носители по крайней мере одного функционального аллеля гена *GSTM1* (U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони, $p = 0.034$). Анализ сочетанных взаимодействий показал, что носители генотипа 677C/C гена *MTHFR* в комбинации с “нулевым” генотипом *GSTM1* характеризуются более низкими значениями минеральной плотности кости по Z-критерию, чем носители других генотипов (ANOVA Краскела–Уоллиса, $p = 0.0012$). Таким образом, аллели генов *MTHFR* и *GSTM1* могут модулировать риск индуцированного глюкокортикоидами остеопороза у больных бронхиальной астмой, что имеет большое значение для выявления индивидов с высоким риском развития остеопороза среди принимающих как системные, так и ингаляционные глюкокортикоиды.

Ключевые слова: бронхиальная астма, остеопороз, полиморфизм, гены системы биотрансформации, предрасположенность, биологические микрочипы.

POLYMORPHISMS IN XENOBIOTIC-METABOLIZING GENES IN THE PATHOGENESIS OF GLUCOCORTICOID-INDUCED OSTEOPOROSIS IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA, by O. A. Gra^{1, 2*}, M. V. Moskalenko³, N. A. Filimonova¹, I. A. Baranova⁴, A. S. Glotov⁵, S. A. Surzhikov¹, O. V. Koroleva⁶, I. V. Goldenkova-Pavlova², T. V. Nasedkina^{1*} (¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; ²Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; ³Federal State Institution “Russian Research Institute of Hematology and Blood Transfusion” Federal Medical-Biological Agency of Russia, St.-Petersburg, 191024 Russia; ⁴The Russian State Medical University, Moscow, 117997 Russia; ⁵Ott’s Scientific and Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Russian Academy of Medical Sciences, St.-Petersburg, 199034 Russia; ⁶Bach Institute of Biochemistry, Russian

Принятые сокращения: БА – бронхиальная астма; SGK – системные глюкокортикоиды; GI – глюкокортикоид-индуцированный; МПК – минеральная плотность кости; ПЦР – полимеразная цепная реакция; SD – стандартное отклонение; *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* – гены цитохрома P450 человека; *GSTT1* – ген глутатион-S-трансферазы T1; *GSTM1* – ген глутатион-S-трансферазы M1; *NAT2* – ген ариламин-N-ацетилтрансферазы 2; *MTHFR* – ген 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы.

* Эл. почта: olgagra@gmail.com; nased@eimb.ru

Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia; *e-mail: olgagra@gmail.com, nased@eimb.ru). Search for and study of risk factors for glucocorticoid-induced (GI) osteoporosis, as one of the most frequent and serious complications of long-term systemic glucocorticoid (SGC) therapy for bronchial asthma are an important problem of prevention medicine. In the present work to determine the frequencies of genotypes and alleles of eight candidate genes of GI osteoporosis in 137 patients with bronchial asthma receiving long-term SGC therapy, using allele-specific hybridization on the biochip. In the analysis of gene polymorphism *MTHFR* 677C>T showed a statistically significant association between genotypes for this gene and proximal femur mineral density (BMD) for the Z-criterion in patients treated with SGC (non-parametric ANOVA Kruskal–Wallis $p = 0.0013$). In addition, the analysis of insertion–deletion polymorphism of *GSTM1* found that carriers of *GSTM1* “null” genotype have lower values of BMD Z-criterion, than carriers of at least one functional allele of *GSTM1* gene (Mann–Whitney U-test with Bonferroni correction, $p = 0.034$). Analysis of gene-gene interactions revealed that carriers of *MTHFR* genotype 677C/C in combination with *GSTM1* “null” genotype characterized by a statistically significant lower values of BMD Z-criterion, than carriers of other variants of genotypes (ANOVA Kruskal–Wallis, $p = 0.0012$). Thus, the alleles of *MTHFR* and *GSTM1* genes may modulate the risk of GI osteoporosis in patients with bronchial asthma, which is very important to identify group of patients with high risk for osteoporosis among individuals receiving SGC as well as inhaled glucocorticoids.

Keywords: bronchial asthma, osteoporosis, polymorphism, xenobiotic-metabolizing genes, predisposition, biological microchips.

Поиск молекулярно-генетических маркеров риска развития различных заболеваний представляет одну из важнейших задач современной генетики человека. Доказано, что генетический полиморфизм определяет наследственную предрасположенность к множеству комплексных заболеваний, в том числе к таким социально-значимым, как остеопороз и бронхиальная астма (БА). В соответствии с причинами, ответственными за потерю костной массы, остеопороз можно классифицировать как первичный (в основном постменопаузальный) или вторичный. Среди вторичного остеопороза наиболее распространен стероидный, что связано с частым применением глюкокортикоидной терапии, быстротой развития и степенью выраженности этой формы заболевания, поэтому поиск и изучение факторов риска развития глюкокортикоид-индуцированного (ГИ) остеопороза, как одного из наиболее частых и тяжелых осложнений длительной терапии БА системными глюкокортикоидами (СГК), является важным направлением профилактической медицины [1, 2].

Индивидуальная чувствительность к глюкокортикоидам хорошо известна, однако ее механизмы до сих пор нуждаются в уточнении. Больные могут иметь нормальные показатели минеральной плотности кости (МПК) при длительном применении высоких доз СГК, и, напротив, при сравнительно коротком применении малых доз может развиваться тяжелый остеопороз с переломами осевого и периферического скелета [3]. Критический уровень МПК, сигнализирующий о высоком риске развития переломов как при первичном, так и при ГИ-osteoporозе, – два стандартных отклонения (SD) по Z-критерию, при этом при ГИ-osteoporозе переломы возможны и при более высоких показателях МПК [2–4].

Таким образом, несмотря на длительную историю изучения ГИ-osteoporоза, в настоящее время

еще нет полного понимания механизмов патогенеза, а вследствие этого нет и достаточно отработанных схем лечения. В свою очередь, отсутствие четких критериев, по которым можно предсказать развитие остеопороза в ответ на прием глюкокортикоидов, свидетельствует о необходимости поиска генетических детерминант данной патологии.

Для адекватной досимптоматической диагностики и профилактики остеопороза посредством индивидуальной коррекции доз гормональных средств необходимо уметь выявлять предрасположенность к развитию остеопороза различной этиологии. В настоящее время в некоторых генах, вовлеченных в метаболизм костной ткани (*COL1A1*, *VDR*, *CALCR* и др.), обнаружен полиморфизм, который приводит к изменению активности ферментов или к формированию функционально неполноценных белковых продуктов [5–8]. В число наиболее вероятных генов-кандидатов, предрасполагающих к развитию остеопороза на фоне терапии БА, относятся гены цитокинов (*TNF α* , *IL-1*, *IL-6*), белковые продукты которых активно продуцируются при тяжелых воспалительных процессах и способствуют более эффективной дифференцировке и пролиферации остеокластов [8, 9].

В свою очередь, прием СГК приводит к снижению абсорбции кальция, способствуя резорбции кости. СГК подавляют функции остеобластов и формирование костной ткани [4, 9]. Известно также, что лекарственные средства этого класса снижают эффективность антиоксидантной системы и усиливают перекисное окисление липидов [10, 11]. При этом основную функцию защиты при активации процессов липопероксидации выполняет антиоксидантная система клеток, ключевые компоненты которой – ферменты системы биотрансформации, превращающие ак-

Краткая характеристика больных бронхиальной астмой, длительно принимавших системные глюкокортикоиды (СГК)

Характеристика	Медиана	Межквартильный размах (25%; 75%)
Возраст, лет	43	17; 54
Возраст к началу заболевания, лет	24.5	14; 36
Длительность заболевания, лет	15	9; 23
Возраст к началу приема СГК, лет	34	24; 40
Суточная доза СГК, мг/сут	10	5; 15
Длительность приема СГК, лет	6	4; 9
Общая доза, г*	23.72	8.21; 47.45

* Суточная доза (мг/сут) × длительность приема (лет) × 365/1000.

тивные пероксидные радикалы в неактивные водорастворимые соединения, легко выводимые из организма [12–14].

Таким образом, определены некоторые генетические факторы риска развития первичного и ГИ-остеопороза. Однако молекулярно-генетические работы, посвященные изучению остеопороза в России, немногочисленны и затрагивают, в основном, лишь единичные полиморфные варианты генов системы метаболизма костной ткани. В связи с этим актуальным становится изучение полиморфизма генов системы биотрансформации с целью определения генотипов высокого риска развития остеопороза среди больных, вынужденных длительно принимать СГК. Отдельно следует отметить, что для проведения подобной работы требуется одновременное определение многих аллельных вариантов ДНК, поэтому наиболее простым и рациональным представляется использование мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей аллель-специфичной гибридизацией с олигонуклеотидными микрочипами.

Таким образом, цель настоящей работы состояла в анализе взаимосвязи полиморфизма генов системы биотрансформации (*CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR*, *CYP2C9*, *CYP2C19* и *NAT2*) с количественными показателями МПК (BMD Total) и Z-критерия (Z-критерий Total) у больных БА, длительно принимающих СГК. Предполагается, что применение подобного системного подхода позволит определить паттерн значимых генов-кандидатов развития остеопороза, а обнаруженные генотипы риска можно будет использовать в качестве дополнительных маркеров, что позволит усовершенствовать донозологическую диагностику этого тяжелого осложнения у больных БА.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выборки. Обследованы вошли 137 человек обоого пола (женщины в пременопаузе) в воз-

расте от 20 до 45 лет, больных БА и принимавших СГК не менее 6 мес. Больные ранее не получали антиостеопоретических препаратов. Критериями исключения из обследования были патология органов дыхания, отличная от БА; заболевания и состояния, вызывающие развитие вторичного остеопороза другой этиологии; беременность или лактация; отсутствие согласия на участие в исследовании.

С целью отбора больных и оценки факторов, влияющих на МПК и риск развития переломов, проводили анкетирование, в котором учитывали: возраст, сопутствующие заболевания и состояния, гинекологический статус женщины, курение и злоупотребление алкоголем, степень физической активности, возраст к началу БА и длительность этого заболевания, возраст к началу приема СГК и длительность приема, суточная и кумулятивная доза СГК, переломы на фоне СГК. Измеряли рост и вес больного, оценивали индекс массы тела. Суточное потребление кальция с продуктами питания рассчитывали по дневнику больного в соответствии с диетическими таблицами. Краткая характеристика больных БА, получавших длительную терапию СГК, представлена в таблице.

Минеральную плотность кости (МПК) измеряли с использованием метода двуэнергетической рентгеновской абсорбциометрии (аппарат “Hologic QDR-4500A”). МПК определяли в проксимальном отделе бедра в целом (шейка бедра, NECK, и большой вертел, TROCH) в абсолютных значениях (г/см²) и с использованием показателей Z-критерия. Снижение МПК на одно–два стандартных отклонения (SD) от поло-возрастного норматива (Z-критерий) соответствует остеопении, более чем на два SD – остеопорозу. Z-критерий показывает, соответствует ли костная масса возрасту больного, и могут ли другие факторы влиять на избыточную потерю костной массы. При распределении 137 больных в соответствии с показателями Z-критерия выделили следующие группы: 42 человека с Z-критерием больше нуля (Z > 0), 38 человек с -1 < Z < 0, 37 – с -2 < Z < -1 (остеопения) и 20 – с Z < -2 (остеопороз).

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (“Promega”).

Изготовление микрочипов. Олигонуклеотиды для иммобилизации на микрочипе синтезировали на автоматическом синтезаторе 394 DNA/RNA Synthesizer (“Applied Biosystems”) с использованием стандартной фосфоамидитной процедуры. На 3'-конце олигонуклеотидов находился спейсер со свободной аминогруппой, который вводили при синтезе с помощью 3'-Amino-Modifier C7 CPG 500 (“Glen Research”, США). Нуклеотидные последовательности иммобилизованных олигонуклеотидов подбирали ранее при разработке и создании биочипа для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации [15].

Мультиплексная ПЦР. Фрагменты ДНК для анализа нарабатывали посредством двухэтапной мультиплексной ПЦР. С целью повышения эффективности мультиплексной ПЦР гены объединяли в группы, соответствующие блокам олигонуклеотидных проб на биочипе.

В группу 1 вошли следующие гены: *CYP1A1* (rs1799814, 4887C>A; rs1048943, 4889A>G; rs4646903, 6235T>C) и *CYP2D6* (rs3892097, 1934G>A; rs4986774, 2637A>DelA), в группу 2 – *GSTT1* (делеция), *GSTM1* (делеция), в группу 3 – *NAT2* (rs1799929, 481C>T; rs1799930, 590G>A; rs1799931, 857G>A) и *MTHFR* (rs1801133; 677C>T), в группу 4 (блок 4) – *CYP2C9* (rs1799853, 430C>T; rs1057910, 1075A>C) и *CYP2C19* (rs4244285, 681G>A).

На первой стадии мультиплексной ПЦР амплифицировали фрагменты генов, входящих в блоки 1, 3, 4; на второй стадии – в блоки 1–4. Реакционная смесь (25 мкл) на первом этапе ПЦР содержала 10 пмоль каждого праймера, 67 мМ Трис-НСl (рН 8.6), 166 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.01% Тритон X-100, 1.5 мМ MgCl₂, 0.2 мМ каждого из dNTP (“Силекс”, Россия), 2.5 ед. акт. Таq-полимеразы (“Силекс”) и матрицу (не менее 10 нг геномной ДНК). Для амплификации использовали программируемый термоциклер Thermocycler 1 фирмы “Biometra” (США). Реакцию проводили в следующем режиме: предварительная денатурация ДНК при 94°C (5 мин), далее 40 циклов амплификации по следующей схеме: 94°C, 30 с; 60°C, 30 с; 72°C, 1 мин; далее 72°C, 5 мин. Продукт первого этапа ПЦР (2.5 мкл) использовали в качестве матрицы на втором этапе ПЦР, который проводили в реакционной смеси того же состава, но добавляли по 50 пмоль флуоресцентно меченных праймеров и по 5 пмоль немеченых праймеров, чтобы получить избыток флуоресцентно меченного одноцепочечного ПЦР-продукта. Реакцию проводили в следующем режиме: предварительная денатурация ДНК при 94°C (5 мин), далее 40 циклов

амплификации по следующей схеме: 94°C, 30 с; 62°C, 30 с; 72°C, 1 мин; далее 72°C, 5 мин.

Гибридизация, регистрация изображения и обработка результатов. Для гибридизации на микрочипе использовали флуоресцентно меченные образцы, полученные на второй стадии мультиплексной ПЦР. Гибридизационная смесь общим объемом 40 мкл состояла из 10 мкл формамида (“Serva”), 10 мкл 20× SSPE (“Promega”) и 20 мкл амплификата (по 5 мкл образца из каждой мультиплексной реакции). Гибридизационную смесь полностью денатурировали при 95°C (5 мин), быстро охлаждали на льду (1 мин), наносили на биочип и оставляли на ночь при 37°C. Затем чип отмывали в 1× SSPE в течение 10 мин при комнатной температуре и высушивали. Флуоресцентный сигнал от ячеек биочипа регистрировали с помощью портативного анализатора биочипов, снабженного камерой ПЗС и программным обеспечением ImageWare (“Биочип-ИМБ”, Россия).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку проводили при помощи методов непараметрической статистики для сравнения количественных признаков с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Мерой центральной тенденции и рассеяния служила медиана/интерквартильный размах. При сравнении средних значений или медиан в двух независимых группах применяли U-критерий Манна–Уитни, в трех независимых группах – ANOVA по Краскелу–Уоллису [5]. Отдельно следует отметить, что при проведении попарных сравнений с использованием U-критерия Манна–Уитни для определения статистической значимости различий применяли поправку Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости $p < 0.05$.

Оценивали риск развития ГИ-остеопороза при определенном генотипе в зависимости от показателей Z-критерия. Использовали статистический параметр OR (odds ratio – коэффициент соотношения шансов), который рассчитывали по формуле:

$$OR = \frac{a/b}{c/d}, \text{ где } a = n_1, b = N_1 - n_1, c = n_2, d = N_2 - n_2;$$

N_1 и N_2 – численность выборки, n_1 и n_2 – число индивидов с изучаемым признаком в этих двух выборках [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами проведено генотипирование 137 образцов ДНК больных БА по 12 однонуклеотидным заменам и двум делециям в восьми генах системы биотрансформации *CYP1A1* (4887C>A, 4889A>G, 6235T>C), *CYP2D6* (1934G>A, 2637A>DelA), *GSTT1* (делеция), *GSTM1* (делеция), *NAT2* (481C>T, 590G>A, 857G>A), *MTHFR* (677C>T), *CYP2C9* (430C>T, 1075A>C) и *CYP2C19* (681G>A).

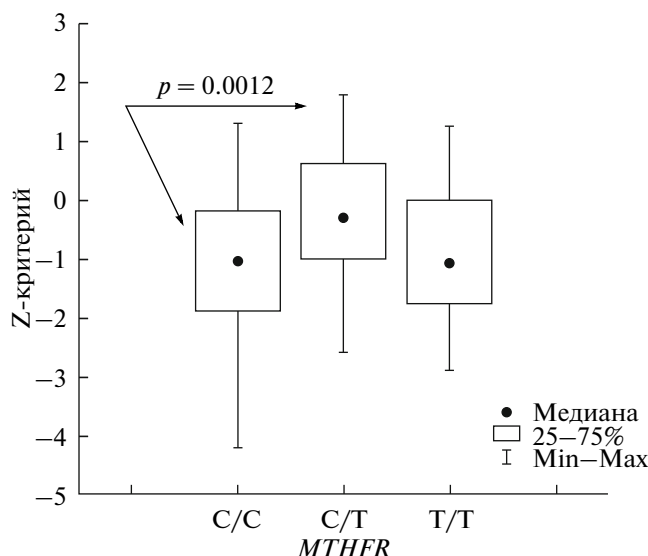


Рис. 1. Сравнительный анализ показателей МПК по Z-критерию в группах больных бронхиальной астмой, носителей различных генотипов по полиморфизму гена *MTHFR* 677C>T. Здесь, а также на рис. 2, 3 и 6 значения *p* между двумя группами рассчитаны по U-критерию Манна–Уитни с поправкой Бонферрони.

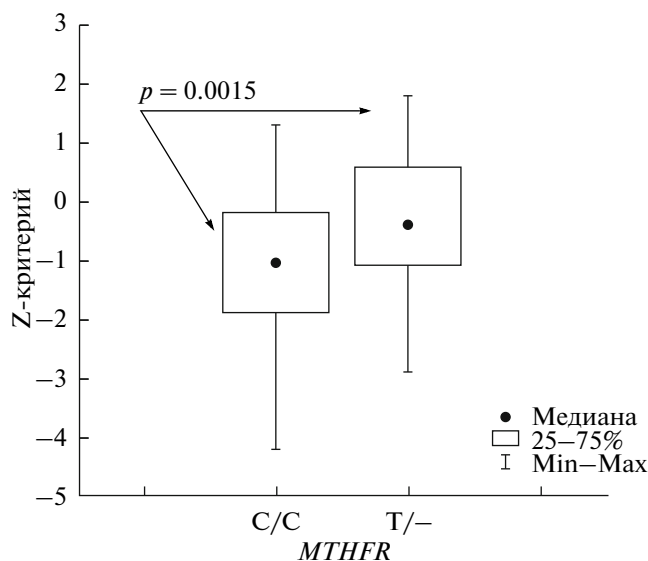


Рис. 2. Сравнительный анализ показателей МПК по Z-критерию в группах больных бронхиальной астмой, носителей гомозиготного генотипа 677C/C *MTHFR* и генотипов 677T/-*MTHFR*.

Не выявлено статистически значимых различий в частотах генотипов и аллелей генов *CYP1A1* (4887C>A, 4889A>G, 6235T>C), *CYP2D6* (1934G>A, 2637A>DelA), *GSTT1* (делеция), *NAT2* (481C>T, 590G>A, 857G>A), *CYP2C9* (430C>T, 1075A>C) и *CYP2C19* (681G>A) у больных БА, длительно принимающих СГК, и подразделенных на группы в соответствии с показателями абсолютных значений МПК (г/см²) и Z-критерия. При этом методами непараметрической статистики удалось обнаружить взаимосвязь полиморфизма генов *GSTM1* и *MTHFR* с отклонением МПК по Z-критерию (Z-критерий – число стандартных отклонений от среднего значения МПК поло-возрастной нормы в референтной популяции).

При анализе полиморфизма гена *MTHFR* 677C>T выявлена статистически значимая ассоциация между генотипами по данному гену и показателями МПК проксимального отдела бедренной кости по Z-критерию (ANOVA Краскела–Уоллиса, *p* = 0.0013).

Больные с генотипом C/C имели более низкую МПК по сравнению с носителями генотипа C/T (U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони, *p* = 0.0012) (рис. 1). Также проведен сравнительный анализ показателей МПК по Z-критерию в группах больных БА, носителей генотипов 677C/C и 677T/-*MTHFR*, и показано, что у носителей генотипа C/C значения МПК ниже, чем у носителей других генотипов (критерий U Манна–Уитни с поправкой Бонферрони, *p* = 0.0015) (рис. 2).

При анализе инсерционно-делеционного полиморфизма гена *GSTM1* обнаружена статистически значимая ассоциация “нулевого” генотипа *GSTM1* со снижением МПК по Z-критерию (U-критерий Манна–Уитни с поправкой Бонферрони, *p* = 0.034) (рис. 3).

После проведения генетического анализа больных разделили на три группы в соответствии

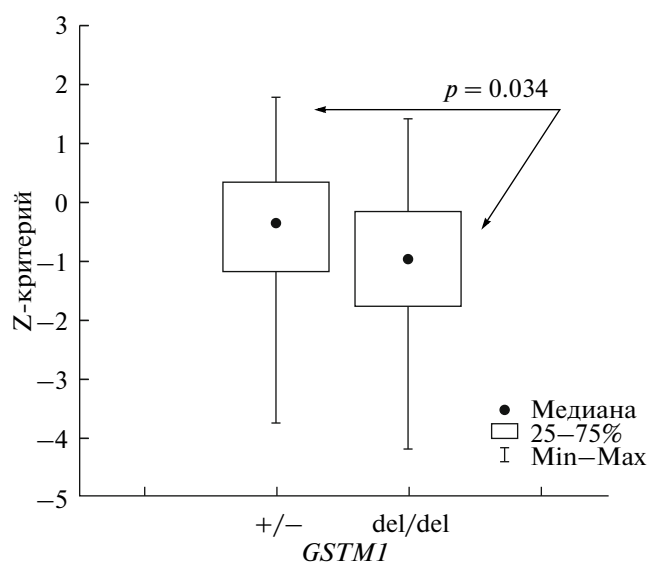


Рис. 3. Сравнительный анализ показателей МПК по Z-критерию в группах больных бронхиальной астмой, носителей различных генотипов по инсерционно-делеционному полиморфизму гена *GSTM1*.

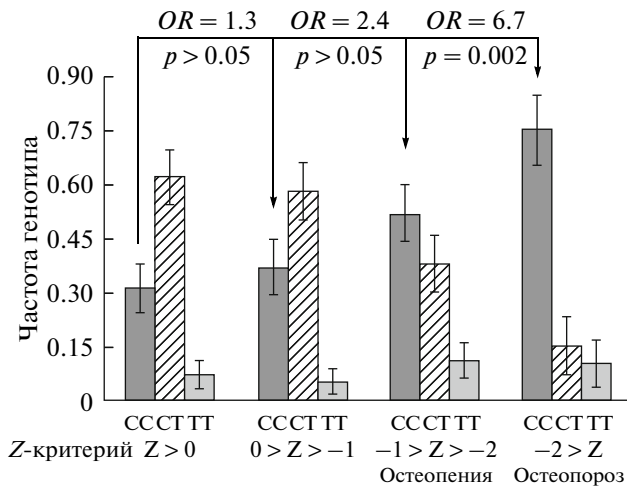


Рис. 4. Распределение генотипов по гену *MTHFR* у больных бронхиальной астмой в зависимости от показателя *Z*-критерия.

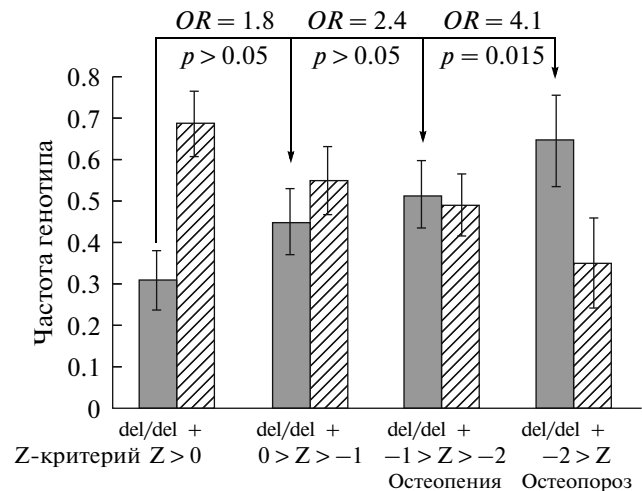


Рис. 5. Распределение генотипов по гену *GSTM1* у больных бронхиальной астмой в зависимости от показателя *Z*-критерия.

с генотипом по гену *MTHFR*: 61 носитель генотипа C/C, 65 – C/T и 11 – T/T; и на две группы в соответствии с генотипом по гену *GSTM1*: 62 носителя “нулевого” генотипа и 75 человек, носителей по крайней мере одного функционального аллеля. Эти группы оказались сопоставимыми по индексу массы тела, возрасту к началу БА и ее длительности (ANOVA Краскела–Уоллиса, $p > 0.05$), что позволило использовать их для дальнейшего анализа.

При анализе распределения генотипов в группах, сформированных в зависимости от показателей *Z*-критерия, установлено, что больные с генотипом T/T по гену *MTHFR* не сильно различались по показателю *Z*-критерия, причем распределение генотипов при снижении показателя *Z*-критерия смещалось в сторону увеличения числа больных с генотипом C/C (рис. 4). Так, например, в группе с *Z*-критерием меньше двух стандартных отклонений (-2 SD) генотип C/C по гену *MTHFR* встречался более чем в 2 раза чаще, чем в группе с *Z*-критерием больше нуля ($OR = 6.69$, $95\% CI = 2.00–22.34$, $p = 0.002$).

У носителей генотипа C/T по гену *MTHFR* *Z*-критерий чаще всего превышал -2 SD, в то время как у большинства больных с генотипом C/C по гену *MTHFR* *Z*-критерий был существенно меньше -1 SD (рис. 4). Сравнение частот аллелей гена *MTHFR* в группах с разными значениями *Z*-критерия показало статистически значимое увеличение частоты аллеля C в группе с *Z*-критерием меньше -2 SD по сравнению с частотой в группе с *Z*-критерием больше нуля (82.5 и 61.9% соответственно; $OR = 2.90$, $95\% CI = 1.15–7.33$, $p = 0.024$).

В ходе анализа гена *GSTM1* обнаружено, что больные с делецией гена *GSTM1* (носители “нулевого” генотипа *GSTM1*) имели более низкие пока-

затели *Z*-критерия, чем носители по крайней мере одного функционального аллеля гена *GSTM1* (рис. 5). Сравнение частот генотипов по гену *GSTM1* в группах с разными значениями *Z*-критерия показало статистически значимое увеличение частоты “нулевого” генотипа *GSTM1* в группе с *Z*-критерием меньше -2 SD, чем в группе с *Z*-критерием больше нуля ($OR = 4.14$, $95\% CI = 1.34–12.80$, $p = 0.015$).

При анализе сочетанного влияния комбинации генотипов *MTHFR* и *GSTM1* на показатели МПК оказалось, что носители “нулевого” генотипа *GSTM1* в сочетании с генотипом 677C/C гена *MTHFR* имели статистически значимо более низкие значения МПК по *Z*-критерию (ANOVA Краскела–Уоллиса $p = 0.0012$), чем больные, носители других генотипов. При анализе сочетанных взаимодействий выявлены статистически значимые различия по *U*-критерию Манна–Уитни (рис. 6): носители “нулевого” генотипа *GSTM1* в комбинации с генотипом 677C/C *MTHFR* имели статистически значимо более низкие значения МПК по сравнению с носителями сочетанных генотипов 677T/-*MTHFR*, “ненулевой” генотип *GSTM1* ($p = 0.00042$, с поправкой Бонферрони) и 677T/-*MTHFR*, “нулевой” генотип *GSTM1* ($p = 0.024$, с поправкой Бонферрони).

Разделение больных на группы в зависимости от показателей *Z*-критерия позволило показать, что генотип C/C *MTHFR* в сочетании с “нулевым” генотипом *GSTM1* статистически значимо чаще встречается у лиц с *Z*-критерием от -1 SD до -2 SD ($OR = 4.82$, $95\% CI = 1.21–19.15$, $p = 0.031$) и меньше -2 SD ($OR = 13.00$, $95\% CI = 3.00–56.30$, $p = 0.0003$), чем у больных с *Z*-критерием больше нуля (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты обследования больных БА при помощи биологических микрочипов указывают на существование ассоциации между определенными генотипами генов системы биотрансформации и показателями Z-критерия – стандартными отклонениями МПК от нормы в данной половозрастной группе больных. Такая взаимосвязь прослеживается только в случае полиморфизма генов *GSTM1* и *MTHFR*, тогда как для полиморфных вариантов остальных генов системы биотрансформации – *CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTT1*, *NAT2*, *CYP2C9* и *CYP2C19*, подобной корреляции с показателями МПК и Z-критерия не обнаружено. Поскольку белковые продукты генов-кандидатов ГИ остеопороза – *GSTM1* и *MTHFR*, играют важную роль в защите организма от окислительного стресса, независимого фактора риска развития остеопороза, можно предположить, что изменение активности ферментов *GSTM1* и *MTHFR* определяет эффективность компенсаторной регуляции в ответ на повышенный окислительный стресс. Рассмотрим вклад генов *GSTM1* и *MTHFR* в развитие ГИ остеопороза более подробно.

Ген *GSTM1* локализован на коротком плече хромосомы 1 (1p13.3), он состоит из восьми экзонов и экспрессируется преимущественно в печени, почках, надпочечниках и желудке. Известно, что глутатион-S-трансфераза-M (*GSTM1*) вовлечена в антиокислительную систему защиты организма, а также является ключевым ферментом фазы II биотрансформации. Кроме того, *GSTM1* участвует в биотрансформации лекарственных средств, он может обуславливать и устойчивость к некоторым из них, в том числе к глюкокортикоидам, и их накопление в организме [17]. Наличие двух “нулевых” аллелей гена *GSTM1* приводит к отсутствию белкового продукта этого гена, что способствует развитию окислительного стресса, обуславливает повышение уровня аддуктов ДНК и может потенцировать появление различных заболеваний многофакторной этиологии [16–19]. Так, под действием окислительного стресса усиливается резорбция костной ткани, и МПК снижается в результате индукции дифференцировки остеокластов и подавления дифференцировки остеобластов свободными радикалами [11]. Отдельно следует отметить, что основная причина окислительного стресса у больных тяжелой формой БА – прием СГК, которые активируют процессы липопероксидации, индуцируя тем самым резорбцию костной ткани и провоцируя развитие вторичного ГИ-остеопороза [1, 20].

Таким образом, можно предположить, что при тяжелой форме БА высокий уровень окислительного стресса на фоне приема СГК и “нулевого” генотипа *GSTM1*, обуславливающего отсутствие ключевого фермента антиокислительной систе-

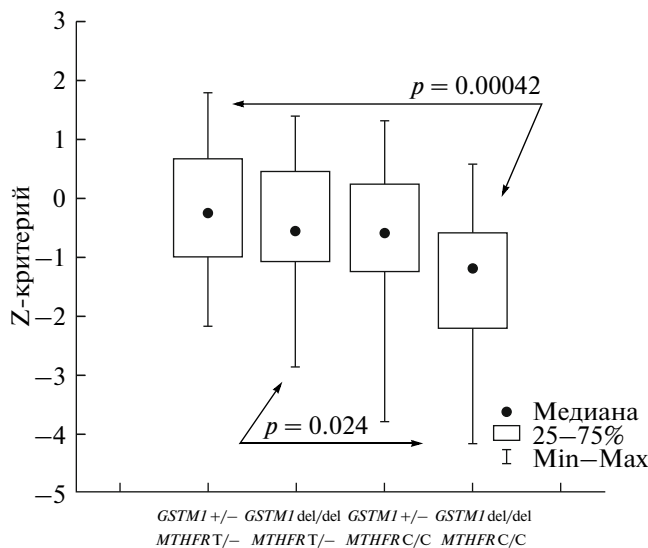


Рис. 6. Сравнительный анализ показателей МПК по Z-критерию в группах больных бронхиальной астмой, носителей различных генотипов по полиморфизму 677C>T гена *MTHFR* и инсерционно-делеционному полиморфизму гена *GSTM1*.

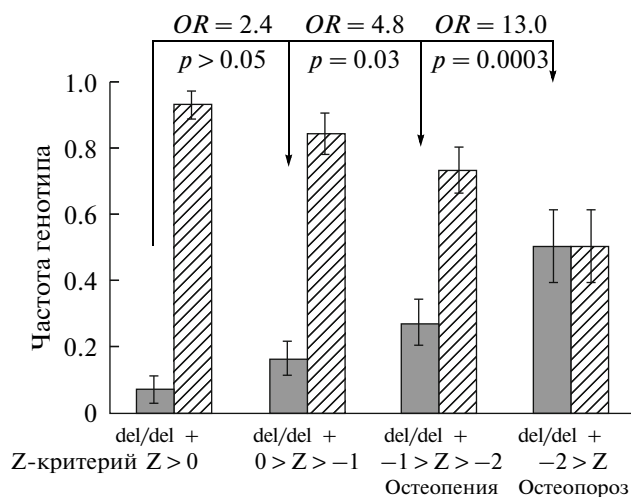


Рис. 7. Распределение генотипов *GSTM1* в сочетании с генотипом 677C/C *MTHFR* у больных бронхиальной астмой в зависимости от показателя Z-критерия.

мы защиты организма и фазы II биотрансформации, приводит к накоплению СГК в организме и разобщению процессов ремоделирования кости. Предполагается, что подобное разобщение процессов костного ремоделирования и ускорение костного обмена при длительной терапии астмы СГК может приводить к снижению МПК у носителей “нулевого” генотипа *GSTM1* и, соответственно, показателей измеряемого Z-критерия и тем самым предрасполагать к развитию ГИ остеопороза.

Интересные результаты получены также при изучении полиморфизма 677C>T гена *MTHFR*,

локализованного на коротком плече хромосомы 1 (1p36.3) и кодирующего 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазу.

MTHFR – это ключевой фермент, регулирующий метаболизм фолата и направляющий фолат либо в цикл синтеза ДНК, либо в цикл метилирования. Замена С на Т в позиции 677 гена *MTHFR* приводит к аминокислотной замене Ala222Val в каталитическом домене фермента, что вызывает диссоциацию кофактора витамина В2 и инактивацию фермента. Таким образом, генотип 677Т/Т ассоциирован с дефицитом фолата, так как в клетках снижается концентрация метил-ТНФ и увеличивается содержание формил-ТНФ [21]. Изучение метаболизма фолата показало, что дефицит фолата повышает восприимчивость к инфекциям, а также может приводить к развитию ряда патологических состояний, в том числе, к снижению показателей МПК, увеличению резорбции костной ткани и возникновению остеопороза [22–25]. Следует отметить, что во всех работах взаимосвязь генотипов и аллелей гена *MTHFR* с Z-критерием МПК анализировали у здоровых индивидов и у больных с первичным остеопорозом, тогда как влияние SGK на развитие вторичного ГИ-остеопороза в зависимости от фолатного статуса, в том числе у больных БА, на сегодняшний день не изучено.

В настоящей работе показано, что у больных БА, длительно принимавших SGK, частота генотипа 677С/С по гену *MTHFR* отрицательно коррелирует с уровнем МПК по Z-критерию, т.е. присутствие функционально полноценного *MTHFR* в сочетании с приемом SGK предрасполагает к разрежению костной ткани и развитию вторичного ГИ-остеопороза.

Как известно, одна из причин развития аллергических заболеваний, в частности БА, состоит в изменении Th1/Th2-баланса, а именно, в увеличении образования цитокинов Th2-типа и уменьшении цитокинов Th1-типа, что приводит к развитию иммунного ответа аллергического типа (Th1 и Th2 – неаллергический и аллергический типы иммунного ответа соответственно). С другой стороны, известно, что терапевтическое действие SGK при БА основано на ингибировании процессов воспаления, в том числе высвобождения лейкотриенов из клеток воспаления. При этом SGK не способны изменять тип иммунного ответа на неаллергический у чувствительных к аллергенам индивидов [26]. Как уже отмечалось ранее, независимо от влияния на тип иммунного ответа SGK супрессируют активность остеобластов, подавляя тем самым формирование кости, а также провоцируют развитие окислительного стресса, который обуславливает повышение резорбции костной ткани.

Ранее при изучении фолатного метаболизма показали, что дефицит фолата может приводить к различным патологиям, связанным с активацией гуморальной иммунной системы (Th2-тип иммунного ответа), в том числе, к формированию атопии и развитию БА [27]. Следовательно, можно предположить, что высокая концентрация фолата у больных БА, носителей генотипа 677С/С гена *MTHFR*, обуславливает нарушение иммунорегуляторного Th1/Th2-баланса в сторону Th1-ответа, что приводит к увеличению выработки Th1-цитокина – TNF- α (фактора некроза опухолей). В свою очередь, TNF- α является важным регулятором активности остеокластов, которые отвечают за снижение МПК и, как следствие, показателей Z-критерия [8, 9]. Предполагается, что подобную стимуляцию пролиферации и функциональной активности остеокластов посредством активации TNF- α высокими концентрациями фолата в сочетании с выраженным окислительным стрессом можно рассматривать как фактор риска развития ГИ-остеопороза у носителей генотипа 677С/С гена *MTHFR*, длительно получавших SGK.

Другим объяснением предрасполагающего действия генотипа 677С/С и аллеля 677С гена *MTHFR* на развитие ГИ остеопороза может быть неравновесие по сцеплению с аллелями близлежащих локусов, расположенных на хромосоме 1. Наиболее вероятный ген-кандидат – ген проколлаген-лизин 1 (*PLOD1*), который находится на расстоянии 150 т.п.н. от гена *MTHFR*. Известно более 20 полиморфных вариантов гена *PLOD1*, обуславливающих синтез белка *PLOD1* со сниженной ферментативной активностью, что приводит к снижению прочности связей в структуре коллагена и, следовательно, может провоцировать развитие заболеваний костно-мышечной системы, в том числе остеопороза [28]. Предполагаемые патогенетические пути развития ГИ-остеопороза у больных БА с указанием изученных факторов риска схематически представлены на рис. 8.

Таким образом, нами установлена взаимосвязь между частотами полиморфных вариантов генов системы биотрансформации и развитием ГИ-остеопороза на фоне БА. Показано, что изученный полиморфизм в генах *GSTM1* и *MTHFR* у больных тяжелой формой БА, получавших длительную терапию SGK, ассоциирован с повышенным риском развития ГИ-остеопороза. Полученные нами результаты в сочетании с данными проведенного ранее анализа полиморфизма в генах, вовлеченных в метаболизм костной ткани [5], позволяют приблизиться к пониманию основ патогенеза осложнений, возникающих при лекарственной терапии тяжелой формы БА, а также сформировать группу высокого риска ГИ-остеопороза среди больных, принимающих SGK. Предполагается, что дальнейшее изучение гене-

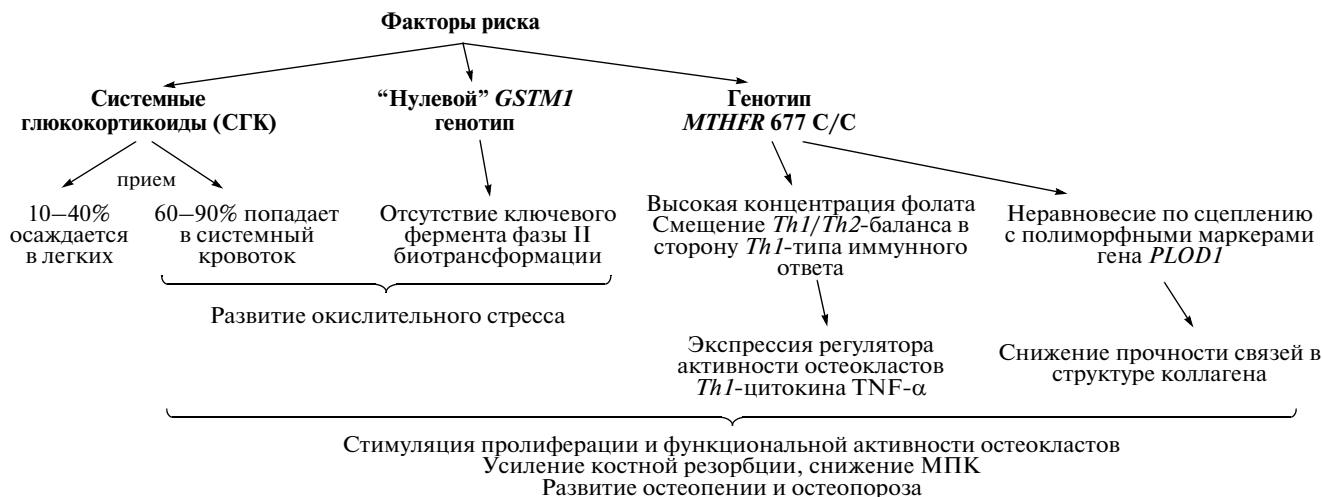


Рис. 8. Патогенетические пути развития глюкокортикоид-индуцированного остеопороза у больных бронхиальной астмой, длительно получавших системные глюкокортикоиды.

тических факторов предрасположенности к ГИ-остеопорозу, в том числе, анализ полиморфизма в генах цитокинов и рецепторов стероидных гормонов, позволит определить все прогностически значимые генетические факторы риска развития осложнений на фоне длительной гормональной терапии БА и, следовательно, разработать верную стратегию применения глюкокортикоидов при БА посредством стандартизации схем ведения больных в соответствии с генетическим статусом.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (08-04-12225-офи) и ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007–2013 годы" (ГК 16.552.11.7034).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- van Staa T.P. 2006. The pathogenesis, epidemiology and management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Calcif. Tissue Int.* **79**, 129–137.
- Kanis J.A., Stevenson M., McCloskey E.V., Davis S., Lloyd-Jones M. 2007. Glucocorticoid-induced osteoporosis: a systematic review and cost-utility analysis. *Health Technol. Assess.* **11**, 1–231.
- Zikan V. 2007. Glucocorticoids and osteoporosis. *Vnitr. Lek.* **53**, 831–840.
- De Nijs R.N. 2008. Glucocorticoid-induced osteoporosis: a review on pathophysiology and treatment options. *Minerva Med.* **99**, 23–43.
- Чучалин А.Г., Баранова И.А., Москаленко М.В., Путилин А.М., Асеев М.В., Иващенко Т.Э., Дёмин Н.В., Гораб Д.Н. 2006. Изучение генетической предрасположенности к глюкокортикоид-индуцированному остеопорозу у больных тяжелой бронхиальной астмой. *Вестник РГМУ.* **4**, 39–43.
- Jin H., van't Hof R.J., Albagha O.M., Ralston S.H. 2009. Promoter and intron 1 polymorphisms of *COL1A1* interact to regulate transcription and susceptibility to osteoporosis. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2729–2738.
- Fang Y., van Meurs J.B., Arp P., van Leeuwen J.P., Hofman A., Pols H.A., Uitterlinden A.G. 2009. Vitamin D binding protein genotype and osteoporosis. *Calcif. Tissue Int.* **85**, 85–93.
- Müller B. 2002. Cytokine imbalance in non-immunological chronic disease. *Cytokine.* **18**, 334–339.
- Lane N.E., Yao W. 2009. Developments in the scientific understanding of osteoporosis. *Arthritis Res. Ther.* **11**, 228.
- Валеева И.Х., Зиганшина Л.Е., Бурнашова З.А., Зиганшин А.У. 2002. Влияние димефосфона и ксидифона на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты крыс, длительно получавших преднизолон. *Эксп. клин. фармакология.* **65**, 40–43.
- Bjelaković G., Beninati S., Pavlović D., Kocić G., Jevtović T., Kamenov B., Saranac L.J., Bjelaković B., Stojanović I., Basić J. 2007. Glucocorticoids and oxidative stress. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **18**, 115–127.
- Surapaneni K.M., Venkataramana G. 2007. Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with osteoarthritis. *Indian J. Med. Sci.* **61**, 9–14.
- Урозова О.И., Кравец Е.Б., Новицкий В.В., Роголёва А.В., Васильева О.А., Кузнецова В.Н., Недосекова Ю.В. 2008. Активность перекисного окисления липидов и системы глутатиона в лимфоцитах у больных диффузным токсическим зобом. *Бюлл. сибирской мед.* **4**, 47–51.
- Bagnyukova T.V., Powell C.L., Pavliv O., Tryndyak V.P., Pogribny I.P. 2008. Induction of oxidative stress and DNA damage in rat brain by a folate/methyl-deficient diet. *Brain Res.* **1237**, 44–51.
- Глотов А.С., Наседкина Т.В., Иващенко Т.Э., Юрасов Р.А., Суржииков С.А., Паньков С.В., Чуудинов А.В., Баранов В.С., Заседателев А.С. 2005.

- Создание биочипа для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации. *Молекуляр. биология.* **39**, 403–412.
16. Гра О.А., Кожекбаева Ж.М., Скотникова О.И., Литвинов В.И., Наседкина Т.В. 2010. Анализ генетической предрасположенности к туберкулезу легких в русской популяции. *Генетика.* **46**, 262–271.
 17. Кулес В.Г. 2004. *Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты.* М.: Реафарм.
 18. Гра О.А., Глотов А.С., Кожекбаева Ж.М., Макарова О.В., Наседкина Т.В. 2008. Генетический полиморфизм *GST*, *NAT2* и *MTRR* и предрасположенность к развитию острого лейкоза у детей. *Молекуляр. биология.* **42**, 214–225.
 19. Gra O.A., Glotov A.S., Nikitin E.A., Glotov O.S., Kuznetsova V.E., Chudinov A.V., Sudarikov A.B., Nasedkina T.V. 2008. Polymorphisms in xenobiotic-metabolizing genes and the risk of chronic lymphocytic leukemia and Non-Hodgkin's lymphoma in adult Russian patients. *Am. J. Hematol.* **83**, 279–287.
 20. Cole T.J., Mollard R. 2007. Selective glucocorticoid receptor ligands. *Med. Chem.* **3**, 494–506.
 21. Schwahn B., Rozen R. 2001. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences. *Am. J. Pharmacogenomics.* **1**, 189–201.
 22. Colin D.S., Pauline M.E., Sarah J.L., George D.S., Tobias J.H. 2009. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T polymorphism is associated with spinal BMD in 9-year-old children. *J. Bone Miner. Res.* **24**, 117–124.
 23. Abrahamsen B., Jorgensen H.L., Nielsen T.L., Andersen M., Haug E., Schwarz P., Hagen C., Brixen K. 2006. *MTHFR* c. 677 C>T polymorphism as an independent predictor of peak bone mass in Danish men—results from the Odense Androgen Study. *Bone.* **38**, 215–219.
 24. Yazdanpanah N., Zillikens M.C., Rivadeneira F., de Jong R., Lindemans J., Uitterlinden A.G., Pols H.A., van Meurs J.B. 2007. Effect of dietary B vitamins on BMD and risk of fracture in elderly men and women: The Rotterdam study. *Bone.* **41**, 987–994.
 25. Hong X., Hsu Y.H., Terwedow H., Tang G., Liu X., Jiang S., Xu X., Xu X. 2007. Association of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and fracture risk in Chinese postmenopausal women. *Bone.* **40**, 737–742.
 26. Hussain I., Kline J.N. 2004. DNA, the immune system, and atopic disease. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **9**, 23–28.
 27. Husemoen L.L., Toft U., Fenger M., Jørgensen T., Johansen N., Linneberg A. 2006. The association between atopy and factors influencing folate metabolism: is low folate status causally related to the development of atopy? *Int. J. Epidemiol.* **35**, 954–961.
 28. Jørgensen H.L., Madsen J.S., Madsen B., Saleh M.M., Abrahamsen B., Fenger M., Lauritzen J.B. 2002. Association of a common allelic polymorphism (C677T) in the methylene tetrahydrofolate reductase gene with a reduced risk of osteoporotic fractures. A case control study in Danish postmenopausal women. *Calcif. Tissue Int.* **71**, 386–392.