

Оригинальные работы

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ Pro12Ala и C1431T PPAR γ В РАЗВИТИИ ЭНДОКРИННОЙ ОФТАЛЬМОПАТИИ

Серкин Д.М., Серебрякова О.В., Серкин М.А.,
Харинцева С.В., Страмбовская Н.Н., Дагбаева С.Д.

ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия»

Серкин Д.М. – ассистент кафедры госпитальной терапии и эндокринологии, ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия»; Серебрякова О.В. – доктор мед. наук, заведующая кафедрой госпитальной терапии и эндокринологии, ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия»; Серкин М.А. – кандидат мед. наук, ассистент кафедры пропедевтики внутренних болезней, ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия»; Харинцева С.В. – доктор мед. наук, доцент, заведующая кафедрой офтальмологии и оториноларингологии, ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия»; Страмбовская Н.Н. – кандидат мед. наук, заведующая лабораторией молекулярной генетики, НИИ молекулярной медицины, ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия»; Дагбаева С.Д. – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики, НИИ молекулярной медицины, ГБОУ ВПО «Читинская государственная медицинская академия».

Цель исследования: изучить связь полиморфизмов Pro12Ala и C1431T PPAR γ с развитием эндокринной офтальмопатии (ЭОП).

Материал и методы. Обследовано 88 человек: 52 пациента с ЭОП и 36 здоровых лиц. Определяли полиморфизмы Pro12Ala и C1431T PPAR γ методом ПЦР.

Результаты. При ЭОП чаще встречаются гомозиготные генотипы Pro/Pro и Ala/Ala ($\chi^2 = 6,035$, $p = 0,049$) и аллель Ala ($\chi^2 = 15,062$, $p < 0,001$) полиморфизма Pro12Ala; генотипы C/C и T/T ($\chi^2 = 28,34$, $p < 0,001$), аллель C ($\chi^2 = 15,06$, $p < 0,001$) полиморфизма C1431T PPAR γ , чем в контроле. Относительный риск развития ЭОП при Ala/Ala-генотипе равен 1,73 (95% ДИ, 1,45–2,08), при C/T-генотипе – 0,61 (95% ДИ, 0,39–0,96). Отношение шансов при C/T-генотипе у пациентов с ЭОП составляет 0,33 (95% ДИ, 0,13–0,82).

Ключевые слова: эндокринная офтальмопатия, PPARG, Pro12Ala, C1431T.

Polymorphism of Pro12Ala and C1431T PPAR γ in the pathogenesis of Graves' orbitopathy

Serkin D.M., Serebryakova O.V., Serkin M.A.,
Charinzeva S.V., Strambovskaia N.N., Dagbaeva S.D.

State Medical Academy of Chita

To examine the association of polymorphisms Pro12Ala and C1431T PPAR γ with the development of thyroid eye disease (TEO). Materials and methods. A total of 88 people: 52 patients with TEO, 36 – healthy individuals. Identified polymorphisms Pro12Ala and C1431T PPAR γ by PCR. Results. In more common TEO homozygous genotypes Pro/Pro and Ala/Ala ($\chi^2 = 6,035$, $p = 0,049$) and allele Ala ($\chi^2 = 15,062$, $p < 0,001$) polymorphism Pro12Ala; genotypes C/C and T/T ($\chi^2 = 28,34$, $p < 0,001$), the allele C ($\chi^2 = 15,06$, $p < 0,001$) polymorphism C1431T PPAR γ , than in the control. The relative risk of TEO in the Ala/Ala genotype of 1.73 (95% CI, 1.45–2.08), with C/T genotype of 0.61 (95% CI, 0.39–0.96). The odds ratio for C/T genotype in patients with TEO 0.33 (95% CI, 0.13–0.82).

Key words: thyroid eye disease, endocrine ophthalmopathy, Graves' ophthalmopathy, PPARG, Pro12Ala, C1431T.

Введение

Эндокринная офтальмопатия (ЭОП) – самостоятельное заболевание, которое характеризуется прогрессирующим иммуномедиаторным воспалением в экстраокулярных мышцах, ретробульбарной клетчатке, слезной железе [3, 5]. Особенностью ЭОП

является взаимосвязь аутоиммунного поражения тканей орбиты с патологией щитовидной железы, сопровождающейся нарушениями ее функции [3, 4]. Аутоагрессия в ретробульбарном пространстве приводит как к утолщению глазодвигательных мышц с возможным нарушением их функции, так и к уве-

Для корреспонденции: Серкин Дмитрий Михайлович – 672090, Чита, ул. Горького, 39А, кафедра госпитальной терапии и эндокринологии. Тел.: 3022-31-43-08, +7-924-270-34-94 (моб.). E-mail: serkind@yandex.ru

личению в объеме орбитальной клетчатки, что вызывает основные клинические проявления ЭОП: экзофтальм, диплопию, фиксацию глазного яблока [4, 7]. Инструментально диагноз ЭОП обычно подтверждают утолщением и повышением рентгеновской плотности глазодвигательных мышц, также часто обнаруживается увеличение рентгеновской плотности ретробульбарной клетчатки [6, 9].

По одним источникам, заболеваемость ЭОП составляет 16 женщин и 2,9 мужчин на 100 000 населения, по другим — достигает 0,8–1,2% в популяции [3, 4, 5]. Ежегодное выявление тиреотоксикоза среди всей популяции населения в мире достигает 2%, ЭОП развивается у 40–60% из них [3, 4]. Глазные симптомы могут появляться как до клинического проявления тиреотоксикоза, так и сопутствовать ему или возникать спустя многие годы [3]. Тяжелые формы в структуре ЭОП обычно не превышают 3–5% всех случаев [10, 16].

В настоящее время немаловажная роль отводится процессу адипогенеза в развитии эндокринной офтальмопатии [5, 11, 12]. Орбитальные фибробласты и субпопуляция преадипоцитов при иммунной стимуляции дифференцируются в зрелые адипоциты, что способствует увеличению объема орбитальной клетчатки [13, 15]. В биоптатах ретробульбарной ткани, взятой у больных ЭОП, имеется в 44,2 раза повышенная экспрессия гена PPAR γ по сравнению с ретробульбарной клетчаткой практически здоровых лиц [12]. Значение PPAR γ в механизме развития ЭОП подтверждается и клиническими наблюдениями [14].

Также имеются данные об изменении содержания белка теплового шока 90 кДа при ЭОП, который участвует в функционировании суперсемейства стероидных рецепторов, к которым относится и PPAR γ [8].

В связи с этим представляет большой клинический и теоретический интерес значение вклада точечных мутаций PPAR γ в развитие ЭОП. Для молекулярно-генетического исследования были выбраны следующие точечные мутации: PPAR γ (Pro12Ala) и PPAR γ (C1431T).

Материал и методы

Было обследовано 52 больных ЭОП в возрасте 48 [33; 55] лет. Мужчин было 10 (19,2%). Контрольная группа представлена 36 здоровыми лицами, сопоставимыми по полу и возрасту.

Критерии включения в исследование: пациенты с ЭОП, в любую фазу заболевания и любой степени тяжести, вне зависимости от наличия или отсутствия сопутствующих заболеваний щитовидной железы, в возрасте 15–71 лет. Диагноз ЭОП выставлялся на

основании клинической картины, подтверждался при проведении компьютерной томографии орбит (утолщение и/или увеличение рентгеновской плотности глазодвигательных мышц, изменение плотности ретробульбарной клетчатки, уменьшение расстояния между межскуловой линией и задним полюсом глазного яблока) и был подтвержден осмотром офтальмолога.

Молекулярно-генетическое тестирование ДНК выполнялось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в крови и включало исследование полиморфизмов гена PPAR γ : Pro12Ala, C1431T.

Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи программы Statistica 6.1. Генотипы и аллели анализировались при помощи критерия хи-квадрат (χ^2). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Вычислялись отношение шансов (ОШ) и относительный риск (ОР) развития ЭОП при наличии различных аллелей и генотипов. Для определения частот аллельных вариантов генов применялись закон Харди–Вайнберга и формула Харди–Вайнберга.

Результаты

Распространенность генотипов мутации PPAR γ (Pro12Ala) в контрольной группе составила: нормальная гомозигота (Pro/Pro) — 77,8%, гетерозигота (Pro/Ala) — 22,2%, мутантная гомозигота (Ala/Ala) не встречалась.

В исследуемой группе распространенность генотипов мутации PPAR γ (Pro12Ala) была представлена следующим образом: нормальная гомозигота (Pro/Pro) — 78,8%, гетерозигота (Pro/Ala) — 15,4%, мутантная гомозигота (Ala/Ala) — 5,8%, статистически значимо отличаясь от контрольной группы ($\chi^2 = 6,035$, $p = 0,049$). В группе пациентов с ЭОП чаще встречались гомозиготные генотипы Pro/Pro и Ala/Ala, а в контрольной группе — гетерозиготный генотип Pro/Ala.

Частота аллеля Pro в контрольной группе составила 88,9%, частота аллеля Ala — 11,1%. Частота аллеля Pro в изучаемой группе составила 86,5%, частота аллеля Ala — 13,5%, статистически значимо отличаясь от контрольной группы ($\chi^2 = 15,062$, $p < 0,001$). Среди обследованных пациентов с ЭОП по сравнению с контролем реже встречался нормальный аллель Pro и чаще — мутантный аллель Ala.

У носителей аллеля Pro вычисляли ОР развития заболевания: ОР = 0,92 (95% ДИ, 0,65–1,29), ОШ составило 0,8 (95% ДИ, 0,32–2,03).

ОР развития ЭОП в группе носительства патологического аллеля Ala был в 1,09 раза выше (95% ДИ, 0,77–1,53), чем среди лиц с нормальным аллельным вариантом, ОШ = 1,24 (95% ДИ, 0,49–3,14).

Таблица 1. Распространенность генотипов и аллелей мутации PPAR γ (Pro12Ala) в исследуемой и контрольной группах, относительный риск и отношение шансов

	Пациенты с ЭОП (n = 52)	Контроль (n = 36)	ОР (95% ДИ)	ОШ (95% ДИ)	χ^2	p
Pro/Pro	41 (78,8%)	28 (77,8%)	0,96 (0,65–1,52)	0,9 (0,33–2,46)	6,035	0,049
Pro/Ala	8 (15,4%)	8 (22,2%)	0,82 (0,48–1,38)	0,64 (0,21–1,89)		
Ala/Ala	3 (5,8%)	–	1,73 (1,45–2,08)	5,16 (0,26–103,04)	15,062	<0,001
Аллель Pro	90 (86,5%)	64 (88,9%)	0,92 (0,65–1,29)	0,8 (0,32–2,03)		
Аллель Ala	14 (13,5%)	8 (11,1%)	1,09 (0,77–1,53)	1,24 (0,49–3,14)		

Примечание: n – количество обследованных, ОР – относительный риск, ОШ – отношение шансов, ДИ – доверительный интервал, χ^2 – хи-квадрат, p – уровень значимости различий между группами.

Таблица 2. Распространенность генотипов и аллелей мутации PPAR γ (C1431T) в исследуемой и контрольной группах, относительный риск и отношение шансов

	Пациенты с ЭОП (n = 52)	Контроль (n = 36)	ОР (95% ДИ)	ОШ (95% ДИ)	χ^2	p
C/C	30 (57,7%)	15 (41,7%)	1,3 (0,91– 1,86)	1,9 (0,81– 4,52)	28,34	<0,001
C/T	13 (25%)	18 (50%)	0,61 (0,39– 0,96)	0,33 (0,13– 0,82)		
T/T	9 (17,3%)	3 (8,3%)	1,33 (0,91– 1,94)	2,3 (0,58– 9,18)	15,06	<0,001
Аллель C	73 (70,2%)	48 (66,7%)	1,07 (0,81– 1,41)	1,18 (0,63– 2,25)		
Аллель T	31 (29,8%)	24 (33,3%)	0,93 (0,71– 1,23)	0,85 (0,45– 1,62)		

Примечание: n – количество обследованных, ОР – относительный риск, ОШ – отношение шансов, ДИ – доверительный интервал, χ^2 – хи-квадрат, p – уровень значимости различий между группами.

У лиц с гомозиготным Pro/Pro-генотипом ОР развития ЭОП составил 0,96 (95% ДИ, 0,65–1,42), ОШ = 0,9 (05% ДИ, 0,33–2,46) по сравнению с носителями Ala-аллеля.

ОР формирования ЭОП в группе гетерозиготного генотипа Pro/Ala составил 0,82 (95% ДИ, 0,48–1,38) в сравнении с лицами с гомозиготными вариантами генотипа, ОШ = 0,64 (95% ДИ, 0,21–1,89).

У лиц, являющихся мутантными гомозиготами Ala/Ala, ОР возникновения ЭОП был равен 1,73 (95% ДИ, 1,45–2,08) в сравнении с носителями Pro/Pro и Pro/Ala, ОШ = 5,16 (95% ДИ, 0,26–103,04).

Статистически значимое повышение риска развития ЭОП имели лишь лица, являющиеся мутантными гомозиготами полиморфизма Pro12Ala.

Распространенность генотипов мутации PPAR γ (C1431T) в контрольной группе: нормальная гомозигота (Cys/Cys) – 57,7%, гетерозигота (Cys/Thr) – 25%, мутантная гомозигота (Thr/Thr) – 17,3%.

В исследуемой группе распространенность генотипов мутации PPAR γ (C1431T) представлена следу-

ющим образом: нормальная гомозигота (Cys/Cys) – 57,7%, гетерозигота (Cys/Thr) – 25%, мутантная гомозигота (Thr/Thr) – 17,3%, статистически значимо отличаясь от контрольной группы ($\chi^2 = 28,34$, $p < 0,001$).

В группе пациентов с ЭОП чаще встречались гомозиготные генотипы Cys/Cys и Thr/Thr, а в контрольной группе гетерозиготный генотип Cys/Thr встречался в 2 раза чаще, чем в исследуемой.

Частота аллеля Cys в контрольной группе составила 66,7%, частота аллеля Thr – 33,3%. Частота аллеля Cys в изучаемой группе составила 70,2%, частота аллеля Thr – 29,8%, статистически значимо отличаясь от контрольной группы ($\chi^2 = 15,06$, $p < 0,001$). Среди обследованных пациентов с ЭОП по сравнению с контролем чаще встречался нормальный аллель Cys и реже – мутантный аллель Thr.

Рассчитывался ОР развития ЭОП в группе носительства нормального аллеля Cys – он был в 1,07 раза выше (95% ДИ, 0,81–1,41), чем среди лиц с мутантным аллельным вариантом, ОШ = 1,18 (95% ДИ, 0,62–2,25).

Вычисляли ОР возникновения ЭОП у лиц – носителей мутантного аллеля Thr по сравнению с носителями нормального аллеля: ОР = 0,93 (95% ДИ, 0,71–1,23) при ОШ = 0,85 (95% ДИ, 0,45–1,62).

Для нормальных гомозигот Cys/Cys мутации С1431Т гена PPAR γ высчитывали ОР возникновения ЭОП: ОР = 1,3 (95% ДИ, 0,91–1,86), ОШ = 1,9 (95% ДИ, 0,81–4,52).

Находили ОР развития ЭОП в группе гетерозиготного генотипа Cys/Thr, ОР = 0,61 (95% ДИ, 0,39–0,96) в сравнении с лицами с гомозиготными вариантами генотипа, ОШ = 0,33 (95% ДИ, 0,13–0,82). Таким образом, гетерозиготный генотип Cys/Thr мутации PPAR γ (С1431Т) можно расценивать в качестве протективного фактора развития ЭОП.

У лиц, являющихся мутантными гомозиготами Thr/Thr, повышен риск развития ЭОП: ОР = 1,33 (95% ДИ, 0,91–1,94) при ОШ = 2,3 (95% ДИ, 0,58–9,18).

Обсуждение

Медиана возраста лиц с ЭОП в нашем исследовании составила 48 [33; 55] лет, пик заболеваемости пришелся на 44–57 лет, что достаточно точно согласуется с литературными сведениями [4, 5, 16]. Согласно данным других авторов, пики заболеваемости ЭОП могут приходиться на 40–50 и 60–70 лет [4, 16], средний возраст больных составляет от 35 до 59 лет [5].

В нашей работе ЭОП чаще страдали женщины, как и в работах других исследователей [4, 5, 7, 16]. Считается, что женский пол характеризуется в 2,7–5,25 раза большим риском развития заболевания [3, 4].

Обнаруженные нами отличия в распространенности генотипов и аллелей полиморфизмов Pro12Ala и С1431Т PPAR γ у пациентов с ЭОП позволяют говорить о генетической предрасположенности развития заболевания у определенной когорты лиц. Для более точной оценки вклада генотипа и аллеля каждого полиморфизма для них рассчитывали ОР и ОШ развития ЭОП.

Для полиморфизма Pro12Ala PPAR γ нами было обнаружено статистически значимое повышение риска развития ЭОП в 1,73 раза среди лиц – носителей Ala/Ala-генотипа. Считается, что аллель Ala ассоциирован со снижением активности PPAR γ [1]. Имеются литературные данные об ассоциации мутантного гомозиготного состояния Ala/Ala полиморфизма Pro12Ala PPAR γ с развитием различных заболеваний и состояний [1], другие авторы обнаруживают связь нормального гомозиготного состояния Pro/Pro с возникновением болезней [2]. Вероятно, генотип Ala/Ala полиморфизма Pro12Ala PPAR γ повышает чувствительность PPAR γ к субстратам, что приводит

к стимуляции трансформации орбитальных фибробластов и способствует формированию ЭОП.

Для полиморфизма С1431Т PPAR γ в нашей работе найден протективный гетерозиготный генотип Cys/Thr. Наличие генотипа Cys/Thr полиморфизма С1431Т PPAR γ снижает риск возникновения ЭОП в 1,63 раза. Вероятно, гетерозиготное состояние гена реализуется в PPAR γ -рецепторы с различной чувствительностью к субстратам, что и уменьшает патологические стимулирующие влияния, и препятствует трансформации орбитальных фибробластов в адипоциты. Таким образом, вероятно, снижается риск развития ЭОП.

Выводы

При ЭОП обнаружены отличия во встречаемости генотипов и аллелей полиморфизмов Pro12Ala и С1431Т PPAR γ . Выявлены генотипы, изменяющие риск развития ЭОП. Наличие генотипа Ala/Ala Pro12Ala PPAR γ способствует повышению риска развития заболевания, а при генотипе Cys/Thr С1431Т PPAR γ – его снижению. Статистически значимого влияния различных аллелей полиморфизмов Pro12Ala и С1431Т PPAR γ на риск развития ЭОП не выявлено.

Работа выполнена в рамках гранта Президента РФ
МД-4448.2013.7.

Список литературы

1. Александрова НВ, Донникова АЕ. Использование современных ДНК-технологий в прогнозировании акушерских осложнений при беременности высокого риска. Мать и дитя в Кузбассе. 2012;48(1):42-46.
2. Бондарь ИА, Шабельникова ОЮ, Филиппенко МЛ, Соколова ЕА. Ассоциация полиморфных маркеров гена PPAR γ Pro12Ala с сахарным диабетом 2 типа в Новосибирской области. VI Всероссийский диабетологический конгресс. Сборник тезисов. М., 2013;47.
3. Бровкина АФ. Болезни орбиты: Руководство для врачей. 2-е изд. М.: ООО “Медицинское информационное агентство”, 2008. 256 с.
4. Бровкина АФ. Эндокринная офтальмопатия. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 184 с.
5. Петунина НА, Трухина ЛВ, Мартиросян НС. Эндокринная офтальмопатия: современный взгляд. Проблемы эндокринологии. 2012;6:24-32.
6. Серкин ДМ, Серебрякова ОВ, Просяник ВИ и др. Рентгенологическая характеристика эндокринной офтальмопатии в условиях Забайкалья. Кубанский научный медицинский вестник. 2011;1:145-148.
7. Серкин ДМ, Серебрякова ОВ, Просяник ВИ. Клиническая характеристика эндокринной офтальмопатии в Забайкалье. Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. 2011;9(1):168-171.

8. Серкин ДМ, Серебрякова ОВ, Харинцева СВ, Харинцев ВВ. Система сывороточных белков теплового шока при эндокринной офтальмопатии [Электронный ресурс]. Забайкальский медицинский вестник. 2013;1:57-61. Режим доступа: <http://medacadem.chita.ru/zmv> (18 апр. 2013).
9. Шеремета МС, Свириденко НЮ, Ремизов ОВ и др. Клинико-рентгенологические взаимоотношения при эндокринной офтальмопатии. Клиническая и экспериментальная тиреология. 2009;5(1):53-57.
10. Bartalena L, Pinchera A, Marcocci C. Management of Graves' ophthalmopathy: reality and perspectives. *Endocrinol Rev.* 2000;21(2): 168-199.
11. Debril MB, Renaud JP, Fajas L, Auwerx J. The pleiotropic functions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Mol Med (Berl).* 2001;79(1):30-47.
12. Kumar S, Coenen MJ, Scherer PE, Bahn RS. Evidence for enhanced adipogenesis in the orbits of patients with Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(2):930-935.
13. Sorisky A, Pardasani D, Gagnon A, Smith TJ. Evidence of adipocyte differentiation in human orbital fibroblasts in primary culture. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(9):3428-3431.
14. Starkey K, Heufelder A, Baker G et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in thyroid eye disease: contraindication for thiazolidinedione use? *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(1): 55-59.
15. Valyasevi RW, Harteneck DA, Dutton CM, Bahn RS. Stimulation of adipogenesis, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma), and thyrotropin receptor by PPARgamma agonist in human orbital preadipocyte fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(5):2352-2358.
16. Wiersinga W, Bartalena L. Epidemiology and prevention of Graves' ophthalmopathy. *Thyroid.* 2002;12:855-860.