

© РУЖИЛО О.С., ДИВАКОВА Т.С., 2013

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ, АКТИВИРУЮЩИХ ПРОЛИФЕРАЦИЮ ПЕРОКСИСОМ PPAR α И PPARGC1A, НА РАЗВИТИЕ СИНДРОМА ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ

РУЖИЛО О.С.*, ДИВАКОВА Т.С.**

УО «Полесский государственный университет»*

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»**

Резюме. Цель исследования - изучение вклада полиморфизма генов, кодирующих PPAR α и PPARGC1A, в развитие синдрома поликистозных яичников (СПКЯ) у женщин репродуктивного возраста в белорусской популяции.

Нами проведено исследование методом случай-контроль 120 женщин. Основная группа включала 60 пациенток с синдромом поликистозных яичников (СПКЯ), группа сравнения состояла из 60 здоровых женщин. Молекулярно-генетическое исследование проводилось методом ПЦР и ПДРФ анализа.

Аллели со сниженной функциональной активностью генов PPAR α (rs4253778) и PPARGC1A (rs8192678) встречаются чаще у пациенток с СПКЯ (PPAR α : $\chi^2=12,87$, OR 2,87 (95% CI 1,60-5,52), $p<0,001$; PPARGC1A: $\chi^2=19,1$, OR 3,78 (95% CI 2,05-6,94), $p<0,001$). Носительство аллеля С гена PPAR α и аллеля А гена PPARGC1A рассматриваются как ассоциированные с СПКЯ.

Ключевые слова: синдром поликистозных яичников, гены PPAR α , PPARGC1A, генетический полиморфизм.

Abstract. The objective of the present investigation was to study the contribution of polymorphism of the genes coding PPAR α and PPARGC1A to the development of polycystic ovary syndrome (PCOS) in women of the reproductive age living in Belarus.

We investigated 120 women using the case-control study method. The main group included 60 women with polycystic ovary syndrome (PCOS), and the control group included 60 healthy women. Molecular-genetic research was conducted using PCR-RFLP analysis. PCOS patients more frequently than controls were carriers of alleles with reduced functional genes activity (PPAR α (rs4253778): $\chi^2=12,87$, OR 2,87 (95% CI 1,60-5,52), $p<0,001$; PPARGC1A (rs8192678): $\chi^2=19,1$, OR 3,78 (95% CI 2,05-6,94), $p<0,001$).

Carriage of allele C of the gene PPAR α and that of allele A of the gene PPARGC1A are considered as associated with PCOS.

Key words: polycystic ovary syndrome, genes PPAR α and PPARGC1A, genetic polymorphism.

Более 70 лет продолжают дискуссии по вопросам этиологии и патогенеза синдрома поликистозных яичников (СПКЯ) у женщин. Несмотря на большое число предложенных теорий развития

СПКЯ, патогенез заболевания до конца не изучен. В настоящее время известно, что СПКЯ имеет семейный характер, носящий мультифакториальный тип наследования [1]. Основной перечень работ, посвященных изучению генетической этиологии СПКЯ, базируется на исследовании полиморфных вариантов возможных генов-кандидатов заболевания. Однако генетические механизмы, лежащие в осно-

Адрес для корреспонденции: 225710, г. Пинск, ул.Центральная, д.80, кв. 70. Тел.моб.: +375 (29) 169-84-85, e-mail: ruzhylo@tut.by – Ружило Ольга Сергеевна.

ве СПКЯ, несмотря на многолетние исследования, до сих пор остаются неясными [2, 3]. В настоящее время основным подходом в изучении генетической предрасположенности к определенной патологии является методика исследования полиморфизмов генов-кандидатов. Сущность подхода заключается в проверке гипотезы, связано ли наличие полиморфного варианта гена с развитием заболевания. Поиски в геноме человека полиморфизма отдельных генов или локусов, которые были бы характерны для всех пациентов с СПКЯ, пока не дали ощутимых результатов. Положительные находки касались гена FTO (ген, ассоциированный с жировой массой, rs9939609). Учитывая важную роль ожирения в этиологии СПКЯ и сахарного диабета 2 типа Barber et al. (2008) установили, что аллель А гена FTO связана с развитием СПКЯ.

Рецепторы, активирующие пролиферацию пероксисом (PPARs) — группа ядерных рецепторов, функционирующих в качестве фактора транскрипции. PPARs играют существенную роль в регуляции клеточной дифференцировки, метаболизме глюкозы и липидов. PPARs оказывают и другие эффекты – противовоспалительный, действие на яичники и плаценту, что может служить связующим звеном между обменом углеводов и липидов, воспалительным ответом и репродуктивной функцией. К эндогенным лигандам PPARs относятся свободные жирные кислоты и метаболиты арахидоновой кислоты, к экзогенными – такие лекарственные средства как тиазолидиндионы и фибраты [5, 6].

Ген PPAR α кодирует белок, имеющий свойство специфически связываться с PPAR-чувствительными элементами промоторов генов жирового и углеводного метаболизма и регулировать их транскрипцию. Среди изученных полиморфизмов PPAR α можно выделить G/C полиморфизм 7-го интрона (rs 4253778). Замена нуклеотида G на C в положении 2528 гена ассоциируется со снижением экспрессии гена, что приводит к нарушению регуляции липидного и углеводного обменов: G/G - нормальный вариант по-

лиморфизма в гомозиготной форме; G/C - гетерозиготная форма полиморфизма; C/C - мутантный вариант полиморфизма в гомозиготной форме.

PPARGC1A (коактиватор 1 α PPAR γ) в результате воздействия на транскрипционные факторы опосредованно выполняет следующие функции: повышение секреции инсулина и катаболическое воздействие на жировую массу; активацию процессов адаптивного термогенеза; стимуляцию образования митохондрий и усиление окислительных процессов; регуляцию глюконеогенеза и транспорта глюкозы; регуляцию липогенеза и др. Особый интерес среди всех обнаруженных вариаций в продукте гена PPARGC1A представляет аминокислотная замена Gly482Ser. Ее причиной является замена нуклеотида G на A в положении 1444 8-го экзона: G/G - нормальный вариант полиморфизма в гомозиготной форме; G/A - гетерозиготная форма полиморфизма; A/A - мутантный вариант полиморфизма в гомозиготной форме. 482Ser-аллель ассоциируется со снижением уровня экспрессии гена PPARGC1A и с уменьшением интенсивности окислительных процессов и митохондриального биосинтеза в клетках [7]. Для 482Ser-аллели показана связь с инсулинорезистентностью и сахарным диабетом типа 2 [8].

Цель настоящего исследования заключается в изучении вклада полиморфных вариантов генов, кодирующих PPAR α и PPARGC1A в развитие СПКЯ у женщин репродуктивного возраста в белорусской популяции.

Методы

Обследование проводилось после получения письменного информированного согласия, одобренного комиссией по биоэтике Полесского государственного университета. Основную группу составили 60 пациенток с СПКЯ, наблюдавшихся в кабинете по лечению бесплодия, невынашивания и эндокринной патологии в акушерско-гинекологическом отделении № 1 филиала «Женская консультация» г. Пин-

ска. Группа сравнения состояла из 60 здоровых женщин репродуктивного возраста. В группе сравнения не было выявлено нарушений менструальной функции, гиперандрогении и ожирения. Диагноз СПКЯ устанавливали на основании клинического обследования и инструментальных методов диагностики в соответствии с критериями «Роттердамского консенсуса по СПКЯ» (2003 г.) Европейского Общества Репродукции Человека и Эмбриологии и Американского Общества Репродуктивной Медицины после исключения другой эндокринной патологии. Для определения индекса массы тела (ИМТ) использовали стандартную формулу: ИМТ = вес, кг / рост², см. Гирсутизм определяли как избыточный рост волос в андрогензависимых зонах по шкале Ферримана-Голлвея.

Всем женщинам были проведены молекулярно-генетические исследования по стандартным методикам с использованием высокочувствительных методов: ПЦР (полимеразная цепная реакция), ПДРФ (полиморфизм длин рестриционных фрагментов) в Научно-исследовательской лаборатории лонгитудинальных исследований УО «Полесский государственный университет». ДНК выделяли из Buccal-эпителия. Для определения полиморфизма G2528C (rs4253778) гена PPAR α проводили ПЦР со следующей парой праймеров (температура отжига – 60°C):

прямой праймер:

5'-ACAATCACTCCTTAAATATGGTGG-3';

обратный праймер:

5'-AAGTAGGGACAGACAGGACCAGTA-3'.

ПЦР проводили на автоматических термоциклерах Biometra (Biometra, Germany). Продуктами амплификации в этой ПЦР являются фрагменты ДНК длиной 266 пар оснований (п.о.). Наличие замены нуклеотида G/C в 2528 положении 7-го интрона гена PPAR α создаёт сайт распознавания для эндонуклеазы TaqI. Для детекции этого полиморфизма проводили обработку продукта ПЦР рестриктазой TaqI при 65°C в течение одного часа. Анализ длины амплифицированных фрагментов и продуктов их рестрикции прово-

дили электрофоретическим разделением в агарозном геле и гель-документированием в проходящем ультрафиолетовом свете, с применением цифровой компьютерной видеосъемки на приборе GDS-8000 («UVP», США). Генотипу GG соответствуют нерестрицированные фрагменты длиной 266 п.о., генотипу GC – три фрагмента длиной 266, 215 и 51 п.о., а генотипу CC – 2 фрагмента длиной 215 и 51 п.о. (рис. 1).

Для определения полиморфизма G1444A гена PPARGC1A (rs8192678) проводили ПЦР со следующей парой праймеров (температура отжига – 58°C):

прямой праймер:

5'-TGCTACCTGAGAGAGACTTTG-3'

обратный праймер:

5'-CTTTCATCTTCGCTGTCATC-3'

Продуктами амплификации в этой ПЦР являются фрагменты ДНК длиной 260 п.о.

Наличие замены нуклеотида G/A в 1444-м положении 8-го экзона гена PPARGC1A создаёт для эндонуклеазы MspI сайт рестрикции. Для детекции этого полиморфизма проводили обработку продукта ПЦР рестриктазой MspI при 37°C в течение одного часа с последующим электрофорезом продуктов рестрикции. Генотипу AA (Ser/Ser) соответствуют нерестрицированные фрагменты длиной 260 п.о., генотипу AG (Ser/Gly) – три фрагмента длиной 260, 148 и 112 п.о., а генотипу GG (Gly/Gly) – 2 фрагмента длиной 148 и 112 п.о. (рис. 2).

Для статистической обработки полученных данных применяли программное обеспечение STATISTICA 8.0 («StatSoft Inc.», США). Значимость различий в частоте аллелей между сравниваемыми выборками определяли с использованием критерия хи-квадрат или точного теста Фишера. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Обследование 60 пациенток с СПКЯ показало, что все они независимо от массы тела имели нарушения менструального цикла, которые дебютировали с менар-

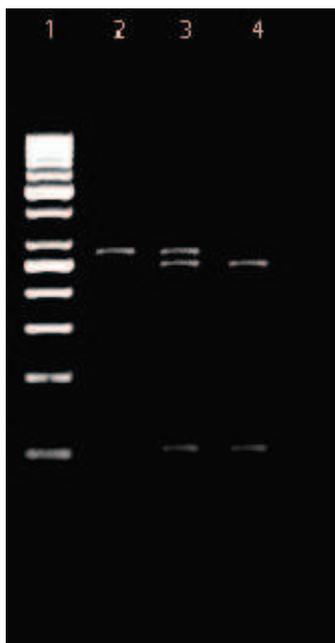


Рис. 1. Электрофореграмма результатов ПЦР-ПДРФ анализа полиморфизма G2528C гена PPAR α .

Дорожки: 1 – ДНК-маркер молекулярных масс (шаг 50 п.о., CarlRoth); 2 – продукт амплификации и рестрикции ДНК индивидуума с генотипом GG; 3 – продукт амплификации и рестрикции ДНК индивидуума с генотипом GC; 4 – продукт амплификации и рестрикции ДНК индивидуума с генотипом CC.

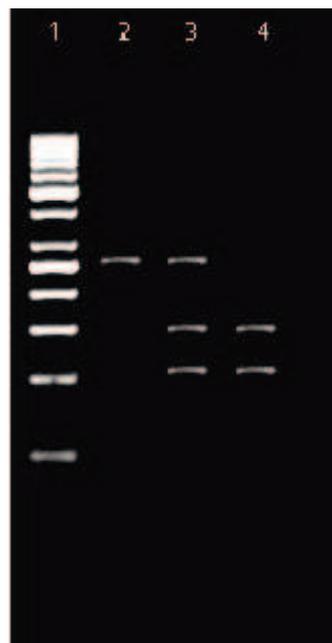


Рис. 2. Электрофореграмма результатов ПЦР-ПДРФ анализа полиморфизма G1444A гена PPARGC1A.

Дорожки: 1 – ДНК-маркер молекулярных масс (шаг 50 п.о., CarlRoth); 2 – продукт амплификации и рестрикции ДНК индивидуума с генотипом AA; 3 – продукт амплификации и рестрикции ДНК индивидуума с генотипом AG; 4 – продукт амплификации и рестрикции ДНК индивидуума с генотипом GG.

хе у 80% пациенток. Вторичная аменорея отмечена в анамнезе у 11,7% пациенток с СПКЯ.

У большинства пациенток с СПКЯ отмечался гирсутизм: у 20% гирсутное число более 12 баллов, 40% женщин имели пограничное оволосение – гирсутное число 7-12 баллов. Избыток массы тела и ожирение отмечено у 26 пациенток (43,3%). Для пациенток с СПКЯ характерно избыточное отложение жира в области живота и развитие абдоминального типа ожирения. Клиническая характеристика исследуемой группы приведена в таблице 1.

Анализ распределения частот аллелей PPAR α и PPARGC1A у пациенток с СПКЯ и здоровых женщин методом построения таблиц сопряженности выявил достоверные различия в частотах аллелей (для PPAR α : $\chi^2=12,87$, OR 2,87 (95% CI 1,60-5,52), $p<0,001$; для PPARGC1A: $\chi^2=19,1$, OR 3,78 (95% CI

2,05-6,94), $p<0,001$. Аллель С PPAR α у пациенток с СПКЯ встречается в 2,2 раза чаще, чем у здоровых. Аллель А PPARGC1A в группе пациенток с СПКЯ встречается в 1,8 раза чаще, чем в группе сравнения. Эти данные сходны с полученными нами ранее на небольшой выборке и подтверждают вывод о том, что генотипы со сниженной функциональной активностью встречались чаще у пациенток с СПКЯ [9].

В исследованиях, где применяется молекулярно-генетический метод, принято обнаруженные частоты распределения полиморфных аллелей сравнивать с т.н. популяционными частотами, то есть с имеющимися в данном географическом регионе у конкретной этнической группы. К сожалению, такой информации по Республике Беларусь в международных базах данных нет, поэтому мы использовали данные о частоте генотипов PPAR α в русской попу-

Таблица 1

Клиническая характеристика пациенток с синдромом поликистозных яичников (СПКЯ)

Показатель	Пациентки с СПКЯ (n=60)	%
Олигоменорея	49	81,7
Вторичная аменорея	7	11,7
Поликистозные яичники при ультразвуковом исследовании	53	88,3
Признаки гиперандрогении		
- Гирсутное число ≥ 12	12	20
- Акне	16	26,8
- Жирная себорея	31	51,7
Бесплодие	50	83,3
Избыток массы тела (ИМТ > 25 кг/м ²)	17	28,3
Ожирение (ИМТ > 30 кг/м ²)	9	15
Окружность талии > 80 см	26	43,3

Таблица 2

Распределение частот генотипов PPAR α у пациенток с СПКЯ, здоровых женщин и в русской популяции

Аллели и генотипы	СПКЯ		Группа сравнения		Русская популяция (Ahmetov Ildus I. et al., 2006), %
	n=60	%	n=60	%	
Генотипы					
GG	2	3,3	33	55	70
GC	53	88,3	26	43,3	27,3
CC	5	8,3	1	1,7	2,7
Аллели					
G	57	47,5	92	76,7	83,6
C	63	52,5	28	23,3	16,4

Таблица 3

Распределение частот генотипов PPARGC1A у пациенток с СПКЯ и в группе здоровых женщин

Аллели и генотипы	СПКЯ		Группа сравнения	
	n=60	%	n=60	%
Генотипы				
GG	2	3,3	28	46,7
GA	51	85	29	48,3
AA	7	11,7	3	5
Частота аллели				
G	55	45,8	85	70,8
A	65	54,2	35	29,2

ляции (размер выборки 1242 человека) [10]. При сравнении частот генотипов у здоровых индивидуумов в русской популяции и в группе сравнения статистически значимых различий не выявлено ($\chi^2=1,56$, $p=0,2842$). База данных ALFRED Йельского универ-

ситета (США) содержит информацию о частотах аллелей гена PPARGC1A в эстонской популяции (A - 0,251; G - 0,749, размер выборки 1884 человека), русской популяции (A - 0,300; G - 0,700, размер выборки 50 человек), французской популяции (A

- 0,400; G – 0,600, размер выборки 58 человек), итальянской популяции (A - 0,350; G – 0,650, размер выборки 26 человек), адыгейской популяции (A - 0,380; G – 0,620, размер выборки 34 человека) [11]. Несмотря на небольшие размеры сравниваемых выборок, частоты аллелей PPARGC1A в нашем исследовании в группе сравнения не имеют статистически значимых различий с частотами аллелей этого гена в других европейских популяциях ($p > 0,05$).

Заключение

Носительство аллеля С гена PPAR α и аллеля А гена PPARGC1A рассматриваются нами как ассоциированные с СПКЯ. Можно предположить, что именно дефекты регуляторных генов, таких как PPARs, являются причиной каскада метаболических и гормональных нарушений при СПКЯ. Кроме того, лечение препаратами, нормализующими углеводный и липидный обмен (бигуаниды и тиазолидиндионы), мероприятия по нормализации веса и правильное питание ведут к нормализации эндокринного статуса и восстановлению овуляции у женщин с СПКЯ.

Практические перспективы использования полученных результатов исследования заключаются в возможности прогнозировать развитие СПКЯ у девушек-подростков с учетом генотипа, семейного анамнеза и образа жизни, а также проводить дифференцированную терапию и корректировать питание, физическую активность, совмещая традиционные подходы и использование генетических детерминант.

Литература

1. Azziz, R. Polycystic Ovary Syndrome Is a Family Affair / Azziz R. // J Clin Endocrinol Metab. – 2008. – N 5. – P. 1579–1581.
2. The Molecular-Genetic Basis of Functional Hyperandrogenism and the Polycystic Ovary Syndrome / H. F. Escobar-Morreale [et al.] // Endocrine Reviews. – 2005. – N 2. – P. 251–282.
3. Genetic polymorphisms of FSHR, CYP17, CYP11A1, CAPN10, INSR, SERPINE1 genes in adolescent girls with polycystic ovary syndrome / T. Unsal [et al.] // J Assist Reprod Genet. – 2009. – Vol. 26. – P. 205–216.
4. Association of variants in the fat mass and obesity associated (FTO) gene with polycystic ovary syndrome / T. M. Barber [et al.] // Diabetologia. – 2008. – Vol. 51. – P. 1153–1158.
5. Nuclear Receptors of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Family in Gestational Diabetes: From Animal Models to Clinical Trials / P. Arck [et al.] // Biology of Reproduction. – 2010. – Vol. 83 – P. 168–176.
6. Yeeoufou, A. Multifaced roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at cellular and whole organism levels / A. Yeeoufou, W. Wahli // Swiss Med Wkly. – 2010. – Vol. 140. – P.13071.
7. An exonic peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 β variation may mediate the resting energy expenditure through a potential regulatory role on important gene expression in this pathway / K. Mirzaei [et al.] // J Nutrigenet Nutrigenomics. – 2012. – Vol. 5, N 2. – P. 59–71.
8. Evidence for interaction between PPARG Pro12Ala and PPARGC1A Gly482Ser polymorphisms in determining type 2 diabetes intermediate phenotypes in overweight subjects / S.M. Ruchat [et al.] // Exp Clin Endocrinol Diabetes. – 2009 Oct. – Vol. 117, N 9. – P. 455–459.
9. Ружи́ло, О.С. Роль полиморфизма генов PPAR α и PPARGC1A в развитии синдрома поликистозных яичников у женщин репродуктивного возраста в белорусской популяции. / О. С. Ружи́ло, Т.С. Дивакова // Репродуктив. здоровье. Восточная Европа. – 2012. – № 5 (23). – С. 189–192.
10. PPAR α gene variation and physical performance in Russian athletes / I. A. Ildus [et al.] // Eur J Appl Physiol. – 2006. – Vol. 97 – P. 103–108.
11. База данных ALFRED (The ALlele FREquency Database) // Йельский университет [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://alfred.med.yale.edu>. – Дата доступа : 18.02.2012.

Поступила 04.03.2013 г.

Принята в печать 05.09.2013 г.

Сведения об авторах:

Ружи́ло О.С. - старший преподаватель кафедры общей и клинической медицины УО «ПГУ»;
Дивакова Т.С. – д.м.н., профессор, зав. кафедрой акушерства и гинекологии ФПК и ПК УО «ВГМУ».