

О.В. Степанова

Харківський національний медичний університет

ПОЛІМОРФІЗМ PRO12ALA ГЕНА PPAR γ ЯК ФАКТОР РИЗИКУ НАБРЯКІВ, ІНДУКОВАНИХ РОЗІГЛІТАЗОНОМ

Ключові слова: інсулінорезистентність, ген PPAR γ , поліморфізм, тiazолідингіони, розіглітазон, набряки.

Тiazолідингіони (ТЗД) застосовують для корекції інсулінорезистентності (ІР) в осіб з діабетом 2 типу [2, 3, 14]. ТЗД — ліганди ядерного фактора транскрипції гамма, який активується проліфератором пероксисом (peroxisome proliferator activated receptor — PPAR γ). PPAR γ регулює експресію генів, що безпосередньо стосуються метаболізму ліпідів та вуглеводів [10, 13]. Препарати відносно безпечні. Розіглітазон і піоглітазон не токсичні для печінки. Випадки гепатотоксичності трапляються в одного зі 100 тис. пацієнтів [16]. Молекулярні механізми цього ефекту невідомі. Терапія ТЗД супроводжується підвищенням маси тіла на 3—5 кг дозозалежним способом та периферійними набряками [15, 16]. Збільшення маси тіла на тлі застосування ТЗД зумовлене перерозподілом вісцерального та підшкірного жиру [16]. Вісцеральна адипозна тканина відрізняється від підшкірної за морфологічними, функціональними показниками та рівнем метаболічної активності.

У клінічній практиці в 3—5 % пацієнтів, які приймають піоглітазон або розіглітазон, з'являються периферійні набряки та понад у 15 % випадків — при комбінованій терапії, яка включає інсулін або діуретики сульфанілового ряду [3, 15]. Причин побічної дії препаратів достотно невідомо, але відомо, що при набряках підвищуються концентрації факторів судинної проникності та ендотеліозалежної вазодилатації [12, 16].

Агоністи PPAR γ здатні до блокування кальцієвих каналів і стимулювання вивільнення азоту оксиду [10], що також може впливати на появу набряків у 5—10 % випадків. Агоністи PPAR γ підвищують ефект інсуліну на реабсорбцію натрію нирками [2, 5, 7—9, 17]. Набряк легенів є найпоширенішим побічним ефектом на тлі застосування антидіабетичних агентів нетiazолідингіонового ряду порівняно з ТЗД (80 проти 11 %). Застосування ТЗД іноді призводить до загострення застійної серцевої недостатності [15]. У зв'язку з цим

пацієнтів з вираженою серцевою недостатністю не включали в клінічні дослідження. ТЗД не рекомендують пацієнтам із серцевою недостатністю III—IV функціональних класів [11, 15]. Індукція глітазонами затримки рідини є вторинною щодо підвищення реабсорбції солі нирками. Клінічні дослідження довели, що підвищення реабсорбції солі нирками в колекторних протоках відбувається тому, що індуковані розіглітазоном набряки усувати спіронолактоном ліпше, ніж петльовими діуретиками [2].

Варіант Pro12Ala гена PPAR γ знижує індуковану лігандами активність PPAR γ на 30—50 % (залежно від типу клітин) [6]. Припускають, що цей тип поліморфізму причетний до розвитку побічної дії ТЗД. Підставою вважати поліморфізм Pro12Ala гена PPAR γ причетним до розвитку набряків були результати досліджень потенційних механізмів індукції набряків ТЗД та серцевої недостатності в експериментальних тварин з пошкодженим геном PPAR γ (делецією) в ниркових каналцях [18]. У них не затримується Na⁺ у відповідь на ТЗД. Результати цього експерименту доводять роль PPAR γ у затримці Na⁺. Було зроблено припущення, що поліморфізм Pro12Ala гена PPAR γ , поширеність якого в різних популяціях становить від 8 до 20 %, є важливим фактором ризику набряків [6].

Таким чином, застосування ТЗД у комбінації з іншими препаратами (інсуліном, метформіном, глобуридом, діуретиками сульфанілового ряду) в клінічній практиці у понад 15 % випадках супроводжується затримкою рідини, гемоділюцією, серцевою недостатністю. Попри властивість ТЗД підвищувати чутливість до інсуліну, коригувати порушення вуглеводного та ліпідного обміну — метаболічних порушень характерних для ІР та метаболічного синдрому (МС), застосування їх значною мірою обмежено.

Мета роботи — визначити зв'язок між поліморфізмом Pro12Ala гена PPAR γ та ризиком появи набряків у разі застосування розіглітазону.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Обстежено 85 пацієнтів з ІР та артеріальною гіпертензією II ступеня, які приймали розіглітазон протягом 24 тиж. Антропометричні дослідження включали визначення обводу талії (ОТ) та обводу стегна (ОС). ІМТ обчислювали за формулою Кетле:

$$\text{ІМТ} = \text{МТ} : (\text{зріст})^2 \quad (1),$$

де ІМТ — індекс маси тіла, кг/м², МТ — маса тіла, кг, зріст — зріст пацієнта, м².

Поліморфні варіанти гена досліджували на аналізаторі ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (Росія) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з попереднім вилученням дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) методом екстракції фенолом та хлороформом. Ампліфікацію виконували з використанням термостабільної Taq полімерази (Fermentas, Латвія) та олігонуклеотидних праймерів: ССААТТСААГСССAGTC (прямий) та GATATGTTGСАGАС — AGTGТАТСАGТGАAG-GAATCGSTTTCCG (зворотний) за умов: температура відпалу праймерів становила 66 °С для 10 циклів та 62 °С для наступних 20 циклів. Рестриктивний аналіз проводили за допомогою рестриктази BstUI (New England Biolabs, Inc., Gaithersburg, MD) кількістю 10 од./пробу протягом 4 год при 60 °С. Фрагменти ДНК (ампліфікати), отримані ПЛР, ідентифікували горизонтальним електро-

форезом в 2 % гелі агар-агар. Фрагменти візуалізували за допомогою ультрафіолетового випромінювача ЕСХ-15.М (Франція), відеосистеми GEL IMAGER-2, «НПФ Біоклон» (Росія) та програмного забезпечення GEL EXPLORER.

Рівень імунореактивного інсуліну (ІРІ) визначали імуноферментним методом за інструкцією (DRG Products), Німеччина. НОМА-ІР визначали за формулою:

НОМА-ІР = показник інсуліну натще (мкОд/мл) × показник глюкози натще (ммоль/л)/22,5.

Усім пацієнтам (за винятком осіб, у яких виявлено набряки) через 24 тиж проводили контрольне клініко-лабораторне обстеження.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

На підставі даних ПЛР, рестриктивного аналізу та горизонтального електрофорезу в агарозному гелі ідентифіковано три генотипи: Pro12 Pro (гомозиготи, рестриктивного сайту немає), гетерозиготи по сайту рестрикції (Pro12 Ala) та група гомозигот (рестриктивний сайт присутній (Ala12 Ala) (фото 1). Серед 85 обстежених з ІР та гіпертензією II ступеня генотип Ala12Ala виявлено у 2,31 %, гетерозиготи Pro12 Ala становили 23,07 % та гомозигот Pro12 Pro — 74,62 %. Розподіл алелів відповідав закону Харді — Вайнберга.

Проведено аналіз впливу розіглітазону на прояв побічного ефекту набряків в залежності від полі-

Таблиця 1. Вплив розіглітазону на збільшення маси тіла, ІМТ, зменшення ОТ та вияви периферійних набряків у чоловіків та жінок залежно від поліморфізму Pro12Ala гена PPARG, дози препарату і тривалості фармакотерапії

Показник	Pro12 Pro		Pro12Ala/Ala12 Ala	
	До лікування / після лікування		До лікування / після лікування	
Маса тіла, кг	87,3 ± 16,2	93,4 ± 15,9	88,7 ± 17,0	90,2 ± 16,1
ІМТ, кг/м ²	27,8 ± 3,1	29,4 ± 2,8	28,1 ± 3,6	29,6 ± 2,8
ОТ, см				
Жінки	86,4 ± 3,7	83,5 ± 4,0	85,1 ± 5,1	81,3 ± 4,2
Чоловіки	97,2 ± 4,3	93,6 ± 3,8	95,4 ± 5,1	89,7 ± 6,0
ІРІ, мкОд/мл	18,5 ± 6,3	14,7 ± 3,7	17,2 ± 5,3	12,7 ± 4,9
Глюкоза натще, ммоль/л	6,65 ± 0,30*	5,71 ± 0,32* P < 0,01	6,58 ± 0,40*	5,04 ± 0,39* P < 0,01
НОМА-ІР-ІРІ	5,47 ± 0,61*	3,74 ± 0,43* P < 0,001	5,03 ± 0,58*	2,84 ± 0,37* P < 0,00
Випадки появи набряків:				
через 4 тиж (4 мг/добу)	—	—	—	—
через 8 тиж (8 мг/добу)	—	—	—	—
жінки		1	—	—
чоловіки		1	—	—
через 16 тиж				
жінки		2	—	—
чоловіки		—	—	1
через 24 тиж				
жінки		2		1
чоловіки		1		1

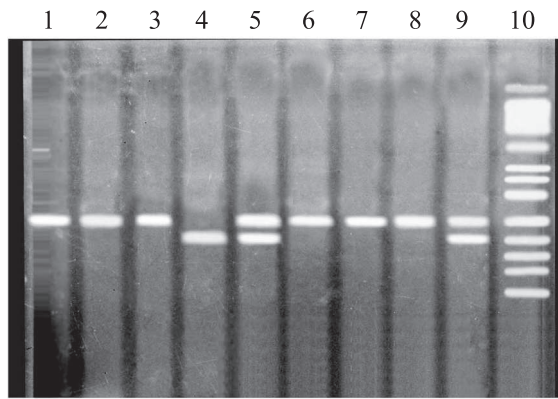


Рисунок. Електрофореграма фрагментів ДНК (ампліфікатів): 1, 2, 3, 6, 7, 8 — гомозиготи Pro12Pro (рестриктивного сайту немає); 5, 9 — гетерозиготи Pro12Ala; 4 — гомозигота Ala12Ala за рестриктивним сайтом; 10 — маркер довжини фрагментів ДНК

морфізму Pro12Ala гена *PPARG* і таких чинників, як підвищення ваги, антропометричних показників (ІМТ, обвід талії — ОТ), рівень ІРІ натще (табл. 1).

Розіглітазон спричинює незначне підвищення маси тіла, її індексу та зменшення ОТ, яке свідчить про властивість препаратів цієї групи перерозподіляти абдомінальний жир і підшкірний. Зменшуючи абдомінальний жир, що відрізняється рівнем метаболічної активності від підшкірного, розіглітазон знижує рівень адипокінів сироватки крові, які безпосередньо впливають на ІР.

Спостерігається також поліпшення глікемічного профілю — зниження рівня глюкози ($6,65 \pm 0,30$) проти ($5,71 \pm 0,32$) ммоль/л, $P < 0,01$ для Pro12Pro; ($6,58 \pm 0,30$) проти ($5,4 \pm 0,32$) ммоль/л, $P < 0,001$ для Pro12Ala/Ala12Ala); НОМА-ІР-ІРІ $5,47 \pm 0,61$ проти $3,74 \pm 0,43$, $P < 0,001$ для Pro12Pro; $5,03 \pm 0,58$ проти $2,84 \pm 0,37$, $P < 0,001$ для Pro12Ala/Ala12Ala); тенденція до зниження рівня ІРІ, що свідчить про підвищення чутливості до інсуліну (табл. 1).

Доведено, що в носіїв алеля 12Ala на 30—50 % (залежно від методу дослідження) знижена біологічна активність рецептора *PPAR γ* порівняно з гомозиготами Pro12Pro, тому припускають, що гомо-

зиготи Ala12Ala меншою мірою чутливі до індукованої агоністами затримки солі і також відносно захищені від розвитку набряків [9].

Усі випадки появи набряків, виявлених у 10 осіб, асоційовані переважно з Pro12Pro генотипом (7 проти 3 в осіб з Pro12Ala генотипом), що становить 12 % пацієнтів. Застосування розіглітазону (4 мг/добу) протягом 4 тиж не викликало побічних ефектів. Зі збільшенням дози до 8 мг/добу в наступні 4 тиж периферійні незначні набряки з'явилися у 2 осіб з генотипом Pro12Pro (одна жінка та один чоловік). Протягом наступних 8 тиж випадки появи периферичних незначних набряків відзначено у 2 жінок з генотипом Pro12Ala та одного чоловіка з генотипом Pro12Ala (табл. 1). Через 24 тиж вияви набряків були ще в 3 осіб (дві жінки й один чоловік з генотипом Pro12Pro) та у 2 пацієнтів з генотипом Pro12Ala (в одного чоловіка та однієї жінки).

Серед жінок набряки зафіксовано в шести випадках, а серед чоловіків — у 4. Затримка Na^+ в ниркових каналцях значною мірою регулюється альдостероном [4]. Таким чином, ризик набряків вищий в людей з генотипом Pro12Pro та в жінок порівняно з чоловіками (табл. 1).

Статистичний аналіз продемонстрував зниження ризику набряків у носіїв алеля Ala12 ($P = 0,05$), тоді як ІМТ ($P = 0,001$), стать ($P = 0,01$) і високі дози (понад 4 мг) ($P = 0,01$) асоціюють з підвищеним ризиком розвитку побічних ефектів — затримкою рідини та набряками. Встановлено, що серед носіїв Pro12Pro генотипу загроза набряків підвищується у 4 рази порівняно з Ala12. Збільшення маси тіла також добре відомий чинник ризику набряків (відносний ризик становить 1,198, $P = 0,0017$).

За результатами аналізу Pro12Ala генотип ідентифіковано як біологічно важливий чинник ризику появи набряку, індукованого розіглітазоном, 4,42 ($P = 0,008$); жіноча стать — ризик 3,34 ($P = 0,0005$) (табл. 2). У разі збільшення маси тіла за період лікування рівень ризику становив 1,2 ($P = 0,0017$).

Дози препарату понад 4 мг/на добу та ІМТ значною мірою збільшували ризик появи набряків.

Таким чином, при генотипі Pro12Pro ризик становив 4,42 і знижувався майже удвічі у гетерозигот Pro12Ala.

Таблиця 2. Оцінка відносного ризику набряків, індукованих агоністами *PPAR γ* в осіб з ІР

Параметр	Оцінка похибки	χ^2	P	Відносний ризик
ІМТ	0,0291	3,2883	0,0698	1,054
ОТ/ОС	0,042	4,5751	0,0567	1,217
Стать	0,3484	11,9842	0,0005	3,340
<i>PPARγ</i> Pro12Ala	0,5616	7,0081	0,0081	4,432
Δ маси тіла	0,0574	9,8722	0,0017	1,198

Примітка. ОТ/ОС — обхват талії/обхват стегна; Δ маси тіла — зміна маси тіла.

Серед осіб з набряками та генотипом Pro12Pro значну кількість становили особи з вираженою гіперінсулінемією (показник інсуліну натще перевищував 35 мкОд/мл) (90 %), ожирінням (80 %).

Поєднання значно вираженої гіперінсулінемії та ожиріння з генотипом Pro12Pro збільшують загрозу розвитку набряків порівняно з випадками тільки одного чинника. Набряки при генотипі Pro12Ala також були пов'язані з ожирінням та суттєвим підвищенням рівня ІРІ. Механізм такого взаємозв'язку невідомий, але є дані, які свідчать про підвищення ризику набряків при комбінованій терапії інсуліном та глітазонами [2, 3].

Масова частка Pro12Pro в окремих популяціях становить понад 80 %, і значна кількість носіїв цього генотипу схильні до появи набряків, індукованих агоністами PPAR γ . Для цих пацієнтів дози ТЗД не повинні перевищувати рекомендовані American Diabetes Association, American Heart Association та ВООЗ [1].

ВИСНОВКИ

Поліморфізм Pro12Ala гена PPAR γ є важливим фактором ризику набряків. Другим чинником є жіноча стать і зміна маси тіла за час лікування.

При генотипі Pro12Pro ризик набряків зростає удвічі порівняно з гетерозиготами Pro12Ala. Поєднання значно вираженої гіперінсулінемії та ожиріння з генотипом Pro12Pro збільшують загрозу розвитку набряків на відміну від випадків тільки одного чинника.

Таким чином, розіглітазон зменшує прояви ІР, може поліпшувати біохімічні показники. Визначення генотипу перед призначенням розіглітазону є важливою умовою запобігання ризику розвитку набряків. Проведені дослідження свідчать про важливість використання генотипування PPAR γ як клінічного релевантного фармакогенетичного маркера ризику розвитку набряків у разі застосування агоністів PPAR γ . Поєднання генотипу Pro12Pro з вираженою гіперінсулінемією (рівень інсуліну натще перевищував 35 мкОд/мл) та ожирінням (ІМТ > 30 кг/м²) підвищує імовірність побічної дії препарату. Для цих пацієнтів дози ТЗД не повинні перевищувати рекомендовані American Diabetes Association, American Heart Association та ВООЗ, тривалість лікування не повинна перевищувати 16 тиж. Запропоновані рекомендації дозволять знизити появу набряків на 80 %.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. A consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association: thiazolidinediones use, fluid retention, and congestive heart failure. // *Circulation*. — 2003. — Vol. 108. — P. 2941—2948.
2. Diamant M., Heine R.J. Thiazolidinediones in type 2 diabetes mellitus: current clinical evidence // *Drugs*. — 2003. — Vol. 63. — P. 1373—1405.
3. Dormandy J.A., Charbonnel B., Eckland D.J. A. On behalf of the PROactive investigators Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (Prospective Pioglitazone Clinical Trial in Macrovascular Events): a randomised controlled trial // *Lancet*. — 2005. — Vol. 366. — P. 1279—1289.
4. Goenka N., Kotonya C., Penney M.D et al. Thiazolidinediones and the renal and hormonal response to water immersion-induced volume expansion in type 2 diabetes mellitus // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* — 2008. — Vol. 294, № 4. — P. E733 — E739.
5. Guan Y.F., Hao C., Cha D.R. et al. Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPAR stimulation of ENAC-mediated renal salt absorption // *N. Med.* — 2005. — Vol. 11. — P. 861—866.
6. Hansen L., Ekstram C.T., Tabanera P.R. et al. The Pro12Ala variant of the PPAR γ gene is a risk factor for peroxisome proliferator-activated receptor- / agonist-induced edema in type 2 diabetic patients // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — Vol. 91, № 9. — P. 3446—3450.
7. Karaliedde J., Starkei G.M., Lorand D.F. et al. Management of rosiglitazone related fluid retention // *Diabetes*. — 2005. — Vol. 54 (suppl. 1). — P. A20.
8. Karaliedde J., Hider A., Donaldson J. et al. Predictors of rosiglitazone induced fluid retention // *Diabetologia*. — 2005. — Vol. 48 (suppl. 1). — P. A281.
9. Kendall D.M., Rubin C.J., Mohideen P. Improvement of glycemic control, triglycerides, and hdl cholesterol levels with muraglitazar, a dual (/) peroxisome proliferator-activated receptor activator, in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin monotherapy // *Diabetes Care*. — 2006. — Vol. 29. — P. 1016—1023.
10. Kota B.P., Huang T.H.-W., Roufogalis B.D. An over-view on biological mechanisms of PPARs // *Pharmacol. Res.* — 2005. — Vol. 51. — P. 85—94.
11. Mudaliar S., Chang A.R., Henry R.R. Thiazolidinediones, peripheral edema, and type 2 diabetes: incidence, pathophysiology, and clinical implications // *Endocr. Pract.* — 2003. — Vol. 9. — P. 406—416.
12. Semenkovich C.F. TZDs and diabetes: testing the waters // *N. Med.* — 2005. — Vol. 11. — P. 822—824.
13. Semple R.K., VChatterjee V.K., O'Rahilly S. PPAR and human metabolic disease // *J. Clin. Invest.* — 2006. — Vol. 116. — P. 581—589.
14. Staels B., Fruchart J.-C. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists // *Diabetes*. — 2005. — Vol. 54. — P. 2460—2470.
15. Tang W.H.W., Francis G.S., Hoogwerf B.J., Young J.B. Fluid retention after initiation of thiazolidinedione therapy in diabetic patients with established chronic heart failure // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2003. — Vol. 41. — P. 1394—1398.
16. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — Vol. 351. — P. 1106—1118.
17. Zanchi A., Chioloro A., Maillard M. et al. Effects of the peroxisome proliferator-activated receptor- agonist pioglitazone on renal and hormonal responses to salt in healthy men // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2003. — Vol. 89. — P. 1140—1145.
18. Zhang H., Zhang A., Kohan D.E. et al. Collecting duct-specific deletion of peroxisome proliferator-activated receptor blocks thiazolidinedione-induced fluid retention // *Proc. N. Acad. Sci USA*. — 2005. — Vol. 102. — P. 9406—9411.

Е.В. Степанова

**ПОЛИМОРФИЗМ PRO12ALA ГЕНА PPARC КАК ФАКТОР
РИСКА ОТЕКОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ РОЗИГЛИТАЗОНОМ**

Стимулирование рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (*PPARG*) розиглитазоном, — широко используемый фармакологический подход при лечении пациентов с инсулинорезистентностью и диабетом 2 типа. Но задержка жидкости и отеки являются побочными эффектами этого препарата. Для генотипа Pro12Pro риск составляет 50 %, что свидетельствует о значении генотипирования полиморфизма Pro12Ala гена *PPARG* для идентификации дополнительного клинического фактора риска и может служить для снижения риска задержки жидкости и отеков, индуцированных агонистами *PPARG*.

E.V. Stepanova

**POLYMORPHISM PRO12ALA OF PPARC GENE
AS A RISK FACTOR OF PIOGLITAZONE-INDUCED EDEMA**

The activation of peroxisome proliferator-activated receptors (*PPARG*) with rosiglitazone is a widely used pharmacological approach to the treatment of patients with insulin resistance and type 2 diabetes. However this drug causes such side effects as fluid retention and edema. The risk of approximately 50 % for the Pro12Pro genotype indicates that testing for the Pro12Ala of the *PPARG* gene in addition to the already identified clinical risk factors may become a useful tool to further reduce the risk of *PPARG* agonist-induced fluid retention and edema.