

УДК 616.379-008-64-06/07

**ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМА RS 2476601 ГЕНА PTPN22 У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА И САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА В СОЧЕТАНИИ С АУТОИММУННЫМИ ТИРЕОПАТИЯМИ**

<sup>1</sup>Репина Е.А., <sup>2</sup>Болдырева М.Н., <sup>1</sup>Сунцов Ю.И., <sup>3</sup>Батенева Е.И.,  
<sup>3</sup>Кадочникова В.В., <sup>1</sup>Ильин А.В., <sup>1</sup>Трошина Е.А.

<sup>1</sup>ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ, Москва, e-mail: e\_repina@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБУ «ГНЦ институт иммунологии» ФМБА РФ, Москва;

<sup>3</sup>ЗАО «ДНК-Технология» Москва

Проведен сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма rs 2476601 гена PTPN22 у 134 пациентов с сахарным диабетом 1 типа (СД1) и 110 пациентов с сочетанием СД1 с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы (АИЗ ЩЖ) (88 пациентов с сочетанием СД1 с аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) и 22 пациента с сочетанием СД1 с диффузным токсическим зобом (ДТЗ). Контрольную группу составили 108 доноров крови без аутоиммунных заболеваний и отягощенной наследственности по ним. Установлено достоверное увеличение частоты аллеля Т (p = 0,0007) и генотипа ТТ (p = 0,0009) полиморфизма rs 2476601 в группе пациентов с СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ по сравнению с контролем. Также установлено достоверное увеличение частоты аллеля Т (p = 0,007) и генотипа ТТ (p = 0,02) данного полиморфизма в группе пациентов с СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ по сравнению с пациентами с изолированным СД1. Увеличение частоты аллеля Т и генотипа ТТ в группе пациентов с СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ по сравнению с изолированным СД1 свидетельствует об ассоциации данного варианта полиморфного маркера rs 2476601 гена PTPN22 повышенным риском развития СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 1 типа, аутоиммунный тиреоидит, ген PTPN22, аллельные варианты, полиморфизм

**PECULIARITIES OF THE FREQUENCY DISTRIBUTION OF ALLELES AND GENOTYPES POLYMORPHISMS RS 2476601 GENE PTPN22 IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 1 AND TYPE 1 DIABETES COMBINED WITH AUTOIMMUNE THYROPATHY**

<sup>1</sup>Repina E.A., <sup>2</sup>Boldyreva M.N., <sup>1</sup>Suntsov Y.I., <sup>3</sup>Bateneva E.I.,  
<sup>3</sup>Kadochnikova V.V., <sup>1</sup>Ilin A.V., <sup>1</sup>Troshina E.A.

<sup>1</sup>FGBU «Endocrinology Research Centre» The Ministry of Health, Moscow, e-mail: e\_repina@mail.ru;

<sup>2</sup>FGBU «Institute of Immunology» FMBA of Russia, Moscow;

<sup>3</sup>ZAO «DNA Technology», Moscow

A comparative analysis of the distribution of allele and genotype frequencies of polymorphisms rs 2476601 PTPN22 gene was carried out in 134 patients with type 1 diabetes mellitus (T1DM) and 110 patients with a combination of type 1 diabetes and autoimmune thyroid disease (AIThD). The control group consisted of 108 blood donors without autoimmune diseases, and family history on them. A significant increase in the frequency of allele T (p = 0,0007) and genotype TT (p = 0,0009) polymorphism rs 2476601 was found in patients with type 1 diabetes with AIThD compared to the control. It was also found a significant increase in the frequency of allele T (p = 0,007) and genotype TT (p = 0,02) of this polymorphism in the patients with type 1 diabetes and AIThD compared to the patients with T1DM. Increasing the frequency of allele T (p = 0,0007) and genotype GG (p = 0,0009) in the group of patients with diabetes and AIThD compared to the patients with only T1DM indicates the association of this embodiment, the polymorphic marker rs 2476601 gene PTPN22 with risk of developing type 1 diabetes with AIThD.

**Keywords:** diabetes mellitus type 1, autoimmune thyroiditis, PTPN22 gene allelic variants, polymorphism

Сахарный диабет 1 типа (СД1) – полигенное многофакторное заболевание, развитие которого связано с аутоиммунной деструкцией β-клеток поджелудочной железы.

Развитие и прогрессирование аутоиммунного воспаления при СД1 на 80% зависит от генетической предрасположенности, которая связана с наследованием определенных аллелей полиморфных генов [2, 3]. Эти гены взаимодействуют друг с другом, а также с другими генами, эпигенетическими и экологическими факторами.

К настоящему времени выявлено 18 генов, находящихся на разных хромосомах, которые в той или иной степени предрасполагают к СД1. К числу ключевых относится ген PTPN22. Он находится на первой хромосоме (1p13.3-p13.1) и кодирует лимфоидный белок тирозиновой фосфатазы (lymphoid protein tyrosine phosphatase-LYP), которая играет важную роль в негативном контроле Т-клеточной активации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток [8, 9]. Белки семейства тирозиновой фосфатазы участвуют в предупреждении

спонтанной Т-клеточной активации путем дефосфорилирования и инактивации ассоциированных с Т-клеточным рецептором киназ и их субстратов. *PTPN22*, экспрессированный на лимфоцитах через образование комплекса с С-концевой киназой (Src Kinase -CSK), супрессирует последующие медиаторы сигналинга Т-клеточного рецептора. Замена аргининового на триптофановый аминокислотный остаток (кодон 620 – R620W) исключает возможность взаимодействия *PTPN22* с CSK, что приводит к нарушению обратной регуляции активированных лимфоцитов [1, 5–7].

В многочисленных исследованиях было установлено, что аллельные изменения R620W гена *PTPN22* связаны с несколькими аутоиммунными заболеваниями, в том числе СД1 и АИЗ ЩЖ, ревматоидным артритом, системной красной волчанкой, витилиго [5, 7, 10]. Это позволило предположить, что *PTPN22* в целом предрасполагает к аутоиммунным заболеваниям. Тем не менее, некоторые аутоиммунные заболевания, такие как целиакия, рассеянный склероз и болезнь Аддисона, не показали связи с *PTPN22* [4].

Задачей настоящего исследования является сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* у пациентов с СД1 и пациентов, имеющих сочетание СД1 и АИЗ ЩЖ.

#### Материалы и методы исследования

В исследование было включено 249 пациентов с СД1, которые находились на обследовании и лечении в ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ. Все пациенты были разделены на 3 группы: в первую группу вошло 89 пациентов с СД1 и аутоиммунным тиреоидитом (АИТ) (средний возраст пациентов  $33,0 \pm 14,0$  лет, из них мужчин – 13 (0,146), женщин – 76 (0,854)), вторую группу составили 22 пациента с СД1 и диффузным токсическим зобом (ДТЗ) (средний возраст пациентов  $33,1 \pm 16,4$  лет, из них мужчин – 7 (0,318), женщин – 15 (0,682)), в третью группу вошло 138 пациентов с СД1 и отрицательными титрами антител к ткани щитовидной железы (АтЩЖ) (средний возраст пациентов  $24,2 \pm 12,9$  лет, из них мужчин – 68 (0,491), женщин – 15 (0,682)). Контрольную группу составили 108 человек из Московской популяции без аутоиммунных заболеваний и отягощенной наследственности по ним, средний возраст в контрольной группе ( $n = 108$ ) –  $46,3 \pm 9,3$  лет, мужчин 73 (68%), женщин – 35 (32%). У всех пациентов предварительно было получено информированное согласие на проведение данного исследования.

Типирование однонуклеотидного полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с флуоресцентными метками и автоматической регистрацией результатов реакции в режиме реального времени (real-time PCR) наборами компании «ДНК-Технология» (Москва) на приборе ДТ-96 («ДНК-Технология») в соответствии с инструкциями производителя.

Количественное определение титров аутоантител к тиреоглобулину (АТГ) и тиреопероксидазе (АТРО) в сыворотках крови осуществляли методом непрямой иммуноферментного анализа с использованием наборов фирмы «Biomegica» (лаборатория клинической биохимии ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ, зав. – А.В. Ильин).

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных подходов, используемых при проведении популяционно-генетических исследований.

Аллельные варианты полиморфных генов подвергались классическому молекулярно-эпидемиологическому анализу – сопоставлению встречаемости аллелей и генотипов у больных СД1, СД1+АИЗ ЩЖ и контролей. Тест на соответствие выборки равновесию Харди-Вайнберга проводили с использованием метода  $\chi^2$  ( $\alpha = 0,05$ ,  $df = 1$ ). Для выявления ассоциации между заболеванием и генотипом использовалась мультипликативная, общая и аддитивная модели наследования.

Ассоциацию между заболеванием и генотипом определяли с помощью критерия  $\chi^2$  (с коррекцией Йейтса на непрерывность выборки), либо точным двусторонним критерием Фишера, сравнивая распределение генотипов и аллелей по каждому полиморфизму между группами пациентов и контролей. Статистика: аллель предрасположенности (риска) А против второго аллеля (протекторного) В. Анализ тенденций проводили с использованием аддитивной модели наследования (тест Кохрана-Армитажа для линейных трендов с одной степенью свободы). Достоверными считали различия при уровне ошибки  $p \leq 0,05/4 = 0,0125$ , то есть допускали 1,6% вероятность того, что найденная в выборке связь между переменными является лишь случайной особенностью данной выборки. Уменьшение уровня значимости связано с наличием множественных сравнений и, как следствие, – введением поправки Бонферрони.

Показатели «отношения шансов» (OR-odds ratio) с 95% доверительным интервалом (95% CI) рассчитывались для «редкого» аллеля, носителей «редкого» аллеля (гетерозигот + гомозигот по «редкому» аллелю) относительно «частых» аллелей и гомозигот по «частому» аллелю соответственно. Аналогичный расчет проводился для гомозигот по «редкому» аллелю относительно гетерозигот и гомозигот по «частому» аллелю.

Сравнение частот встречаемости сочетаний генотипов проводилось с использованием критерия Краскала-Уоллиса и точного двустороннего критерия Фишера.

Отношение рисков (RR-related risk) рассчитано как отношение риска наступления события (СД1) у лиц, имеющих фактор риска (определенное сочетание генотипов) по отношению к контрольной группе.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Нами впервые проведено сравнительное исследование полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* у пациентов с СД1 и СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ.

Исследование частоты встречаемости однонуклеотидной замены R620W (*rs 2476601*) гена *PTPN22*.

Результаты исследования частот полиморфных вариантов гена *PTPN22* в выборке пациентов с СД1, серонегативных по АтЩЖ, и случайной (контрольной) выборке представлены в табл. 1. Наблюдаемое распределение частот генотипов по исследованному локусу гена *PTPN22* в выборке СД1 соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга ( $p = 0,86$ ), в выборке пациентов наблюдается отклонение от равновесного состояния, поэтому для сравнений с группой контроля использован тест Кохрана-Армитажа.

Анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* не выявил повышение встречаемости «редкого» аллеля *T* среди больных СД1, серонегативных по АтЩЖ, – 48/268 (17,9%), в сравнении со здоровыми лицами 32/216 (14,8%) и генотипа ТТ 4/134 (3%) и 5/108 (5%), соответственно.

Поскольку статистически достоверных различий по аллельным вариантам и генотипам гена *PTPN22* между группами СД1 + АИТ и СД1 + ДТЗ выявлено также не было, группы объединены в общую СД1 + АИЗ ЩЖ.

Результаты исследования частот полиморфных вариантов гена *PTPN22* в выборке пациентов с СД1, сочетанным с аутоиммунными заболеваниями, и случайной (контрольной) выборке представлены в табл. 2. Наблюдаемое распределение частот генотипов по исследованному локусу гена *PTPN22* в выборке СД1 + АИЗ ЩЖ соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга ( $p = 0,41$ ).

Анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* среди больных СД1 с АИЗ ЩЖ и доноров выявил достоверное увели-

чение частоты встречаемости аллеля *T*,  $p = 0,0007$ ,  $OR = 2,26$  (1,4–3,63), и генотипа ТТ,  $p = 0,0009$ ,  $OR = 1,4$  (0,43–4,55) в группе пациентов. При этом отношение шансов для носителей «редкого» аллеля *T* составило  $OR = 3,0$  (1,69–5,33),  $p = 0,0002$ . Достоверные значения относительного риска для аллеля *T*  $RR = 1,58$  (1,17–2,13) показывают, что аллель *T* можно отнести к аллелям риска для СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ.

Результаты исследования частот полиморфных вариантов гена *PTPN22* в выборке пациентов с изолированным СД1 и СД1, сочетанным с АИЗ ЩЖ, представлены в табл. 3.

Анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* выявил повышение встречаемости «редкого» аллеля *T* среди больных СД1, сочетанным с АИЗ ЩЖ, – 7/110 (6%), в сравнении с пациентами, страдающими изолированным СД1, – 4/134 (3%) ( $OR = 1,8$ , 95% CI: 1,17–2,76,  $p = 0,007$ ) (табл. 3). Для генотипа ТТ отношение шансов по сравнению с СС и СТ составило  $OR$  (ТТ) = 2,21 (0,63–7,75),  $p = 0,02$ .

Частота носителей «редкого» аллеля *T* у больных СД1 + АИЗ ЩЖ (лица с генотипами СТ и ТТ), была достоверно выше – 55/110 (50%), чем в группе СД1 – 44/134 (33%),  $OR = 2,05$ , 95% CI: 1,22–3,44,  $p = 0,0087$ . Оценочный тест для анализа изменения степени ассоциации между генотипом *PTPN22* *rs 2476601* и определенной клинической формой СД1, в зависимости от числа полиморфных аллелей (тренд-тест Кохрана-Армитажа) показал статистически различия между сравниваемыми генотипами ( $p = 0,006$ ), что свидетельствует о наличии тенденции к высокой степени ассоциации генотипа данного полиморфизма с клинической формой сахарного диабета.

**Таблица 1**

Распределение аллелей и генотипов полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* у пациентов с СД1 и в контрольной группе

| Группы             | Частота генотипов, абс./отн. |        |        |       | Частота аллелей, абс./отн. |          |       |
|--------------------|------------------------------|--------|--------|-------|----------------------------|----------|-------|
|                    | СС                           | СТ     | ТТ     | Всего | С                          | Т        | Всего |
| СД1 без АтЩЖ (134) | 90/0,67                      | 40/0,3 | 4/0,03 | 134/1 | 220/0,821                  | 48/0,179 | 268/1 |
| Контроль (108)     | 81/0,75                      | 22/0,2 | 5/0,05 | 108/1 | 184/0,852                  | 32/0,148 | 216/1 |

**Таблица 2**

Распределение аллелей и генотипов полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* у пациентов с СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ и в контрольной группе

| Группы             | Частота генотипов, абс./отн. |         |        |       | Частота аллелей, абс./отн. |          |       |
|--------------------|------------------------------|---------|--------|-------|----------------------------|----------|-------|
|                    | СС                           | СТ      | ТТ     | Всего | С                          | Т        | Всего |
| СД1 + АИЗ ЩЖ (110) | 55/0,5                       | 48/0,44 | 7/0,06 | 110/1 | 158/0,72                   | 62/0,28  | 220/1 |
| Контроль (108)     | 81/0,75                      | 22/0,2  | 5/0,05 | 108/1 | 184/0,852                  | 32/0,148 | 216/1 |

Таблица 3

Распределение аллелей и генотипов полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* у пациентов с СД1 и СД1 в сочетании с АИЗ ЩЖ

| Группы             | Частота генотипов, абс./отн. |         |        |       | Частота аллелей, абс./отн. |          |       |
|--------------------|------------------------------|---------|--------|-------|----------------------------|----------|-------|
|                    | СС                           | СТ      | ТТ     | Всего | С                          | Т        | Всего |
| СД1 без АтЩЖ (134) | 90/0,67                      | 40/0,3  | 4/0,03 | 134/1 | 220/0,821                  | 48/0,179 | 268/1 |
| СД1 + АИЗ ЩЖ (110) | 55/0,5                       | 48/0,44 | 7/0,06 | 110/1 | 158/0,72                   | 62/0,28  | 220/1 |

### Выводы

Нами получена высоко достоверная ассоциация полиморфизма *rs 2476601* гена *PTPN22* с повышенным риском развития сочетания СД1 и АИЗ ЩЖ. При этом аллель Т и генотип ТТ являются аллелем и генотипом высокого риска для развития аутоиммунного полигландулярного синдрома 2 типа.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов, связанных с рукописью.

Источник финансирования – работа выполнена на средства, выделенные для Федеральной целевой программы «Сахарный диабет».

### Список литературы

1. Абатуров А.Е., Петренко Л.Л., Герасименко О.Н., Агафонова Е.А., Высочина И.Л., Кривуша Е.Л., Ермолаева О.А. Хронический аутоиммунный тиреоидит у детей // Здоровье ребенка. – 2009. – № 1(16). – С. 18–23.
2. Алексеев Л.П., Дедов И.И., Хаитов Р.М., Болдырева М.Н., Шестакова М.В., Петеркова В.А., Кураева Т.Л., Прокофьев С.А. Клиническая значимость определения HLA-DRB1-генотипов, ассоциированных с предрасположенностью или устойчивостью к сахарному диабету 1 типа в различных этнических группах России. // Сахарный диабет. – 2007. – № 3. – С. 2–5.
3. Бровкина О.И. Исследование ассоциации генов-кандидатов с сахарным диабетом 1 типа и диагностическая тест-система для ранней диагностики риска развития сахарного диабета 1 типа: Автореф. дис. канд. мед. наук. – М., 2012. – 22 с.
4. Репина Е.А. Общие генетические маркеры сахарного диабета 1 типа и аутоиммунных заболеваний щитовидной железы // Сахарный диабет. – 2011. – № 2. – С. 23–31.
5. Bottini N., Musumeci L., Alonso A., Rahmouni S., Nika K., Rostamkhani M., MacMurray J., Meloni G.F., Lucarelli P., Pellecchia M., Eisenbarth G.S., Comings D., Mustelin T. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes. // Nat. Genet. – 2004. – № 36. – P. 337–338.
6. Fousteri G., Jofra T., Di Fonte R., Kuka M., Iannaccone M., Battaglia M. PTPN22 controls virally-induced autoimmune diabetes by modulating cytotoxic T lymphocyte responses in an epitope-specific manner. // Immunol. Res. – 2014. – № 60. – P. 193–200.
7. Fousteri G., Liossis S.N., Battaglia M. Roles of the protein tyrosine phosphatase PTPN22 in immunity and autoimmunity. // Clin. Immunol. – 2013. – № 149. – P. 556–65.
8. Huber A., Menconi F., Corathers S., Jacobson E.M., Tomer Y. Joint genetic susceptibility to type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis: from epidemiology to mechanisms. // Endocr. Rev. – 2008. – № 29. – P. 697–725.
9. Salmond R.J., Brownlie R.J., Morrison V.L., Zamovska R. The tyrosine phosphatase PTPN22 discriminates weak self peptides from strong agonist TCR signals. // Nat. Immunol. – 2014. – № 15. – P. 875–83.
10. Wiersinga W.M. Thyroid autoimmunity. // Endocr. Rev. – 2014. – № 26. – P. 139–57.