

МикроРНК и эндокринная офтальмопатия, участие в глюкокортикоидном ответе

А.Ф. Бровкина^{1, 2}, Д.А. Сычев¹, О.С. Торопова²

¹ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» МЗ РФ, Москва

²ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы «Московский офтальмологический центр», Москва

РЕФЕРАТ

Накопленный клинический опыт доказывает существование глюкокортикоидорезистентных форм эндокринной офтальмопатии (ЭОП). Предполагают, что эпигенетические факторы (микроРНК) оказывают влияние на патогенез заболевания и участвуют в формировании глюкокортикоидного ответа.

Цель. Изучить роль микроРНК-146а и микроРНК-155 у больных с клиническими формами ЭОП и оценить их влияние на глюкокортикоидный ответ.

Материал и метод. В исследование вошли 20 больных (40 орбит) ЭОП, пролеченных глюкокортикоидами (ГК) с отрицательным результатом, средний возраст – 52,65±12,6 года. Контрольная группа – 28

волонтеров, не имеющих аутоиммунных и опухолевых заболеваний, возраст 62,9±7,54 года. Уровень экспрессии микроРНК-155 и микроРНК-146а определяли методом ПЦР в реальном времени.

Результаты. Полученные данные свидетельствуют о повышении уровня экспрессии микроРНК-146а и микроРНК-155 у больных с клиническими формами ЭОП в стадии фиброза (p<0,01).

Заключение. Полученные результаты функциональной активности микроРНК-146а и микроРНК-155 подтверждают их участие в патогенезе развития отечного экзофтальма и эндокринной миопатии путем активизации фибропластического процесса.

Ключевые слова: эндокринная офтальмопатия, ГК терапия, микроРНК. ■

Точка зрения. Восток – Запад. 2021;2:12–15.

ABSTRACT

MicroRNA and endocrine ophthalmopathy, involvement in glucocorticoid response

A.F. Brovkina^{1, 2}, D.A. Sychev¹, O.S. Toropova²

¹Department of ophthalmology Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow

²Botkin Hospital, Moscow

The accumulated clinical experience proves the existence of glucocorticoid-resistant forms of endocrine ophthalmopathy. It is assumed that epigenetic factors (miRNA) affect the pathogenesis of the disease and are involved in the formation of the glucocorticoid response.

Purpose. To study the role of miRNA-146a and miRNA-155 in patients with clinical forms of endocrine ophthalmopathy and to assess their effect on the glucocorticoid response.

Material and method. The study included 20 patients (40 orbits) with image intensifier tubes, treated with glucocorticoids (GC) with a negative result, mean age – 52.65 ± 12.6 years. The control group – 28 volunteers without autoimmune and tumor diseases, age 62.9 ±

7.54 years. The expression level of miRNA-155 and miRNA-146a was determined by real-time PCR.

Results. The obtained data indicate an increase in the expression level of miRNA-146a and miRNA-155 in patients with clinical forms of endocrine ophthalmopathy at the stage of fibrosis (p<0.01).

Conclusion. The obtained results of the functional activity of miRNA-146a and miRNA-155 confirm their participation in the pathogenesis of the development of edematous exophthalmos and endocrine myopathy by activating the fibroplastic process.

Key words: endocrine ophthalmopathy, GC therapy, microRNA. ■

Point of View. East – West. 2021;2:12–15.

В основе патогенеза клинических симптомов эндокринной офтальмопатии (ЭОП) лежат морфологические изменения в экстраокулярных мышцах (ЭОМ) и орбитальной клетчатке. Они заключаются в инфильтрации тканей пред-

ставителями иммунной системы (Т- и В-лимфоциты, макрофаги, тучные и плазматические клетки). Морфологическим изменениям предшествует появление провоспалительных цитокинов, фибробластов и гликозаминогликанов, что при-

водит к увеличению мягких тканей орбиты в объеме с развитием экзофтальма и сопутствующими симптомами, и фиброзом в исходе воспалительного процесса [1].

Избирательное поражение мягких тканей орбиты лежит в основе

формирования 3 клинических форм ЭОП: тиреотоксического псевдоэкзофтальма, отечного экзофтальма (ОЭ) и эндокринной миопатии. Наиболее тяжело протекает ОЭ, который может сопровождаться как нарушением зрительных функций, так и серьезными косметическими недостатками. Такие больные составляют 5-7% среди всех больных ЭОП. Зоной первичного поражения могут быть прямые мышцы глаза (миогенный вариант ОЭ) и орбитальная клетчатка (липогенный вариант ОЭ), но чаще все же диагностируется смешанный вариант заболевания [2].

С 50-х годов XX столетия единственно эффективным методом лечения остаются глюкокортикоиды (ГК). Однако 5-30% больных не отвечают на лечение ГК [3, 4]. Столь значительную вариабельность показателей резистентности к ГК можно объяснить как особенностями патогенеза, так и некорректным их назначением. In addition, the use of glucocorticoids given intravenously (iv) or injected locally has been widespread. Glucocorticoids play a positive role in reducing the inflammation and congestion of the orbital tissue, thus attempting to prevent the progression of the autoimmune disease. Причины наличия глюкокортикоидорезистентности у больных ЭОП до настоящего времени остаются дискуссионными. При аутоиммунных заболеваниях одной из причин неэффективного действия ГК считают наличие полиморфизма генов ГК рецептора NR3C1 и ферментов, участвующих в их метаболизме [5-7]. Это положение по характеру заболевания может быть распространено и на ЭОП. Публикации по данному вопросу, однако, единичны и противоречивы [5, 8]. В частности, проведенное фармакогенетическое тестирование по полиморфизму генов NR3C1, CYP3A5, CYP3A4 не подтвердило связь полиморфных вариантов гена GK рецептора NR3C1 и цитохрома P450 с ГК ответом у больных ЭОП [9].

В последнее время в литературе появляются сведения, указывающие на роль эпигенетических механизмов в развитии ряда аутоиммунных заболеваний, не исключением явилась и ЭОП. Речь идет о микроРНК, которые рассматривают в качестве

потенциальных биомаркеров развития ЭОП и отрицательного ответа на терапии ГК у этой группы больных [10, 11]. Считают, что микроРНК задействованы в сложных механизмах патогенеза и его контроля при различных заболеваниях. Влияя на степень экспрессии генов, они участвуют в процессах клеточной пролиферации, дифференцировки клеток и апоптоза [12]. Наибольшую роль в тяжести течения ЭОП можно отнести к функциям микроРНК-21, микроРНК-27а, микроРНК-27б, микроРНК-146а, микроРНК-155 [13-15]. Тем не менее, роль микроРНК в патогенезе ЭОП полностью не определена.

Показана роль микроРНК в регуляции адипогенеза [13]. Авторы исследовали значимость микроРНК-27а и микроРНК-27б в адипогенезе ретробульбарной клетчатки у больных ЭОП in vitro и контрольной группы. В результате было получено достоверное снижение уровней экспрессии семейства микроРНК-27 (27а и 27б) в орбитальной жировой клетчатке у больных ЭОП по сравнению со здоровыми лицами. Что же касается микроРНК-21, то снижение уровня ее экспрессии приводило к подавлению пролиферации и дифференцировки орбитальных фибробластов и усилению апоптоза. Повышенная их экспрессия, наоборот, усиливала пролиферацию и дифференцировку орбитальных фибробластов, блокируя их гибель [14]. Это дает основание полагать, что микроРНК-21 принимают участие в пролиферации фибробластов с последующим быстрым развитием фиброза пораженных тканей.

Участие в адипогенезе и избыточном образовании фибробластов принимают и другие микроРНК. Речь идет о микроРНК-146а и микроРНК-155, которые, как полагают, отвечают за пролиферацию миофибробластов и развитие фиброза в мягких тканях орбиты [15, 16]. Однако все не так однозначно. МикроРНК-146а принимают участие в патогенезе ЭОП, оказывая противовоспалительный и антифиброзный эффекты [16]. В то же время, выявлено, что повышенная экспрессия микроРНК-146а способствует воспалению и прогрессированию этого заболевания, увеличивая митоз фи-

бробластов [17]. И микроРНК-146а, и микроРНК-155 характеризуются противоположным влиянием на воспалительные реакции, осуществляемые Т-лимфоцитами и, по-видимому, имеют несколько мишеней в патогенезе ЭОП [18].

ЦЕЛЬ

Изучить роль микроРНК-155 и микроРНК-146а у больных разными клиническими формами ЭОП и их влияние на ГК ответ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В группу исследования вошли 20 больных (40 орбит) ЭОП, резистентных к ГК. Средний возраст их составил $52,65 \pm 12,6$ года. Контрольную группу составили 28 волонтеров в возрасте $62,9 \pm 7,54$ лет, не имеющих аутоиммунных и опухолевых заболеваний. Клинические формы ЭОП представлены в *таблице 1*.

Таким образом, в исследование вошли равноценные по количеству группы пациентов с активной стадией ЭОП и в стадии ее компенсации. Диагноз ЭОП и ее клинической формы базировался на основании анализа длительности (важно!) анамнеза заболевания, данных офтальмологического обследования, УЗ-сканирования и эхобиометрии ЭОМ, компьютерной томографии (КТ) орбит. Оценку уровня экспрессии микроРНК-155 и микроРНК-146а определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с использованием прибора CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США).

Статистический анализ для выборки малого объема проводили с использованием непараметрического статистического критерия Манна-Уитни с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Распределение уровней экспрессии микроРНК-146а и микроРНК-155 в основной и контрольной группах представлено в *таблице 2*.

Оказалось, что различия в распределении уровней экспрессии ми-

Таблица 1

Клинические формы ЭОП и степень их компенсации		
Клиническая форма ЭОП	Степень компенсации процесса	п больных (количество орбит)
ОЭ, миогенный и смешанный варианты	суб- и декомпенсация	8 (16)
ОЭ, липогенный вариант	компенсация	7 (14)
Эндокринная миопатия	компенсация	5 (10)
Всего		20 (40)

Таблица 2

Распределение уровней экспрессии микроРНК-146а и микроРНК-155 в основной и контрольной группах				
Группы больных	микроРНК -146а	p-value	микроРНК -155	p-value
Основная группа (n=20)	0,2938±0,327	p<0,01	0,0663±0,026	p<0,01
Контрольная группа (n=28)	0,0135±0,025		0,0388±0,037	

кроРНК-146 и микроРНК-155 в основной и контрольной группах статистически значимы ($p < 0,01$). Уровень экспрессии микроРНК-146а в целом по группе больных ЭОП в 21,8 раза превышает уровень микроРНК-146а контрольной группы. А микроРНК-155 этих же больных превышает уровень контрольной группы в 1,7 раза. Полученные результаты подтверждают, что повышенная экспрессия микроРНК-146а и микроРНК-155 в плазме крови больных ЭОП способствует избыточной пролиферации фибробластов, быстрому развитию фиброза содержимого орбиты, являясь вероятной причиной резистентности к ГК у больных ЭОП.

В таблице 3 представлены уровни экспрессии микроРНК-146а и микроРНК-155 в плазме крови больных разными клиническими формами ЭОП, резистентных к ГК.

МикроРНК-146а и микроРНК-155 – многофункциональные гены, они могут работать как в качестве активаторов клеточной пролиферации, так и апоптоза. Результаты исследования показали, что более активная экспрессия отмечена у больных с липогенным вариантом ОЭ (превышение уровня экспрессии в 57,89 раз по сравнению с кон-

трольной группой). Такое же значительное превышение отмечено и у больных эндокринной миопатией, имеющих длительный анамнез заболевания (уровень экспрессии микроРНК-146а больше в 26,51 раза по сравнению с контрольной группой).

В группе больных с миогенным и смешанным вариантом ОЭ уровень экспрессии микроРНК-146а превышал всего в 8,5 раз. Учитывая патоморфологические изменения, обнаруживаемые у больных этих групп (фиброзизация), можно сделать заключение, что повышенный уровень орбитальных фибробластов связан с активацией микроРНК-146а. По мнению N. Wang et al, действие микроРНК-146а у больных ЭОП сложное. Они могут выполнять различные функции в орбитальных фибробластах: активизировать пролиферацию клеток и подавлять ее [17]. МикроРНК-155 у больных тех же групп имели аналогичную закономерность. Так, у больных липогенным ОЭ и эндокринной миопатией с компенсированным клинически симптомами уровень экспрессии микроРНК-155 был повышен соответственно в 2,5 и 2,3 раза, а пациенты с миогенным и смешанным вариантом заболевания имели уро-

вень превышения экспрессии всего в 1,77 раза. Показатели меньше, чем при микроРНК-146а, но закономерность распределения та же. Это связано с тем, что микроРНК-155 тоже многофункциональные гены с характерной регуляцией, но условия меняют их функции. Они могут регулировать пролиферацию клеток, их дифференцировку или усиливать апоптоз [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты функциональной активности микроРНК-146а и микроРНК-155 подтверждают их участие в патогенезе развития отечного экзофтальма и эндокринной миопатии путем активизации фибропластического процесса. Есть основание полагать, что именно эта особенность и приводит к формированию отрицательного глюкокортикоидного ответа у таких больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bahn R.S. Pathophysiology of Graves' ophthalmopathy: the cycle of disease.

Таблица 3

Распределение уровней экспрессии микроРНК-146а и микроРНК-155 в зависимости от клинической формы ЭОП, резистентных к ГК

Клиническая форма ЭОП (n-количество больных)	микроРНК -146а	p-value	микроРНК -155	p-value
Отечный экзофтальм, миогенный и смешанный вариант, в стадии суб- и декомпенсации (n=8)	0,1036±0,121	p<0,01	0,0662±0,006	p<0,01
Контрольная группа (n=28)	0,0135±0,025		0,0388±0,037	
Отечный экзофтальм липогенный вариант (n=7)	0,7812±0,247	p<0,01	0,0994±0,043	p<0,01
Контрольная группа (n=28)	0,0135±0,025		0,0388±0,037	
Эндокринная миопатия, компенсация (n=5)	0,3579±0,229	p<0,01	0,0896±0,043	0,01<p<0,05
Контрольная группа (n=28)	0,0135±0,025		0,0388±0,037	

J. Clin. Endocrinol. Metab. 2003;88:1939–1946.

2. Бровкина А.Ф. Эндокринная офтальмопатия: реальность и перспективы. Офтальмологические ведомости. 2012; 5(2): 31-34.

3. Nagayama Y., Izumi M., Kiriya T. et al. Treatment of Graves' ophthalmopathy with high-dose intravenous methylprednisolone pulse therapy. Acta Endocrinol. 1987; 5(116): 513–518.

4. Bartalena L., Baldeschi L., Boboridis K. et al. The 2016 European Thyroid Association/European Group on Graves' Orbitopathy Guidelines for the Management of Graves' Orbitopathy. Eur Thyroid J. 2016; 5(1): 9–26.

5. Vannucchi G., Covelli D., Campi I. et al. The therapeutic outcomes of intravenous steroids therapy for active Graves orbitopathy is influenced by the time of response but not polymorph of the glucocorticoid receptor. Eur. J. Endocrinol. 2013; 170(1): 55-61.

6. Quax R.A.M., Koper J.W., Huisman A.M. et al. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and in the glucocorticoid-induced transcript 1 gene are associated with disease activity and response to glucocorticoid bridging therapy in rheumatoid arthritis. Rheumatol. Int. 2015; 35(8): 1325–1333.

7. Ito A., Okada Y., Hashita T. Differences in the Blood Concentration of Tacrolimus in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis Patients with CYP3A5*3/*3. Biochem. Genet. 2017; 55(3): 268-277.

8. Саакян С.В., Пантелева О.Г., Батырбекова Ф.Х. и др. Генетические факторы развития резистентности к глюкокортикоидам у больных эндокринной офтальмопатией. Эффективная фармакотерапия. 2019; 15(33): 18–23.

9. Бровкина А.Ф., Сычев Д.А., Торопова О.С. Влияние полиморфизма генов CYP3A4, CYP3A5 и NR3C1 на эффективность глюкокортикоидной терапии у больных эндокринной офтальмопатией. Вестник офтальмологии. 2020; 136(6): 125-132.

10. Tatulashvili S., Baudry C., Sadoul J.L., Bihan H. New perspectives for the diagnosis and prognosis of Graves disease. Annals Endocrinologie. 2018; 79(1): 31-39.

11. Shen L., Huang F., Ye L. et al. Circulating microRNA predicts insensitivity to glucocorticoid therapy in Graves ophthalmopathy. Endocrine. 2015; 49(2): 445-456.

12. Flynt A.S., Lai E.C. Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. Nature Reviews Genetics. 2008; 9(11): 831-842.

13. Jang S.Y., Chae M.K., Lee J.H. et al. MicroRNA-27 inhibits adipogenic differentiation in orbital fibroblasts from patients with Graves orbitopathy. PLoS One. 2019; 14(8): e0221077. doi:10.1371/journal.pone.02211077

14. Tong B.D., Xiao M.Y., Zeng J.X., Xiong W. MiRNA-21 promotes fibrosis in orbital fibroblasts from thyroid-associated ophthalmopathy. Mol. Vis. 2015; 21: 324-334.

15. Woeller C.F., Roztocil E., Hammond C., Feldon S.E. TSHR Signaling Stimulates Proliferation Through PI3K/Akt and Induction of miR-146a and miR-155 in Thyroid Eye Disease Orbital Fibroblasts. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2019; 60(13): 4336-4345.

16. Jang S.Y., Park S.J., Chae M.K. et al. Role of microRNA-146a in regulation of fibrosis in orbital fibroblasts from patients with Graves' orbitopathy. Br. J. Ophthalmol. 2018; 102: 407-414.

17. Wang N., Chen F.E., Long Z.W. Mechanism of microRNA-146a/notch2 signaling regulating il-6 in Graves ophthalmopathy. Cell. Physiol. Biochem. 2017; 41: 1285–1297.

18. Huffaker T.B., Hu R., Runtsch M.C. Epistasis between microRNAs 155 and 146a during T cell-mediated antitumor immunity. Cell. Rep. 2012; 2: 1697–1709.