

КЛІНІЧНА МЕДИЦИНА

УДК 616.72 – 002.72: 579.01.8:575.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА TOLL-LIKE РЕЦЕПТОРА 4 ASP299GLY У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ

Белоглазова К.В., Шлыкова О.А., Измайлова О.В. Кайдашев И.П.

Крымский государственный медицинский университет им. С. И. Георгиевского, г. Симферополь,
Высшее государственное учебное заведение Украины
«Украинская медицинская стоматологическая академия» г. Полтава

У 37 хворих ревматоїдним артритом (РА) була вивчена частота поліморфізму гену Toll-like рецептора 4 Asp299Gly. Встановлено, що більшість хворих РА є носіями гомозиготного варіанту (AA) Asp299Gly Toll-like рецептора 4. Носії алелю G (AG,GG,G) Asp299Gly Toll-like рецептора 4 значно частіше зустрічаються в групі хворих РА, чим в групі здорових донорів. Можна передбачити, що хворі РА з гомозиготним варіантом (AA) Asp299Gly Toll-like рецептора 4 є гіперреспондерами на ендотоксин, тоді які мають алель G Asp299Gly даних рецепторів мають схильність до розвитку РА.

Ключові слова: ревматоїдний артрит, Toll-like рецептори, поліморфізм.

В последние годы накапливается все больше сведений о патологиях, связанных с Toll-подобными рецепторами [9]. Широкий спектр лигандов TLR и представленность этих рецепторов на большинстве клеток организма способствуют вовлечению TLR в патогенез многих заболеваний. Дефекты в системе TLR: нарушения распознавания лигандов, экспрессии TLR, трансдукции сигнала, выработки эффекторных молекул, а также полиморфизм генов TLR могут приводить к развитию тяжелых инфекционных заболеваний (сепсис, менингит), аутоиммунных заболеваний, атеросклероза, аллергопатологии [9].

Целью данной работы явилось изучение генетического полиморфизма Toll-like рецептора 4 Asp299Gly у больных ревматоидным артритом (РА).

Материал и методы

Исследование проводилось на образцах крови 37 больных РА, находившихся на лечении в ревматологическом отделении КРУ клинической больницы им. Н.А.Семашко г. Симферополя, и 23 доноров. Все больные поступили в стационар по поводу обострения основного заболевания. Возраст пациентов РА от 19 до 72 лет. Длительность заболевания от 1 года и выше 10 лет.

У всех больных выявлен положительный ревматоидный фактор (серопозитивный вариант РА). Диагноз РА устанавливали по критериям ACR (Американская Коллегия Ревматологов, 1987г) [1]. Основными клиническими проявлениями являлись боль (при пальпации и движении), припухлость пораженных суставов, утренняя скованность в суставах от

30 минут, выраженное ограничение подвижности суставов. Данные объективного обследования суставов, используя стандартные опросники HAQ. По данным рентгенологического исследования были выявлены типичные для РА изменения. Рентгенологическую стадию определяли по модифицированному методу Steinbrocker. Активность РА по клиническим и лабораторным данным в среднем соответствовала II степени. Активность болезни определяли согласно классификации, принятой в Украине в 1979 (Ассоциация Ревматологов Украины 2002г) [3]. Нарушение функции суставов у больных РА было не менее II степени.

Материалом исследования служила периферическая кровь, которую получали при поступлении больного на стационарный этап лечения.

С целью изучения аллелей полиморфного участка Asp299Gly гена Toll-подобного рецептора 4 выделили ДНК из венозной крови обследованных методом фенол-хлороформной экстракции. Полиморфный участок ДНК амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции на амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», Москва) с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров. Ампликоны подвергали рестрикционному анализу и идентифицировали методом электрофореза в агарозном геле.

Полученные результаты были обработаны с помощью статистики для параметрических и непараметрических критериев с использованием программы «MedStat» (серийный №MS0011) ДНПП ТОВ «Альфа», г.Донецк.

Результаты и их обсуждение

Данные о частоте полиморфизма гена Toll-like рецептора 4 Asp299Gly у больных РА представлены в таблице 1

Частота полиморфизма гена Asp299Gly Toll-like рецепторов 4 типа у больных РА.

Генотип, аллель	Контрольная группа, абс.% (n=23)	Группа больных ревматоидным артритом % (n=37)
GG	0,0 (0)	2,70* (1)
AG	4,35 (1)	10,81* (4)
AA	95,65 (22)	86,50 (32)
G	2,18	8,1*
A	97,82	91,9

* $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Анализируя данные таблицы выявлена высокая частота встречаемости аллеля G и генотипов AG, GG у больных РА. В группе здоровых доноров частота генотипов была следующая: AA-95,65%, AG-4,35%, аллель A встречался у 97,82%, а аллель G у 2,18% обследованных. Обращает на себя внимание отсутствие гомозиготного варианта GG, что возможно связано с небольшой кагортой обследованных. Сравнение частот встречаемости генотипов и аллелей A и G в контрольной и в группе больных РА показало, что среди больных РА аллель G встречается в 3 раза чаще, чем в контрольной группе, а генотипы AG, GG в 2 раза чаще.

Исходя из полученных результатов можно предположить, что лица имеющие аллель G гена Asp299Gly предрасположены к развитию РА.

Известно, что РА является иммунологически опосредованной болезнью с гиперактивацией В-клеточного звена иммунитета [12].

Известно, что классическим поликлональным активатором В-лимфоцитов является липополисахарид (ЛПС, эндотоксин - ЭТ), представляющий собой основной структурный компонент внешней мембраны грамотрицательных бактерий, постоянно действующим резервуаром, которой являются дистальные отделы кишечника [10; 19].

Решающую роль в распознавании эндотоксина (ЭТ) грамотрицательной бактерии и бактериальной ДНК играют CD 14 рецепторы на клетках моноцитарно-макрофагального ряда, которые не имея внутрицитоплазматического домена передают сигнал Toll-like рецепторам, преимущественно TLR4 типа [2; 7]. Toll-like рецепторы входят в суперсемейство интегральных мембранных гликопротеинов I типа, которые экспрессируются на антиген-презентирующих клетках, включая макрофаги и дендритные клетки, и играют решающую роль в распознавании микробных компонентов, так называемых pathogen-associated molecular patterns [2].

Распознавание микробных компонентов TLR инициирует активацию сигнальных путей, в результате чего происходит экспрессия генов цитокинов (ФНО α , ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12, ИФН α/β и других), ко-стимуляторных молекул и некоторых других генов. Продукты этих генов контролируют систему врожденного иммунитета и, в дальнейшем, направляют развитие адаптивного иммунного ответа [8; 16]. Характер и интенсивность ответа, опосредуемого TLR, определяется несколькими компонентами, составляющими систему TLR. Система TLR включает лиганды TLR, сами рецепторы (гены, кодирующие TLR, мРНК, белок), молекулы, осуществляющие трансдукцию сигнала – адаптерные белки, а также эффекторные молекулы, которые вырабатываются в результате активации TLR и опосредуют их дальнейшие эффекты [8; 13].

Arbour с соавт. в проведенном исследовании показали, что случайные мутации генов Asp299Gly и Thr399Ile оказывают влияние на внеклеточный домен Toll-like рецепторов 4 типа, ассоциированный с ослабленным ответом на ингаляционный ЛПС у человека. Мутация Asp299Gly прерывает TLR4- опосредованный ЛПС сигнал [6].

Данное исследование показало, что генетически обусловленная мутация Toll-like рецепторов 4 типа (мутация Asp299Gly) приводит к различному ответу на ЛПС [6].

В недавно проведенных экспериментах на мышах было выявлено, что мыши, у которых имелись дефекты функции TLR4 являются гиперреспондерами к ЭТ. Предполагают, что TLR4 играют важную роль в сигнализации о наличии ЭТ. Был обнаружен ген TLR4 на уровне хромосом, отвечающий за дефектный ответ на ЭТ. В этом исследовании также были установлены независимые мутации в генах TLR4 двух ЛПС гиперреспондерных линиях мышей (C3H/HeJ and C57BL10/ScCr). Это даёт возможность предположить, что TLR4 является доминантным рецептором для ЭТ in vivo [15].

У человека были идентифицированы полиморфные аллели TLR4 типа. Один из таких, сравнительно распространенных, полиморфизмов TLR4 типа может быть связан с повышенным риском развития септического шока и снижением риска развития атеросклероза, но не ассоциирован с повышением риска менингококковой инфекции. Однако другие аллели этого гена, которые встречаются реже, могут предрасполагать к развитию этой инфекции. Таким образом, TLR4 принимает непосредственно участие в сигнальном ответе на различные экзогенные и эндогенные молекулы [18].

Парадоксальным на первый взгляд могут показаться данные полученные Mieke F. Roelofs с соавт. (2008) при изучении взаимосвязи между функциональными вариантами (Asp299Gly) Toll-like рецептора 4, CD 14+ рецепторов и провоспалительных цитокинов у больных ревматоидным артритом, которые выявили, что AG вариант рецептора ассоциируется с более высоким уровнем CD 14+ рецепторов у больных ревматоидным артритом и с менее выраженным цитокиновым провоспалительным ответом на ЭТ в культуре мононуклеарных клеток [17]. На наш взгляд, это можно объяснить с позиций различной концентрации в периферической крови белка связывающего ЭТ (LPB) у больных РА и концентрации данного белка в культуральной среде, где обычно используется эмбриональная коровья сыворотка. Как известно, активация CD 14+ рецепторов под действием ЭТ происходит после образования комплекса ЛПС-LPB [8]. Не исключено, что более высокий ответ на ЛПС у больных РА с гомозиготным аллелем AA (которых в процентном отношении больше) связано с альтернативными пу-

тями эндотоксиновой активации клеток через другие типы рецепторов (CD 18, сквенджер рецепторы и др).

Выводы:

1. Установлено, что большинство больных РА (86,50%) являются носителями гомозиготного варианта (AA) Asp299Gly Toll-like рецепторов 4 типа.

2. Носители аллеля G Asp299Gly Toll-like рецептора 4 значительно чаще встречаются в группе больных РА, чем в группе здоровых доноров ($p < 0,05$).

3. Можно предположить, что больные РА с гомозиготным вариантом (AA) Asp299Gly Toll-like рецепторов 4 типа, являются гиперреспондерами на эндотоксин, в то время как имеющие гетерозиготный вариант Asp299Gly данных рецепторов имеют предрасположенность к развитию РА.

Литература

1. Балабанова Р.М. Ревматические болезни / Балабанова Р.М, под ред. В.А.Насоновой., Н.В.Бунчука.- М.,1997.- С.257-294.
2. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология / Дранник Г.Н. - К.: ООО "Полиграф плюс", 2006.-481 с.
3. Коваленко В.Н. Ревматоидный артрит: этиопатогенез, клиника, диагностика, лечение / В. Н. Коваленко // Лики України.- 2005.- № 1.- С. 24-26.
4. Коваленко В.Н. Ревматические заболевания: итоги пленума правления Ассоциации ревматологов Украины / В. Н. Коваленко // Здоров'я України.-№ 21.-С. 13-15.
5. Насонова В.А. Рациональная фармакотерапия ревматических заболеваний / В.А.Насонова, Е.Л.Насонов.- М.: Москва, 2003.
6. Arbour N. C. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans / N. C. Arbour, E. Lorenz, V. C. Schutte // Nat Genet.-2000.-Vol. 25.-P. 187-91.
7. B Cell Maturation Antigen, the Receptor for a Proliferation-Inducing Ligand and B Cell-Activating Factor of the TNF Family, Induces Antigen Presentation in B Cells / Min Yang, Hidenori Hase // The Journal of Immunology.-2005.- Vol. 175.-P. 2814-2824.
8. CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis./ N. Kawanaka, Yamamura et al. // Arthritis Rheum.- 2002.-Vol.46,N.10.-P. :2578.
9. Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor-4 complex./ K. Ohashi, V. Burkart, S. Flohe, H. Kolb // J Immunol.-2000.-Vol. 164.-P. 558-561.
10. Heine H. The biology of endotoxin / H. Heine, E.T. Riet-schel, A.J. Ulmer // Mol. Biotechnol.- 2001.-Vol.19,№3.-P. 279-296.
11. Immune activation in the small intestine in patients with rheumatoid arthritis / R Nissinen, M Leirisalo-Repo et al. // The Journal of Immunology.-2003
12. Inflammation in Rheumatoid Arthritis // Arthritis Rheum.-2002.-Vol. 46,№10.-P. 2578-2588.
13. Inhibition of Toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis / S. Abdollahi-Roodsaz, L.A. Joosten et al. // Arthritis Rheum.-2007.-Vol. 56,N.9.-P. 2957-2967.
14. Macintire D.K. Bacterial translocation: clinical implications and prevention / D. K. Macintire, T. L. Bellhorn // Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.-2002.-Vol. 32, №5.-P. 1165-1178.
15. Phylogenetic variation and polymorphism at the Toll-like receptor 4 locus (TLR4) / I. Smirnova, A. Poltorak, K. Edward, L Chan et al. // Genome Biology.-2000.-Vol.1,N.1.-P. 002.1-002.10.
16. Potentiation of lipopolysaccharide-induced chemokine and adhesion molecule expression in corneal fibroblasts by soluble CD14 or LPS-binding protein / Fukuda K, Kumagai N et al. // Invest Ophthalmol Vis Sci.-2005.-Vol.46,N.9.-P. :3095-3101.
17. The functional variant(Asp299gly) of Toll-like receptors 4 influences TLR4-mediated cytokine production in rheumatoid arthritis / F. Mieke, Roelofs, H. Mark, Wenink, J. M. Erik Toonen et al. // Journal of Rheumatology.-2008.-Vol.35,N.4.-P. 558-561.
18. Toll-like receptors(TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes:a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses / Sabroe I, Jones EC,Usher Lret al. // J.Immunol.-2002.-Vol. 168.-P. 4701-4710.
19. Yakovlev M. Element of endotoxin theory of human physiology and pathology: systemic endotoxemia, endotoxin aggregation and endotoxin insufficiency / M. Yakovlev // J.Endotoxin Research. - 2000.-Vol. 16,N2.- P. 120- 122.

Summary

GENE POLYMORPHISM TOLL-LIKE RECEPTOR 4 ASP299GLY IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTRITIS

Beloglazova K. V., Shlykova O. A., Izmaylova O. V., Kaidashev I. P.

Key words: rheumatoid arthritis, Toll-like receptor, polymorphism

37 patients with rheumatoid arthritis (RA) were studied for the frequency of polymorphism Asp299gly Toll-like receptor 4 types. It has been established that most of patients with RA are carriers of homozygous variant (AA) Asp299gly Toll-like receptor type 4. Carriers of heterozygous variant (AG, GG, G) Asp299gly Toll-like receptor 4-type are more often found in the group of patients with RA than in the group of healthy donors. It can be supposed that patients with homozygous variant (AA) Asp299gly Toll-like receptor type 4 are hyperresponder to endotoxin, while the patients with heterozygous variant Asp299Gly are predisposed to RA development.

Crimea State Medical University, Simferopol

Ukrainian Ministry of Health Public Service,

Ukrainian Medical Stomatological Academy,

Матеріал надійшов до редакції 30.09.2009