

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

## АССОЦИАЦИИ ВАРИАБЕЛЬНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ С НАРУШЕНИЯМИ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

А.С. Головкин, А.В. Понасенко, А.Г. Кутихин, И.И. Жидкова,  
М.В. Хуторная, Р.Р. Салахов, О.Л. Барбараш

ФГБНУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»  
650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6

Цель исследования: определить вклад отдельных локусов генов Toll-подобных рецепторов в развитие нарушений углеводного обмена (НУО) у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС). Материал и методы. В исследование включено 292 пациента с ИБС с наличием и отсутствием НУО. Изучены ассоциации 8 полиморфных локусов 4 генов: *TLR1* (rs5743551 и rs5743611), *TLR2* (rs3804099 и rs5743708), *TLR4* (rs4986790 и rs4986791), *TLR6* (rs3775073 и rs5743810) у больных ИБС с развитием НУО. Результаты. Носители вариантного аллеля G локуса rs5743611 гена *TLR1* имеют повышенный, а носители аллеля T локуса rs4986791 (Thr399Ile) и аллеля G локуса rs4986790 (Asp299Gly) гена *TLR4* – сниженный риск развития НУО. Носители вариантного гомозиготного (G/G) генотипа локуса rs5743611 гена *TLR1* имеют более чем трехкратное увеличение риска развития НУО в возрасте от 50 до 70 лет. Минорный гомозиготный (A/A) генотип локуса rs5743810 гена *TLR6* является протективным в отношении развития нарушений углеводного обмена у мужчин. Заключение. Выявлена взаимосвязь между вариабельностью локусов генов рецепторов врожденного иммунитета и развитием НУО у пациентов с ИБС.

**Ключевые слова:** ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет 2-го типа, атеросклероз, Toll-подобные рецепторы, полиморфизм генов.

## ВВЕДЕНИЕ

Доказано участие иммунных реакций в патогенезе целого ряда широко распространенных неинфекционных заболеваний: хронической сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца (ИБС), инфаркта миокарда (ИМ), атеросклероза, сахарного диабета 2-го типа (СД 2-го

типа), болезни Альцгеймера [1]. В настоящее время широко изучается активность клеточного звена иммунитета в реализации воспалительных процессов. В частности, особое внимание уделяется рецепторному аппарату иммунокомпетентных клеток.

Наиболее активно изучаемыми являются Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors,

Головкин Алексей Сергеевич – д-р мед. наук, зав. отделом экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: golovkin\_a@mail.ru

Понасенко Анастасия Валериевна – канд. мед. наук, исполняющий обязанности заведующего лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: ponaav@kem.cardio.ru

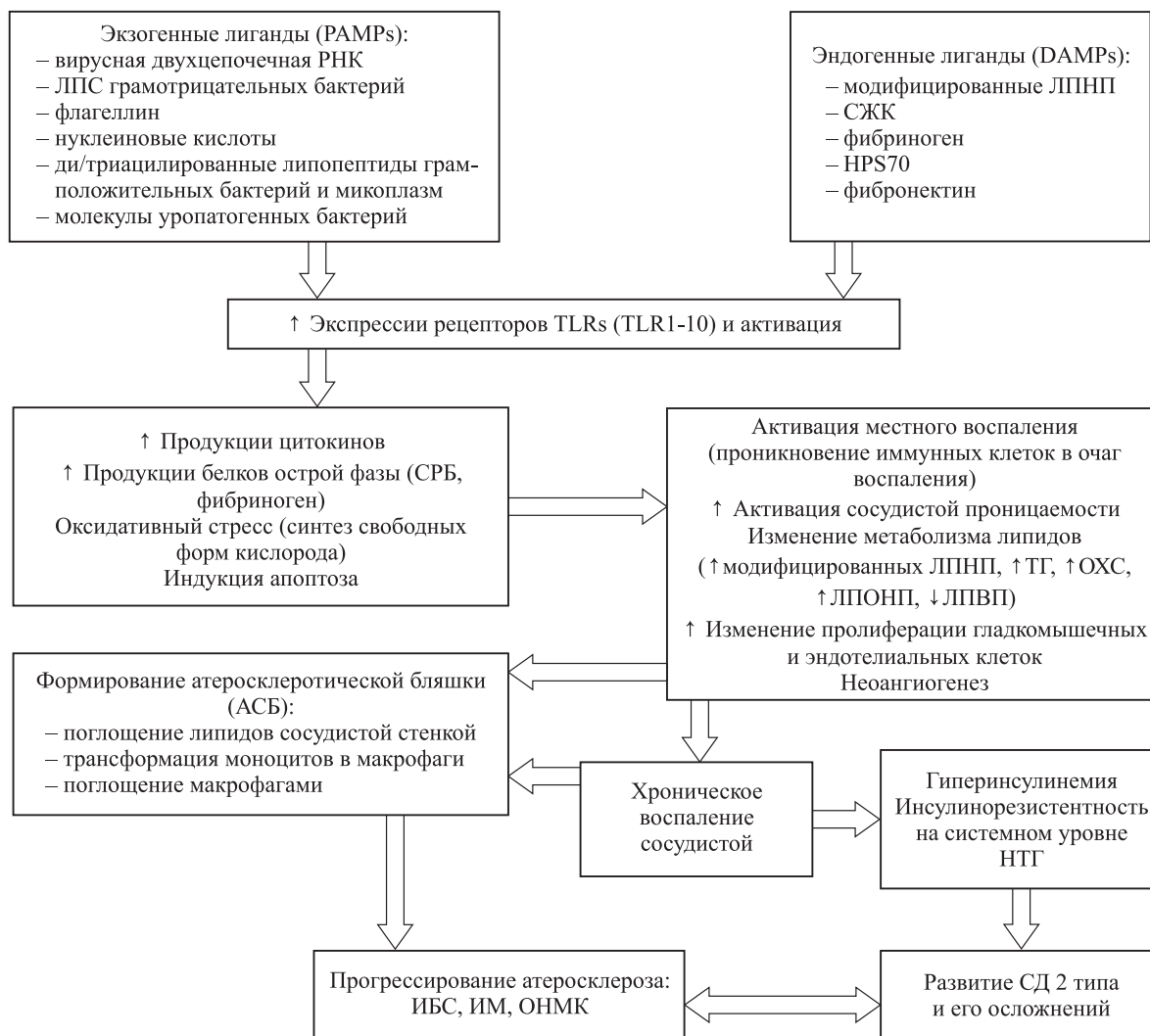
Кутихин Антон Геннадьевич – младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: antonkutikhin@gmail.com

Жидкова Ирина Игоревна – врач-кардиолог, аспирант, e-mail: Irina04046@yandex.ru

Хуторная Мария Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: masha\_hut@mail.ru

Салахов Рамиль Ринатович – младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии, e-mail: srr1986@mail.ru

Барбараш Ольга Леонидовна – д-р мед. наук, проф., директор, e-mail: reception@kem.cardio.ru



Участие TLRs в патогенезе атеросклероза и СД 2-го типа.

↑ – увеличение; PAMPs – pathogen-associated molecular patterns (патогенассоциированные молекулярные «образы»); РНК – рибонуклеиновая кислота, ЛПС – липополисахарид; СРБ – С-реактивный белок; DAMPs – damage associated molecular patterns; СЖК – свободные жирные кислоты; HPS70 – белок теплового шока-70; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ТГ – триглицериды; ОХС – общий холестерин, ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности, ЛПВП – липопротеины высокой плотности; НТГ – нарушение толерантности к глюкозе

TLRs). Известно 13 TLRs, из них у человека изучено 10 [2]. По данным многих исследований доказано, что TLRs участвуют в патогенезе атеросклероза и СД 2-го типа. На рисунке-схеме суммированы наиболее важные звенья патогенеза атеросклероза и сахарного диабета 2-го типа с участием TLRs. Экспрессия TLRs и их активация происходит под действием различных эндогенных и экзогенных лигандов, приводя в последующем к увеличению продукции цитокинов, белков острой фазы, оксидативному стрессу. Закономерным итогом этих процессов является формирование атеросклеротической

бляшки и инсулинорезистентности (ИР). Известно, что *TLR1*, *TLR2* и *TLR4* обнаружены в атеросклеротических бляшках, эндотелии сосудов и кардиомиоцитах [3].

TLRs являются ключевыми активаторами моноцитов и макрофагов. Экспрессия TLRs приводит к лейкоцитарной инфильтрации, трансформации макрофагов в пенстые клетки и повреждению эндотелия [4]. По данным различных исследований, имеется причинно-следственная связь между инфекциями (как бактериальными, так и вирусными) и атеросклерозом. На сегодняшний день эти исследования связаны с

*Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gingivalis*, вирусом гриппа, цитомегаловирусом, вирусом Эпштейна–Барр, вирусом простого герпеса, вирусами гепатита В и С, а также с вирусом иммунодефицита человека [5].

Считается, что повреждение эндотелия сосудов у больных СД 2-го типа может быть связано с инициацией TLRs, которая приводит к активации транскрипционного ядерного фактора (NF-κB). В результате этого происходит экспрессия провоспалительных генов, прогрессирует процесс воспаления в стенке сосудов даже после возвращения к нормогликемии или эугликемии. Сохраняющийся воспалительный процесс может способствовать прогрессированию атеросклероза [6]. Активация TLR4 сопровождается развитием ИР адипоцитов. У мышей с экспериментальным сахарным диабетом уровень экспрессии TLR4 повышен, а стимуляция липополисахаридом (ЛПС) ведет к чрезмерной секреции воспалительных цитокинов [7].

Межиндивидуальные различия в генах, кодирующих TLRs, могут определять различный характер течения воспалительного ответа и специфических иммунных реакций при внедрении патогенов. Так, например, установлено, что аллель G полиморфизма rs4986790 (Asp299Gly) гена *TLR4* ослабляет аффинность рецептора к лигандам и, таким образом, уменьшает воспалительный ответ на грамотрицательные патогенные организмы. Определено, что носители аллеля G данного полиморфизма гена *TLR4* имеют более низкие уровни циркулирующих провоспалительных цитокинов, острофазных белков (в том числе С-реактивного белка), растворимых адгезивных молекул и других медиаторов воспаления [8].

Тем не менее накопленные данные о локусе rs4986790 (Asp299Gly) гена *TLR4* и его связи с атеросклерозом противоречивы. Так, по результатам одних исследователей, указанный полиморфизм связан с уменьшением риска развития атеросклероза сонных артерий и острых коронарных событий [9], по данным других авторов, его ассоциаций с атеросклерозом коронарных артерий не выявлено [10]. В то же время другими исследователями установлена связь между носительством аллеля G данного полиморфизма гена *TLR4* и увеличением риска развития СД 2-го типа [11]. Однако по данным [12] мутантные аллели локусов Asp299Gly и Thr399Ile гена *TLR4* снижают риск развития СД 2-го типа и не оказывают влияния на проявления ИБС как в группе с СД 2-го типа, так и в группе без него. Также была определена достоверная ассоциативная связь между гаплотипами, содержащими

ми четыре минорных аллеля локусов rs647317, rs2149356, rs1927906 и rs4986791 (Ile399Thr) *TLR4*, и увеличением риска развития сахарного диабета обоих типов у мужчин с высокими уровнями липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), что, в свою очередь, может увеличивать риск развития атеросклероза [13].

Таким образом, в настоящее время влияние полиморфизмов генов *TLRs* на риск развития атеросклероза и СД 2-го типа остается вопросом спорным и недостаточно изученным. Кроме того, недостаточно данных о генетическом детерминировании иммунного ответа, опосредованного рецепторами врожденного иммунитета, при развитии двух заболеваний: СД 2-го типа и атеросклероза.

Цель исследования – определить вклад отдельных локусов генов Toll-подобных рецепторов в развитие нарушений углеводного обмена (НУО) у пациентов с ИБС.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведено обследование 292 пациентов с ИБС, которым было выполнено коронарное шунтирование на базе ФГБНУ «НИИ КПССЗ», г. Кемерово с 2011 по 2012 г. Все участники исследования принадлежали к одной этнической группе – русские.

Диагноз ИБС устанавливали на основании национальных клинических рекомендаций Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК) по стабильной стенокардии (2008 г.), наличия ангинозных болей в грудной клетке, данных анамнеза, а также лабораторных данных и инструментальных методов обследования.

Критериями включения в исследование были наличие верифицированного диагноза ИБС, возраст от 40 до 70 лет, принадлежность к русской национальности, проживание на территории Кемеровской области и наличие подписанного информированного согласия на проведение исследования. Критериями исключения являлись отсутствие согласия на участие в исследовании, злокачественные новообразования в анамнезе, сопутствующие аутоиммунные заболевания, острые инфекционные заболевания или обострение хронических, а также психические заболевания. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института. Медиана возраста пациентов составила 58 (54; 63) лет (от 40 до 70 лет включительно), в исследование включены 239 (81,85 %) мужчин и 53 (18,15 %) женщины. Большинство пациентов имело традиционные факторы риска. Артериальная гипертензия (АГ) встречалась у 262 (89,73 %) пациентов, НУО

(СД 2-го типа или нарушенная толерантность к глюкозе (НТГ)) отмечались у 87 (29,80 %): СД 2-го типа – у 58 (19,86 %), НТГ – у 29 (9,93 %), перенесенный ИМ – у 224 (76,71 %), курение в анамнезе – у 196 (67,12%) больных, дислипидемия – у 227 (77,74 %) человек.

Диагноз СД 2-го типа в стационаре устанавливался на основании данных анамнеза, исследования уровня глюкозы в плазме крови натощак и/или перорального глюкозотолерантного теста (ПГТТ) и уровня гликозилированного гемоглобина (HbA1c) в соответствии с клиническими рекомендациями по СД 2-го типа [14].

Нормальные показатели глюкозы в венозной крови натощак составляют  $\leq 6,1$  ммоль/л; через 2 ч после ПГТТ  $\leq 7,8$  ммоль/л. Нормальным считается уровень HbA1c до 6,0 % (42 ммоль/моль). В качестве диагностического критерия СД 2-го типа выбран уровень HbA1c  $\geq 6,5$  % (48 ммоль/моль). При уровне глюкозы в венозной крови натощак  $\geq 7,0$  ммоль/л, а также через 2 ч после ПГТТ или случайного определения уровня глюкозы в венозной крови  $\geq 11,1$  ммоль/л устанавливался предварительный диагноз СД 2-го типа [14].

Содержание глюкозы в венозной крови натощак  $\geq 6,1$  ммоль/л, но  $\leq 7,0$  ммоль/л и уровень глюкозы через 2 ч после ПГТТ  $\geq 7,8$  ммоль/л, но  $< 11,1$  ммоль/л расценивались как НТГ [14].

Пациенты были разделены на 2 группы в зависимости от наличия или отсутствия НУО. В первую группу вошли пациенты без НУО, во вторую – пациенты с выявленными НУО (СД 2-го типа и НТГ в анамнезе). Первая группа состояла из 205 пациентов (177 (86,34 %) мужчин и 28 (13,66 %) женщин) – медиана возраста пациентов составила 58 (53,50;63) лет, вторая группа – из 87 человек (62 (71,26 %) мужчины

и 25 (28,74 %) женщин) – медиана возраста пациентов 59 (54; 62) лет. Во второй группе 58 (66,70 %) человек были с СД 2-го типа и 29 (33,30 %) – с НТГ. Среди пациентов с СД 2-го типа у 10 (17,24 %) человек был впервые выявленный сахарный диабет. Медиана HbA1c у пациентов с СД 2-го типа составила 6,75 (5,88; 8,73). Дебют СД 2-го типа развился при медиане возраста 51 (46,75; 56) год. Длительность СД 2-го типа в среднем составила  $6,34 \pm 3,20$  года. Клинико-анамнестические характеристики групп пациентов приведены в табл. 1.

Для проведения исследования выделяли геномную ДНК методом фенол-хлороформной экстракции с протеиназой К по модификации K. Smith с соавт. из цельной венозной крови [15]. Генотипирование проводили по технологии Taqman с использованием флуоресцентно-меченых зондов производства Applied Biosystems (США). Концентрации и качественные характеристики выделенной ДНК проверяли с использованием спектрофотометра NanoDrop-2000 (TFS, США). Тремя основными критериями для выбора однонуклеотидных полиморфизмов были: частота минорного аллеля  $\geq 5$  % в русской популяции согласно HarMap; функциональные последствия на молекулярном уровне; малое количество или отсутствие исследований о значимости в патогенезе ИБС. Для выбора полиморфизмов использовались базы данных NCBI dbSNP; SNPinfo [16, 17]. Исследовали 8 аллельных вариантов 4 генов системы TLRs: *TLR1* (rs5743551 и rs5743611), *TLR2* (rs3804099 и rs5743708), *TLR4* (rs4986790 и rs 4986791), *TLR6* (rs3775073 и rs5743810).

Математическая обработка проводилась при помощи программы SNPStats (Institut Catala d'Oncologia; Universidad Autynoma de Barcelona,

Таблица 1

Клинико-анамнестические характеристики групп пациентов

Показатель	Без НУО, n = 205 (70, 21 %)	С НУО, n = 87 (29, 79 %)	p
Женщины, n (%)	28 (13,66)	25 (28,74)	0,002
Мужчины, n (%)	177 (86,34)	62 (71,26)	
Медиана возраста, лет	58 (53,50; 63,00)	59 (54,00; 62,00)	0,688
С дислипидемией, n (%)	160 (78,05)	67 (77,01)	0,883
Курящие, n (%)	142 (69,27)	54 (62,10)	0,242
С АГ, n (%)	179 (87,32)	83 (95,40)	0,037
ПИКС, n (%)	161 (78,54)	63 (72,41)	0,191
Стенокардия ФК I–II, n (%)	103 (50,24)	50 (57,47)	0,511
Стенокардия ФК III–IV, n (%)	102 (49,76)	37 (42,53)	

Примечание. АГ – артериальная гипертензия; ПИКС – постинфарктный кардиосклероз; ФК – функциональный класс.



Испания); статистического пакета программы Statistica® for Windows 6,0, StatSoft Inc., США. Две независимые группы по количественному признаку сравнивались с помощью U-критерия Манна–Уитни. Анализ различия частот в трех и более независимых группах проводился при помощи критерия  $\chi^2$  по Пирсону.

Распределение частот генотипов во всех контрольных выборках соответствовало равновесию Харди–Вайнберга (Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) с критическим значением вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу об отсутствии данного равновесия  $p \leq 0,05$ .

Расчет показателей отношения шансов (ОШ) с 95%-м доверительными интервалами (ДИ) для групп и подгрупп проводился по всем пяти моделям наследственности (кододоминантной, доминантной, рецессивной, сверхдоминантной и лог-аддитивной). Релевантность моделей наследственности для каждого конкретного полиморфизма оценивалась по информационному критерию Акаике (Akaike information criterion, AIC), за наиболее релевантную модель принималась та, для которой значение AIC было наименьшим. В качестве референтного генотипа принимался гомозиготный генотип с большей частотой. Критическое значение вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу об отсутствии влияния полиморфизма на риск развития заболевания  $p$  принималось равным или  $< 0,05$ . С целью избегания эффекта множественных сравнений был использован критерий перестановок (permutation test) [18].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Носители аллеля G локуса rs5743611 *TLR1* имели статистически значимо повышенный риск развития НУО в соответствии с лог-аддитивной моделью наследования (ОШ = 1,54, 95 % ДИ = 1,01–2,34,  $p = 0,044$ ) (табл. 2). Аллель Т полиморфизма rs4986791 (Thr399Ile) и аллель G полиморфизма rs4986790 (Asp299Gly) гена *TLR4* были статистически значимо ассоциированы со сниженной вероятностью развития НУО в соответствии с лог-аддитивной моделью (ОШ = 0,46, 95 % ДИ = 0,22–0,96,  $p = 0,028$  и ОШ = 0,41, 95 % ДИ = 0,19–0,90,  $p = 0,016$  соответственно) (см. табл. 2). Дальнейший анализ по гендерно-возрастным подгруппам позволил обнаружить большую выраженность связи вариантного гомозиготного (G/G) генотипа локуса rs5743611 гена *TLR1* с увеличением риска развития НУО у пациентов в возрасте от 50 до 70 лет (ОШ = 3,36, 95 % ДИ = 1,08–10,43,  $p = 0,049$ ) (табл. 3). Кроме того, нами определено, что гомозиготный (A/A) генотип полимор-

физма rs5743810 гена *TLR6* статистически значимо связан со снижением риска развития НУО у мужчин (ОШ = 0,28, 95 % ДИ = 0,09–0,87,  $p = 0,057$ ) (табл. 4).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из важных свойств иммунной системы является способность к распознаванию чужеродных веществ и развитию защитных воспалительных реакций в ответ на их воздействие. Врожденный иммунитет обеспечивает специфическое распознавание патогенов с помощью ограниченного числа генетически запрограммированных рецепторов, воспринимающих «образы» патогенов (pattern recognition receptors PRRs), взаимодействующих с патогенассоциированными молекулярными «образами» (pathogen-associated molecular patterns-PAMPs), такими как РНК и ДНК бактерий и вирусов, липополисахариды бактериальной стенки. PAMPs закодированы в геноме микроорганизмов, а в геноме макроорганизмов отсутствуют. Toll-подобные рецепторы являются представителями семейства сигнальных PRRs, локализуемых как в цитозоле, так и на мембранах клетки. Они необходимы для быстрого распознавания инфекционных патогенов (вирусов, бактерий, грибов) посредством экзогенных лигандов с последующей активацией защитных механизмов. Так, например, TLR3 распознает вирусную двухцепочечную РНК; TLR4 связывает эндотоксин ЛПС из грамотрицательных бактерий; TLR5 распознает бактериальные белки жгутиков (флагеллин); TLR7, TLR8, TLR9 обнаруживают патогенные нуклеиновые кислоты. TLR10 может образовывать гетеродимеры с TLR1 или TLR2, но его лиганд в настоящее время неизвестен. TLR11 распознает молекулы уропатогенных бактерий [19]. Кроме этого TLRs принимают участие в реализации асептического воспаления посредством эндогенных лигандов (модифицированные ЛППП, свободные жирные кислоты (СЖК), фибриноген, фибронектин) [20]. При активации TLRs происходит индукция синтеза провоспалительных интерферонов и цитокинов, обеспечивающих реализацию реакций врожденного иммунитета, а также осуществляется экспрессия молекул, которые способствуют активации Т-лимфоцитов (развитие адаптивного иммунного ответа). Таким образом, осуществляется взаимодействие приобретенного-адаптивного и врожденного компонентов иммунитета. Клинические и эпидемиологические данные показывают, что хроническое воспаление и инфекция увеличивают риск ИБС и СД 2-го типа.

В нашем исследовании аллель Т полиморфизма rs4986791 (Thr399Ile) и аллель G полиморфизма rs4986790 (Asp299Gly) гена *TLR4*

Связь аллельных локусов генов с риском развития НУО у пациентов с ИБС ( $n = 292$ )

Модель наследования	Генотип	Без НУО, $n = 205$ (%)	С НУО, $n = 87$ (%)	ОШ (95 % ДИ)	$p$	AIC
rs5743611 гена <i>TLR1</i>						
Кодоминантная	C/C	127 (62)	46 (52,9)	1,00	0,096	350,0
	C/G	70 (34,1)	33 (37,9)	1,34 (0,78–2,32)		
	G/G	8 (3,9)	8 (9,2)	3,08 (1,07–8,88)		
Доминантная	C/C	127 (62)	46 (52,9)	1,00	0,120	350,3
	C/G-G/G	78 (38)	41 (47,1)	1,51 (0,90–2,54)		
Рецессивная	C/C-C/G	197 (96,1)	79 (90,8)	1,00	0,058	349,1
	G/G	8 (3,9)	8 (9,2)	2,75 (0,98–7,73)		
Сверхдоминантная	C/C-G/G	135 (65,8)	54 (62,1)	1,00	0,500	352,3
	C/G	70 (34,1)	33 (37,9)	1,20 (0,71–2,04)		
Лог-аддитивная	–	–	–	1,54 (1,01–2,34)	0,044	348,7
rs4986790 гена <i>TLR4</i>						
Кодоминантная	A/A	166 (81)	79 (90,8)	1,00	0,033	347,9
	A/G	37 (18,1)	8 (9,2)	0,47 (0,21–1,07)		
	G/G	2 (1)	0 (0)	0,00 (0,00–NA)		
Доминантная	A/A	166 (81)	79 (90,8)	1,00	0,027	347,8
	A/G-G/G	39 (19)	8 (9,2)	0,42 (0,18–0,95)		
Рецессивная	A/A-A/G	203 (99)	87 (100)	1,00	0,073	349,5
	G/G	2 (1)	0 (0)	0,00 (0,00–NA)		
Сверхдоминантная	A/A-G/G	168 (82)	79 (90,8)	1,00	0,064	349,3
	A/G	37 (18,1)	8 (9,2)	0,48 (0,21–1,09)		
Лог-аддитивная	–	–	–	0,41 (0,19–0,90)	0,016	346,9
rs4986791 гена <i>TLR4</i>						
Кодоминантная	C/C	165 (80,5)	78 (89,7)	1,00	0,050	348,7
	C/T	38 (18,5)	9 (10,3)	0,53 (0,24–1,16)		
	T/T	2 (1)	0 (0)	0,00 (0,00–NA)		
Доминантная	C/C	165 (80,5)	78 (89,7)	1,00	0,048	348,8
	C/T-T/T	40 (19,5)	9 (10,3)	0,47 (0,21–1,03)		
Рецессивная	C/C-C/T	203 (99)	87 (100)	1,00	0,073	349,5
	T/T	2 (1)	0 (0)	0,00 (0,00–NA)		
Сверхдоминантная	C/C-T/T	167 (81,5)	78 (89,7)	1,00	0,110	350,1
	C/T	38 (18,5)	9 (10,3)	0,54 (0,24–1,18)		
Лог-аддитивная	–	–	–	0,46 (0,22–0,96)	0,028	347,9

Примечание. AIC – Akaike information criterion (информационный критерий Акаике).

были статистически значимо ассоциированы со сниженной вероятностью развития НУО в соответствии с лог-аддитивной моделью наследования (ОШ = 0,46, 95 % ДИ = 0,22–0,96,  $p = 0,028$  и ОШ = 0,41, 95 % ДИ = 0,19–0,90,  $p = 0,016$  соответственно) (см. табл. 2), что согласуется с данными других исследований, таких как проведенное А.С. Manolakis с соавт. (2011): аллель Т и аллель G данных полиморфизмов гена *TLR4*

были обнаружены преимущественно у пациентов, не страдающих диабетом ( $p < 0,0001$ ) [21]. J.R. Rudofsky с соавт. в 2004 г. показали, что аллель G полиморфизма Asp299Gly и аллель Т полиморфизма Thr399Ile гена *TLR4* были связаны со снижением распространенности диабетической невропатии при СД 2-го типа [22].

Однако не все исследователи разделяют эту точку зрения. М. Buraczynska с соавт. выявили

Таблица 3

Связь аллельных локусов генов рецепторов врожденного иммунитета с риском развития НУО у пациентов с ИБС с поправкой на возраст ( $n = 292$ )

Возраст	Генотип	Без НУО, $n = 205$	С НУО, $n = 87$	ОШ (95 % ДИ)
rs5743611 гена <i>TLR1</i>				
До 50 лет	C/C	14	9	1,00
	C/G	7	4	0,92 (0,21–4,17)
	G/G	1	1	1,79 (0,10–32,48)
От 50 до 70 лет	C/C	113	37	1,00
	C/G	63	29	1,42 (0,79–2,56)
	G/G	7	7	3,36 (1,08–10,43)

$p = 0,049$

Таблица 4

Связь аллельных локусов генов рецепторов врожденного иммунитета с риском развития НУО у пациентов с ИБС с поправкой на пол ( $n = 292$ )

Пол	Генотип	Без НУО, $n = 205$	С НУО, $n = 87$	ОШ (95 % ДИ)
rs5743810 гена <i>TLR6</i>				
Мужчины	G/G	70	31	1,00
	A/G	77	27	0,80 (0,43–1,47)
	A/A	30	4	0,28 (0,09–0,87)
Женщины	G/G	14	8	1,00
	A/G	12	13	1,81 (0,56–5,88)
	A/A	2	4	3,61 (0,54–24,34)

$p = 0,057$

связь аллеля G полиморфизма Asp299Gly гена *TLR4* с ранним началом диабетической ретинопатии у больных СД 2-го типа [23].

Известно, что ЛПС содержат в своем составе липиды и включают ацилированный гидроксил насыщенных (свободных) жирных кислот. Если их заместить полиненасыщенными жирными кислотами, то ЛПС теряют свойства активировать TLRs [24]. Исследования Е.А. Schwartz с соавт. [25], Т. Coll с соавт. [26] и другие исследования [27] показали, что увеличение концентрации СЖК приводит к активации TLR2 и TLR4. Эти данные доказывают, что насыщенные жирные кислоты являются естественными лигандами TLR2, TLR4 и способны их активировать [28]. При этом известно, что уровень свободных СЖК повышается при СД 2-го типа [29].

Повышение выделения СЖК при СД 2-го типа приводит к инфильтрации жировой ткани макрофагами и лейкоцитами за счет активации TLR2 и/или TLR4 адипоцитов [28]. Активация TLR4 способствует развитию ИР адипоцитов. У мышей с сахарным диабетом уровень TLR4 повышен, а стимуляция ЛПС ведет к чрезмер-

ной секреции воспалительных цитокинов [7]. Мыши с дефектом TLR4 отличаются меньшим количеством жировой ткани в организме и повышенной чувствительностью к инсулину даже на фоне диеты, богатой жирами. Введение липидов мышам с дефектом TLR4 не вызывает ИР в адипоцитах [1]. Таким образом, по нашему мнению, воспаление жировой ткани, обусловленное активацией TLR2 и TLR4 на фоне повышенного уровня СЖК при СД 2-го типа, способствует развитию ИР и СД 2-го типа. Эти данные подтверждают роль TLR2 и TLR4 в патогенезе СД 2-го типа.

TLR4 является одним из основных рецепторов TLRs, активация которого приводит к запуску воспаления, повреждению тканей, развитию диабета и его осложнений [12].

Известно, что мутационная изменчивость локусов Thr399Ile и Asp299Gly, детерминирующих биологическую активность рецепторов TLR4, может быть связана с развитием нарушений метаболизма углеводов [21].

Другим локусом интереса, на наш взгляд, выступает варибельный участок rs5743611 гена *TLR1*. Вариантный аллель G этого локуса имел

достоверную связь с увеличением в 1,5 раза риска развития НУО, а при его гомозиготном состоянии G/G риск возрастает у лиц старшей возрастной категории (50–70 лет) в 3 раза и более. Также установлено, что вариантный гомозиготный (A/A) генотип маркерного региона rs5743810 *TLR6* достоверно связан с 1,5-кратным снижением риска развития НУО у мужчин.

Рецептор TLR2 уникален своей способностью образовывать гетеродимеры с TLR1, TLR6 на поверхности цитоплазматической мембраны. Гетеродимер TLR2-TLR1 распознает триацилированные липопептиды грамотрицательных бактерий и микоплазм, в то время как гетеродимер TLR2-TLR6 распознает диацилированные липопептиды грамположительных бактерий и микоплазм. Гомодимеры TLR1, TLR2 и TLR6 сами функционально неактивны. Благодаря данной особенности рецептор TLR2 имеет широкий диапазон распознавания патогенассоциированных молекулярных паттернов. Ряд проведенных исследований показал, что высокий уровень глюкозы при СД 2-го типа вызывает именно гетеродимеризацию TLR2-TLR6. Также доказано, что TLR2 димеризуется с TLR1 или TLR6 при наличии СЖК [30]. Принимая во внимание особенности функциональной активности данного рецептора, следует полагать, что полиморфизмы генов, относящихся к субсемейству TLR2 (TLR1, TLR2 и TLR6), вносят существенный вклад в развитие СД 2-го типа. Вполне возможно, что это связано с MyD88-зависимыми и независимыми путями, необходимыми для передачи сигналов с TLRs. Трансдукция становится более эффективной при СД 2-го типа и атеросклерозе на фоне повышения содержания СЖК, выступающих в качестве дополнительных лигандов, повышающих активность TLRs.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Вариабельность локусов генов рецепторов врожденного иммунитета связана с развитием нарушений углеводного обмена у пациентов с ишемической болезнью сердца: носители вариантного аллеля G локуса rs5743611 *TLR1* имеют повышенный, а носители аллеля T локуса rs4986791(Thr399Ile) и аллеля G локуса rs4986790 (Asp299Gly) гена *TLR4* – сниженный риск развития нарушений углеводного обмена. Кроме того, носители вариантного гомозиготного (G/G) генотипа локуса rs5743611 гена *TLR1* имеют более чем трехкратное увеличение риска развития нарушений углеводного обмена у пациентов в возрасте от 50 до 70 лет. Минорный гомозиготный (A/A) генотип локуса rs5743810 *TLR6*

является протективным в отношении развития нарушений углеводного обмена у мужчин.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Radin M.S., Sinha S., Bhatt B.A. et al.** Inhibition or deletion of the lipopolysaccharide receptor Toll-like receptor-4 confers partial protection against lipid-induced insulin resistance in rodent skeletal muscle // *Diabetologia*. 2008. Vol. 51. P. 336–346.
2. **Cario E.** Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later // *Inflamm. Bowel Dis*. 2010. Vol. 16. P. 1583–1597.
3. **Edfeldt K., Swedenborg J., Hansson G.K. et al.** Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation // *Circulation*. 2002. Vol. 105. P. 1158–1161.
4. **Chen S., Sorrentino R., Shimada K. et al.** Chlamydia pneumoniae-induced foam cell formation requires MyD88-dependent and-independent signaling and is reciprocally modulated by liver X receptor activation // *J. Immunol*. 2008. Vol. 181. P. 7186–7193.
5. **Harskamp R.E., van Ginkel M.W.** Acute respiratory tract infections: a potential trigger for the acute coronary syndrome // *Ann. Med*. 2008. Vol. 40. P. 121–126.
6. **Ruiz-Ortega M., Esteban V., Egidio J.** The regulation of the inflammatory response through NF- $\kappa$ B pathway in cardiovascular disease // *Trends Cardiovasc. Med*. 2007. Vol. 17 (1). P. 19–25.
7. **Mohammad M.K., Morran M., Slotterbeck B. et al.** Dysregulated Toll-like receptor expression and signaling in bone marrow-derived macrophages at the onset of diabetes in the non-obese diabetic mouse // *Int. J. Immunol*. 2006. Vol. 18. P. 1101–1113.
8. **Kiechl S., Lorenz E., Reindel M. et al.** Toll-like receptors 4 polymorphisms and atherogenesis // *N. Engl. J. Med*. 2002. Vol. 347 (3). P. 185–192.
9. **Ameziane N., Beillat T., Verpillat P. et al.** Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2003. Vol. 23. P. 61–64.
10. **Yang I.A., Holloway J.W., Ye S.** TLR4 Asp 299Gly polymorphism is not associated with coronary artery stenosis // *Atherosclerosis*. 2003. Vol. 170. P. 187–190.
11. **Сульская Ю.В.** Генетический полиморфизм Toll-like рецепторов 4 типа у больных с сахарным диабетом 2 типа // *Таврический медико-биологический вестник*. 2009. № 3 (47). С. 12.
12. **Dasu M.R., Jialal I.** Amelioration of wound healing in diabetic toll-like receptor-4 knockout mice // *J. Diabetes Complications*. 2013. Vol. 27 (5). P. 417–421.
13. **Kolz M., Baumert J., Mueller M. et al.** Association between variations in the TLR4 gene and incident type 2 diabetes is modified by the ratio of total cholesterol to HDL cholesterol // *BMC Med. Genet*. 2008. Vol. 9. P. 9–19.
14. **Дедов И.И., Шестакова М.В.** Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным с сахарным диабетом. М.: Информполиграф, 2013. С. 2–6.
15. **Smith K., Kliko C., Cantor C.** Puls-elektroforez and methods of work with the big molecules of DNA. The



- Analysis of the genome. Methods: the Lane with English. M.: World, 1990. P. 58–94.
16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP> (29 Sep. 2014).
  17. <http://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snfunc.htm> (29 Nov. 2014).
  18. **Sole X., Guiny E., Valls J. et al.** SNPStats: a web tool for the analysis of association studies // *Bioinformatics*. 2006. Vol. 22 (15). P. 1928–1929.
  19. **Brown J., Wang H., Hajishengallis G.N. et al.** TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk // *J. Pent. Res.* 2011. Vol. 90. P. 4174–4127.
  20. **Gill R., Tsung A., Billiar T.R.** Linking oxidative stress to inflammation: toll-like receptors // *Free Radic. Biol. Med.* 2010. Vol. 48. P. 1121–1132.
  21. **Manolakis A.C., Kapsoritakis A.N., Tiaka E.K. et al.** *TLR4* gene polymorphisms: evidence for protection against type 2 diabetes but not for diabetes-associated ischaemic heart disease // *Eur. J. Endocrinol.* 2011. Vol. 165 (2). P. 261–267.
  22. **Rudofsky J.R., Reismann P., Witte S. et al.** Asp299Gly and Thr399Ile genotypes of the *TLR4* gene are associated with a reduced prevalence of diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes // *Diabetes Care*. 2004. Vol. 27, N 1. P. 179–183.
  23. **Buraczynska M., Baranowicz-Gaszczyk I., Tarach J. et al.** Toll-like receptor 4 gene polymorphism and early onset of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes // *Human Immunology*. 2009. Vol. 70, N 2. P. 121–124.
  24. **Lee J.Y., Hwang D.H.** The modulation of inflammatory gene expression by lipids: mediation through Toll-like receptors // *Mol. Cell*. 2006. Vol. 21 (2). P. 174–185.
  25. **Schwartz E.A., Zhang W.Y., Karnik S.K. et al.** Nutrient modification of the innate immune response: a novel mechanism by which saturated fatty acids greatly amplify monocyte inflammation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010. Vol. 30. P. 802–808.
  26. **Coll T., Palomer X., Blanco-Vaca F. et al.** Cyclooxygenase 2 inhibition exacerbates palmitate-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells // *Endocrinology*. 2010. Vol. 151. P. 537–548.
  27. **Shi H., Kokoeva M.V., Inouye K. et al.** *TLR4* links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance // *J. Clin. Invest.* 2006. Vol. 116 (11). P. 3015–3025.
  28. **Böni-Schnetzler M., Boller S., Debray S. et al.** Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor I // *Endocrinology*. 2009. Vol. 150. P. 5218–5229.
  29. **Haffner S.M., Lehto S., Ronnema T. et al.** Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction // *N. Engl. J. Med.* 1998. Vol. 339. P. 229–234.
  30. **Lee J.Y., Zhao L., Youn H.S. et al.** Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1 // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 16971–16979.

#### ASSOCIATION OF INHERITED VARIATION WITHIN THE GENES ENCODING TOLL-LIKE RECEPTORS WITH DISORDERS OF CARBOHYDRATE METABOLISM AMONG PATIENTS WITH CORONARY ARTERY DISEASE

A.S. Golovkin, A.V. Ponasenko, A.G. Kutikhin, I.I. Zhidkova, M.V. Khutornaya, R.R. Salakhov, O.L. Barbarash

*Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases  
650002, Kemerovo, Pine Avenue, 6*

**Aim of the study.** To determine the impact of polymorphisms within the genes encoding Toll-like receptors on the development of carbohydrate metabolism disorders (CMDs) amongst patients with coronary artery disease (CAD). **Materials and Methods.** We recruited 292 patients with CAD and investigated 8 polymorphisms within 4 genes, namely *TLR1* (rs5743551 and rs5743611), *TLR2* (rs3804099 and rs5743708), *TLR4* (rs4986790 and rs4986791), and *TLR6* (rs3775073 and rs5743810).

**Results.** Carriers of G allele of rs5743611 polymorphism within *TLR1* gene had an increased risk of CMDs. Moreover, the risk of CMDs was 3-fold higher in carriers of G/G genotype of rs5743611 polymorphism between 50 and 70 years of age. However, carriers of T allele of rs4986791 (Thr399Ile) polymorphism and G allele of rs4986790 (Asp299Gly) polymorphism within *TLR4* gene had decreased risk of CMDs. In addition, A/A genotype of rs5743810 polymorphism within *TLR6* gene was associated with reduced risk of CMDs in males. **Conclusion.** There are certain associations of polymorphisms within genes encoding Toll-like receptors and development of CMDs amongst patients with CAD.

**Keywords:** ischemic heart disease, type 2 diabetes mellitus, atherosclerosis, Toll-like receptors, gene polymorphisms.

*Статья поступила 10 февраля 2015 г.*