

TLR4-РІВНІ У ХВОРИХ НА ПОДАГРУ: ЗВ'ЯЗОК З АКТИВНІСТЮ ЗАХВОРЮВАННЯ

Резюме. TLR4-рівні мають вагоме значення у розвитку багатьох ревматичних захворювань, хоча їх роль при подагрі залишається дискусійною.

Мета дослідження – визначити вміст TLR4 у хворих на подагру та оцінити зв'язок з активністю захворювання.

Матеріали і методи. У дослідження було включено 65 хворих на подагру (100 % чоловіки), віком (mean±SD) (53,1±9,7) року і з тривалістю захворювання – (10,0±7,1) року. Серед обстежених – 26 (40 %) із хронічною тофусною подагрю. Контрольну групу складали 23 практично здорових осіб. Активність захворювання підраховували за Gout Activity Score (GAS). TLR4-рівень визначали за допомогою ELISA.

Результати досліджень та їх обговорення. TLR4-рівні у хворих на подагру були достовірно вищими порівняно з практично здоровими особами ((301,4±12,2) пг/мл та (280,1±8,7) пг/мл відповідно). Активність за шкалою GAS була 5,8±2,2. У пацієнтів із низьким TLR4-рівнем (<294,0 пг/мл) активність захворювання за шкалою GAS була найнижчою, тоді як з високим TLR4-рівнем (>305,2 пг/мл) – висока активність. Збільшення вмісту TLR4 супроводжувалось зростанням кількості нападів подагри протягом останнього року, кількості уражених суглобів, інтенсивності болю за ВАШ. Виявлено достовірні асоціативні зв'язки між TLR4-рівнем та активністю за GAS (r=0,55), кількістю уражених суглобів (r=0,47), рівнем СК сироватки крові (r=0,27) та ВАШ (r=0,49; p<0,05).

Висновки. У хворих на подагру визначають високі TLR4-рівні, що асоціюються з активністю захворювання.

Ключові слова: подагра; активність; TLR4.

ВСТУП Функціональна роль Toll-like-рецепторів (TLR) у розвитку подагричного запалення до кінця не відома, тому є виправданим інтерес вчених до поглибленого її вивчення. Toll-подібні рецептори належать до сімейства патерн-розпізнавальних рецепторів (ППР), що експресуються на антигенпрезентуючих клітинах, таких, як макрофаги та дендритні клітини, В-лімфоцити та на деяких неімунних клітинах, зокрема на фібробластах та епітеліальних клітинах. До цього сімейства також відносять NOD-подібні рецептори, які розташовані внутрішньоклітинно [1]. Основною функцією сигнальних TLR- та NOD-рецепторів є розпізнавання консервативних молекулярних структур мікроорганізмів та сигналів ендогенної природи, у тому числі й кристалів СК, які отримали назву патогенасоційованими молекулярними структурами (pathogen-associated molecular patterns) [2]. На сьогодні у людини ідентифіковано більш ніж 11 типів TLR. TLR разом із NOD-рецепторами ініціюють сигнальний шлях, що призводить до синтезу прозапальних цитокинів, хемокинів, молекул міжклітинної адгезії та інших компонентів, що сприяють ефекторній відповіді [3].

Результати нещодавніх досліджень показали, що TLR 4 типу можуть бути залученими до розвитку запального артриту, в тому числі гострого подагричного артриту [4, 5]. Так, у хворих на анкілозивний спондилоартрит виявлялося значне підвищення рівня TLR4 як у HLA-B27-позитивних, так і в негативних пацієнтів з АС порівняно зі здоровими особами [6]. Окрім того, у HLA-B27-позитивних пацієнтів були встановлені тісні кореляційні зв'язки між TLR4, прозапальними цитокінами (TNF- α , IL-12) та показниками активності захворювання (ШОЕ, С-реактивним білком) [6, 7]. У хворих на ревматоїдний артрит (РА) TLR4-рівні залишалися підвищеними як при ранньому, так і при пізньому РА [8], окрім того, TLR4 можуть регулювати синтез прозапальних цитокинів TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 та матричних металопротеїназ [9, 10]. TLR4 роблять свій внесок у підтримання стійкої експресії прозапальних цитокинів та запалення, і зрештою, руйнування кісток та суглобового хряща. В цілому, вчені зазначають, що TLR4 є важливим аспектом дослідження патогенезу ревматичних захворювань та в якості потенцій-

ної терапевтичної мішені [11]. У хворих на подагру відсутні дані про вплив TLR4 на перебіг захворювання та їх взаємодія з активністю запального процесу. У зв'язку з цим, дане дослідження є досить актуальним.

Метою дослідження було визначити вміст TLR4 у хворих на подагру та оцінити наявність зв'язку з активністю захворювання.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Дослідження проведено відповідно до принципів Гельсінської декларації і було схвалено Етичним комітетом Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова. Усі обстежені дали згоду на участь в дослідженні. Відповідно до мети та завдань було обстежено 65 чоловіків віком від 31 до 75 років, хворих на подагру, та 23 практично здорових чоловіків репрезентативного віку. Діагноз подагри встановлювали на основі критеріїв ACR/EULAR 2015 р. [12]. У дослідженні використали клінічні та лабораторні методи обстеження. Лабораторне обстеження включало визначення сечової кислоти (СК) сироватки крові та TLR4 типу. Вміст TLR4 визначали за допомогою комерційного набору "Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit for Toll Like Receptor 4 (TLR4) (Human)" (Cloud-Clone Corp, USA) відповідно до інструкції фірми-виробника.

Активність подагри визначали за шкалою Gout Activity Score (GAS) [13], яку розраховували за формулою:

$$GAS = 0,09 \times \text{кількість нападів за останні 12 місяців} + 1,01 \times \sqrt{СК} + 0,34 \times \text{ВАШ болю пацієнта} + 0,53 \times \ln(1 + \text{кількість тофусів}),$$

де СК – сечова кислота (мг/дл), ВАШ – візуальна аналогова шкала болю (см).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики з допомогою прикладних програм MS Excel XP та Statistica SPSS 10.0 for Windows. Визначали середню арифметичну та квадратичне відхилення. Вірогідність результатів оцінювали за допомогою t-критерію. Для ранжування окремих показників визначали медіану (Me) та процентилі (P_{25} , P_{75}).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ Середній вік чоловіків, яких включили в дослідження, був (53,1±9,7) року (табл. 1), середня тривалість захворювання (M± σ) за даними анамнезу становила (10,0±7,0) року.

Більшість пацієнтів – 59 (90,8 %) мала напади подагричного артриту протягом останнього року. За кількістю нападів на рік найбільшу групу склали хворі з 1–2 нападами. Таких осіб було 24 (36,9 %) і лише 3 (4,6 %) пацієнти мали більше 10 нападів подагри. У середньому в групі обстежених хворих кількість нападів складала $3,8 \pm 3,1$. Середня кількість уражених суглобів становила $8,1 \pm 5,0$. 40 % пацієнтів відмічали наявність тофусів, причому більшість хворих із хронічною тофусною подагрою мали 10 і більше тофусів. Таких хворих було 14 (53,8 %). Рівень СК сироватки крові пацієнтів із подагрю становив $(454,6 \pm 119,4)$ мкмоль/л, а інтенсивність болю за ВАШ була на рівні $(4,7 \pm 2,3)$ см.

У хворих на подагрю було підвищення TLR4-рівня порівняно з практично здоровими особами. Виявилось, що у пацієнтів із подагрю TLR4-рівень коливався в межах від 281,2 до 341,9 пг/мл і у середньому становив $(301,4 \pm 12,2)$ пг/мл, тоді як в осіб контрольної групи TLR4-

вміст коливався від 264,1 до 294,0 пг/мл і у середньому був $(280,1 \pm 8,7)$ пг/мл.

Також ми проаналізували TLR4-рівні у хворих на подагрю залежно від наявності тофусів (рис. 1). Аналіз засвідчив наявність достовірних відмінностей між групами пацієнтів з та без тофусів та контрольною групою. У хворих на подагрю з наявністю тофусів медіана та інтервал $[P_{25}; P_{75}]$ для TLR4-рівня відповідали діапазону 305,6 [300,7; 319,7]. Дещо нижчі показники виявилися у хворих без тофусів – 297,5 [291,5; 301,6]. Найнижчий TLR4-рівень було зафіксовано в осіб контрольної групи – 280,2 [273,5; 287,2].

Оцінка активності подагри з використанням GAS-шкали виявила, що більшість з обстежених хворих мала високу активність. У середньому активність за GAS у групі хворих становила $5,8 \pm 2,2$.

Процентильний аналіз показника GAS засвідчив достовірні відмінності між групами хворих. Як показано на рисунку 2, у хворих на подагрю без тофусів медіана та

Таблиця 1. Клініко-лабораторна характеристика хворих на подагрю

Показник	Значення	
Чоловіки	n (%)	65 (100)
Вік (роки)	$M \pm \sigma$	$53,1 \pm 9,7$
Тривалість захворювання (роки)	$M \pm \sigma$	$10,0 \pm 7,1$
Кількість нападів протягом останнього року	$M \pm \sigma$	$3,8 \pm 3,1$
0	n (%)	6 (9,2)
1–2	n (%)	24 (36,9)
3–5	n (%)	18 (27,8)
6–10	n (%)	14 (21,5)
>10	n (%)	3 (4,6)
Кількість суглобів, що залучені під час атак	$M \pm \sigma$	$8,1 \pm 5,0$
Наявність тофусів	n (%)	26 (40)
1–3	n (%)	6 (23,1)
4–9	n (%)	6 (23,1)
10 і більше тофусів	n (%)	14 (53,8)
СК сироватки крові (мкмоль/л)	$M \pm \sigma$	$454,6 \pm 119,4$
ВАШ болю (см)	$M \pm \sigma$	$4,7 \pm 2,3$

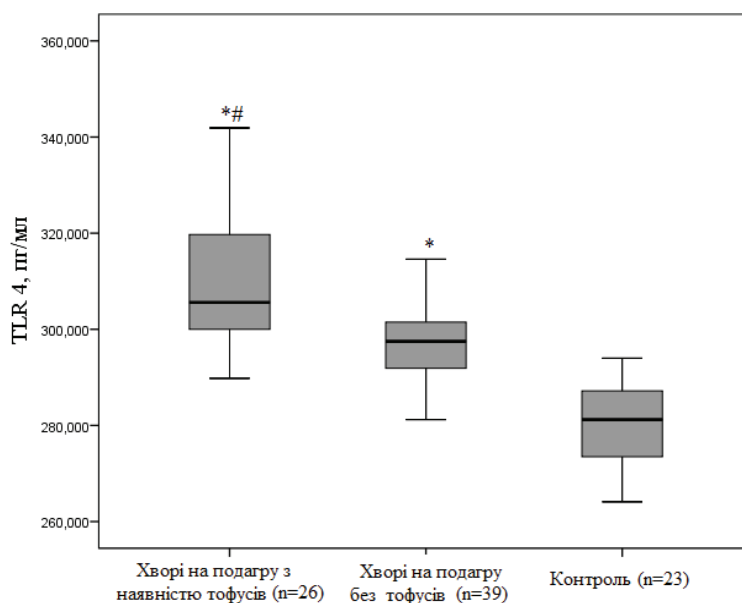


Рис. 1. Процентильний розподіл TLR4-вмісту у хворих на подагрю залежно від наявності тофусів та в осіб контрольної групи. Примітка. Верхня і нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75} , лінії за межами боксів – P_5 та P_{95} , лінія у середині боксів – медіана: * – $p < 0,05$ відносно контрольної групи, # – $p < 0,05$ стосовно групи хворих без тофусів.

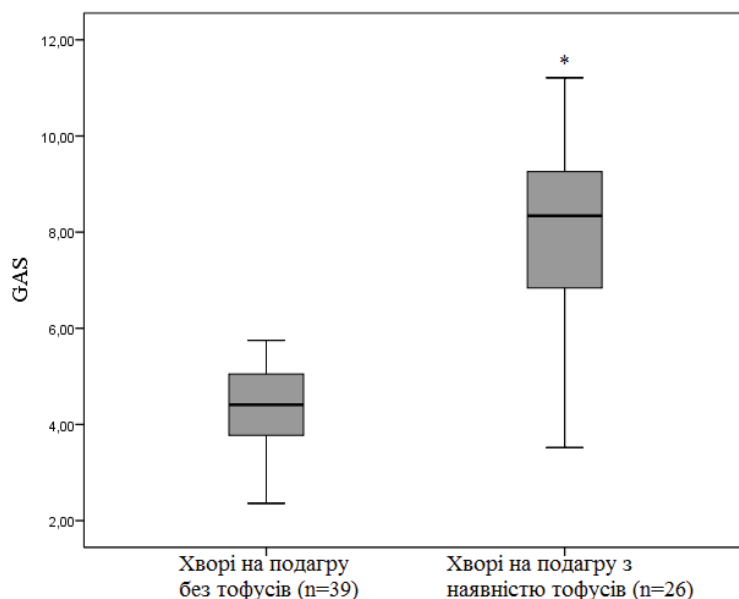


Рис. 2. Процентильний GAS-аналіз у хворих на подагру залежно від наявності тофусів.

Примітка. Верхня і нижня межі боксів відповідають P_{25} та P_{75} , лінії за межами боксів – P_5 та P_{95} , лінія у середині боксів – медіана: * – $p < 0,05$ стосовно групи хворих без тофусів.

інтервал [P_{25} ; P_{75}] відповідали діапазону 4,41 [3,7; 5,1], тоді як у хворих з наявністю тофусів вони становили 8,34 [6,7; 9,2]. За середніми величинами GAS у хворих на подагру з наявністю тофусів була в 1,8 рази вищою, ніж у хворих з відсутністю тофусів.

У подальшому ми проаналізували зв'язок TLR4-рівня з активністю захворювання за GAS та з клінічними особливостями подагри. З метою оцінки зв'язку ми зробили розподіл усередині групи хворих за процентилем і виділили три групи залежно від TLR4-рівня. До першої групи було включено 13 хворих із низьким TLR4-рівнем (<294,0 пг/мл [$<P_{25}$]). Другу групу склали 36 пацієнтів, у яких TLR4-рівень був у межах 294,0–305,2 пг/мл [P_{25} - P_{75}]. До третьої групи увійшло 16 хворих із найвищими рівнями TLR4 (>305,2 пг/мл [$>P_{75}$]). Було виявлено (табл. 2), що у хворих на подагру зі збільшенням TLR4-рівня зростає кількість нападів за останній рік та кількість уражених суглобів. Аналогічні закономірності були у змінах таких показників, як СК сироватки крові та ВАШ болю. З'ясувалось, що у хворих із низьким TLR4-рівнем (<294,0 пг/мл) активність захворювання за шкалою GAS була найнижчою, разом з тим, як у пацієнтів із високим TLR4-рівнем (>305,2 пг/мл) відмічали найвищу активність.

Кореляційний аналіз засвідчив, що у хворих на подагру найтісніший асоціативний зв'язок виявили між

TLR4-рівнем та активністю захворювання за шкалою GAS ($r=0,55$; $p < 0,05$). Деяко меншої сили були прямі кореляції з кількістю уражених суглобів, рівнем СК сироватки крові та інтенсивністю болю за ВАШ ($r=0,47$; $0,27$; $0,49$; $p < 0,05$). Не встановлено достовірного зв'язку між TLR4-рівнем та кількістю нападів за останній рік ($r=0,21$; $p > 0,05$).

Отже, у хворих на подагру зареєстровано значне підвищення TLR4-рівня в крові, порівняно з контрольною групою, причому найвищі рівні були зафіксовані у пацієнтів із наявністю тофусів. У хворих із високим TLR4-рівнем відмічалася найвища активність, тоді як у групі з низькими TLR4-рівнями прояви активності були мінімальними. З'ясувалось, що TLR4-рівень статистично достовірно корелює з кількістю уражених суглобів, рівнем СК сироватки крові, ВАШ та активністю захворювання за шкалою GAS.

ВИСНОВКИ 1. У хворих на подагру має місце підвищення TLR4-рівня в сироватці крові.

2. Підвищені TLR4-рівні асоціюються з високою активністю захворювання за GAS, кількістю уражених суглобів, рівнем СК сироватки крові та інтенсивністю болю за ВАШ. Зв'язок TLR4 з клініко-лабораторними показниками може свідчити про можливу патогенетичну роль TLR4 при подагрі.

Перспективи подальших досліджень полягають у необхідності підтвердження використання цих даних у щоденній клінічній практиці.

Таблиця 2. Активність захворювання та клінічні показники у хворих на подагру залежно від TLR4-рівня

Показник	Рівень TLR 4 типу (пг/мл)		
	$<P_{25}$ <294,0 (n=13)	P_{25} - P_{75} 294,0-305,2 (n=36)	$>P_{75}$ >305,2 (n=16)
Кількість нападів за останні 12 місяців	2,23±1,9	3,9±2,8*	4,5±3,8*
Кількість уражених суглобів	4,7±3,8	8,1±4,7*	11,1±4,9*#
СК сироватки крові (мкмоль/л)	426,7±98,9	449,2±113,1	489,6±145,2
GAS	4,2±0,9	5,7±2,0*	7,4±2,4*#
ВАШ (см)	3,2±1,7	4,5±2,1*	6,0±2,5*#

Примітки: 1) * – достовірні відмінності стосовно групи хворих $<P_{25}$; 2) # – достовірні відмінності стосовно P_{25} - P_{75} .

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Kim Y. NOD-like receptors in infection, immunity, and diseases / Y. Kim, J. Shin, M. Nahm // *Yonsei Medical Journal*. – 2016. – No. 57. – P. 5–14.
2. Rock K. Uric acid as a danger signal in gout and its comorbidities / K. Rock, H. Kataoka, J. Lai // *Nature Reviews Rheumatology*. – 2013. – No. 9. – P. 13–23.
3. Akira S. Pathogen recognition and innate immunity / S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi // *Cell*. – 2006. – No. 124. – P. 783–801.
4. The discriminative capacity of soluble Toll-like receptor (sTLR) 2 and sTLR4 in inflammatory diseases / J. Ten Oever, M. Kox, F. van de Veerdonk [et al.] // *BMC Immunology*. – 2014. – No. 15. – P. 55.
5. Soluble uric acid primes TLR-induced proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra / T. Crisan, M. Cleophas, M. Oosting [et al.] // *Annals of the Rheumatic Diseases*. – 2016. – No. 75. – P. 755–762.
6. Increased expression of Toll-like receptor 4 in peripheral blood leucocytes and serum levels of some cytokines in patients with ankylosing spondylitis / Z. Yang, Y. Liang, Y. Zhu [et al.] // *Clinical & Experimental Immunology*. – 2007. – No. 149. – P. 48–55.
7. Toll-like receptor 2 and 4 induced interleukin-19 dampens immune reactions and associates inversely with spondyloarthritis disease activity / T. Kragstrup, T. Andersen, C. Holm [et al.] // *Clinical & Experimental Immunology*. – 2015. – No. 180. – P. 233–242.
8. Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: Toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis / C. Ospelt, F. Brentano, Y. Rengel [et al.] // *Arthritis & Rheumatology*. – 2008. – No. 58. – P. 3684–3692.
9. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4 / N. Kayagaki, M. Wong, I. Stowe [et al.] // *Science*. – 2013. – No. 341. – P. 1246–1249.
10. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death / J. Shi, Y. Zhao, K. Wang [et al.] // *Nature*. – 2015. – No. 526. – P. 660–665.
11. McCormack W. Toll-like receptors and NOD-like receptors in rheumatic diseases / W. McCormack, A. Parker, L. O'Neill // *Arthritis research & therapy*. – 2009. – No. 11. – P. 243.
12. 2015 Gout classification criteria: an American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism collaborative initiative / T. Neogi, T. Jansen, N. Dalbeth [et al.] // *Arthritis & Rheumatology*. – 2015. – No. 67. – P. 2557–2568.
13. Development and first validation of a disease activity score for gout / C. Scirè, G. Carrara, C. Viroli [et al.] // *Arthritis Care & Research*. – 2016. – No. 68. – P. 1530–1537.

Отримано 10.01.18

©I. V. Orlova, M. A. Stanislavchuk

M. Pyrohov Vinnitsia National Medical University

LEVELS OF TLR 4 IN PATIENTS WITH GOUT: THEIR ASSOCIATION WITH DISEASE ACTIVITY

Summary. TLR4 levels have a significant role in the development of rheumatic diseases, but role of TLR4 in gout remains on the discussion.

The aim of the study – to determine the level of TLR4 in patients with gout and evaluate its association with the disease activity.

Materials and Methods. Study involved 65 patients with gout (100 % men), aged (mean±SD) 53.1±9.7 years, with a disease duration 10.0±7.1 years. In 26 (40) we diagnosed tophaceous gout. Control group was represented by 23 healthy persons. Diagnosis of gout was based on the ACR/EULAR 2015 criteria. The disease activity was determined by the Gout Activity Score (GAS). TLR4 in serum was determined by ELISA.

Results and Discussion. TLR4 levels in gout patients were significantly higher in comparison with practically healthy subjects (301.4±12.2) pg/ml and (280.1±8.7) pg/ml, respectively). The activity by GAS scale was (5.8±2.2). In patients with low TLR4 (<294.0 pg/ml), activity was lowest by GAS, while in patients with high levels of TLR4 (>305.2 pg/ml), the highest activity was observed. The increase in the TLR4 content was also accompanied by an increase in the number of gout attacks during the last year, the number of affected joints, and the intensity of pain for VAS. The level of TLR4 correlated with GAS (r=0.55), the number of affected joints (r=0.47) the level of serum uric acid (r=0.27) and VAS (r=0.49, p<0.05).

Conclusions. In patients with gout, the high levels of TLR4 are associated with the disease activity. Association of increased level TLR4 with high gout activity may indicate possible pathogenic role of TLR4 in gout.

Key words: gout; activity; TLR4.

©И. В. Орлова, М. А. Станиславчук

Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова

TLR4-УРОВНИ У БОЛЬНЫХ ПОДАГРОЙ: СВЯЗЬ С АКТИВНОСТЬЮ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Резюме. TLR4-уровни имеют большое значение в развитии многих ревматических заболеваний, хотя его роль при подагре остается дискуссионной.

Цель исследования – определить содержания TLR4 у больных подагрой и оценить связь с активностью заболевания.

Материалы и методы. В исследование было включено 65 больных подагрой (100 % мужчины), возрастом (mean±SD) (53,1±9,7) лет и длительностью заболевания – (10,0±7,1) лет. Среди них 26 (40 %) с хронической тофусной подагрой. Контрольную группу составили 23 практически здоровых лиц. Активность заболевания считали за Gout Activity Score (GAS). Уровень TLR4 определяли с помощью ELISA.

Результаты исследований и их обсуждение. Уровни TLR4 у больных подагрой были достоверно выше по сравнению с практически здоровыми лицами ((301,4±12,2) пг/мл и (280,1±8,7) пг/мл соответственно). Активность по шкале GAS была в 5,8±2,2. У больных с низким TLR4-уровнем (<294,0 пг/мл) активность заболевания по шкале GAS была низкой, тогда как у пациентов с высоким TLR4-уровнем (>305,2 пг/мл) отмечалась высокая активность. Увеличение содержания TLR4 сопровождалось ростом количества приступов подагры в течение последнего года, количества пораженных суставов, интенсивности боли по ВАШ. Выявлены достоверные ассоциативные связи между TLR4-уровнем и активностью по GAS (r=0,55), количеством пораженных суставов (r=0,47), уровнем мочевой кислоты сыворотки крови (r=0,27) и ВАШ боли (r=0,49; p<0,05).

Выводы. У больных подагрой определяются высокие TLR4-уровни, ассоциирующиеся с активностью заболевания.

Ключевые слова: подагра; активность; TLR4.