

Повышенная экспрессия регуляторных генов в крови и суставном хряще больных ревматоидным артритом

Е.В. Четина, Л.А. Семенова, А.Л. Логунов, В.В. Коломацкий, М.А. Макаров, А.А. Роскидайло, Е.А. Нарышкин, С.А. Макаров

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт ревматологии» РАМН, Москва

Research Institute of Rheumatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Контакты: Елена Васильевна Четина
etchetina@mail.ru

Contact: Elena Vasilyevna Chetina
etchetina@mail.ru

Поступила 27.10.10

Цель — исследовать соотношение экспрессии нетканеспецифических регуляторных генов *mTOR*, *p21*, *ATG1*, *каспазы 3*, фактора некроза опухолей (*ФНО α*) и интерлейкина 6 (*ИЛ 6*), а также генов матриксной металло-протеиназы 13 (*ММП 13*) и коллагена X типа (*КОЛ10A1*), ассоциированных с резорбцией хряща ММП 13 и КОЛ10A1 в крови и хряще коленных суставов больных ревматоидным артритом (РА).

Материал и методы. Исследовано 25 образцов суставного хряща дистальных мыщелков бедренной кости 15 больных РА (средний возраст $52,4 \pm 9,1$ года), которым проведено эндопротезирование коленных суставов, и 10 здоровых людей (средний возраст $36,0 \pm 9,1$ года), включенных в контрольную группу. Кроме того, проанализированы 28 образцов крови больных РА, взятой перед эндопротезированием коленных суставов (средний возраст $52 \pm 7,6$ года), и 27 образцов крови здоровых людей (контроль, средний возраст $53,6 \pm 8,3$ года). Посредством количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в образцах крови и хряща определены уровни экспрессии генов *mTOR*, *p21*, *ATG1*, *каспазы 3*, *ФНО α*, *ИЛ 6*, *КОЛ10A1* и *ММП 13*. Содержание белкового эквивалента исследуемых генов *p70-S6K* (активируемого *mTOR*), *p21* и *каспазы 3* определяли в лизатах изолированных лимфоцитов с использованием готовых наборов для иммуноферментного анализа (ELISA). Суммарный белок в клеточных экстрактах определяли методом Бредфорда.

Результаты. Экспрессия генов *mTOR*, *ATG1*, *p21*, *ФНО α*, *ММП 13* и *КОЛ10A1* в образцах хряща больных РА на поздней стадии заболевания была значительно выше, чем у здоровых людей. В то же время экспрессия *ИЛ 6* оказалась значительно ниже, чем в контрольной группе. В крови больных РА экспрессия генов *mTOR*, *ATG1*, *p21*, *ФНО α* и *ИЛ 6* значительно превышала уровни их экспрессии у доноров. Уровни экспрессии *каспазы 3* существенно не различались в крови больных РА и здоровых людей. Экспрессия *ММП 13* и *КОЛ10A1* в крови не обнаружена. Высокая экспрессия генов *mTOR*, *p21* и *каспазы 3* в крови сопровождалась повышенной концентрацией соответствующих белков в лизатах клеток больных РА по сравнению со здоровыми лицами. **Заключение.** Полученные результаты впервые свидетельствуют о повышенной экспрессии регуляторных генов *mTOR*, *ATG1*, *p21* и *ФНО α* в крови и суставном хряще больных РА. Эти изменения сопровождаются повышенной экспрессией гена *ММП 13*, ответственного за резорбцию хряща. Поэтому повышение экспрессии исследованных регуляторных генов в крови больных РА может свидетельствовать о деструкции суставного хряща.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, экспрессия генов, *mTOR*, кровь, суставной хрящ

ENHANCED REGULATORY GENE EXPRESSIONS IN THE BLOOD AND ARTICULAR CARTILAGE OF PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

E.V. Chetina, L.A. Semyonova, A.L. Logunov, V.V. Kolomatsky, M.A. Makarov, A.A. Roskidailo, E.A. Naryshkin, S.A. Makarov

Objective: to study the expression ratio of the non-tissue specific regulatory genes *mTOR*, *p21*, *ATG1*, *caspase 3*, tumor necrosis factor- α (*TNF- α*), and interleukin-6 (*IL-6*), as well as matrix metalloproteinase 13 (*MMP-13*) and X type collagen (*COL10A1*), cartilage resorption-associated MMP13 and COL10A1 in the blood and knee articular cartilage in patients with rheumatoid arthritis (RA).

Subjects and methods. Twenty-five specimens of the distal femoral articular cartilage condyles were studied in 15 RA patients (mean age 52.4 ± 9.1 years) after endoprosthetic knee joint replacement and in 10 healthy individuals (mean age 36.0 ± 9.1 years) included into the control group. Twenty-eight blood samples taken from 28 RA patients (aged 52 ± 7.6 years) prior to endoprosthetic knee joint replacement and 27 blood samples from healthy individuals (mean age 53.6 ± 8.3 years; a control group) were also analyzed. Real-time quantitative polymerase chain reaction was applied to estimate the expression of the *mTOR*, *p21*, *ATG1*, *caspase 3*, *TNF- α* , *IL-6*, *COL10A1*, and *MMP-13* genes. The levels of a protein equivalent in the *p70-S6K* (activated by *mTOR*), *p21*, and *caspase 3* genes concerned was measured in the isolated lymphocyte lysates, by applying the commercially available ELISA kits. Total protein in the cell extracts was determined using the Bradford assay procedure.

Results. The cartilage samples from patients with end-stage RA exhibited a significantly higher *mTOR*, *ATG1*, *p21*, *TNF α* , *MMP-13*, and *COL10A1* gene expressions than did those from the healthy individuals. At the same time, *IL6* gene expression was much lower than that in the control group. The expressions of the *mTOR*, *ATG1*, *p21*, *TNF α* , and *IL 6* genes in the blood of RA patients were much greater than those in the donors. *Caspase 3* expression did not differ essentially in the bloods of the patients with RA and healthy individuals. The bloods failed to show *MMP-13* and *COL10A1* expressions. High *mTOR* and *p21* gene expressions were accompanied by the elevated concentrations of the corresponding proteins in the cell lysates of the patients with RA compared to the controls.

Conclusion. The findings suggest for the first time that regulatory *mTOR*, *ATG1*, *p21*, and *TNF α* gene expressions are enhanced in the blood and articular cartilage of RA patients. These changes are accompanied by the increased expression of *MMP 13* gene that is responsible for articular cartilage resorption. Therefore, the higher expression of the examined regulatory genes in the blood of RA patients may be indicative of articular cartilage degradation.

Key words: rheumatoid arthritis, gene expression, *mTOR*, blood, articular cartilage

Ревматоидный артрит (РА) характеризуется хроническим воспалением синовиальной оболочки сустава с последующим разрушением хряща, деформацией и нарушением функции сустава. Предполагаемые патогенетические механизмы РА включают повреждение механизмов клеточного деления иммунных клеток, суставных синовиоцитов и хондроцитов. В суставе при РА продуцируется большое количество провоспалительных медиаторов, оказывающих синергическое митогенное воздействие на синовиальные фибробласты, в результате которого эти клетки входят в клеточный цикл с последующим высвобождением деструктивных молекул в суставную сумку [1]. Эрозии суставного хряща, в свою очередь, наблюдаются преимущественно в зонах, прилегающих к пролиферирующим синовиоцитам, которые, как предполагается, секретируют протеолитические ферменты, разрушающие коллаген (в частности, матриксную металлопротеиназу 13 — ММП 13) и протеогликаны хряща и кости. Гиперплазия синовии также характеризуется опухолевым типом пролиферации и считается главной причиной деструкции сустава при РА [2].

Кроме того, известно, что при РА происходит нарушение механизмов клеточной регуляции [3]. Одним из главных регуляторов клеточного роста и биосинтеза белка в клетке является протеинкиназа *mTOR* (mammalian target of rapamycin) [4]. Активность гена *mTOR* может положительно регулироваться разветвленными аминокислотами, глюкозой, факторами роста (инсулином), митогенами и цитокинами (фактор некроза опухоли α — ФНО α) [5]. Напротив, в условиях голодания, гипоксии или стресса происходит инактивация *mTOR* и активация аутофагии, обеспечивающей выживание клеток.

Недавние исследования показали, что продукт гена *mTOR* может вовлекаться в патологический процесс при РА. В частности, оказалось, что *mTOR* регулирует инвазивные свойства синовиальных фибробластов при РА [6]. Кроме того, продемонстрировано, что компоненты сигнального пути *mTOR* участвуют в реактивации РА после беременности [7]. Наши предварительные исследования также показали, что уровни экспрессии гена *mTOR* различаются в крови клинически однородной группы первичных больных РА и могут в дальнейшем служить прогностическим маркером тяжести заболевания и активности разрушения суставов [8].

Кроме того, ингибирование *mTOR* рапамицином на животных моделях подавляло формирование синовиальных остеокластов, значительно снижало инвазивные свойства синовиоцитов, препятствовало формированию эрозий кости и разрушению хряща [6, 9], а также способствовало апоптозу остеокластов [9, 10]. Другой ингибитор *mTOR*, эверолимус, значительно снижал активность болезни у больных РА [11].

Активность сигнального пути *mTOR* реципрочно связана с механизмом аутофагии, которая связана с продукцией ингибиторов циклин-зависимых киназ, таких как p21, и наступает при аресте пролиферации, а также в результате недостатка питательных веществ, отсутствия критических трофических факторов, гипоксии, действия токсинов или химиотерапии [12]. Аутофагия также индуцируется цитокинами (ФНО α , интерфероном γ) и аутоантителами. Она может быть важным фактором патогенеза РА и других аутоиммунных заболеваний [13].

При аутофагии происходит переваривание лизосомами белков и собственных поврежденных клеточных орга-

нелл в аутофагосомах — вакуолях, ограниченных двойной мембраной, сформированных с участием продукта гена *ATG1*, который является маркером аутофагии. Это способствует более длительному автономному выживанию клетки. Ранее считалось, что аутофагия является механизмом ответа на неблагоприятные условия внешней среды, однако в настоящее время показано, что она также необходима для протекания нормальных физиологических процессов в клетке. Аутофагия тесно связана с апоптозом и может служить резервным механизмом клеточной смерти при продолжительном стрессе, когда нарушен апоптоз [12, 14].

Клеточная смерть у многоклеточных организмов происходит преимущественно посредством апоптоза. Апоптоз проявляется в уменьшении размеров клеток, конденсации и фрагментации хроматина, уплотнении наружной и цитоплазматических мембран без выхода содержимого клетки в окружающую среду и ультраструктурных изменений внутриклеточных органелл. В этом процессе участвуют многочисленные каспазы, передающие информацию каспазе 3, которая непосредственно запускает программу апоптоза.

Недавние исследования показали нарушение процесса апоптоза у больных РА. В частности, низкую активность апоптоза наблюдали в лейкоцитах синовиальной жидкости и синовиоцитах при раннем РА [15–19]. Кроме того, сообщалось об изменении профиля экспрессии ряда регуляторных генов у больных РА и выявлены статистически достоверные различия по экспрессии генов, связанных с апоптозной активностью (*FasL*, *LIGHT*), регуляторов морфогенеза хряща и кости (*BMP 4/6* и *Runx2*) в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) больных РА по сравнению со здоровыми людьми [20].

Некоторые авторы допускают существование корреляции между экспрессией генов, кодирующих нетканеспецифичные процессы, в различных тканях [21]. Поэтому мы предположили, что при РА уровни экспрессии генов, ответственных за регуляцию клеточной жизнедеятельности, включая рост клеток и их пролиферацию (компоненты сигнального пути *mTOR*), аутофагию, апоптоз и показатели активности воспалительного процесса, могут изменяться сходным образом в крови и суставном хряще. Это позволило бы оценивать состояние суставного хряща у больных РА при отсутствии рентгенологических маркеров его деструкции.

В связи с этим цель настоящей работы — сравнить уровни экспрессии генов и концентрации кодируемых ими белков: *mTOR*, *ATG1*, p21, каспазы 3, ММП 13, коллагена X типа (COL10A1), провоспалительных цитокинов ФНО α и ИЛ 6 — у больных РА в крови, полученной перед протезированием коленных суставов, и в суставном хряще, полученном при операции и у здоровых лиц.

Материал и методы

Пациенты. Исследовано 25 образцов суставного хряща дистальных мышечков бедренной кости, полученных у 15 больных РА (средний возраст $52,4 \pm 9,1$ года), которым проведено эндопротезирование коленных суставов, и 10 здоровых людей (средний возраст $36 \pm 9,1$ года), включенных в контрольную группу. Образцы хрящей в контрольной группе получали менее чем через 16 ч после скоропостижной смерти при аутопсии. У них не обнаружено какой-либо патологии, в частности признаков диабета или сосудистой недостаточности нижних конечностей.

Кроме того, проанализированы 28 образцов крови больных РА (средний возраст $52 \pm 7,6$ года), взятой перед эндопротезированием коленных суставов, и 27 образцов крови здоровых людей (контроль, средний возраст $53,6 \pm 8,3$ года). Диагноз РА соответствовал критериям Американской коллегии ревматологов.

Фракционирование клеток крови. Фракционирование клеток периферической крови проводили в градиенте плотности верографина-фикола по стандартной методике. Фракции МКПК, которые локализовались в интерфазе, собирали и дважды отмывали фосфатно-солевым буфером [22]. Белки экстрагировали в буфере для экстракции белков (Invitrogen, FNN0011) в соответствии с рекомендациями производителя.

Определение содержания белков p70-S6K, p21 и каспазы 3 в изолированных клетках крови. Концентрации суммарного p70 рибосомального белка S6 киназы (p70-S6K), [pT389] (KHO0571); активного p70-S6K, фосфорилированного по треонину 389 (KHO0581); ингибитора циклин-зависимой киназы p21 Waf1/Cip1 (KHO5421) и активной каспазы 3 после ее расщепления в области Asp175/Ser176 (KHO1091) определяли с использованием готовых наборов для иммуноферментного анализа (ELISA) в соответствии с рекомендациями производителя (Invitrogen). Результаты пересчитывали на 1 мкг белка, измеренного методом Бредфорда в изолированных клетках крови [23].

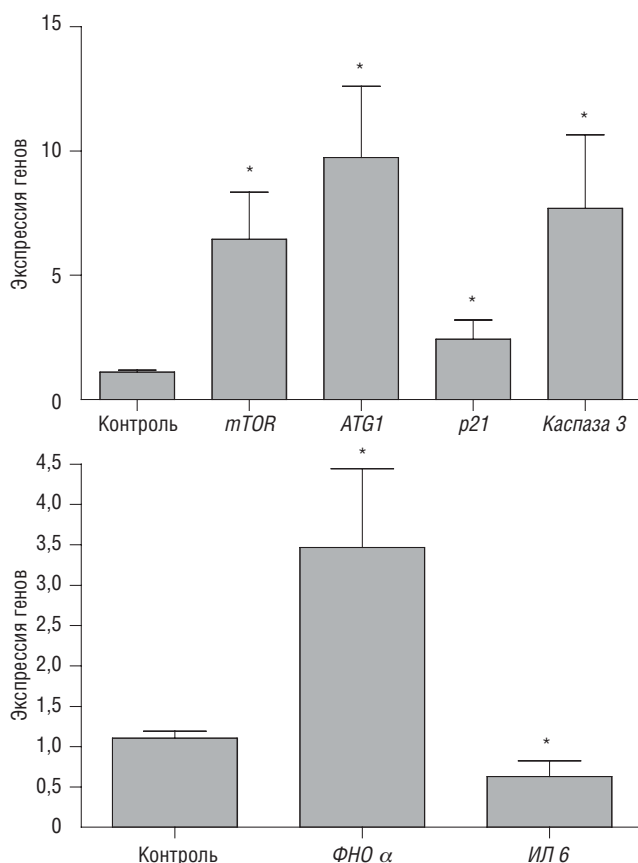


Рис. 1. Относительная экспрессия регуляторных генов в хряще коленных суставов больных РА по сравнению со здоровыми донорами. Контроль – уровень экспрессии генов у доноров. Статистически значимые различия по сравнению с контролем обозначены звездочками (здесь и на рис. 2, 3)

Выделение РНК, реакция обратной транскрипции (ОТ) и полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени. Из собранных образцов цельной крови выделена общая РНК, которая переведена в кДНК посредством обратнотранскриптазной реакции, как описано ранее [24].

Посредством количественной ПЦР в режиме реального времени в образцах периферической крови и хряща проведена оценка уровней относительной экспрессии генов у больных РА по сравнению со здоровыми лицами из контрольной группы, как описано ранее [24]. Использовали готовые праймеры и зонды для TaqMan методики (Applied Biosystems Int., USA): mTOR (Hs00234522_m1), ATG1 (Hs00177504_m1), каспазы 3 (Hs00263337_m1), p21 (Hs00355782_m1), ФНО α (Hs00174128_m1), ММП 13 (Hs00233992_m1) и КОЛ10A1 (Hs00166657_m1). β-Актин или 18S РНК использовали в качестве гена домашнего хозяйства. Количественную оценку уровней мРНК проводили на приборе 7300 (Applied Biosystems Int., США), как описано ранее [24].

Статистический анализ. Количественные данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. t-критерий Манна–Уитни использовали для сравнения показателей больных РА и контрольных доноров. Значения $p < 0,05$ считались статистически достоверными.

Результаты

Относительная экспрессия генов в суставном хряще больных РА по сравнению со здоровыми лицами. В образцах хряща больных РА на поздней стадии заболевания экспрессия mTOR ($6,45 \pm 1,9$; $p = 0,03$), ATG1 ($9,73 \pm 2,9$; $p = 0,046$), p21 ($2,44 \pm 0,8$; $p = 0,03$), каспазы 3 ($7,69 \pm 2,9$; $p = 0,03$), ФНО α ($3,46 \pm 0,9$; $p = 0,02$), ММП 13 ($785,7 \pm 247,1$; $p < 0,001$) и КОЛ10A1 ($12,6 \pm 3,9$; $p < 0,001$) была значительно выше, чем у здоровых доноров (рис. 1). В то же время экспрессия IL6 ($0,62 \pm 0,2$; $p = 0,04$) оказалась значительно ниже, чем в контрольной группе.

Следует также отметить, что не наблюдалось значительных различий между экспрессией генов mTOR, ATG1 и каспазы 3 у исследуемых больных РА. Однако экспрессия гена p21 была значительно ниже по сравнению с экспрессией генов mTOR ($p = 0,02$), ATG1 ($p = 0,05$) и каспазы 3 ($p < 0,001$). Экспрессия гена ФНО α значительно превышала экспрессию гена IL6 ($p = 0,047$).

Относительная экспрессия генов в крови больных РА по сравнению со здоровыми лицами. Анализ образцов периферической крови также показал значительное превышение экспрессии генов mTOR ($5,67 \pm 1,9$; $p < 0,001$), ATG1 ($4,15 \pm 0,8$; $p < 0,001$), p21 ($14,41 \pm 3,9$; $p < 0,001$), ФНО α ($150,07 \pm 55,8$; $p < 0,001$), IL6 ($117,35 \pm 83,7$; $p < 0,001$) у больных РА по сравнению с контролем (рис. 2). Экспрессия каспазы 3 у больных РА была в 2,5 раза выше, чем в контроле, однако эти различия не были статистически значимы ($p = 0,18$). Экспрессия p21 была значительно выше экспрессии mTOR ($p < 0,001$), ATG1 ($p < 0,001$) и каспазы 3 ($p < 0,001$), а экспрессия ФНО α и IL6 в крови больных РА оказалась практически одинаковой. Экспрессия генов ММП 13 и КОЛ10A1 в крови больных РА и здоровых доноров не обнаружена.

Содержание белков исследуемых генов в изолированных клетках крови больных РА и здоровых доноров. Для оценки активности исследуемых генов определялось содержание общего и фосфорилированного белка p70-S6K (преимущественно активируется mTOR-сигнальным путем), активированной формы каспазы 3 и p21 в клетках крови больных

РА и здоровых доноров. Наблюдалось значительное повышение концентрации общего $p70\text{-S6K}$ ($2,83 \pm 0,36$; $p=0,045$), фосфорилированного $p70\text{-S6K}$ ($7,96 \pm 3,2$; $p=0,001$), $p21$ ($14,32 \pm 5,7$; $p=0,044$; рис. 3). Средний уровень каспазы 3 ($3,07 \pm 1,2$; $p=0,4$) был несколько выше, чем в контроле, но различия статистически недостоверны.

Обсуждение

В настоящее время одной из важных задач ревматологии является раннее обнаружение разрушения суставного хряща и кости при РА. Одним из возможных подходов к решению этой проблемы может быть анализ экспрессии генов, изменение которой, как показали наши исследования деструкции суставного хряща при остеоартрозе, предшествует возникновению структурных нарушений в ткани [25]. При этом меняется экспрессия как тканеспецифических генов, так и регуляторных факторов, функционирующих в разных тканях [26].

Кроме того, недавно было показано, что экспрессия нетканеспецифических, регуляторных генов в крови больных РА и здоровых доноров значительно различается [8, 20]. Поэтому при условии аналогичных изменений экспрессии в крови и суставном хряще такие гены могли бы служить диагностическим маркером разрушения хряща при РА.

В данном исследовании мы продемонстрировали значительное повышение экспрессии регуляторных генов $mTOR$, $ATG1$, $p21$ и $\PhiНО\ \alpha$ в крови и хряще больных на поздней стадии РА. При этом экспрессия исследуемых генов коррелировала с содержанием соответствующих белков в клетках крови, что указывает на связь экспрессии генов с их активностью. В частности, как по экспрессии, так и по содержанию продуктов генов количество $mTOR$, $ATG1$, $p21$ оказалось значительно выше в крови больных РА, чем в контроле, а количество каспазы 3 достоверно не отличалось от такового в контроле.

Более высокая относительная экспрессия генов $p21$ по сравнению с экспрессией каспазы 3 в клетках крови может свидетельствовать об ингибировании апоптозной активности, что ранее неоднократно отмечалось при РА [27, 28]. Напротив, сравнительно низкая экспрессия $p21$ в хряще указывает на то, что апоптозная активность хондроцитов не ингибируется. Поскольку экспрессия каспазы 3 в хряще значительно превышает ее уровень у здоровых доноров, это приводит к гибели хондроцитов и последующему разрушению внеклеточного матрикса.

Повышенная экспрессия цитокинов $\PhiНО\ \alpha$ и ИЛ 6 в клетках крови больных РА свидетельствует об участии Т- и В-лимфоцитов в иммунном ответе [29]. Напротив, в хряще экспрессия ИЛ 6 оказалась ниже, чем в контрольной группе. Ранее также отмечалась очень низкая экспрессия этого цитокина в развивающемся хряще [30].

Повышенная экспрессия $mTOR$, $ATG1$ и $p21$ в крови может быть связана с развитием гипермитогенного ареста клеточного цикла в клетках больных РА [31]. Гипермитогенный арест наступает, когда клетки не способны преодолеть контрольные пункты G1/S или G2, что приводит к выходу из клеточного цикла на фазе G1 или G2. Это ведет к началу клеточного старения или, иногда, к клеточной смерти [32]. При этом уровни циклинов очень высоки, однако деление клеток ингибируется высоким содержанием ингибиторов циклин-зависимых киназ, таких как $p21$. Кроме того, гипермитогенный арест представляет собой устойчивое состояние, которое характеризуется высокими

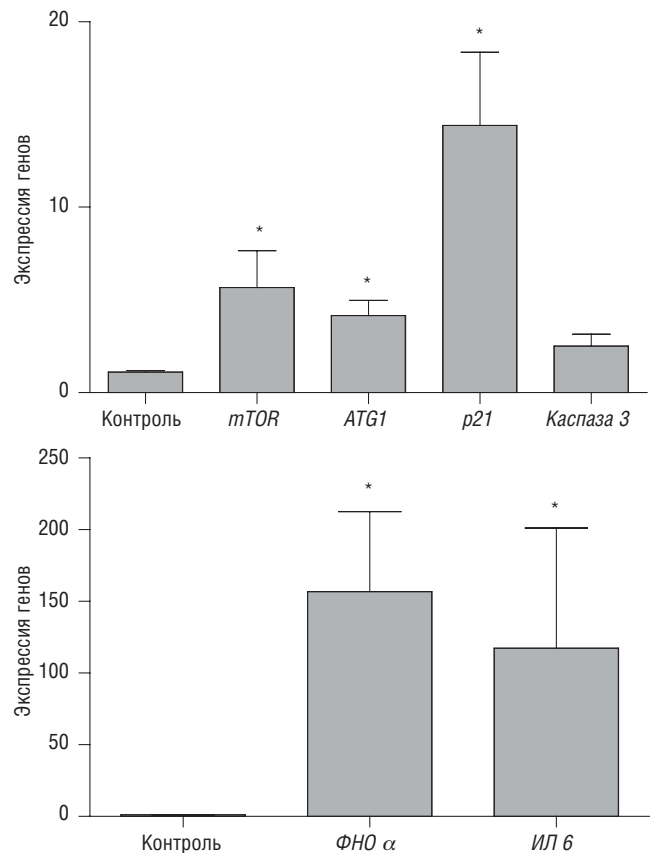


Рис. 2. Относительная экспрессия регуляторных генов в крови больных РА по сравнению со здоровыми донорами. Контроль – уровень экспрессии генов у доноров

уровнями секреции аутокринных и паракринных факторов, а также интенсивным синтезом белка, и вследствие этого может поддерживать воспалительный процесс [32].

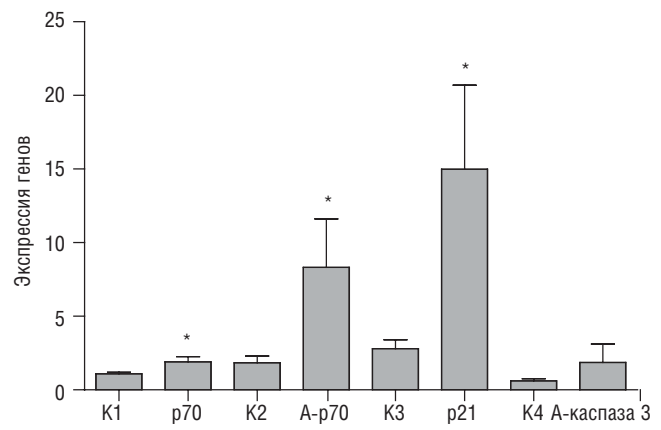


Рис. 3. Экспрессия белков исследуемых регуляторных генов в крови больных РА и здоровых доноров. K1, K2, K3 и K4 – концентрация белков у доноров. $p70$ – $p70\text{-S6K}$, общий белок, активируемый геном $mTOR$ (в нг/мкг клеточного белка), A- $p70$ – $p70\text{-S6K}$, фосфорилированный белок, активируемый геном $mTOR$ (в единицах активности/мкг клеточного белка), $p21$ – ингибитор циклин-зависимых киназ $p21$ (в пг/мкг клеточного белка), A-кас-паза 3 – каспаза 3, активированная расщеплением в сайте Asp175/Ser176

Повышение экспрессии специфичных для гиалинового хряща генов, коллагеназы *ММП 13* и *КОЛ10А1* (коллагена X типа), в образцах хряща обследованных больных позволяет судить о механизме разрушения суставного хряща при РА, который включает активацию генов гипертрофной зоны фетальной ростковой пластинки в процессе формирования кости. Как нами было показано ранее, аналогичные механизмы участвуют в резорбции суставного хряща при остеоартрозе [33].

Заключение

В данной работе впервые показано, что экспрессия *mTOR*, *ATG1*, *p21* и *ФНО α* в крови и суставном хряще боль-

ных РА значительно выше, чем у здоровых лиц. Эти изменения сопровождаются повышенным содержанием соответствующих белков в клетках крови, что свидетельствует о функциональной активности указанных генов. Поскольку повышенная экспрессия исследованных регуляторных генов в хряще сопровождается повышенной экспрессией гена *ММП 13*, ответственного за резорбцию хрящевого матрикса, определение уровня экспрессии этих генов в крови может быть использовано в качестве дополнительного метода оценки разрушения суставного хряща у больных РА.

Работа осуществлена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 09-04-01158-а и № 12-04-00038а).

ЛИТЕРАТУРА

- Firestein G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423:356–61.
- Rindfleisch J.A., Muller D. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *Am Fam Physician* 2005;72:1037–47.
- Karouzakis E., Neidhart M., Gay R.E., Gay S. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunology Letters* 2006;106:8–13.
- Hay N., Sonnenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004;18:1926–45.
- Djavahery-Mergny M., Amelotti M., Mathieu J. et al. NF-κB activation represses tumor necrosis factor-α-induced autophagy. *J Biol Chem* 2006;281:30373–82.
- Laragione T., Gulko P.S. mTOR regulates the invasive properties of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Mol Med* 2010;16:352–8.
- Häupl T., Ostensen M., Grützku A. et al. Reactivation of rheumatoid arthritis after pregnancy: increased phagocyte and recurring lymphocyte gene activity. *Arthr Rheum* 2008;58:2981–92.
- Tchetina E.V., Demidova N.V., Semyanova L.A. et al. Differential expression of mammalian target of rapamycin (mTOR) in the peripheral blood of early-stage rheumatoid arthritis patients as a prognostic marker of the disease activity and knee joint destruction: a two year follow up study. *Ann Rheum Dis* 2010;69(Suppl.3):675.
- Carlson R.P., Hartman D.A., Tomchek L.A. et al. Rapamycin, a potential disease-modifying antiarthritic drug. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;266:1125–38.
- Cejka D., Hayer S., Niederreiter B. et al. Mammalian target of rapamycin signaling is crucial for joint destruction in experimental arthritis and is activated in osteoclasts from patients with rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum* 2010;62:2294–302.
- Bruyn G.A., Tate G., Caeiro F. et al. Everolimus in patients with rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate: a 3-month, double-blind, randomised, placebo-controlled, parallel-group, proof-of-concept study. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1090–5.
- Lum J.J., DeBerardinis R.J., Thompson C.B. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:439–48.
- Lleo A., Invernizzi P., Selmi C. et al. Autophagy: highlighting a novel player in the autoimmunity scenario. *J Autoimmun* 2007;2:61–8.
- Lu B., Capan E., Li C. Autophagy induction and autophagic cell death in effector T cells. *Autophagy* 2007;3:158–9.
- Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med* 2001;40:275–84.
- Catrina A.I., Ulfgren A.K., Lindblad S. et al. Low levels of apoptosis and high FLIP expression in early rheumatoid arthritis synovium. *Ann Rheum Dis* 2002;61:934–6.
- Rasa K., Scheel-Toellner D., Lee C.-Y. et al. Synovial fluid apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. *Arthr Res Ther* 2006;8:R120.
- Shin Y.J., Han S.H., Kim D.S. et al. Autophagy induction and CHOP under-expression promotes survival of fibroblasts from rheumatoid arthritis patients under endoplasmic reticulum stress. *Arthr Res Ther* 2010;12:R19.
- Wood K., Twigg H.L., Doseff A.I. Dysregulation of CD8+ lymphocyte apoptosis, chronic disease, and immune regulation. *Front Biosci* 2009;14, 3771–81.
- Grcevic D., Jajic Z., Kovacic N. et al. Peripheral blood expression profiles of bone morphogenetic proteins, tumor necrosis factor-superfamily molecules, and transcription factor Runx2 could be used as markers of the form of arthritis, disease activity, and therapeutic responsiveness. *J Rheumatol* 2010;37:246–56.
- Mahr S., Burmester G.R., Hilke D. et al. Cis- and trans-acting gene regulation is associated with osteoarthritis. *Am J Hum Genet* 2006;78:793–803.
- Лимфоциты — методы. Под ред. Д. Клауса. М.: Мир, 1990; 52–3.
- Kruger N.J. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol* 1994;32:9–15.
- Четина Е.В., Ди Батиста Д., Пул А.Р. Роль простагландина Е2 в ингибировании разрушения коллагена суставного хряща больных остеоартрозом. *Науч-практич ревматол* 2009;3:18–23.
- Tchetina E.V., Squires G., Poole A.R. Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions. *J Rheumatol* 2005;32:876–86.
- Четина Е.В., Пул А.Р. Роль ростовых факторов в подавлении разрушения коллагена и дифференциации хондроцитов при остеоартрозе. *Вестн РАМН* 2008;5:15–21.
- Gartel A.L., Tyner A.L. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2002;1:639–49.
- Peng S.L. Fas (CD95)-related apoptosis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:26–30.
- Raghav S.K., Gupta B., Agrawal C. et al. Expression of TNF-α and related signaling molecules in the peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. *Mediators Inflamm* 2006;3:12682.
- Dodds R.A., Merry K., Littlewood A., Gowen M. Expression of mRNA for IL1β, IL6 and TGFβ1 in developing human bone and cartilage. *J Histochem Cytochem* 1994;42:733–44.
- Blagosklonny M.V. Cell senescence and hypermitogenic arrest. *EMBO Report* 2003;4:358–62.
- Demidenko Z.N., Blagosklonny M.V. Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. *Cell Cycle* 2008;7:3355–61.
- Четина Е.В. Механизмы эмбриогенеза при остеоартрозе: роль дифференцировки хондроцитов в резорбции суставного хряща. *Науч-практич ревматол* 2010;3:65–77.