

Мониторинг терапии ритуксимабом больных ревматоидным артритом посредством анализа экспрессии генов в периферической крови

Четина Е.В., Пиванова А.В., Кузикянц К.Х., Девятайкина А.Ю.,
Лукина Г.В., Самаркина Е.Ю., Алексанкин А.П., Александрова Е.Н.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой» РАН, Москва, Россия 115522, Москва, Каширское шоссе, 34А

Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia 34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522

Контакты: Елена Васильевна Четина; etchetina@mail.ru

Contact: Elena Chetina; etchetina@mail.ru

Поступила 23.12.13.

Цель — посредством анализа экспрессии генов в крови больных ревматоидным артритом (РА) определить предикторы эффективности терапии ритуксимабом (РТМ).

Материал и методы. Обследованы 16 больных РА (средний возраст $53,4 \pm 10,8$ года, средняя длительность заболевания $8,2 \pm 7,1$ года), получавших ранее без эффекта базисные противовоспалительные препараты и ингибиторы фактора некроза опухоли α (ФНО α). Каждому пациенту проводился один курс лечения РТМ в дозе 0,5–1 г. В контрольную группу вошли 26 здоровых лиц. Клинический ответ оценивали по индексу активности заболевания DAS28, определяли также скорость оседания эритроцитов (СОЭ), сывороточные уровни антител к циклическому цитруллинированному пептиду, С-реактивного белка (СРБ) и ревматоидного фактора. Эрозии костей и сужение суставных щелей оценивали рентгенологически. Общую РНК выделяли из крови и использовали для оценки экспрессии генов *mTOR*, *ULK1*, *каспазы 3*, *p21*, *ФНО α* , *катепсина К*, *матрикс-протеиназы (ММП) 9*, *интерлейкина (ИЛ) 1 β* , *интерферона (ИФН) γ* и *циклооксигеназы (ЦОГ) 2* посредством обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. Экспрессия всех исследованных генов была повышена ($p < 0,05$) у больных РА по сравнению со здоровыми лицами в начале исследования. Терапия РТМ приводила к снижению ($p < 0,05$) DAS28, СОЭ, уровня СРБ и деpleции CD19+ В-лимфоцитов. На фоне лечения РТМ не изменялись число эрозий и величина суставной щели. Отмечалось подавление экспрессии генов *mTOR*, *p21*, *каспазы 3*, *ULK1*, *ФНО α* , *ИЛ1 β* и *катепсина К* в крови до уровня здоровых лиц. Экспрессия *ММП9* также снижалась ($p < 0,05$) по сравнению с началом исследования, однако оставалась значительно выше, чем в контроле, а значительных изменений в экспрессии *ИФН γ* и *ЦОГ2* не происходило.

Заключение. Анализ экспрессии генов в крови может служить источником информации о состоянии больных РА в ходе терапии РТМ. Остаточная повышенная экспрессия *ММП9*, *ИФН γ* и *ЦОГ2* после терапии может быть причиной сохранения активности РА и повторного обострения заболевания.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; экспрессия генов; периферическая кровь; воспаление; поражение суставов; ритуксимаб.

Для ссылки: Четина ЕВ, Пиванова АВ, Кузикянц КХ и др. Мониторинг терапии ритуксимабом больных ревматоидным артритом посредством анализа экспрессии генов в периферической крови. Научно-практическая ревматология. 2014;52(3):263–269.

RITUXIMAB THERAPY MONITORING IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS THROUGH PERIPHERAL BLOOD GENE EXPRESSION ANALYSIS

Chetina E.V., Pivanova A.V., Kuzikyants K.Kh., Devyataikina A.Yu.,
Lukina G.V., Samarkina E.Yu., Aleksankin A.P., Aleksandrova E.N.

Objective: to determine the predictors of the efficiency of rituximab (RTM) therapy through analysis of blood gene expressions in patients with rheumatoid arthritis (RA).

Subjects and methods. Sixteen patients (mean age $53,4 \pm 10,8$ years) with RA (mean duration $8,2 \pm 7,1$ years) who had previously received disease-modifying antirheumatic drugs and tumor necrosis factor- α (TNF- α) inhibitors without effects were examined. Each patient underwent a treatment cycle with RTM in a dose of 0.5–1 g. A control group included 26 healthy individuals. Clinical response was assessed with DAS28. Erythrocyte sedimentation rate (ESR), serum levels of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, C-reactive protein (CRP), and rheumatoid factor (RF) were estimated. Bone erosions and joint space narrowing were evaluated radiologically. RNA was isolated from blood and used to estimate the expression of the *mTOR*, *ULK1*, *caspase 3*, *p21*, *TNF- α* , *cathepsin K*, *matrix metalloproteinase-9* (*MMP-9*), *interleukin-1 β* (*IL-1 β*), *interferon- γ* (*IFN- γ*), and *cyclooxygenase-2* (*COX-2*) genes by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Results. At the beginning of the investigation, the expression of all the genes under study was increased ($p < 0.05$) in the patients with RA versus the healthy individuals. RTM therapy resulted in reductions in DAS28, ESR, CRP levels, and CD10+ B lymphocyte depletion ($p < 0.05$). There were no changes in the number of erosions and the width of the joint space during RTM therapy. The blood expression of the *mTOR*, *p21*, *caspase 3*, *ULK1*, *TNF- α* , *IL-1 β* , and *cathepsin K* genes was suppressed to that of healthy individuals. As compared to the beginning of the investigation, the expression of *MMP-9* was also reduced ($p < 0.05$); however, it remained far higher than that in the controls and no drastic changes occurred in the expression of the *IFN- γ* and *COX-2* genes.

Conclusion. Blood gene expression analysis may serve as a source of information on the status of patients with RA during RTM therapy. The higher residual expression of *MMP-9*, *IFN- γ* , and *COX-2* may be a reason for the preserved activity of RA and its exacerbation.

Key words: rheumatoid arthritis; gene expression; peripheral blood; inflammation; joint lesion; rituximab.

Reference: Chetina EV, Pivanova AV, Kuzikyants KKh, et al. Rituximab therapy monitoring in patients with rheumatoid arthritis through peripheral blood gene expression analysis. Rheumatology Science and Practice. 2014;52(3):263–269.

DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2014-263-269>

Ревматоидный артрит (РА) является одним из наиболее распространенных аутоиммунных ревматических заболеваний, которое представляет собой комплексный системный многофакторный воспалительный процесс, включающий поражение суставов [1]. Хотя его этиология до конца не ясна, показано, что развитие РА сопровождается изменениями клеточного и гуморального иммунитета [2].

Известно, что В-лимфоциты играют критическую протекторную роль в поддержании здоровья (защищают от инфекции, атеросклероза и канцерогенеза, обеспечивают эффективность вакцин) [3]. Например, регуляторные В-клетки способны подавлять аутоиммунность [4] путем индукции анергии Т-лимфоцитов или экспансии регуляторных Т-лимфоцитов [5]. Эта активность опосредуется продукцией интерлейкина (ИЛ) 10 и трансформирующего фактора роста (ТФР) β [6, 7]. Помимо продукции антител, протективная роль В-клеток также опосредуется недостаточно изученными механизмами, независимыми от антител [8]. Вместе с тем нарушение В-клеточной толерантности при РА и других аутоиммунных заболеваниях приводит к синтезу аутоантител, активирующих систему комплемента и лимфоциты и индуцирующих воспаление и деструкцию ткани [3].

В связи с этим одним из новых препаратов селективного действия, используемых в ревматологии, является ритуксимаб (РТМ). Это химерные моноклональные антитела мыши и человека IgG1k, связывающие поверхностный антиген CD20 [9], который экспрессируется на В-лимфоцитах, находящихся на разных стадиях дифференцировки, но не экспрессируется на предшественниках В-лимфоцитов или терминально дифференцированных плазматических клетках [10]. После связывания РТМ индуцирует деплецию В-лимфоцитов путем комплемент- и антителопосредованной клеточной цитотоксичности, хотя некоторые нециркулирующие тканевые В-лимфоциты связываются с РТМ, но не погибают [11].

РТМ в комбинации с метотрексатом (МТ) уменьшает активность РА [12, 13]. Более того, РТМ значительно замедляет разрушение суставов при РА [14, 15], часто независимо от клинического ответа пациентов [14]. При этом сохранение симптомов РА несмотря на лечение РТМ коррелирует с сохранением плазматических клеток и синовиальных В-лимфоцитов [15].

Вместе с тем механизмы действия РТМ при РА не до конца ясны. Предполагается, что действие РТМ, прежде всего, связано с подавлением процессов, опосредованных В-лимфоцитами: продукции аутоантител, презентации антигенов Т-лимфоцитам, активации макрофагов и дендритных клеток [2]. Считается, что клиническое улучшение связано с уменьшением уровня антител в сыворотке [13, 16, 17], причем наилучший клинический ответ наблюдался при практически полной деплеции В-лимфоцитов после первой инфузии препарата [18].

Результаты терапии РТМ показывают, что помимо продуцирования антител В-лимфоциты выполняют дополнительные функции, поскольку часто количество аутоантител уменьшается как у ответивших, так и у не ответивших на лечение и их уровни не коррелируют с тяжестью проявлений заболевания [13, 19]. Кроме того, больные могут достичь ремиссии несмотря на сохранение антител в сыворотке [16].

Исследование молекулярных механизмов могло бы прояснить характер действия РТМ при РА. Однако они в достаточной степени не изучены. В настоящее время проведен ряд исследований, направленных на прогнозирование эффективности РТМ на основе особенностей экспрессии генов больных РА до использования препарата. В частности, показано, что ответившие на лечение имеют в синовии более высокие уровни экспрессии генов, связанных с функциями макрофагов и Т-лимфоцитов, низкие уровни экспрессии гена аргиназы (*ARG1*) и повышенную экспрессию генов фактора 1, ассоциированного с рецептором фактора некроза опухолей (TRAF) 1 и TOLL-подобного рецептора (TLR) 4 [20], а также низкие уровни хемокина с последовательностью C-X-C (CXCL13), который является хемоаттрактантом для В-лимфоцитов [21]. Одним из механизмов элиминации В-лимфоцитов может быть стимулирование их апоптоза [22, 23]. Напротив, у не ответивших на терапию повышена экспрессия интерферона (ИФН) γ [24] и генов тканевого ремоделирования [25].

Исследования динамики экспрессии генов на фоне терапии РТМ малочисленны. Так, в синовиальной ткани отмечалось снижение экспрессии генов, кодирующих иммуноглобулины, хемотаксис, активацию лейкоцитов и иммунный ответ; напротив, экспрессия генов, связанных с онтогенезом клеток и регенерацией тканей, усиливалась в ходе лечения РТМ [26]. Кроме того, у хорошо отвечавших на терапию РТМ в крови наблюдалось увеличение экспрессии генов кластера ИФН I типа [27].

Ранее проведенные нами исследования показали, что экспрессия тканенеспецифических регуляторных генов *mTOR* (mammalian target of rapamycin), главного регулятора клеточного роста и пролиферации; *ULK1*, маркера аутофагии, способствующей более длительному, автономному выживанию клетки; *p21*, ингибитора циклин-зависимых киназ, подавляющего клеточное деление; *каспазы 3*, индикатора апоптозной активности; провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли (ФНО) α ; а также протеаз *катепсина К* и *металлопротеиназы (ММП) 9*, ответственных за разрушение кости и хряща, нарушена в крови больных РА и они могут служить прогностическими маркерами тяжести заболевания и разрушения суставного хряща и кости [28–30]. Кроме того, нами было выявлено, что в ходе лечения МТ экспрессия вышеперечисленных генов изменяется и коррелирует с изменениями клинических, иммунологических и рентгенологических параметров, используемых для оценки состояния больного в клинической практике [31, 32].

В данной работе проанализированы изменения клинических, иммунологических, рентгенологических показателей и экспрессии генов *mTOR*, *ULK1*, *p21*, *каспазы 3*, *ММП9* и *катепсина К*, а также цитокинов *ФНО α* , *ИЛ1 β* , *ИФН γ* и *циклооксигеназы (ЦОГ) 2* у больных РА в ответ на терапию РТМ.

Материал и методы

Пациенты. В исследование включены 15 серопозитивных и один серонегативный больной РА (2 мужчины и 14 женщин) в возрасте ≥ 18 лет (средний возраст $53,4 \pm 10,8$ года), с достоверным диагнозом РА по критериям Американской коллегии ревматологов (ACR)

1987 г. Длительность заболевания составляла в среднем $8,2 \pm 7,1$ года (от 0,6 года до 27 лет). Ранее больные получали без эффекта базисные противовоспалительные препараты, а также ингибиторы ФНО α .

Больные проходили лечение в ФГБУ «НИИР им. В.А. Насоновой» РАН в 2010–2013 гг. Регистрационный номер клинического исследования 01200900996. Протокол исследования утвержден локальным комитетом по этике, информированное согласие получено от всех исследованных больных.

Критерием исключения являлось наличие противопоказаний для назначения генно-инженерных биологических препаратов в эффективных терапевтических дозах.

Все пациенты получали по одному курсу из двух инфузий РТМ (мабтеры): 8 – по 0,5 г, 8 – по 1 г на фоне терапии МТ в дозе 15–20 мг в неделю (7 из 16 больных), или лефлуномидом 20 мг/сут ($n=2$), или азатиоприном 150 мг/сут ($n=1$), или оксиклорохином 200–400 мг/сут ($n=2$). 11 больных дополнительно получали метилпреднизолон по 3–12 мг в день, а 14 принимали нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП: кеторол, найз, аркоксию или диклофенак). Каждый больной наблюдался одним и тем же ревматологом в течение всего периода исследования.

Контрольную группу составили 26 сопоставимых по полу и возрасту с группой больных (средний возраст $51 \pm 13,2$ года) доноров крови без аутоиммунных заболеваний иотягощенной наследственности.

Клинические и лабораторные методы. Для количественной оценки активности РА был использован индекс DAS28.

Иммунологические методы. Определение концентрации С-реактивного белка (СРБ) и ревматоидного фактора (РФ) в сыворотке проводилось с использованием иммунонефелометрического метода на автоматическом анализаторе BN-100 (Dade Behring, Германия). Концентрация антител к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП) определялась иммуноферментным методом с использованием коммерческого набора фирмы Axis-Shield Diagnostic Limited (Великобритания) согласно инструкции фирмы-производителя. Количество CD19+ В-лимфоцитов в периферической крови определяли методом проточной цитофлюориметрии с использованием набора моноклональных антител Cyto-Stat Tetra Chrome CD45-FITC/CD56-RD-1/CD19-ECD/CD3-PC5 и Cyto-Stat Tetra Chrome CD45-FITC/CD56-RD-1/CD8-ECD/CD3-PC5 на проточном цитофлюориметре Cytomics FC 500 согласно инструкции фирмы-производителя (Beckman Coulter, США).

Инструментальные методы. Всем пациентам проводилась рентгенография кистей и дистальных отделов стоп в прямой проекции в начале исследования и через год после первой инфузии РТМ. Для оценки прогрессирования изменений суставов использовали метод Sharp в модификации van der Heijde. При этом подсчитывали эрозии и сужение суставных щелей в 16 суставах каждой кисти и в 6 суставах каждой стопы. Счет числа эрозий и сужения суставной щели регистрировали для каждой кисти и каждой стопы, вычисляли среднее значение оценок, данных двумя сотрудниками отдела рентгенологии ФГБУ «НИИР им. В.А. Насоновой» РАН.

Молекулярно-биологические методы. Общую РНК выделяли из цельной крови, используя коммерческий

набор РИБО-золь-А («ИнтерЛабСервис», Москва) согласно инструкции фирмы-производителя. Обратнотранскриптазную реакцию проводили с использованием коммерческого набора Реверта-Л («ИнтерЛабСервис», Москва) согласно инструкции фирмы-производителя. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в режиме реального времени проводили с использованием прибора модели 7300 Applied Biosystems и наборов для оценки экспрессии генов (Applied Biosystems, USA): *mTOR* (Hs0023522_m1), *ULK1* (Hs00177504_m1), *p21* (Hs00355782_m1), *каспазы 3* (Hs00263337_m1), *ФНО α* (Hs00174128_m1), *ММП9* (Hs00234579_m1), *катепсина К* (Hs00166156_m1), *ИЛ1 β* (Hs00174097_m1), *ЦОГ2* (Hs00153133_m1) и *ИФН γ* (Hs00855471_m1), как описано ранее [33, 34]. β -Актин использовали в качестве эндогенного контроля.

Статистический анализ. Данные количественных экспериментов представлены как медиана [25-й; 75-й перцентили]. Анализы выполняли в двух повторностях. Статистический анализ проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для статистической обработки результатов использовали тесты Манна–Уитни и Уилкоксона. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$. Статистически значимые различия по сравнению с контролем отмечены (*) звездочкой, по сравнению с началом исследования – знаком (*).

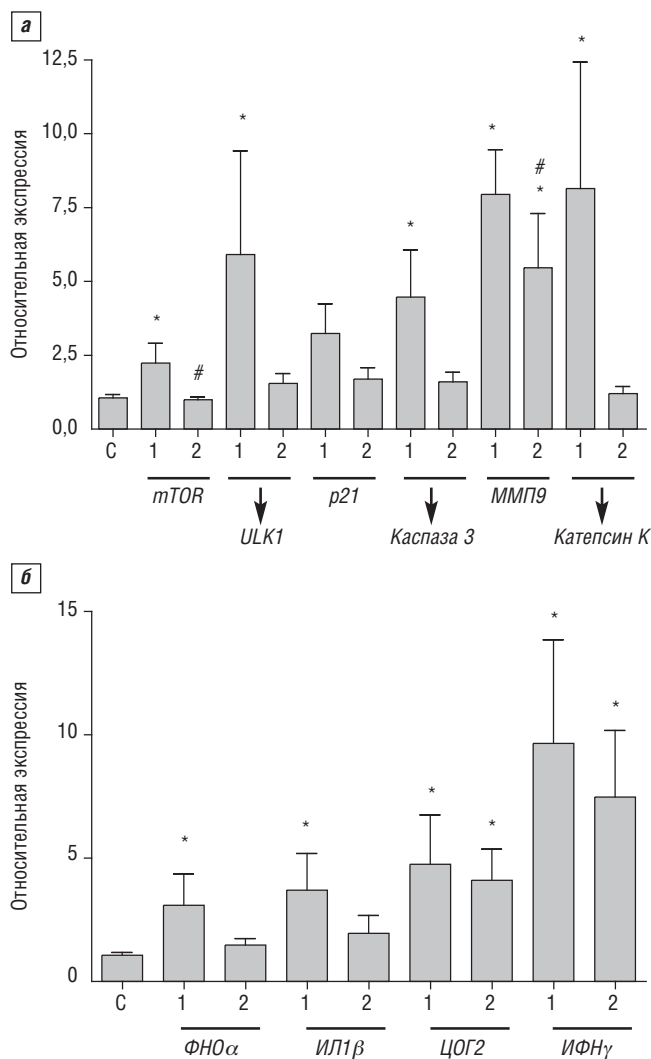
Результаты

Характеристика больных РА ($n=16$). В начале исследования 7 больных имели II рентгенологическую стадию по Штейнброкеру, 7 – III стадию, 2 – IV стадию. Все пациенты соответствовали II функциональному классу по критериям ACR. Большинство больных данной подгруппы (14 из 16) имели высокую активность заболевания (DAS28 $>5,1$) в начале исследования (табл. 1). После введения РТМ отмечалось значительное уменьшение индекса DAS28 ($p=0,0005$). При этом медиана дельты DAS28 составила 2,5 [0,4; 4,9]. У 10 больных DAS28 снижался не менее чем на 1,2. Ремиссия (DAS $<2,6$) отмечена у 3, а низкая активность (3,2 $>$ DAS $>2,6$) – у 5 больных. У 4 больных активность заболевания после лечения РТМ снижалась до умеренной (3,2 $<$ DAS $<5,1$) и еще у 4 больных – оставалась высокой (DAS $>5,1$). В соответствии с критериями эффективности терапии Европейской антиревматической лиги (EULAR) DAS28 терапия РТМ оказалась неэффективна у 4 из 16 больных РА, у остальных отмечался удовлетворительный эффект. СОЭ и уровень СРБ, несмотря на значительное уменьшение ($p < 0,05$), нормализовались только у 8 и 4 больных соответственно и оставались повышенными в большинстве случаев (см. табл. 1). Уровни АЦЦП и РФ изменялись незначительно. При этом сероконверсию наблюдали у двух больных, и при повторном обследовании уровень IgM РФ у них соответствовал норме. После первого курса терапии РТМ у всех исследованных больных наблюдали практически полную деплецию CD19+В-лимфоцитов ($p=0,0002$).

Оценка экспрессии генов в крови больных РА ($n=16$). В начале исследования у больных РА была значительно ($p < 0,05$) повышена экспрессия большинства исследуемых генов, за исключением *p21*, по сравнению с контролем (см. рисунок). Терапия РТМ приводила к значитель-

Таблица 1 Характеристика больных РА, Ме [25-й; 75-й перцентили]

Пациенты	До лечения (n=16)	Через 6 мес (n=16)	p
РФ, МЕ/л	282,5 [143,5; 455]	172 [96,5; 538,5]	0,67
АЦЦП, ЕД/мл	200 [111,6; 332,2]	328,5 [121,2; 501]	0,54
СРБ, мг/мл	27,1 [11,6; 44,1]	7,9 [5,6; 20,2]	0,01
СОЭ, мм/ч	45 [35,5; 62,5]	21 [16,5; 36]	0,001
DAS28	6,3 [5,7; 7,1]	3,5 [2,7; 5,1]	0,0005
Δ DAS28		2,5 [0,9; 3,7]	
Скованность, мин	135 [45; 210]	7,5 [0; 35]	0,001
Число припухших суставов	7 [2,5; 10,5]	1 [0,5; 4]	0,001
Число болезненных суставов	16,0 [10; 23,05]	2 [1; 7]	0,001
Общий счет эрозий по Шарпу (n=7)	7 [0; 22]	6 [0; 22]	0,5
Общий счет сужений по Шарпу (n=7)	65 [19; 91]	76 [33; 91]	0,25
Содержание CD19+ В-лимфоцитов, %	10,3 [4,2; 13,5]	0,06 [0; 0,32]	0,0002



Относительная экспрессия генов *mTOR*, *ULK1*, *p21*, *каспазы 3*, *катепсина К*, желатиназы *ММР9* (а) и *ФНОα*, *ИЛ1β*, *ЦОГ2* и *ИФНγ* (б) в крови больных РА (n=16) до (1) и после (2) одного курса лечения РТМ по сравнению со здоровыми лицами – контроль (С; n=26). Статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) по сравнению с уровнем экспрессии гена в контроле обозначены звездочкой (*); статистически значимые различия по сравнению с уровнем экспрессии гена в начале исследования обозначены знаком (#).

ному снижению экспрессии *mTOR* ($p=0,05$) и *ММР9* ($p=0,01$) по сравнению с исходным уровнем. Экспрессия остальных исследованных генов также снижалась, однако эта динамика не достигла уровня статистической достоверности. Вместе с тем экспрессия большинства исследованных генов становилась сравнимой с их экспрессией у здоровых лиц ($p > 0,05$), лишь уровни экспрессии *ММР9*, *ЦОГ2* и *ИФНγ* оставались значительно выше, чем в контроле ($p < 0,01$).

Следовательно, терапия РТМ может обеспечивать нормализацию экспрессии ряда генов, ответственных за рост, пролиферацию, выживание, апоптоз клеток, за разрушение костной ткани и синтез провоспалительных цитокинов *ФНОα* и *ИЛ1β*.

Наблюдалась положительная корреляция уровня РФ с экспрессией *p21* ($r=0,605$, $p=0,01$), *катепсина К* ($r=0,607$, $p=0,02$), *ЦОГ2* ($r=0,529$, $p=0,03$) и *ИФНγ* ($r=0,592$, $p=0,01$). Уровень АЦЦП в конце исследования коррелировал с исходным уровнем экспрессии *mTOR*, *ULK1*, *p21*, *ФНОα* и *ММР9* (табл. 2). Сывороточное содержание РФ в конце терапии также положительно коррелировало с исходными уровнями экспрессии *p21* и *катепсина К*. В то же время наблюдалась отрицательная корреляция исходной экспрессии *ULK1* и *ММР9* с числом болезненных суставов; *ММР9* – с числом эрозий в конце исследования.

Обсуждение

Новые данные о возможных молекулярных механизмах заболевания позволяют заменить неспецифические иммуносупрессорные препараты на медикаменты, оказывающие селективное воздействие на разные типы клеток, цитокины и сигнальные пути. Такая терапия позволит увеличить эффективность лечения, уменьшить токсичность и получить новые представления о патогенезе болезни [2].

В данном исследовании мы показали, что использование РТМ при РА обеспечивало практически полную деплецию В-лимфоцитов в крови. Это согласуется с данными других исследователей, которые также показали, что ответ на РТМ сопровождается значительным снижением числа В-лимфоцитов [18].

Кроме того, наблюдалось значительное улучшение клинических параметров. Снижалась активность заболевания по DAS28, уменьшались скованность, число при-

Таблица 2 Коэффициенты корреляции (по Спирмену) экспрессии генов в начале исследования с клиническими и иммунологическими показателями в конце первого курса терапии РТМ у больных РА (n=16)

Показатель	Экспрессия генов в начале исследования					
	<i>mTOR</i>	<i>ULK1</i>	<i>p21</i>	<i>каспаза 3</i>	<i>ФНОα</i>	<i>катепсин К</i>
АЦЦП	0,557 (p=0,03)	0,736 (p=0,004)	0,531 (p=0,05)	0,710 (p=0,006)	0,614 (p=0,01)	0,600 (p=0,02)
РФ			0,582 (p=0,01)			0,616 (p=0,01)
Число болезненных суставов		-0,514 (p=0,04)			-0,532 (p=0,03)	
Число эрозий (n=7)					-0,882 (p=0,008)	

пухших и болезненных суставов, СОЭ, уровень РФ и СРБ. Большинство больных РА (n=10) имели снижение уровня DAS28>1,2. Однако при этом активность заболевания у большинства больных снижалась до умеренной (3,2<DAS<5,1) и сохранялось повышение уровней РФ, АЦЦП, СРБ, СОЭ, болезненности, припухлости суставов и утренней скованности.

Поскольку практически все аспекты фенотипа заболевания представляют патофизиологические процессы, кодируемые генами и их продуктами, которые, таким образом, определяют уникальную биологию болезни [35], исследования изменения экспрессии генов в крови больных РА при терапии РТМ позволили определить некоторые механизмы действия препарата на молекулярном уровне.

В частности, улучшение клинической картины заболевания сопровождалось снижением изначально повышенной экспрессии генов, ответственных за регуляцию клеточной пролиферации (*mTOR*, *p21*), выживания (*ULK1*) и апоптоза (*каспазы 3*) до уровня здоровых лиц. Это свидетельствует о восстановлении клеточного гомеостаза периферических клеток крови. А поскольку данные гены не являются тканеспецифичными, не исключены аналогичные изменения в тканях других органов больных РА при терапии РТМ. Следует также отметить, что в этом состоит отличие действия РТМ от МТ, при использовании которого для терапии больных РА экспрессия *ULK1*, *p21* и *каспазы 3* оставалась повышенной [31, 32]. Снижение экспрессии *каспазы 3* у обследованных больных РА до уровня здоровых лиц в результате терапии РТМ ставит под сомнение утверждение о том, что одним из механизмов элиминации В-лимфоцитов может быть стимулирование их апоптоза [22, 23], и согласуется с ранее полученными данными о том, что способность РТМ индуцировать апоптоз чрезвычайно низка [23]. Вместе с тем пока остается не ясен механизм ингибирующего действия РТМ на исследованные нами тканеспецифические регуляторные гены.

Значительное снижение (до уровня здорового контроля) экспрессии *катепсина К* — главного гена, ответственного за разрушение кости [36], — которое сопровождалось отсутствием прогрессирования деструкции суставов, может служить одним из показателей антидеструктивного действия препарата. Однако для окончательных выводов необходимы дополнительные более длительные исследования, включающие большее число больных.

Продолжение воспалительного процесса, проявляющегося в сохранении припухлости суставов у 12 из 16 больных, несмотря на снижение уровней экспрессии *ФНО α* и *ИЛ1 β* до контрольных значений, вероятно, обусловлено

сохранением высокой экспрессии *ЦОГ2* и *ИФН γ* . Кроме того, сохраняющаяся у большинства обследованных больных (n=13) болезненность суставов может быть связана с высокой экспрессией *ММП9* и *ЦОГ2*, поскольку ранее отмечалось участие белков, кодируемых этими генами, в развитии нейропатической боли в исследованиях на животных [37, 38].

Важно также отметить, что выявленная нами отрицательная корреляция между экспрессией генов *ULK1* и *ММП9* в начале исследования с числом болезненных суставов и числом эрозий в конце терапии соответственно может свидетельствовать о том, что больные с высокой экспрессией этих генов будут более активно отвечать на терапию РТМ, поэтому контроль экспрессии данных генов перед терапией может быть экономически обоснован.

В целом наше исследование показывает, что при лечении РТМ частичное улучшение клинических показателей больных РА сопровождается снижением экспрессии тканеспецифических регуляторных генов *mTOR*, *ULK1*, *p21*, *каспазы 3*, цитокинов *ФНО α* , *ИЛ1 β* и протеиназы *катепсина К* до уровня нормы. Сохранение высокой экспрессии *ММП9*, *ИФН γ* и *ЦОГ2* может быть причиной низкого процента ремиссии, а также сохранения болезненности и припухлости суставов у большинства больных РА после одного курса терапии РТМ. Кроме того, высокие исходные уровни экспрессии *ULK1* и *ММП9* ассоциировались с положительной динамикой отдельных клинических и лабораторных признаков РА на фоне терапии РТМ.

Прозрачность исследования

Работа осуществлена при финансовой поддержке РФФИ (проект №12-04-00038а).

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

Благодарности

Предварительные результаты исследования были опубликованы в виде тезисов в Материалах XVIII Российского национального конгресса «Человек и его здоровье». Санкт-Петербург, 16–18 октября 2013 г., с. 86–87; в Материалах I Евразийского конгресса ревматологов, Алматы, Казахстан, 15–17 мая 2012 г., с. 112–113; в Материалах VII Всероссийской конференции ревматологов России, Владимир, 23–26 мая 2012 г., № 204, с. 55; в материалах European League Against Rheumatism (EULAR), Annual Symposium, Ann Rheum Dis. 2012;71(Suppl 3):668.

ЛИТЕРАТУРА

- Насонов ЕЛ. Применение ритуксимаба при ревматоидном артрите. В кн.: Анти-В-клеточная терапия в ревматологии: фокус на ритуксимаб. Под ред. Е.Л. Насонова. Москва: ИМА-ПРЕСС; 2012. С. 55–93. [Nasonov EL. Application rituximab at rheumatoid arthritis. In: *Anti-B-kletochnaya terapiya v revmatologii: fokus na rituksimab* [Anti-B-cellular therapy in rheumatology: focus on rituximab]. Nasonov EL, editor. Moscow: IMA-PRESS; 2012. P. 55–93.]
- Tuscano JM, Sands J. B cell reductive therapy with rituximab in the treatment of rheumatoid arthritis. *Biologics*. 2009;3:225–32. Epub 2009 Jul 13. DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/BTT.S3168>.
- Chan OT, Madaio MP, Shlomchik MJ. The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. *Immunological Reviews*. 1999;169:107–21. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.1999.tb01310.x>.
- Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes – key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol*. 2008;20:332–8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2008.03.003>. Epub 2008 Apr 15.
- Fillatreau S, Gray D, Anderton SM. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):391–7. DOI: 10.1038/nri2315.
- Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, et al. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*. 2002;3(10):944–50. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ni833>. Epub 2002 Sep 3.
- Reichardt P, Dornbach B, Rong S, et al. Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunologic synapse. *Blood*. 2007;110(5):1519–29. DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-10-053793>. Epub 2007 Mar 28.
- Anolik JH, Looney RJ, Lund FE, et al. Insights into the heterogeneity of human B cells: diverse functions, roles in autoimmunity, and use as therapeutic targets. *Immunol Res*. 2009 Dec;45(2–3):144–58. DOI: 10.1007/s12026-009-8096-7.
- Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al. Depletion of B cells *in vivo* by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994;83(2):435–45.
- Anderson KC, Bates MP, Slaughenhaupt BL, et al. Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood*. 1984;63(6):1424–33.
- Martin F, Chan AC. B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:467–96. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090517>.
- Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, et al. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum*. 2006;54(9):2793–806. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.22025>.
- Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, et al. Efficacy of B-cell targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2004;350(25):2572–81. DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa032534>.
- Keystone EC, Emery P, Peterfy CG, et al. Rituximab inhibits structural joint damage in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to tumour necrosis factor inhibitor therapies. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(2):216–21. DOI: 10.1136/ard.2007.085787. Epub 2008 Apr 3.
- Thurlings RM, Vos K, Wijnbrants CA, et al. Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(7):917–25. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2007.080960>. Epub 2007 Oct 26.
- Ferraro AJ, Drayson MT, Savage CO, MacLennan IC. Levels of autoantibodies, unlike antibodies to all extrinsic antigen groups, fall following B cell depletion with rituximab. *Eur J Immunol*. 2008;38(1):292–8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200737557>.
- Cambridge G, Leandro MJ, Edwards JC, et al. Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(8):2146–54. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.11181>.
- Dass S, Rawstron A, Vital E, et al. Highly sensitive B cell analysis predicts response to rituximab therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(10):2993–9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/art.23902>.
- Higashida J, Wun T, Schmidt S, et al. Safety and efficacy of rituximab in patients with rheumatoid arthritis refractory to disease modifying antirheumatic drugs and anti-tumor necrosis factor alpha treatment. *J Rheumatol*. 2005;32(11):2109–15.
- Julia A, Barcelo M, Erra A, et al. Identification of candidate genes for rituximab response in rheumatoid arthritis patients by microarray expression profiling in blood cells. *Pharmacogenomics*. 2009 Oct;10(10):1697–708. DOI: 10.2217/pgs.09.99.
- Rosengren S, Wei N, Kalunian KC, et al. CXCL13: a novel biomarker of B-cell return following rituximab treatment and synovitis in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2011 Mar;50(3):603–10. DOI: 10.1093/rheumatology/keq337. Epub 2010 Nov 23.
- Maloney DG, Smith B, Appelbaum FR. The anti-tumor effect of monoclonal anti-CD20 antibody (mAb) therapy includes direct antiproliferative activity and induction of apoptosis in CD20 positive non-Hodgkin's lymphoma (NHL) cell lines. *Blood*. 1996;88 (Suppl 1):637.
- Van Meerten T, van Rijn RS, Hol S, et al. Complement-induced cell death by rituximab depends on CD20 expression level and acts complementary to antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Clin Cancer Res*. 2006;12(13):4027–35. DOI: <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0066>.
- Ratnerman HG, Vosslander S, de Ridder S, et al. The interferon type I signature towards prediction of non-response to rituximab in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*. 2012 Apr 27;14(2):R95. DOI: 10.1186/ar3819.
- Hogan VE, Holweg CT, Choy DF, et al. Pretreatment synovial transcriptional profile is associated with early and late clinical response in rheumatoid arthritis patients treated with rituximab. *Ann Rheum Dis*. 2012 Nov;71(11):1888–94. DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-201115.
- Gutierrez-Roelens I, Galant C, Theate I, et al. Rituximab treatment induces the expression of genes involved in healing processes in the rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum*. 2011 May;63(5):1246–54. DOI: 10.1002/art.30292.
- Vosslander S, Ratnerman HG, van der Pouw Kraan TC, et al. Pharmacological induction of IFN type I activity following therapy with rituximab determines clinical response in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:1153–9. DOI: 10.1136/ard.2010.147199. Epub 2011 Mar 27.
- Tchetina EV, Demidova NV, Semyonova LA, 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.
- Четина ЕВ, Демидова НВ, Каратеев ДЕ, Насонов ЕЛ. Гетерогенность первичных больных ревматоидным артритом по экспрессии генов в крови: теоретические основы дифференциального подхода к терапии. Научно-практическая ревматология. 2011;49(4):24–30. [Chetina EV, Demidova NV, Karateev DE, Nasovov EL. Heterogeneity of early rheumatoid arthritis patients according to blood gene expression: theoretical bases of a differential therapy approach. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2011;49(4):24–30. (In Russ.)]. DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2011-57>.
- Четина ЕВ, Семенова ЛА, Логунов АЛ и др. Повышенная экспрессия регуляторных генов в крови и суставном хряще

- больных ревматоидным артритом. Научно-практическая ревматология. 2012;50(4):44–8. [Chetina EV, Semyonova LA, Logunov AL, et al. Enhanced regulatory gene expressions in the blood and articular cartilage of patients with rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2012;50(4):44–8. (In Russ.)]. DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2012-1111>.
31. Tchetina EV, Demidova NV, Karateev DE, Nasonov EL. Rheumatoid factor positivity is associated with increased joint destruction and upregulation of matrix metalloproteinase 9 and cathepsin K gene expression in the peripheral blood in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate. *Int J Rheumatol*. 2013;2013:457876. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/457876>. Epub 2013 Nov 14.
 32. Четина ЕВ, Демидова НВ, Каратеев ДЕ, Насонов ЕЛ. Регистрация изменения экспрессии генов в крови как дополнительный инструмент мониторинга терапии метотрексатом больных ревматоидным артритом. Научно-практическая ревматология. 2013;51(6):654–61. [Chetina EV, Demidova NV, Karateev DE, Nasonov EL. Analysis of gene expression in blood as an additional tool to monitor methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2013;51(6):654–61. (In Russ.)]. DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2013-654-61>.
 33. Четина ЕВ, ДиБатиста Д, Пул АР. Роль простагландина E2 в ингибировании разрушения коллагена суставного хряща больных остеоартрозом. Научно-практическая ревматология. 2009;48(3):18–24. [Chetina EV, DiBattista D, Pool AR. Prostaglandin E2 role in inhibition of joint cartilage collagen destruction in patients with osteoarthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2009;48(3):18–24. (In Russ.)]. DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2009-1308>.
 34. Tchetina EV, Poole AR, Zaitseva EM, et al. Differences in mTOR (mammalian target of rapamycin) gene expression in the peripheral blood and articular cartilages of osteoarthritic patients and disease activity. *Arthritis*. 2013;2013:461486. DOI: 10.1155/2013/461486. Epub 2013 Jun 25.
 35. Verweij CL, Vosslander S. New insight in the mechanism of action of rituximab: the interferon signature towards personalized medicine. *Discov Med*. 2011 Sep;12(64):229–36.
 36. Troen BR. The role of cathepsin K in normal bone resorption. *Drug News Perspect*. 2004;17(1):19–28. DOI: <http://dx.doi.org/10.1358/dnp.2004.17.1.829022>.
 37. Kawasaki Y, Xu ZZ, Wang X, et al. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. COX2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice. *Nat Med*. 2008 Mar;14(3):331–6. DOI: 10.1038/nm1723. Epub 2008 Feb 10.
 38. Vardeh D, Wang D, Costigan M, et al. COX2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice. *J Clin Invest*. 2009 Feb;119(2):287–94. DOI: 10.1172/JCI37098. Epub 2009 Jan 5.