

Молекулярные механизмы регуляции боли у больных остеоартрозом

Четина Е.В.¹, Маркова Г.А.¹, Таскина Е.А.¹, Шарапова Е.П.¹, Кашеварова Н.Г.¹, Алексеева Л.И.¹, Коломацкий В.В.¹, Макаров М.А.¹, Логунов А.Л.¹, Макаров С.А.¹, Кузин А.Н.²

¹ФГБНУ Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой, Москва, Россия;

²ГБУЗ г. Москвы «Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва, Россия

¹115522 Москва, Каширское шоссе, 34А;

²115516 Москва, Тарный проезд, 3

¹V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia; ²Bureau of Forensic and Medical Examination, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia
¹34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522; ²3, Tarnyi Passage, Moscow 115516

Контакты: Елена Васильевна Четина; etchetina@mail.ru

Contact: Elena Chetina etchetina@mail.ru

Поступила 21.05.15

Цель — изучение механизмов, определяющих уровень боли, на основании анализа профилей экспрессии генов, участвующих в деструкции суставного хряща, воспалении и регуляции метаболизма в крови больных остеоартрозом (ОА) с разными уровнями экспрессии гена *mTOR* (Mammalian Target Of Rapamycin) и на разных стадиях заболевания.

Материал и методы. Работа проведена на образцах периферической крови 47 амбулаторных больных ОА; 21 больного с поздней стадией ОА, госпитализированного для эндопротезирования коленного сустава, и 27 здоровых людей, составивших контрольную группу (средний возраст — 60,0±7,1; 56,6±8,9 и 58,6±8,3 года соответственно), а также образцов суставного хряща, полученных при оперативном лечении у 21 больного ОА и при аутопсии у 14 здоровых ранее лиц (средний возраст — 38,2±4,3 года), погибших в результате травмы. Состояние больных оценивали по данным клинического, рентгенологического, ультразвукового и денситометрического исследования. Общую РНК выделяли из крови и после обратной транскрипции использовали для определения уровня экспрессии генов в полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты и обсуждение. В подгруппе с низкой экспрессией гена *mTOR* экспрессия всех исследованных генов оказалась на уровне контроля, за исключением гена матриксной металлопротеиназы 9 (*MMP9*), экспрессия которого была значительно выше. У больных с высокой экспрессией гена *mTOR* и больных на поздней стадии ОА экспрессия всех исследованных генов была значительно выше, чем в контроле. Обнаружена положительная корреляция экспрессии генов трансформирующего ростового фактора $\beta 1$ (*TRFβ1*; $r=0,594$; $p=0,005$) и катепсина К ($r=0,595$; $p=0,003$) в крови и суставном хряще больных ОА на поздней стадии заболевания.

Заключение. Разные уровни боли у больных ОА с разными уровнями экспрессии гена *mTOR* могут быть связаны с соотношением экспрессии генов *MMP9* и тканевого ингибитора металлопротеиназ 1 (*TIMP1*), избыточной или недостаточной активностью гена *mTOR*, а также с экспрессией факторов роста — *TRFβ1* и сосудистого эндотелиального фактора роста, участвующих в процессах регенерации тканей.

Ключевые слова: остеоартроз; боль; экспрессия генов; кровь; *mTOR*; *MMP9*; *TIMP1*.

Для ссылки: Четина ЕВ, Маркова ГА, Таскина ЕА и др. Молекулярные механизмы регуляции боли у больных остеоартрозом. Научно-практическая ревматология. 2016;54(4):424-431.

MOLECULAR MECHANISMS OF PAIN REGULATION IN PATIENTS WITH OSTEOARTHRITIS

Chetina E.V.¹, Markova G.A.¹, Taskina E.A.¹, Sharapova E.P.¹, Kashevarova N.G.¹, Alekseeva L.I.¹, Kolomatsky V.V.¹, Makarov M.A.¹, Logunov A.L.¹, Makarov S.A.¹, Kuzin A.N.²

Objective: to study the mechanisms determining the level of pain on the basis of an analysis of the expression profiles of the genes involved in joint destruction, inflammation, and metabolic regulation in the blood of patients with osteoarthritis (OA) with different expression levels of the Mammalian Target Of Rapamycin (*mTOR*) gene and at different disease stages.

Material and methods. Peripheral blood samples from 47 outpatients with OA, from 21 late-stage OA patients admitted to hospital for endoprosthetic knee joint replacement, and from 27 healthy individuals who formed a control group (mean age, 60.0±7.1, 56.6±8.9, and 58.6±8.3 years, respectively), as well as articular cartilage samples obtained intra-operatively from 21 patients with OA and at autopsy from previously healthy people (mean age, 38.2±4.3 years) who had died from trauma, were examined. Clinical, radiographic, ultrasound, and densitometric examination was performed. Total RNA was isolated from blood and after reverse transcription it was used to estimate gene expression levels in real-time polymerase chain reaction.

Results and discussion. In the low *mTOR* gene expression subgroup, the expression of all the study genes proved to be at the control level, except the matrix metalloproteinase 9 (*MMP9*) gene, the expression of which was significantly higher. In the patients with a high expression of the *mTOR* gene and in those with late-stage OA, the expression of all the study genes was much higher than in the control group. There was a positive correlation of the gene expression of the transforming growth factor $\beta 1$ (*TGF-β1*) ($r = 0.594$; $p = 0.005$) and cathepsin K ($r = 0.595$; $p = 0.003$) in the blood and articular cartilage of patients with late-stage OA.

Conclusion. The different levels of pain in OA patients with different expression levels of the *mTOR* gene may be associated with the expression ratio of the genes *MMP9* and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (*TIMP1*), the excessive or insufficient activity of the *mTOR* gene, and the expression of the growth factors TGF- $\beta 1$ and vascular endothelial growth factor, which are involved in the processes of tissue regeneration.

Key words: osteoarthritis; pain; gene expression; blood; *mTOR*; *MMP9*; *TIMP1*.

For reference: Chetina EV, Markova GA, Taskina EA, et al. Molecular mechanisms for pain regulation in patients with osteoarthritis. Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice. 2016;54(4):424-431 (In Russ.).

doi: <http://dx.doi.org/10.14412/1995-4484-2016-424-431>

Остеоартроз (ОА) является распространенным заболеванием соединительной ткани, при котором происходит разрушение су-

ставного хряща [1, 2]. Одна из гипотез объясняет развитие патологического процесса в хрящевой ткани при ОА нарушением ба-

ланса анаболических и катаболических процессов с преобладанием последних. Кроме того, разрушению хряща способствует активация протеиназ матрикса вследствие усиленной продукции цитокинов: интерлейкина 1 β (ИЛ1 β) а также фактора некроза опухоли α (ФНО α) и нарушение баланса концентраций протеаза/ингибитор, что приводит к усилению активности матриксных металлопротеиназ (ММП) [3]. Помимо этого при ОА происходит нарушение равновесия пролиферации и апоптоза хондроцитов [4–7].

Боль при ОА является основным клиническим симптомом, ограничивающим трудоспособность. Хотя боль в коленных суставах усиливается по мере увеличения их рентгенологических изменений, в большинстве исследований отмечается, что тяжесть нарушений, выявляемых при рентгенографии, не коррелирует с интенсивностью боли у отдельных больных, поскольку она может быть связана с разрушением субхондральной кости, повреждением костного мозга или разрывами мениска, а также внесуставными факторами [8, 9]. Кроме того, отмечалось, что боль при ОА может быть обусловлена синовитом, который связан с секрецией провоспалительных цитокинов [10–12] и нейрогенным воспалением, обусловленным локальным высвобождением в полость сустава из афферентных нейронов нейропептидов (нейрогенных факторов), таких как субстанция P и пептид кальцитонинового гена [13]. Боль также может включать нейропатический компонент, формирующийся вследствие повреждения нервных окончаний соматосенсорной нервной системы [14, 15]. Поскольку суставы иннервируются периферической нервной системой, ноцицепторы могут активироваться сигналами из окружающей среды. Связь движения с болью обусловлена вкладом центральной нервной системы [11, 16].

Однако, несмотря на различные источники боли, на молекулярном уровне она ассоциируется с экспрессией генов, участвующих в развитии воспалительной реакции, разрушении внеклеточного матрикса (ВКМ), а также в выработке регуляторных факторов роста. Возникновение боли во многом определяется продукцией хондроцитами цитокинов, таких как ФНО α , ИЛ1 β , ИЛ6 и фактора роста нервов (ФРН), которые участвуют в разрушении хряща и индуцируют гипералгезию. В частности, показано, что повышение экспрессии цитокинов ИЛ1 β [17] и циклооксигеназ (ЦОГ) 1 и 2 [18, 19] приводило к деградации хряща, экспрессии ММП9, ММП2, катепсина K и S [20–22] и усилению боли. В свою очередь, ФНО α способен непосредственно активировать сенсорные нейроны через собственные рецепторы и инициировать каскад провоспалительных реакций с образованием ИЛ [23]. Вместе с тем наблюдалась и обратная зависимость, поскольку подавление боли ребамипидом или коэнзимом Q10 уменьшало разрушение хряща, подавляя экспрессию ММП13, ИЛ1 β , ИЛ6 при экспериментальном ОА и снижало экспрессию ММП1, ММП3, ММП13 и агреканызы ADAMTS5 в хондроцитах больных ОА [24, 25].

С другой стороны, в условиях повреждения ткани и воспаления возникает дисбаланс динамического равновесия между ММП и регулируемыми их активностью тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (ТИМП), снижение их относительной концентрации может при-

водить к усилению боли [21, 26–28]. Напротив, инфузия ТИМП приводила к уменьшению боли в опытах на животных [27].

Поскольку на молекулярном уровне боль ассоциируется с экспрессией генов, участвующих в развитии воспаления и разрушении ВКМ, она тесно связана с нарушениями основных метаболических путей, и прежде всего — регулируемых *mTOR* (Mammalian Target Of Rapamycin), который является главным регулятором центральной и периферической болевой чувствительности [29, 30]. Усиление боли отмечается как при повышенной, так и при пониженной экспрессии *mTOR* [17, 31]. Так, введение ингибитора *mTOR* рапамицина непосредственно в мозг может облегчать хроническую боль [32]. С другой стороны, избыточное ингибирование *mTORC1* активирует ERK (extracellular signal-regulated kinase) сигнальный путь в сенсорных нейронах и приводит к усилению боли [31]. Недавние исследования показали, что пластичность периферической боли опосредуется *mTORC1* и MAPK (mitogen-activated protein kinase) сигнальными путями. Более того, стимулирование сигнального пути AMPK (АМФ-активируемой протеин киназы) приводит к ингибированию обоих сигнальных путей и снимает боль [31, 33].

Кроме того, недавно показано, что активация ФРН, который, как известно, участвует в развитии болевых ощущений при ОА, может индуцироваться трансформирующим ростовым фактором β 1 (ТРФ β 1) посредством ALK5-Smad2/3 сигнального пути [34]. В этом случае боль может быть связана с разрушением матрикса суставного хряща и высвобождением локализованного в матриксе ТРФ β 1. Однако другие исследования показывают, что повышение экспрессии ТРФ β 1 может также приводить к снижению болевых ощущений за счет активации регенеративных процессов [35–38].

Ангиогенез — процесс образования новых кровеносных сосудов в органе или ткани — также может участвовать в формировании боли, поскольку рост кровеносных сосудов и сенсорных нейронов является интегративным процессом [39]. Повышение активности ангиогенеза у больных ОА наблюдали при росте остеофитов [40], в суставном хряще [28], синовии [41] и мениске [42]. Проангиогенными факторами, которые продуцируются хондроцитами, синовиоцитами, а также в субхондральной кости и костном мозге, внутри сустава, при ОА являются простагландины, окись азота, цитокины, хемокины и факторы роста, ключевым из которых является сосудистый эндотелиальный фактор роста (СЭФР) [39]. При этом суставной хрящ при ОА менее устойчив к ангиогенезу в связи с потерей протеогликанов, синтезом коллагенов типов I и X вокруг врастающих сосудов, что представляет собой фенотипический сдвиг от хряща к костеобразованию после прорастания сосудов [43]. Кроме того, неоваскуляризация связана с появлением боли при ОА, потому что сопровождается иннервацией сенсорными нейронами [39]. С другой стороны, исследования на животных показали, что, помимо снабжения кислородом и метаболитами тканей сустава при ОА [44], СЭФР может участвовать в процессе их репарации [45].

Ранее мы сообщали, что больные ОА не являются однородной группой. Их можно разделить на подгруппы в соответствии с экспрессией гена *mTOR* — главного

регулятора клеточного роста и пролиферации [46, 47]. Низкая экспрессия (НЭ) этого гена в крови больных ОА ассоциировалась с более высокими показателями боли по сравнению с больными, имеющими высокую его экспрессию (ВЭ). В то же время ВЭ *mTOR* в крови больных ОА сопровождалась более частым развитием синовита и высокой экспрессией провоспалительных цитокинов, а профили экспрессии исследованных генов данных больных были сходны с таковыми у больных ОА на поздней стадии заболевания перед хирургическим лечением. Однако молекулярные механизмы, обуславливающие различия интенсивности боли у больных ОА, имеющих разные уровни экспрессии гена *mTOR*, неясны.

Поскольку интенсивность боли, так же как экспрессия *mTOR*, регулируется ростовыми факторами и связана с экспрессией провоспалительных цитокинов и протеаз, целью данного исследования было изучение экспрессии генов, участвующих в вышеперечисленных процессах, у больных ОА с разными уровнями экспрессии гена *mTOR* и на разных стадиях заболевания.

Материал и методы

Пациенты. Контрольная группа состояла из 27 здоровых женщин в постменопаузе, сравнимых по возрасту с амбулаторными больными ОА (средний возраст $58,6 \pm 8,3$ года, от 42 до 74 лет). Критериями исключения для контрольных лиц были боль в коленных суставах, крепитация, низкая минеральная плотность кости (МПК; Т-критерий $< -2,5$ SD). Контрольным лицам проводили анализ крови, включая исследование гематологических и биохимических параметров, а также денситометрию позвоночника и бедренной кости.

Первая амбулаторная группа больных состояла из 47 неродственных между собой женщин в постменопаузе, с первичным ОА коленного сустава (средний возраст $60,7 \pm 7,1$ года, от 47 до 74 лет). Больные имели II–IV рентгенологическую стадию заболевания по Келлгрену–Лоренсу, средние уровни боли по визуальной аналоговой шкале (ВАШ; 40–70 мм) и нормальную МПК. Проводилось лечение нестероидными противовоспалительными препаратами (НПВП; см. таблицу): мелоксикамом (15 мг в день), нимесулидом (200 мг в день) или ацеклофенаком

Демографическая и клиническая характеристика амбулаторных больных ОА

Показатель	Подгруппа		p
	НЭ <i>mTOR</i> (n=15)	ВЭ <i>mTOR</i> (n=32)	
Возраст, годы	60,7±6,7	60,3±6,9	0,86
Длительность заболевания, годы	12,0±8,8	11,2±10,3	0,80
ИМТ, кг/м ²	35,6±5,4	32,3±5,4	0,06
Длительность менопаузы, годы	11,4±6,4	12,3±7,2	0,69
Рентгенологическая стадия, n (%):			
II	7 (46,6)	22 (68)	0,15
III	6 (40)	6 (18,7)	0,16
IV	2 (13,4)	4 (12,5)	0,93
СОЭ, мм/ч	13,1±8,8	11,7±6,6	0,55
Индекс WOMAC, мм	1202±285	1102±309	0,29
Боль при спуске	64,6±15,7	58,8±17,7	0,28
Боль при подъеме	62,1±16,1	57,0±17,9	0,35
Боль в начале движения	51,8±12,3	48,9±22,6	0,64
Боль в покое	35,0±20,3	31,8±15,8	0,55
Боль при ходьбе	59,2±12,5	49,6±10,5	0,009*
Боль стоя	62,5±13,0	50,8±16,4	0,02*
Боль ночью	28,8±19,4	35,6±23,4	0,34
Общая боль	364,2±82,0	332,4±93,7	0,26
Общая скованность	101,3±25,7	75,0±27,0	0,003*
Общая физическая функция	737,4±217,6	695,0±229,8	0,55
Узелки Гебердена, n (%)	12 (80,0)	19 (59,0)	0,08
Узелки Бушара, n (%)	4 (27,0)	6 (18,7)	0,26
Синовит, n (%)	3 (20)	20 (62,5)	0,004*
МПК, г/см ² :			
позвоночник (L _{1-IV})	0,916±0,1	0,960±0,1	0,35
шейка бедра	0,843±0,1	0,795±0,1	0,16
бедро в целом	0,981±0,1	0,884±0,1	0,01*
Противовоспалительная терапия, n (%):			
мелоксикам	8 (53)	23 (72)	0,20
нимесулид	4 (27)	7 (22)	0,70
ацеклофенак	0	2 (6)	–
ничего	3 (20)	0	–
Хондроитина сульфат, n (%)	9 (60)	7 (22)	0,01*
Хондроитина сульфат+ глюкозамина сульфат, n (%)	6 (40)	25 (78)	0,01*

Примечание. Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение, если не указано иное. ИМТ – индекс массы тела.

(200 мг в день). Пациенты также принимали хондроитина сульфат (1 г в день) с глюкозамина сульфатом (1 г в день) или без него.

Кроме того, обследовали кровь 21 женщины в постменопаузе с поздней стадией ОА перед эндопротезированием коленных суставов (средний возраст $56,6 \pm 8,9$ года, от 49 лет до 71 года). При проведении операции у этих больных был получен суставной хрящ для исследования экспрессии генов. Все больные данной подгруппы имели III или IV рентгенологическую стадию заболевания, испытывали сильную боль и хромали.

Все обследованные больные соответствовали критериям ОА Американской коллегии ревматологов (ACR) [48]. Протокол исследования одобрен локальным комитетом по этике, от всех обследованных больных получено информированное согласие.

Критериями исключения для больных ОА и здоровых лиц были ревматоидный артрит, вторичный артроз, связанный с реактивным артритом, системные воспалительные суставные заболевания, подагра, псевдоподагра, болезнь Педжета, внутрисуставные переломы, хроноз, акромегалия, гемохроматоз, болезнь Вильсона, первичный синовиальный хондрохроматоз, хондрокальциноз, асептический некроз головки бедра или костей голени, хирургические операции на коленном суставе, любые нарушения метаболизма кости, заболевания почек, сахарный диабет 1-го и 2-го типа и другие эндокринные заболевания, неконтролируемая артериальная гипертензия, сосудистая недостаточность, язва желудка или двенадцатиперстной кишки, кровотечения и тромбозы. Женщины, которые принимали эстроген, прогестерон, глюкокортикоиды, бисфосфонаты или альфакальцитрол, также были исключены.

Суставной хрящ. Суставной хрящ снимали с дистальной части мыщелка бедренной кости удаленного при эндопротезировании коленного сустава у больных с поздней стадией ОА (средний возраст $56,6 \pm 8,9$ года, от 49 лет до 71 года), а также при аутопсии трупов 14 ранее здоровых лиц, погибших в результате травмы (средний возраст $38,2 \pm 4,3$ года, от 29 лет до 51 года) не более чем через 12 ч после смерти. Они не получали химиотерапию, не имели диабета или сосудистой недостаточности.

Хрящ срезали полностью до субхондральной кости и использовали для анализа экспрессии генов.

Клиническое и инструментальное исследование. Стадию заболевания определяли по данным рентгенографии коленных суставов в соответствии с классификацией Келлгрена–Лоуренса [49]. Интенсивность боли и функциональный статус оценивали по WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities osteoarthritis index) [50]. Синовит регистрировали по данным анамнеза и ультразвукового исследования (УЗИ) коленных суставов. УЗИ коленных суставов проводилось на приборе Voluson station (GE Medical Systems, Kretztechnik GMBH & Co OHG, Zipf, Австрия) с мультимодальным линейным зондом 4–13 МГц. Наличие синовита оценивали в соответствии с инструкциями Европейской антиревматической лиги (EULAR) [51].

Измерение МПК позвоночника (L_{1-IV}) и проксимального отдела бедра проводили с помощью рентгеновской абсорбциометрии на приборе QDR-4500w (Hologic, США). Диагноз остеопороза основывался на рекомендациях Всемирной организации здравоохране-

ния [52]: Т-критерий $< -2,5$ SD. Никто из обследованных лиц не имел остеопороза.

Выделение РНК, реакция обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени. Из собранных образцов цельной крови и хряща коленного сустава выделена общая РНК, которая переведена в кДНК посредством реакции обратной транскрипции (ОТ), как описано ранее [46].

Посредством количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени в образцах периферической крови и хряща проведена оценка уровней экспрессии генов больных ОА по сравнению с нормальным контролем, как описано ранее [46]. Использовали готовые праймеры и зонды TaqMan (Applied Biosystems Int., США): *mTOR* (Hs00234522_m1), *TRFβ1* (Hs99999918_m1), *СЭФР* (Hs00173626_m1), *ММП9* (Hs00174128_m1), *ТИМП1* (Hs00171558_m1), катепсин К (Hs00166156_m1), *ЦОГ2* (Hs00153133_m1), *ИЛ1β* (Hs00174097_m1), *ФНОα* (Hs00174128_m1). I-Actin использовали в качестве гена домашнего хозяйства. Количественную оценку уровней мРНК проводили на приборе 7300 (Applied Biosystems Int., США), как описано ранее [46]. В системе ПЦР в режиме реального времени относительная экспрессия каждого гена рассчитывается по сравнению с контролем, который равен 1.

Статистический анализ. Тест на нормальность Колмогорова–Смирнова показал, что данные распределены в соответствии с кривой распределения Гаусса. Поэтому для статистической обработки использовали непарный t-тест Стьюдента и корреляционный анализ по Пирсону. Количественные данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Статистический анализ проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). При $p < 0,05$ различия считались достоверными. Статистически значимые различия по сравнению с контролем отмечены звездочкой (*), между отдельными подгруппами больных – знаком (#).

Результаты

Клиническая характеристика амбулаторных больных остеоартрозом. У 29 из 47 амбулаторных больных была II, у 12 – III и у 6 – IV стадия ОА. Средняя продолжительность болезни составляла $11,6 \pm 9,5$ года (от 1 года до 30 лет). Большинство больных имели узелки Гебердена и высокий ИМТ (от 20,5 до 45,9). Все больные имели нормальную МПК. Интенсивность боли по WOMAC не превышала 65 мм, скованность составляла в среднем $83,4 \pm 25,8$ (от 20 до 126 мм). Синовит в коленном суставе по данным УЗИ обнаружен у 48,9% больных ОА.

Амбулаторные больные ОА были разделены на две подгруппы: с НЭ и ВЭ гена *mTOR* [46, 47]. При НЭ гена *mTOR* отмечалась значительно более сильная боль при ходьбе и стоя и более значительная скованность, чем при ВЭ *mTOR* (см. таблицу). При ВЭ гена *mTOR* узелки Гебердена встречались реже, чаще выявлялся синовит, МПК бедренной кости и шейки бедра была меньше и отмечались более сильные ночные боли, чем при НЭ.

II стадия ОА в подгруппе ВЭ гена *mTOR* встречалась несколько чаще, а III – несколько реже, чем в подгруппе НЭ гена *mTOR*. Однако эти различия недостоверны.

Большинство больных (31 из 47) обеих подгрупп принимали мелоксикам, тогда как 11 из 47 больных назначался нимесулид. Только двое больных с ВЭ гена *mTOR* полу-

чали ацеклофенак, а трое больных с НЭ гена *mTOR* не нуждались в НПВП. Хондроитина сульфат в сочетании с глюкозамином или без него получали больные обеих подгрупп, но значительно больше больных подгруппы с ВЭ гена *mTOR* принимали хондроитина сульфат с глюкозамином по сравнению с подгруппой НЭ *mTOR*.

Экспрессия генов протеаз и ингибитора металлопротеиназ в крови больных остеоартрозом. В подгруппе больных ОА с НЭ гена *mTOR* экспрессия гена *катепсина К*, который имеет коллагеназную активность и способен расщеплять коллаген [53], и *ТИМП1* была не выше, чем у здоровых людей (рис. 1). Напротив, экспрессия *ММП9* оказалась значительно ($p<0,05$) выше контроля. При ВЭ гена *mTOR*, а также на поздней стадии заболевания (ES) экспрессия протеаз и *ТИМП1* значительно ($p<0,05$) повышена. Вместе с тем при ВЭ *mTOR* экспрессия генов *ТИМП1* ($p=0,001$) и *катепсина К* ($p=0,001$) была значительно выше, чем на поздней стадии ОА.

Экспрессия генов провоспалительных факторов в крови больных остеоартрозом. Экспрессия *ИЛ1 β* и *ЦОГ2* в подгруппе больных с НЭ гена *mTOR* существенно не отлича-

лась от нормы, а у амбулаторных больных с ВЭ гена *mTOR* и у больных на поздней стадии ОА экспрессия *ЦОГ2* значительно превышала норму (см. рис. 1). Кроме того, при ВЭ гена *mTOR* экспрессия *ИЛ1 β* была значительно выше, чем на поздней стадии ОА ($p=0,015$).

Экспрессия генов ростовых факторов в крови больных остеоартрозом. Экспрессия *ТРФ β 1* и *СЭФР* в подгруппе больных с НЭ гена *mTOR* не превышала норму, а у амбулаторных больных с ВЭ гена *mTOR* и у больных на поздней стадии ОА она была значительно выше, чем у здоровых лиц (см. рис. 1).

Профили экспрессии генов *mTOR* и *АМПК* в исследуемых подгруппах больных ОА приводятся для сравнения, хотя эти данные были опубликованы ранее [46, 47, 54].

Анализ корреляции экспрессии генов в крови и суставном хряще больных остеоартрозом на поздней стадии заболевания. Анализ экспрессии генов *катепсина К*, *ММП9*, *ТРФ β 1* и *ИЛ1 β* в крови и суставном хряще больных ОА на поздней стадии показал наличие положительной корреляции только в случае *ТРФ β 1* ($r=0,594$; $p=0,005$) и *катепсина К* ($r=0,595$; $p=0,003$; рис. 2).

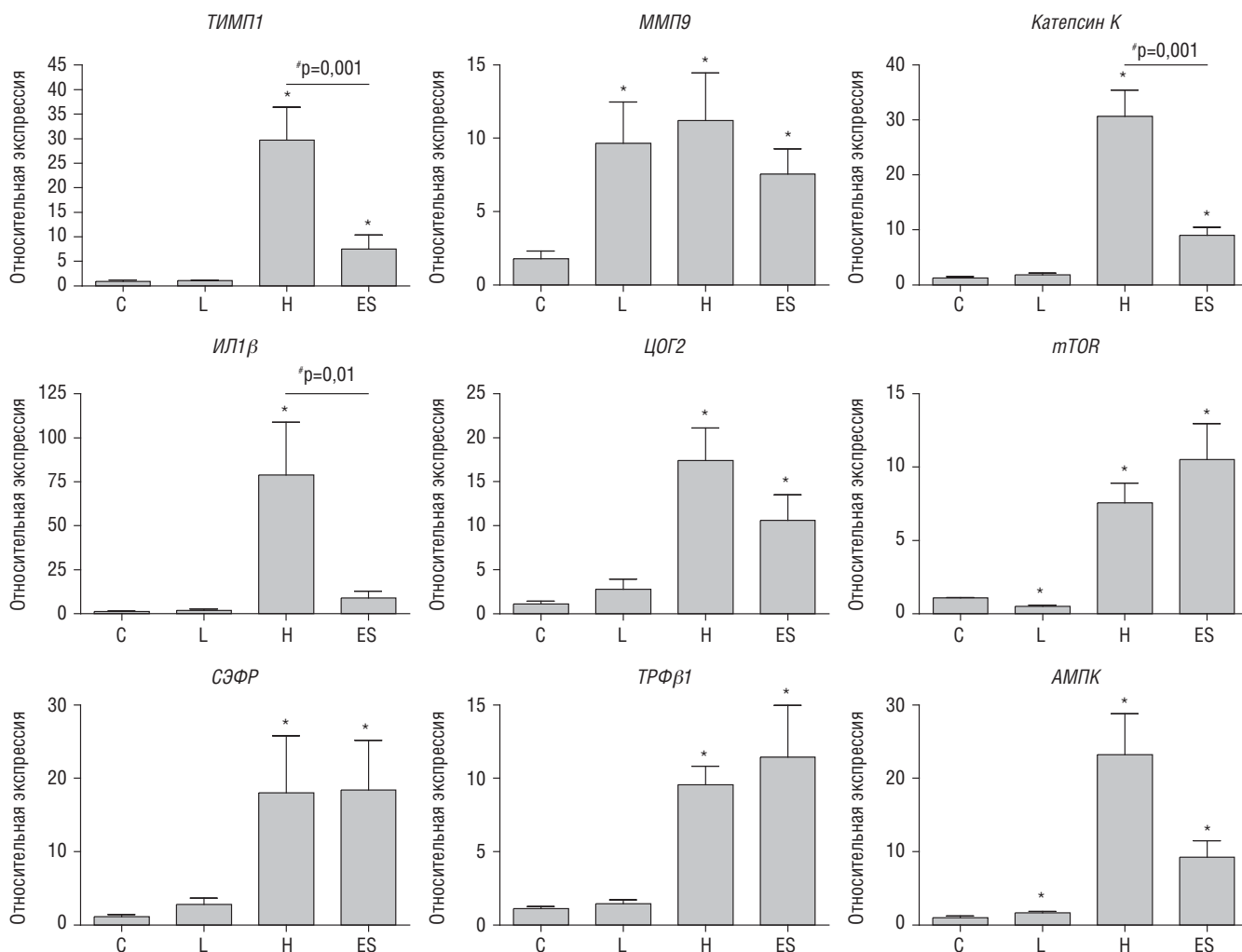


Рис. 1. Относительная экспрессия генов, обуславливающих деструкцию сустава, воспаление и метаболические процессы, связанные с регенерацией тканей в крови больных ОА, имеющих разные уровни экспрессии гена *mTOR* и больных ОА на поздней стадии заболевания. L – подгруппа больных с НЭ гена *mTOR*; H – подгруппа больных с ВЭ гена *mTOR*; ES – больные ОА на поздней стадии заболевания, C – контроль. Статистически значимые различия по сравнению с контролем отмечены звездочкой (*), между отдельными подгруппами больных – знаком (#)

Обсуждение

Исследование профилей экспрессии генов, участвующих в деструкции ВКМ, ингибитора этой деструкции, провоспалительных цитокинов и факторов роста в крови, проведенное в настоящей работе, позволяет прояснить некоторые аспекты регуляции боли у больных ОА. Так, в подгруппе больных с НЭ гена *mTOR* боль, вероятно, обусловлена повышенной активностью ММП9. Индукция боли при активации данной металлопротеиназы также отмечалась ранее в исследованиях *in vitro* и на животных моделях [21, 26–28]. При этом боль у больных ОА с НЭ гена *mTOR* может усиливаться за счет того, что повышение активности данной протеиназы не сдерживается ее главным ингибитором — *ТИМП1* [26], экспрессия которого оставалась на уровне контроля. Кроме этого, учитывая низкую экспрессию генов провоспалительных цитокинов, маловероятно, что боль у данной подгруппы пациентов связана с воспалительной реакцией. Более того, боль при высокой экспрессии *ММП9* может усиливаться за счет способности этого фермента блокировать действие анальгетиков, поскольку сообщалось о вкладе *ММП9* в развитие толерантности к морфину [55].

Пониженная экспрессия гена *mTOR*, вероятно, связанная с повышенной экспрессией его ингибитора, *АМПК*, может также обуславливать сильную боль у данной группы больных, поскольку ранее сообщалось об усилении боли при ингибировании экспрессии *mTOR* [31].

В подгруппе амбулаторных больных ОА с ВЭ гена *mTOR* боль может быть связана с деструктивными процессами ввиду высокой экспрессии генов протеаз *катепсина К* и *ММП9*. Боль может усиливаться и за счет высокой активности воспаления, которая определяется увеличением экспрессии *ИЛ1β*, *ЦОГ2* и ассоциируется с более частыми случаями синовита у больных этой подгруппы. Неоваскуляризация, обусловленная высокой экспрессией *СЭФР*, также может приводить к усилению боли, поскольку образование новых сосудов сопровождается формированием сенсорных нейронов [39]. Кроме того, появление боли у этих пациентов может способствовать ВЭ гена *mTOR*, которую также связывают с формированием боли [29, 30].

Однако у больных с ВЭ гена *mTOR* отмечена также высокая экспрессия генов *ТИМП1* и *АМПК*, ингибирующих активность генов *ММП9* и *mTOR* соответственно. В связи с этим отмечалось, что подавление экспрессии *mTOR* посредством *АМПК* приводило к уменьшению боли [33]. Это может быть причиной того, что, несмотря на синовит и высокие уровни экспрессии генов, связанных с деструктивными процессами, больные подгруппы ОА с ВЭ гена *mTOR* испытывают менее интенсивную боль.

Особое значение для них может также иметь ВЭ гена *ТРФβ1*. Хотя, по данным некоторых исследований на хондроцитах животных и человека *in vitro* [34], *ТРФβ1* может участвовать в активации ФРН и усиливать боль, другие исследования, напротив, связывают повышенную экспрессию *ТРФβ1* с подавлением боли, ассоциированным с усилением процессов регенерации ткани [35–38]. При этом отмечалась отрицательная корреляция между уровнями *ТРФβ1* и рентгенологической стадией ОА [56]. *СЭФР* также может участвовать в регенерации тканей сустава [45]. Это может объяснять несколько большее число пациентов с рентгенологической стадией II в группе с ВЭ гена *mTOR*, по сравнению с подгруппой, имевшей НЭ ге-

на *mTOR*. Вероятно, смещение равновесия от деструкции к регенерации может способствовать уменьшению боли при ОА. Экспрессия всех исследованных генов, связанных с процессами регенерации при ВЭ гена *mTOR*, оказалась значительно выше, чем у здоровых лиц, и приближалась к уровню экспрессии генов пациентов с поздней стадией ОА, которым было показано эндопротезирование коленного сустава.

На поздней стадии заболевания боль достигает максимального уровня, вероятно, в связи с высокой экспрессией генов, обуславливающих деструкцию сустава, воспаление, и факторов роста, которая сопровождается значительным снижением экспрессии белков, противодействующих боли. В частности, в данной подгруппе боль может быть обусловлена высокой экспрессией *катепсина К*, *ММП9*, *ЦОГ2*, *mTOR* и *СЭФР*, которая сопровождалась снижением экспрессии ингибиторов боли: *АМПК* и *ТИМП1*. Вероятно, поэтому боль усиливается настолько, что приводит к необходимости оперативного лечения.

Хотя экспрессия генов была измерена в крови, данные выводы, вероятно, можно экстраполировать на экспрессию по крайней мере некоторых из исследуемых генов в тканях сустава, поскольку мы наблюдали положительную корреляцию экспрессии генов *катепсина К* и *ТРФβ1* в крови и суставном хряще на поздней стадии ОА.

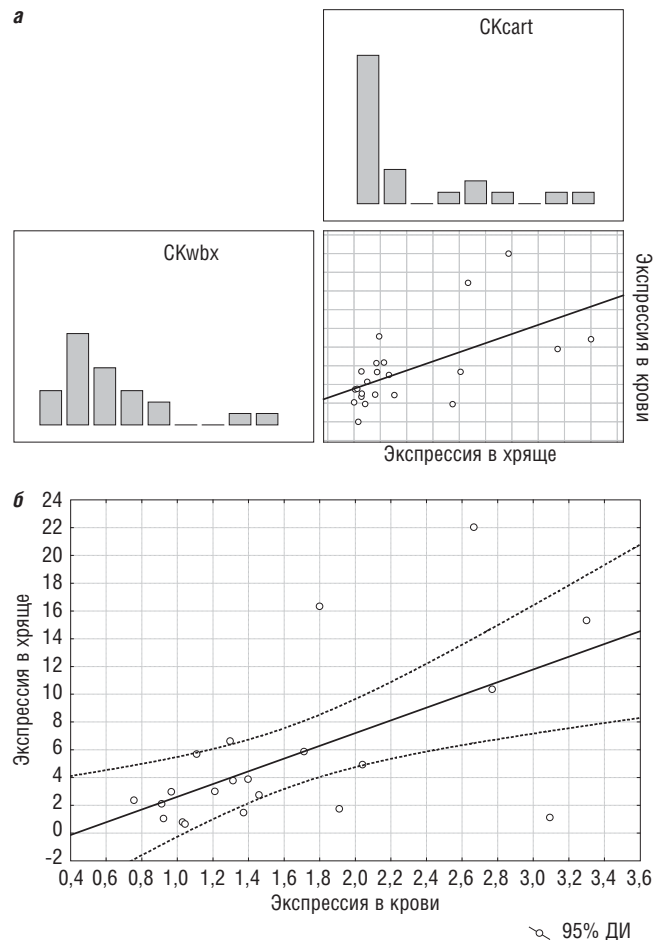


Рис. 2. Анализ линейной регрессии экспрессии генов: а – *катепсина К* ($r=0,595$; $p=0,003$) и б – *ТРФβ1* ($r=0,594$; $p=0,005$) по отношению к актину в периферической крови и суставном хряще больных ОА. ДИ – доверительный интервал

Заключение

В данной работе проведена комплексная оценка экспрессии генов, ассоциированных с манифестацией боли у пациентов с ОА. При этом впервые показано, что различия по интенсивности боли, которые отмечают у больных с разными уровнями экспрессии гена *mTOR*, определяются прежде всего соотношением экспрессии генов *ММП9* и *ТИМП1*. Кроме того, боль может зависеть от метаболических процессов, регулируемых геном *mTOR*, избыточная или недостаточная активность которого связана с усилением боли. Напротив, активация процессов, связанных с регенерацией тканей, обусловленная экспресси-

ей факторов *ТРФβ1* и *СЭФР*, может способствовать уменьшению боли.

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 исследования и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tchetina EV, Semyonova LA. Genetic mechanisms of cartilage degradation in the development and osteoarthritis. In: Protein Purification and Analysis III – Methods and applications; Edited by iConcept Press. iConcept Press Ltd.; 2014.
2. Buckwalter JA, Saltzman C, Brown T, et al. The impact of osteoarthritis: implications for research. *Clin Orthop Relat Res*. 2004 Oct;427 Suppl:S6-15. doi: 10.1097/01.blo.0000143938.30681.9d
3. Dean DD, Azzo W, Martel-Pelletier J, et al. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest*. 1989 Aug;84(2):678-85. doi: 10.1172/JCI114215
4. Muller B. Cytokine imbalance in non-immunological chronic disease. *Cytokine*. 2002 Jun 21;18(6):334-9. doi: 10.1006/cyto.2002.0882
5. Aigner T, Rose J, Martin J, et al. Aging theories of primary osteoarthritis: from epidemiology to molecular biology. *Rejuvenation Res*. 2004;7(2):134-45. doi: 10.1089/1549168041552964
6. Lorenzo P, Bayliss MT, Heinegard D. Altered patterns and synthesis of extracellular matrix macromolecules in early osteoarthritis. *Matrix Biol*. 2004 Oct;23(6):381-91. doi: 10.1016/j.matbio.2004.07.007
7. Sharif M., Whitehouse A, Sharman P, et al. Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase 3. *Arthritis Rheum*. 2004 Feb;50(2):507-15. doi: 10.1002/art.20020
8. Clauw DJ, Witter J. Pain and rheumatology: thinking outside the joint. *Arthritis Rheum*. 2009 Feb;60(2):321-4. doi: 10.1002/art.24326
9. Stoppiello LA, Mapp PI, Wilson D, et al. Structural associations of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2014 Nov;66(11):3018-27. doi: 10.1002/art.38778
10. Poole AR, Guilak F, Abramson SB. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Moskowitz SW, Altman RD, Hochberg MC, Buckwalter JA, and Goldberg VM, editors. Osteoarthritis: Diagnosis and Medical/Surgical Management. 4th edition. Lippincott, PA, USA: Williams & Wilkins; 2007. P. 27-49.
11. Sofat N, Ejindu V, Kiely P. What makes osteoarthritis painful? The evidence for local and central pain processing. *Rheumatology (Oxford)*. 2011 Dec;50(12):2157-65. doi: 10.1093/rheumatology/ker283. Epub 2011 Sep 27.
12. Lee AS, Ellman MB, Yan D, et al. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene*. 2013 Sep 25;527(2):440-7. doi: 10.1016/j.gene.2013.05.069. Epub 2013 Jul 2.
13. Saito T. Neurogenic inflammation in osteoarthritis of the knee. *Mod Rheumatol*. 2003 Dec;13(4):301-4. doi: 10.3109/s10165-003-0253-6
14. Orita S, Ishikawa T, Miyagi M, et al. Pain-related sensory innervation in monoiodoacetate-induced osteoarthritis in rat knees that gradually develops neuronal injury in addition to inflammatory pain. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011 Jun 16;12:134. doi: 10.1186/1471-2474-12-134
15. Moreton BJ, Tew V, das Nair R, et al. Pain phenotype in patients with knee osteoarthritis: classification and measurement properties of painDETECT and self-report Leeds assessment of neuropathic symptoms and signs scale in a cross-sectional study. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2015 Apr;67(4):519-28. doi: 10.1002/acr.22431
16. Ordeberg G. Characterization of joint pain in human OA. *Novartis Found Symp*. 2004;260:105-15; discussion 115-21, 277-9.
17. Attur M, Belitskaya-Levy I, Oh C, et al. Increased interleukin-1β gene expression in peripheral blood leukocytes is associated with increased pain and predicts risk for progression of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2011 Jul;63(7):1908-17. doi: 10.1002/art.30360
18. Prochazkova M, Zanvit P, Dolezal T, et al. Increased gene expression and production of spinal cyclooxygenase 1 and 2 during experimental osteoarthritis pain. *Physiol Res*. 2009;58(3):419-25. Epub 2008 Jul 18.
19. 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.
20. Leichsenring A, Bäcker I, Wendt W, et al. Differential expression of Cathepsin S and X in the spinal cord of a rat neuropathic pain model. *BMC Neurosci*. 2008 Aug 12;9:80. doi: 10.1186/1471-2202-9-80
21. Kawasaki Y, Xu ZZ, Wang X, et al. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. *Nat Med*. 2008 Mar;14(3):331-6. doi: 10.1038/nm1723. Epub 2008 Feb 10.
22. McDougall JJ, Schuelert N, Bowyer J. Cathepsin K inhibition reduces CTXII levels and joint pain in the guinea pig model of spontaneous osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Oct;18(10):1355-7. doi: 10.1016/j.joca.2010.07.014. Epub 2010 Aug 6.
23. Ohtori S, Takahashi K, Moriya H, Myers RR. TNF-α and TNF-α receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004 May 15;29(10):1082-8. doi: 10.1097/00007632-200405150-00006
24. Moon SJ, Woo YJ, Jeong JH, et al. Rebamipide attenuates pain severity and cartilage degeneration in a rat model of osteoarthritis by downregulating oxidative damage and catabolic activity in chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012 Nov;20(11):1426-38. doi: 10.1016/j.joca.2012.08.002. Epub 2012 Aug 10.
25. Lee J, Hong YS, Jeong JH, et al. Coenzyme Q10 ameliorates pain and cartilage degradation in a rat model of osteoarthritis by regulating nitric oxide and inflammatory cytokines. *PLoS One*. 2013 Jul 22;8(7):e69362. doi: 10.1371/journal.pone.0069362
26. Ji RR, Xu ZZ, Wang X, Lo EH. Matrix metalloprotease regulation of neuropathic pain. *Trends Pharmacol Sci*. 2009 Jul;30(7):336-40. doi: 10.1016/j.tips.2009.04.002. Epub 2009 Jun 10.
27. Tejima E, Guo S, Murata Y, et al. Neuroprotective effects of over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinase TIMP-1. *J Neurotrauma*. 2009 Nov;26(11):1935-41. doi: 10.1089/neu.2009-0959

28. Franses RE, McWilliams DF, Mapp PI, Walsh DA. Osteochondral angiogenesis and increased protease inhibitor expression in OA. *Osteoarthr Cartilage*. 2010 Apr;18(4):563-71. doi: 10.1016/j.joca.2009.11.015. Epub 2009 Dec 21.
29. Lyu D, Yu W, Tang N, et al. The mTOR signaling pathway regulates pain-related synaptic plasticity in rat entorhinal-hippocampal pathways. *Mol Pain*. 2013 Dec 9;9:64. doi: 10.1186/1744-8069-9-64
30. Jiang F, Hua LM, Jiao YL, et al. Activation of mammalian target of rapamycin contributes to pain nociception induced in rats by BmK I, a sodium channel-specific modulator. *Neurosci Bull*. 2014 Feb;30(1):21-32. doi: 10.1007/s12264-013-1377-0. Epub 2013 Oct 16.
31. Melemedjian OK, Khoutorsky A, Sorge RE, et al. mTORC1 inhibition induces pain via IRS-1-dependent feedback activation of ERK. *Pain*. 2013 Jul;154(7):1080-91. doi: 10.1016/j.pain.2013.03.021. Epub 2013 Mar 15.
32. Geranton SM, Jimenez-Diaz L, Torsney C, et al. A rapamycin-sensitive signaling pathway is essential for the full expression of persistent pain states. *J Neurosci*. 2009 Nov 25;29(47):15017-27. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3451-09.2009
33. Price TJ, Dussor G. AMPK: An emerging target for modification of injury-induced pain plasticity. *Neurosci Lett*. 2013 Dec 17;557 Pt A:9-18. doi: 10.1016/j.neulet.2013.06.060. Epub 2013 Jul 3.
34. Blaney Davidson EN, van Caam AP, Vitters EL, et al. TGF- β is a potent inducer of Nerve Growth Factor in articular cartilage via the ALK5-Smad2/3 pathway. Potential role in OA related pain? *Osteoarthr Cartilage*. 2015, Mar;23(3):478-86. doi: 10.1016/j.joca.2014.12.005. Epub 2014 Dec 18.
35. Lantero A, Tramullas M, Diaz A, Hurler MA. Transforming growth factor- β in normal nociceptive processing and pathological pain models. *Mol Neurobiol*. 2012 Feb;45(1):76-86. doi: 10.1007/s12035-011-8221-1. Epub 2011 Nov 29.
36. Echeverry S, Shi XQ, Haw A, et al. Transforming growth factor-beta1 impairs neuropathic pain through pleiotropic effects. *Mol Pain*. 2009 Mar 27;5:16. doi: 10.1186/1744-8069-5-16
37. Christiansen BA, Bhatti S, Goudarzi R, Emami S. Management of osteoarthritis with avocado/soybean unsaponifiables. *Cartilage*. 2015 Jan;6(1):30-44. doi: 10.1177/1947603514554992
38. Tramullas M, Lantero A, Diaz A, et al. BAMBI (bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor) reveals the involvement of the transforming growth factor-beta family in pain modulation. *J Neurosci*. 2010 Jan 27;30(4):1502-11. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2584-09.2010
39. Mapp PI, Walsh DA. Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 May 29;8(7):390-8. doi: 10.1038/nrrheum.2012.80
40. Brown RA, Weiss JB. Neovascularisation and its role in the osteoarthritic process. *Ann Rheum Dis*. 1988 Nov;47(11):881-5. doi: 10.1136/ard.47.11.881
41. Bonnet CS, Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)*. 2005 Jan;44(1):7-16. doi: 10.1093/rheumatology/keh344. Epub 2004 Aug 3.
42. Ashraf S, Wibberley H, Mapp PI, et al. Increased vascular penetration and nerve growth in the meniscus: a potential source of pain in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Mar;70(3):523-9. doi: 10.1136/ard.2010.137844. Epub 2010 Nov 15.
43. Walker GD, Fischer M, Gannon J, et al. Expression of type-X collagen in osteoarthritis. *J Orthop Res*. 1995 Jan;13(1):4-12. doi: 10.1002/jor.1100130104
44. Ballara SC, Miotla JM, Paleolog EM. New vessels, new approaches: angiogenesis as a therapeutic target in musculoskeletal disorders. *Int J Exp Pathol*. 1999 Oct;80(5):235-50. doi: 10.1046/j.1365-2613.1999.00129.x
45. Kolostova K, Taltynov O, Pinterova D, et al. Tissue repair driven by two different mechanisms of growth factor plasmids VEGF and NGF in mice auricular cartilage: regeneration mediated by administering growth factor plasmids. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2012 Jul;269(7):1763-70. doi: 10.1007/s00405-011-1821-6. Epub 2011 Nov 10.
46. Tchétina 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:Article ID 461486. doi: 10.1155/2013/461486. Epub 2013 Jun 25.
47. Четина ЕВ, Братыгина ЕА, Зайцева ЕМ и др. Прогнозирование течения остеоартроза по экспрессии гена mTOR (mammalian target of rapamycin). Научно-практическая ревматология. 2012;50(1):27-32 [Chetina EV, Bratygina EA, Zaitseva EM, et al. Prediction of the course of osteoarthritis from mTOR (mammalian target of rapamycin) gene expression. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2012;50(1):27-32 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2012-500
48. Altman R, Asch E, Bloch D, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*. 1986 Aug;29(8):1039-49. doi: 10.1002/art.1780290816
49. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 1957;16(4):494-501. doi: 10.1136/ard.16.4.494
50. Bellamy N. WOMAC osteoarthritis Index: a user's guide. London, Ontario: University of Western Ontario; 1995.
51. Backhaus M, Burmester G, Gerber T, et al. Guidelines for muscular skeletal ultrasound in rheumatology. *Ann Rheum Dis*. 2001;60(7):641-9. doi: 10.1136/ard.60.7.641
52. World Health Organization Study Group: Assessment of fracture risk and its application for screening for postmenopausal osteoporosis. Geneva: WHO; 1994.
53. Dejica VM, Mort JS, Lavery S, et al. Cleavage of type II collagen by cathepsin K in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol*. 2008 Jul;173(1):161-9. doi: 10.2353/ajpath.2008.070494. Epub 2008 May 29.
54. Четина ЕВ, Братыгина ЕА, Зайцева ЕМ и др. Нарушение регуляторных механизмов сигнального пути mTOR при остеоартрозе. Научно-практическая ревматология. 2012;50(6):33-7 [Chetina EV, Bratygina EA, Zaitseva EM, et al. Impaired regulatory mechanisms of the mTOR signaling pathway in osteoarthritis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2012;50(6):33-7 (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2012-1290
55. Nakamoto K, Kawasaki S, Kobori T, et al. Involvement of matrix metalloproteinase-9 in the development of morphine tolerance. *Eur J Pharmacol*. 2012 May 15;683(1-3):86-92. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.03.006. Epub 2012 Mar 15.
56. Chua SD Jr, Messier SP, Legault C, et al. Effect of an exercise and dietary intervention on serum biomarkers in overweight and obese adults with osteoarthritis of the knee. *Osteoarthr Cartilage*. 2008 Sep;16(9):1047-53. doi: 10.1016/j.joca.2008.02.002. Epub 2008 Mar 24.