

Е.В. Четина, Н.В. Демидова, Д.Е. Каратеев, Е.Л. Насонов  
 Лаборатория генетики Учреждения Российской академии медицинских наук  
 Научно-исследовательского института ревматологии РАМН, Москва

## ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПЕРВИЧНЫХ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ ПО ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В КРОВИ: ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ПОДХОДА К ТЕРАПИИ

**Контакты:** Елена Васильевна Четина [etchetina@mail.ru](mailto:etchetina@mail.ru)

**Цель** — оценить тяжесть заболевания в зависимости от уровня экспрессии генов цикла клеточного деления: p21, ингибитора циклинзависимых киназ; каспазы 3, индикатора апоптозной активности; mTOR (mammalian target of rapamycin), главного регулятора клеточного роста и пролиферации; ATG1, маркера аутофагии; а также провоспалительного цитокина фактора некроза опухоли (ФНО)  $\alpha$  в крови больных ревматоидным артритом (РА).

**Материал и методы.** Обследовано 39 первичных больных РА (средний возраст 47,1 года) и 47 здоровых доноров (средний возраст 43,1 года). Экспрессию генов определяли в клетках периферической крови посредством полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Уровень активности РА оценивали по индексу DAS 28, а также по степени поражения суставов.

**Результаты.** На основании экспрессии гена mTOR группа больных РА была разделена на три подгруппы. В подгруппе 1 (18 пациентов) экспрессия mTOR была ниже ( $p < 0,01$ ), чем у здоровых доноров, а ATG1 — повышена. Больные подгруппы 2 (12 пациентов) имели сходные уровни экспрессии mTOR со здоровыми донорами, однако экспрессия p21, ATG1 и каспазы 3 у этих больных была значительно повышена. Пациенты подгруппы 3 (9 человек) имели значительно более высокие уровни экспрессии всех исследованных генов ( $p < 0,01$ ) по сравнению со здоровыми донорами. Больные трех подгрупп значительно различались по экспрессии ФНО  $\alpha$ , которая статистически значимо превышала уровни экспрессии этого гена у здоровых лиц. При этом она оказалась максимальной у пациентов подгруппы 3. Некоторые различия в подгруппах больных РА наблюдались по клиническому и иммунологическим показателям. В частности, наименьшая утренняя скованность отмечена у больных подгруппы 2, больные подгруппы 1 имели значительно меньше припухших суставов по сравнению с подгруппой 3. Кроме того, пациенты подгруппы 2 имели статистически достоверно более высокие уровни антицитруллиновых антител, а в подгруппе 3 уровни ревматоидного фактора оказались значительно ниже, чем в остальных подгруппах.

**Заключение.** Группа первичных больных РА не является однородной. Подгруппы больных РА различаются по уровням экспрессии генов клеточного цикла и ФНО  $\alpha$  и некоторым клиническим и иммунологическим показателям. Вариации экспрессии генов цикла клеточного деления в разных подгруппах больных РА могут указывать на неодинаковые механизмы развития заболевания и, следовательно, необходимость разных подходов к их терапии.

**Ключевые слова:** ревматоидный артрит, экспрессия генов, периферическая кровь, воспаление, поражение суставов

### HETEROGENEITY OF EARLY RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS ACCORDING TO BLOOD GENE EXPRESSION: THEORETICAL BASES OF A DIFFERENTIAL THERAPY APPROACH

E.V. Chetina, N.V. Demidova, D.E. Karateev, E.L. Nasovov

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

**Contact:** Elena Vasilyevna Chetina [etchetina@mail.ru](mailto:etchetina@mail.ru)

**Objective:** to assess disease severity in relation to the expression of cell-division cycle genes: p21, a cyclin-dependent kinase inhibitor; caspase 3, an apoptotic activity indicator; mammalian target of rapamycin (mTOR), a major regulator of cell growth and proliferation; ATG1, a marker of autophagy; and the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the blood of rheumatoid arthritis (RA) patients.

**Subjects and methods.** Thirty-nine early RA patients (mean age 47.1 years) and 47 healthy individuals (mean age 43.1 years) were examined. Gene expression in their peripheral blood cells was assessed using real-time polymerase chain reaction. RA activity was estimated according to DAS28 index and joint destruction.

**Results.** In accordance with mTOR gene expression, the group of RA patients were divided into three subgroups: 1) 18 patients had a significantly lower mTOR gene expression than did the healthy controls ( $p < 0.01$ ) and upregulated ATG1; 2) 12 patients had the same mTOR gene expression levels as in the healthy controls; p21 ATG1, and caspase 3 were, however, much upregulated; 3) 9 patients showed significant upregulation of all the examined genes as compared to the healthy controls ( $p < 0.01$ ). The patients from 3 subgroups differed in TNF- $\alpha$  gene expression that was statistically significantly exceeded that in the healthy individuals, the expression being highest in subgroup 3 patients. The subgroups of RA patients showed some differences in clinical and immunological parameters. Particularly, subgroup 2 patients exhibited the lowest morning stiffness values while subgroup 1 patients had much fewer swollen joints than did subgroup 3 patients. In addition, subgroup 2 patients had significantly statistically higher levels of anti-citrullinated antibodies whereas subgroup 3 patients had lower rheumatoid factor concentrations than the other subgroups.

**Conclusion.** Early RA patients represent a heterogeneous group. RA patient subgroups differ in the expression of cell-cycle and TNF- $\alpha$  genes and in some clinical and immunological parameters. Variability in the expression of the cell-division cycle genes in different subgroups of RA patients can indicate different mechanisms involved in the development and progression of the disease and hence the necessity of applying diverse approaches to their therapy.

**Key words:** rheumatoid arthritis, gene expression, peripheral blood, inflammation, joint degradation

Ревматоидный артрит (РА) характеризуется персистентным воспалением синовиальной ткани сустава с последующим разрушением суставного хряща, деформацией сустава и нарушением его функционирования. При прогрессировании заболевания в процесс могут быть вовлечены многие системы органов. Предполагаемые патогенетические механизмы РА включают нарушение механизмов клеточного деления иммунных клеток, суставных синовиоцитов и хондроцитов хряща. В частности, в поврежденном суставе продуцируется большое количество цитокинов и провоспалительных медиаторов, которые оказывают синергический митогенный эффект на синовиальные фибробласты и вынуждают их войти в клеточный цикл с последующим освобождением деструктивных молекул в суставную сумку [1]. Эрозия суставного хряща, в свою очередь, наблюдается преимущественно в зонах, прилегающих к пролиферирующим синовиоцитам, которые, как предполагается, секретируют протеолитические ферменты, разрушающие коллаген и протеогликаны хряща и кости. Гиперплазия синовиальной оболочки также характеризуется опухолевым типом пролиферации и считается главной причиной деструкции сустава при РА [2].

Цикл клеточного деления представляет собой сложный многоступенчатый процесс, регулирующий пролиферацию клеток [3]. В процессе деления клеток происходит последовательная смена фаз клеточного цикла G1/S/G2/M, которые характеризуются участием специфических для каждой фазы циклинов и циклин-зависимых киназ (рис. 1). В фазе G1 клетки содержат диплоидное количество ДНК и варьирующее количество РНК; в фазе S синтезируются копии каждой цепи ДНК; в короткую фазу G2 клетка уже содержит двойное, по сравнению с нормальным, количество ДНК. Наконец, в фазу М (митотическую) происходит собственно деление, при котором дочерние клетки оказываются в фазе G1. Движение клеток через фазы клеточного цикла зависит от функционирования ряда специфических киназ и соответствующих им циклинов. На стадии G1/S продуцируются циклины D и E. На стадии G2/M необходимо участие циклинов A и B.

Большинство клеток здорового организма находится в состоянии гипомитогенного ареста, или в состоянии покоя [4]. Арест происходит на стадии G0. Это состояние характеризуется низким уровнем метаболической активности и отличается минимальной скоростью синтеза белков и РНК, а также отсутствием синтеза ДНК и низкой активностью циклина D1. Классический арест в G0 можно индуцировать *in vitro* удалением из среды ростовых факторов.

В случае неспособности клеток (часто по причине накопления мутаций) преодолеть контрольные пункты G1/S или G2, это приводит к их выходу из клеточного цикла в фазе G1 или G2. Такой выход из цикла называется гипермитогенным арестом (ГА) и приводит к началу клеточного старения или (иногда) к клеточной смерти [5]. При

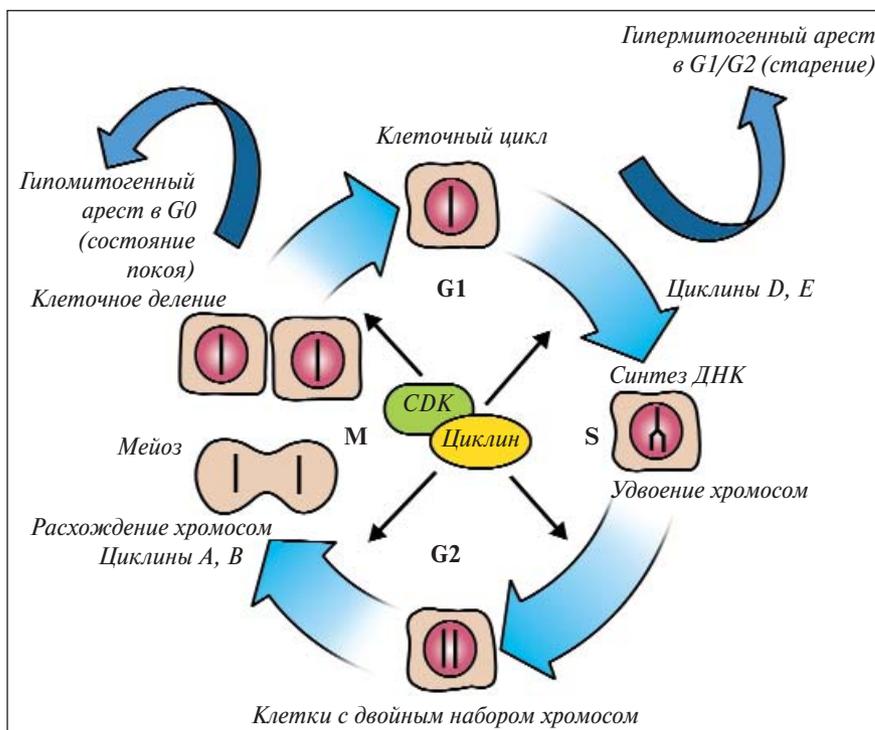


Рис. 1. Цикл деления клетки

этом, хотя уровни циклинов A, B, C и D очень высоки, деление клеток подавляется высокими внутриклеточными концентрациями ингибиторов циклин-зависимых киназ, например p21. ГА можно индуцировать *in vitro* хелаторами железа, контактным ингибированием или трансформирующим фактором роста (ТФР)  $\beta 1$ . При этом ГА представляет собой устойчивое состояние, которое также характеризуется высокими уровнями секреции аутокринных и паракринных факторов и интенсивным синтезом белка.

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 без ультраструктурных изменений внутриклеточных органелл. В этом процессе участвуют многочисленные каспазы, передающие информацию каспазе 3, которая непосредственно запускает программу апоптоза [6].

Однако в состоянии ареста пролиферации, при недостатке питательных веществ или в отсутствие критических трофических факторов, гипоксии, действия токсинов или химиотерапии, а также под действием цитокинов – фактора некроза опухоли (ФНО)  $\alpha$ , интерферона  $\gamma$  и аутоантител, клетки могут переходить в состояние аутофагии [7].

При аутофагии происходит переваривание лизосомами белков и собственных поврежденных клеточных органелл. Это способствует более длительному, автономному выживанию клетки. Однако этот процесс может закончиться смертью клетки при продолжительном состоянии стресса. Ранее считалось, что аутофагия является механизмом ответа на неблагоприятные условия внешней среды, однако в настоящее время показано, что она участвует и в нормальных физиологических процессах клетки. При этом продукт гена *ATG1* является маркером аутофагии, поскольку ответствен за формирование двойной мембраны ауто-

фагосом. Аутофагия тесно связана с апоптозом и может служить запасным механизмом клеточной смерти, когда выключается апоптоз [8].

Различные фазы цикла клеточного деления нуждаются в интенсивном синтезе белка. Главным регулятором биосинтеза белка в клетке является консервативная протеинкиназа *mTOR* (mammalian target of rapamycin) [9]. Активность самого гена *mTOR* может положительно регулироваться разветвленными аминокислотами, глюкозой, факторами роста (инсулином) и митогенами. Напротив, в условиях голодания или стресса происходит инактивация *mTOR* и активация аутофагии, обеспечивающей выживание клетки.

Поскольку при РА происходит нарушение механизмов клеточного деления иммунных клеток, суставных синовиоцитов и хондроцитов хряща, мы предположили, что экспрессия генов, ответственных за эти процессы, может изменяться не только в тканях сустава, но и в крови.

Цель настоящей работы — оценить уровни экспрессии генов клеточного цикла *mTOR*, *ATG1*, *p21*, каспазы 3 и провоспалительного цитокина ФНО  $\alpha$  в крови первичных больных РА по сравнению со здоровыми представителями контрольной группы и изучить ассоциацию экспрессии этих генов со степенью поражения суставов и маркерами воспалительного процесса.

**Материал и методы**

**Пациенты.** В исследование включено 39 пациентов обоего пола в возрасте 18 лет и старше, с достоверным диагнозом РА с длительностью заболевания не более 2 лет и при условии отсутствия терапии базисными противовоспалительными препаратами (БПВП) и системной терапии глюкокортикоидами. Диагноз выставлялся согласно классификационным критериям Американской коллегии ревматологов (ACR) 1987 г. при наличии 4 из 7 критериев, причем первые 4 присутствовали в течение 6 нед болезни.

Критерием исключения пациента являлось наличие противопоказаний для назначения БПВП в эффективных терапевтических дозах.

Контрольную группу составили 47 произвольно набранных доноров крови без аутоиммунных заболеваний и отягощенной наследственности, сопоставимых по полу и возрасту с группой больных.

**Клинические, лабораторные и инструментальные методы.** Для оценки выраженности суставного синдрома

использовались: суставной индекс Ричи (ИР; 53 сустава) — суммарное числовое выражение интенсивности болей в суставах при пальпации. Выраженность болей оценивалась по 4-балльной шкале: 0 — отсутствие боли, 1 — слабая и умеренно выраженная боль, о которой пациент говорит врачу, 2 — выраженная боль, от которой пациент морщится, 3 — сильная боль, пациент отстраняется от исследователя. При подсчете ИР в одну группу объединяются I–V проксимальные межфаланговые суставы и I–V пястно-фаланговые суставы каждой кисти, I–V плюснефаланговые суставы правой и левой стоп, височно-нижнечелюстные, грудиноключичные и ключично-акромиальные суставы; выраженность боли в группе определяется по максимально

болезненному суставу. Число припухших суставов (ЧПС): отсутствие или наличие припухлости — оценивалось в 44 суставах. Число болезненных суставов (ЧБС): отсутствие или наличие болезненности — оценивалось в 53 суставах. Учитывалась продолжительность утренней скованности в минутах. Для количественной оценки активности РА были использованы комбинированные индексы DAS (Disease Activity Score), рекомендованные EULAR. При расчете DAS учитываются болезненность и припухлость суставов, скорость оседания эритроцитов (СОЭ), общая оценка состояния здоровья пациентом (ОСЗП). В исследовании нами также вычислялся модифицированный индекс, учитывающий 28 суставов (DAS 28).

**Иммунологические методы.** Определение концентрации С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке проводилось с использованием иммунефелометрического метода на автоматическом анализаторе BN-100 (Dade Behring, Германия). Верхняя граница нормы для СРБ составляла 5,0 мг/мл. Определение ревматоидного фактора (IgM РФ) проводилось методом иммунефелометрии на автоматическом анализаторе BN-100 (Dade Behring, Германия), «cut-off» — 15 МЕ/л. Определение концентрации антител к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП) 2 проводилось иммуноферментным методом с использованием коммерческого набора фирмы Axis-Shield Diagnostic Ltd (Великобритания) согласно инструкции фирмы-производителя, «cut-off» — 0–5 Ед/мл.

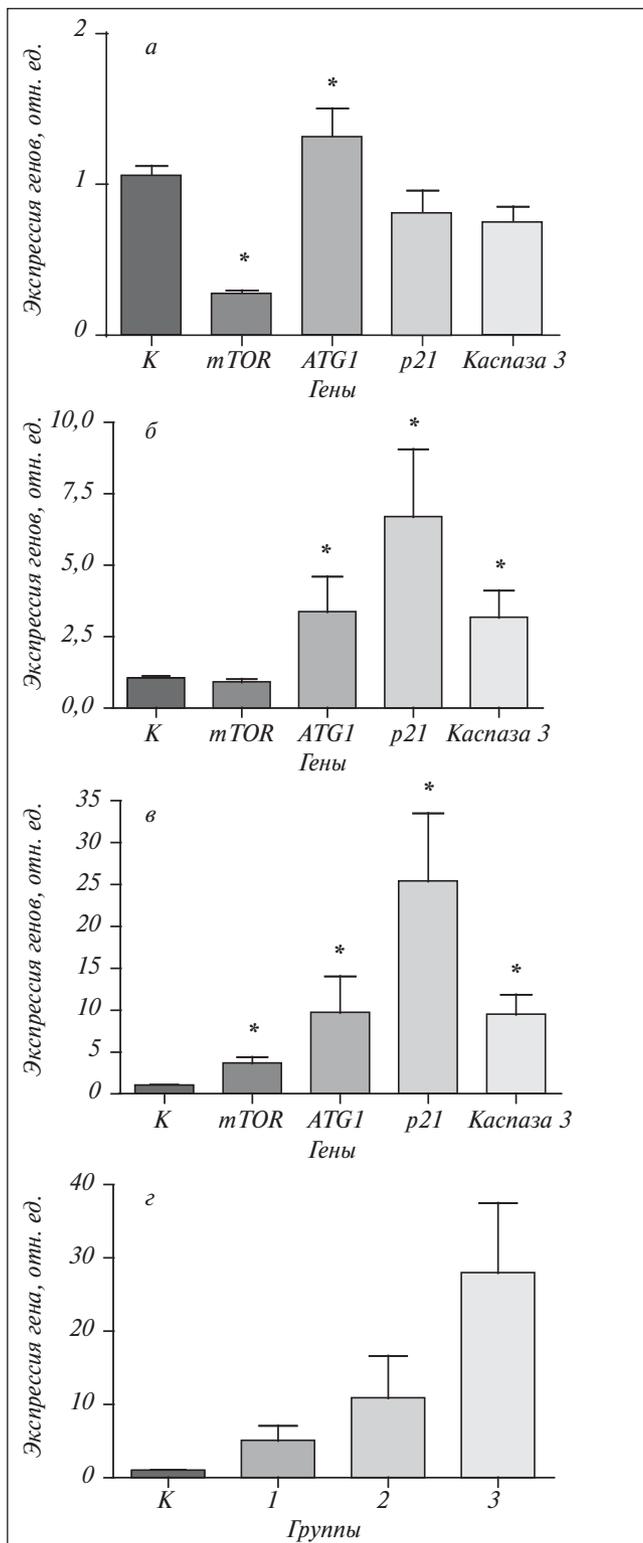
**Молекулярно-биологические методы.** Общую РНК выделяли из цельной крови, используя коммерческий набор «РИБО-золь-А» («ИнтерЛабСервис», Москва) согласно инструкции фирмы-производителя. Обратнo-транскриптазную реакцию проводили с использованием коммерческого набора «Реверта» («ИнтерЛабСервис», Москва) согласно инструкции фирмы-производителя. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в режиме реального времени проводили с использованием прибора модели 7300 Applied Biosystems и наборов для экспрессии генов (Applied Biosystems, США): *mTOR* (Hs0023522\_m1), *ATG1* (Hs00177504\_m1), *p21* (Hs00355782\_m1), каспаза 3 (Hs00263337\_m1), ФНО  $\alpha$  (Hs00174128\_m1), как описано ранее [10].  $\beta$ -Актин использовали в качестве эндогенного контроля.

**Статистический анализ.** Данные количественных экспериментов представлены как среднее арифметиче-

Таблица 1

Клинические и иммунологические показатели больных РА

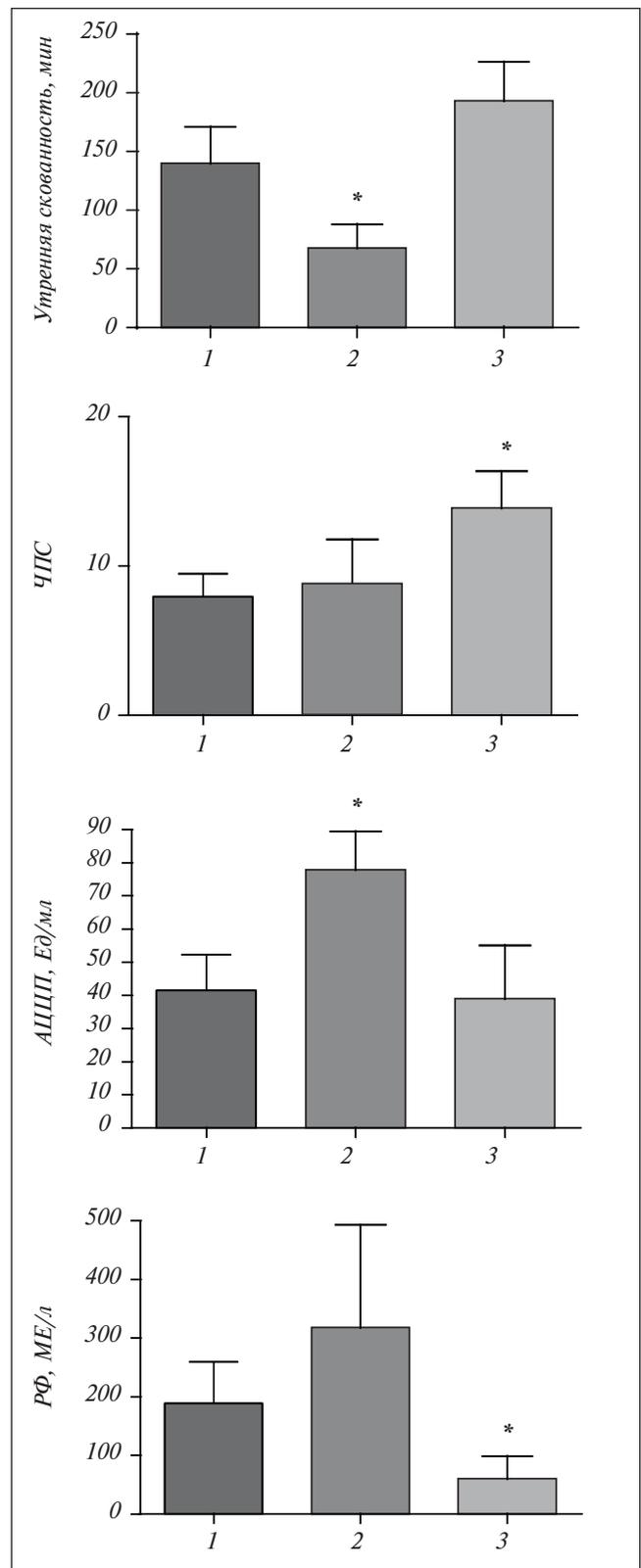
Показатель	Среднее значение показателя	Диапазон значений
Длительность заболевания, нед	7,72	1–24
Длительность утренней скованности, мин	135,8	15–360
ЧПС	8,8	1–28
ЧБС	9,5	1–33
ИР	8,2	1–19
АЦЦП, Ед/мл	46,4	0,1–100
РФ, МЕ/л	217,6	9,5–3094
СРБ, мг/мл	19,9	1,2–140,8
DAS 28	5,22	2,4–7,72



**Рис. 2.** Относительная экспрессия генов в крови больных РА.

а – подгруппа 1; б – подгруппа 2; в – подгруппа 3; з – экспрессия ФНО α в подгруппах 1–3 и в группе контроля (К)

ское ± стандартное отклонение. Анализы проводили в трех повторностях. Статистический анализ проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для статистической обработки результатов использовали тест Манна–Уитни. Значения вероятности ошибки <math>\leq 0,05</math>



**Рис. 3.** Клинические и иммунологические показатели в подгруппах (1–3) больных РА

считались достоверными. Статистически значимые различия отмечены звездочкой (\*).

**Результаты**

**Общая характеристика обследованных первичных больных РА.** Большинство больных имели стадию заболева-

Таблица 2

Клинические и иммунологические показатели в подгруппах больных РА

Показатель	Подгруппы					
	1		2		3	
	среднее значение	диапазон значений	среднее значение	диапазон значений	среднее значение	диапазон значений
Длительность заболевания, нед	8,9	1–18	8,8	2–24	4,4	1–9
Длительность утренней скованности, мин	140,0	20–360	67,9	0–240	193,3	90–360
ЧПС	7,9	0–28	8,8	1–40	13,9	6–28
ЧБС	9,4	1–28	9,8	1–41	15,0	5–33
ИР	8,7	1–19	6,3	1–11	9,3	3–16
АЦЦП, Ед/мл	41,4	0,1–100	77,9	0,2–100	39,0	0,1–100
РФ, МЕ/л	188,9	9,5–1014	318,1	9,5–3094	60,3	9,5–365,6
СРБ, мг/мл	18,4	1,2–140	20,1	4,3–27	19,5	3,4–42,1
DAS 28	5,28	2,4–7,7	5,4	5,5–57,5	5,5	3,2–7,5
Число эрозий	0,3	0–2	0,7	0–3	0,4	0–2
Сужение суставной щели, мм	12,7	0–33	17,1	2–43	12,2	3–32

ния II, рентгенологическое прогрессирование II, активность II и повышенные значения РФ (табл. 1).

**Экспрессия генов у первичных больных РА.** Обследованные больные значительно различались по уровню экспрессии генов, ассоциированных с циклом клеточного деления. Поскольку ген *mTOR* является основным регулятором биосинтеза белка и пролиферации, в соответствии с уровнями экспрессии этого гена все больные были разделены на 3 подгруппы (рис. 2).

В подгруппу 1 были включены 18 пациентов, у которых экспрессия *mTOR* была ниже ( $p < 0,001$ ), чем у здоровых доноров. Это сопровождалось значительно более высокой экспрессией *ATG1*. Пониженная экспрессия *mTOR* при значительном повышении экспрессии *ATG1* свидетельствует о состоянии аутофагии в клетках крови исследуемых пациентов.

Больные подгруппы 2 (12 пациентов) достоверно не отличались по уровню экспрессии *mTOR* от здоровых доноров. При этом экспрессия *ATG1*, *p21* и каспазы 3 оказалась значительно повышена по сравнению с донорами.

Наконец, пациенты подгруппы 3 (9 человек) имели значительно более высокие уровни экспрессии всех исследованных генов ( $p < 0,001$ ) по сравнению со здоровыми донорами.

Больные всех подгрупп имели статистически достоверно более высокие уровни экспрессии ФНО  $\alpha$  по сравнению со здоровыми донорами (см. рис. 2). При этом у пациентов подгруппы 1 относительная экспрессия ФНО  $\alpha$  оказалась значительно ниже, чем в других подгруппах, а максимальная экспрессия ФНО  $\alpha$  наблюдалась у больных подгруппы 3.

**Клинические и иммунологические характеристики первичных больных РА.** Среди пациентов исследуемых подгрупп отмечены различия по некоторым клиническим и иммунологическим признакам. Так, больные подгруппы 3 имели значительно более низкие уровни РФ в сыворотке (в среднем 60,3 МЕ/л) и более высокое ЧПС (в среднем 13,9) по сравнению с больными подгруппы 1 (рис. 3, табл. 2). У больных подгруппы 2 наблюдалось наибольшее содержание АЦЦП (в среднем 77,9 Ед/мл), а также наименьшая

длительность утренней скованности (в среднем 67,9 мин) по сравнению с другими подгруппами.

Анализ корреляций (по Спирману) уровня экспрессии генов цикла клеточного деления с клиническими и иммунологическими показателями в подгруппах показал, что у больных подгруппы 1 наблюдалась отрицательная корреляция относительной экспрессии *mTOR* и каспазы 3 с числом эрозий, а ФНО  $\alpha$  – с ЧПС и ЧБС, а также индекса DAS 28. Напротив, положительная ассоциация экспрессии *ATG1* отмечена с величиной сужения суставной щели в той же подгруппе больных РА (табл. 3).

У больных подгруппы 2 обнаружена отрицательная корреляция экспрессии *mTOR* с показателями длительности утренней скованности и индекса DAS 28, а также положительная ассоциация с уровнем РФ. Экспрессия генов *ATG1*, *p21* и каспазы 3 положительно коррелировала с количеством СРБ, числом эрозий и величиной сужения суставной щели (кроме *ATG1* для последнего показателя). Кроме того, значения коэффициента корреляции оказались положительными при анализе уровня индекса DAS 28 с экспрессией генов *p21*, каспазы 3 и ФНО  $\alpha$ .

У больных подгруппы 3 экспрессия ФНО  $\alpha$  положительно коррелировала с уровнем АЦЦП (см. табл. 3).

Сравнение величин коэффициентов корреляции между подгруппами больных РА показало, что большинство из них статистически достоверно различаются между подгруппами 1 и 2 (см. табл. 3). Достоверных различий между значениями коэффициентов корреляции в подгруппах 2 и 3 обнаружить не удалось.

#### Обсуждение

В настоящее время лечение больных с ранним РА базируется на назначении БПВП в эффективных терапевтических дозах с целью купирования воспалительного процесса [11]. Однако при этом наступает лишь временное улучшение, иногда достаточно длительное.

Вместе с тем, поскольку сообщалось о нарушении пролиферативных процессов и апоптозной активности у данных больных [11], активация воспалительного процес-

Таблица 3

*Корреляция относительной экспрессии генов с клиническими и иммунологическими показателями у больных РА (по Спирману)*

Подгруппа 1	<i>mTOR</i>	<i>ATG1</i>	<i>p21</i>	Каспаза 3	ФНО α
ЧПС					-0,433* <sup>a</sup> p=0,05
ЧБС					-0,567* <sup>a</sup> p=0,01
DAS 28					-0,424* p=0,05
Число эрозий	-0,425* <sup>a</sup> p=0,05			-0,474* <sup>a</sup> p=0,05	
Сужение суставной щели		0,469* p=0,04			
Подгруппа 2	<i>mTOR</i>	<i>ATG1</i>	<i>p21</i>	Каспаза 3	ФНО α
Продолжительность утренней скованности	-0,582* <sup>a</sup> p=0,04				
РФ	0,521* p=0,05				
СРБ		0,857* <sup>a</sup> p=0,006	0,714* <sup>a</sup> p=0,04	0,666* <sup>a</sup> p=0,05	
DAS 28	-0,566* p=0,05		0,761* <sup>a</sup> p=0,02	0,809* <sup>a</sup> p=0,01	0,654* <sup>a</sup> p=0,05
Число эрозий		0,763* <sup>a</sup> p=0,02	0,732* <sup>a</sup> p=0,03	0,732* <sup>a</sup> p=0,03	
Сужение суставной щели			0,843* <sup>a</sup> p=0,008	0,903* <sup>a</sup> p=0,002	
Подгруппа 3	<i>mTOR</i>	<i>ATG1</i>	<i>p21</i>	Каспаза 3	ФНО α
АЦЦП					0,714* p=0,05

**Примечание.** \* – коэффициенты корреляции по данному признаку достоверно различались ( $p \leq 0,05$ ) между подгруппами 1 и 2. В таблице указаны только статистически значимо различающиеся значения коэффициентов корреляции внутри каждой подгруппы больных РА.

са может быть обусловлена нарушением цикла деления клеток больных РА. В связи с этим обнаруженная нами в данном исследовании гетерогенность больных РА по экспрессии генов, связанных с циклом клеточного деления, и провоспалительного цитокина ФНО α у первичных больных РА может быть важна не только в теоретическом плане, но и для определения способа лечения. При этом следует подчеркнуть, что между подгруппами, сформированными на основании экспрессии генов, наблюдались некоторые различия по клиническим и иммунологическим признакам. В частности у больных подгруппы 3 уровни РФ оказались наиболее низкими, а ЧПС – высоким. В подгруппе 2 уровни АЦЦП были максимальными, а длительность утренней скованности – минимальной.

У пациентов подгруппы 1, обладающих значительно более низкой экспрессией гена *mTOR*, уровень экспрессии ФНО α оказался также наиболее низким по сравнению с больными других подгрупп, хотя и значительно выше, чем у здоровых представителей контрольной группы. Вместе с тем больные подгруппы 1, вероятно, имеют низкий метаболический потенциал, поскольку у них существенно снижена экспрессия гена *mTOR*, ответственного за биосинтез белка, а значительно более высокая экспрессии маркера

аутофагии *ATG1* свидетельствует об аутофагии, которая развивается при недостатке питательных веществ и использует расщепление клеточных белков в качестве источника энергии [12]. На участие нарушения сигнальной системы *mTOR* – *ATG1* в поражении суставов у этих больных также указывают значения коэффициента корреляции экспрессии генов с состоянием суставов. В частности, ввиду положительной корреляции экспрессии *ATG1* с величиной сужения суставной щели можно предположить участие продукта этого гена в патологическом процессе. Напротив, отрицательная корреляция экспрессии *mTOR* с числом эрозий указывает на то, что повышение экспрессии этого гена может улучшить состояние суставов в данной подгруппе больных. Это особенно важно в практическом плане, поскольку активность *mTOR* можно регулировать пищевыми добавками, содержащими разветвленные аминокислоты [13]. С другой стороны, отрицательная корреляция экспрессии ФНО α с рядом клинических показателей может указывать на то, что у данных больных усиление воспалительного процесса служит защитной реакцией в ответ на метаболические изменения в клетках, поэтому блокирование воспаления может привести к неблагоприятному течению заболевания.

У пациентов подгрупп 2 и 3 значительно более высокая экспрессия *ATG1* по сравнению с *mTOR* также позволяет предположить развитие аутофагии в клетках их крови. Кроме того, поскольку высокая экспрессия гена *mTOR* сопровождается более высокой экспрессией *p21*, клетки крови этих больных находятся в состоянии гипермитогенного ареста клеточного цикла, который приводит к накоплению стареющих популяций клеток [4]. Такие клетки могут быть нечувствительны к терапевтическим агентам, действующим на делящиеся клетки. Так, например, отмечалось, что применение анти-В-клеточных препаратов, которые взаимодействуют с быстро делящимися и зрелыми В-лимфоцитами, более эффективно для РФ-позитивных больных [14]. Поэтому низкие сывороточные уровни РФ у больных подгруппы 3 могут обуславливать их меньшую чувствительность к отдельным биологическим препаратам.

Значительное превышение экспрессии *p21* по сравнению с экспрессией каспазы 3 может указывать на недостаточную активность апоптоза у больных подгрупп 2 и 3 [15]. Нарушение равновесия процессов пролиферации и апоптоза ранее также рассматривалось как один из механизмов развития РА [6, 16].

Кроме того, положительная корреляция индекса DAS 28 с экспрессией ФНО  $\alpha$  у больных подгруппы 2 может указывать на то, что повышение экспрессии этого гена может привести к усилению активности заболевания. У больных подгруппы 3 наиболее высокая экспрессия ФНО  $\alpha$  по сравнению с больными других подгрупп сопровождается наибольшим ЧПС, что свидетельствует о воспалении. В то же время положительная корреляция экспрессии ФНО  $\alpha$  с уровнем АЦЦП, который ассоциируется с радиографически регистрируемым повреждением суставов [17], вероятно, указывает на активный процесс их деградаций.

Подгруппа 2, вероятно, является промежуточным звеном между подгруппами 1 и 3. По профилю экспрессии исследуемых генов (за исключением гена *mTOR*) эта подгруппа близка к подгруппе 3; по некоторым клиническим и иммунологическим признакам (ЧПС и концентрации РФ) она имеет сходство с подгруппой 1, хотя по уровню АЦЦП и длительности утренней скованности достоверно отличается от двух других подгрупп. Кроме того, сравнение межгрупповых коэффициентов корреляции отчетливо разграничивает подгруппы 1 и 2. В то же время в подгруппах 2 и 3 достоверных различий по межгрупповым коэффициентам корреляции не обнаружено.

Существенное влияние нарушений экспрессии генов, ответственных за клеточное деление, на разрушение суставов и активность маркеров воспаления подтверждается так-

же положительными значениями коэффициента корреляции по Спирману между содержанием СРБ в сыворотке, DAS 28, числом эрозий, сужением суставной щели и экспрессией *p21* и каспазы 3 у больных РА подгруппы 2. При этом положительная корреляция экспрессии *ATG1* с сужением суставной щели у пациентов подгруппы 1, а также положительная корреляция экспрессии большинства исследованных генов больных подгруппы 2 с показателями поражения суставов и маркерами воспалительного процесса может указывать на то, что повышение уровней экспрессии этих генов является частью патологического процесса. Поэтому блокирование повышенной экспрессии отдельных генов может способствовать улучшению состояния пациентов.

Необходимость поиска новых подходов для лечения РА помимо ингибирования воспаления подтверждается недавними системными исследованиями экспрессии генов в клетках периферической крови больных ювенильным идиопатическим артритом в активной фазе и в состоянии ремиссии [18]. Эти исследования показали, что в состоянии ремиссии не происходит восстановления профилей транскрипции, свойственных здоровым донорам, а достигается состояние нового сбалансированного гомеостаза про- и противовоспалительных процессов.

#### Заключение

Группа первичных больных РА является неоднородной по уровню экспрессии гена *mTOR* – основного регулятора биосинтеза белка в клетке, ряда генов, ассоциированных с циклом клеточного деления, и провоспалительного цитокина ФНО  $\alpha$ . У больных подгруппы 1, имеющих пониженную экспрессию гена *mTOR* и высокую экспрессию *ATG1*, клетки крови могут находиться в состоянии аутофагии. При этом повышение экспрессии ФНО  $\alpha$  может играть протективную роль у больных данной подгруппы. Повышенная экспрессия *p21*, превышающая экспрессию *mTOR*, свидетельствует о наличии ГА в клетках крови у пациентов подгрупп 2 и 3. У пациентов подгрупп 2 и 3 ГА в клетках крови сопровождается состоянием аутофагии и недостаточностью активности апоптоза.

В связи с этим пациенты подгруппы 1 могут нуждаться в добавках разветвленных аминокислот для повышения экспрессии *mTOR* и активности белкового синтеза, которые в реципрокном режиме приведут к снижению аутофагии. Пациентам подгрупп 2 и 3 помимо противовоспалительного лечения могут быть необходимы препараты, активирующие апоптозную активность и ингибирующие аутофагию.

Работа осуществлена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 09-04-01158-а).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Firestein G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423:356–61.
2. Rindfleisch J.A., Muller D. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *Am Fam Physician* 2005;72:1037–47.
3. Karp G. Cell and molecular biology: concepts and experiments. 4th ed. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, 2005;598–9.
4. Blagosklonny M.V. Cell senescence and hypermitogenic arrest. *EMBO Report* 2003;4:358–62.
5. Demidenko Z.N., Blagosklonny M.V. Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. *Cell Cycle* 2008;7:3355–61.
6. Eguchi K. Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med* 2001;40:275–84.
7. 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.
8. Levine B., Klionsky D.J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004;6:463–77.
9. Hay N., Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004;18:1926–45.
10. Четина Е.В., ДиБатиста Д., Пул А.Р. Роль простагландина Е2 в ингибировании разрушения коллагена суставного хряща больных остеоартрозом. *Научно-практич ревматол* 2009;3:18–23.
11. Насонов Е.Л., Самсонов М.Ю. Новые направления в исследовании воспаления при ревматических заболеваниях. Избранные лекции по клинической ревматологии. Под ред. В.А. Насоновой, Н.В. Бунчука. М., 2001;29–44.
12. Proud C.G. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur J*