ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Метаболические аспекты прогнозирования достижения ремиссии по базальной экспрессии генов в крови у больных ревматоидным артритом при терапии метотрексатом[1]

Четина Е.В., Демидова Н.В., Маркова Г.А.

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

Ревматоидный артрит (РА) – аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся хроническим эрозивным артритом (синовит) и системным воспалительным поражением внутренних органов. Метотрексат (МТ) является препаратом выбора для лечения РА. Однако в настоящее время невозможно предсказать эффективность МТ у конкретного больного; у значительного числа пациентов он не дает желаемого эффекта или вызывает побочные реакции. Выявление больных, чувствительных к МТ, позволило бы значительно улучшить результаты терапии.

***Цель** исследования – изучение особенностей базальной (до терапии) экспрессии генов, ответственных за основные пути метаболизма и генерации энергии, у больных РА с различной активностью заболевания, ранее не получавших МТ, а также идентификация генов, базальная экспрессия которых может служить предиктором достижения ремиссии.*

***Пациенты и методы.** Исследована кровь 40 больных РА, ранее не получавших МТ (средний возраст 47,5 года, средняя длительность заболевания 7,9 нед) и 26 здоровых доноров (средний возраст 45,1 года). Всем больным был назначен МТ (15 мг/нед), который они получали в течение 2 лет. Клинический ответ оценивали по индексу DAS28, сывороточным уровням антител к циклическому цитруллинированному пептиду, СРБ и ревматоидного фактора. Ремиссию диагностировали в соответствии с критериями ACR/EULAR и по DAS28 (DAS28<2,6). Структурные изменения суставов оценивали рентгенологически. Экспрессию генов определяли в клетках периферической крови посредством обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.*

Контрольную группу составили 26 произвольно набранных доноров крови без аутоиммунных заболеваний и отягощенной наследственности, сопоставимых по полу и возрасту с группой больных.

***Результаты и обсуждение.** На фоне терапии МТ наблюдалось значительное уменьшение активности заболевания по индексу DAS28. В конце исследования большинство больных имели умеренную (3,2⩽ DAS28 ⩽5,1), 4 – высокую активность заболевания, а у 12 достигнута ремиссия (DAS28 <2,6).*

Анализ экспрессии генов показал, что больные РА, достигшие клинической ремиссии после терапии МТ, имели более высокую базальную экспрессию генов, ассоциированных с гликолизом (Glut1, PKM), воспалением (TNFα), аутофагией (ULK1), апоптозом (каспаза 3, p21) и гипоксией (HIF1α), по сравнению с больными, не достигшими ремиссии, и здоровыми лицами. Кроме того, у пациентов, достигших ремиссии, базальная экспрессия гена CD1 оказалась значительно выше, чем у здоровых лиц, тогда как у остальных пациентов экспрессия этого гена была существенно ниже, чем в контроле. При сохранении высокой активности заболевания базальная экспрессия генов p21, каспазы 3, TGFβ1 и RUNX2 была значительно ниже, чем у здоровых лиц и остальных больных РА.

***Выводы.** Достижение ремиссии у больных РА, ранее не получавших МТ, ассоциируется с более высокой базальной (до терапии) экспрессией генов, связанных с активностью гликолиза, воспалением, аутофагией, апоптозом, гипоксией, по сравнению с больными, не способными достичь ремиссии. Повышенная базальная экспрессия гена CD1 по сравнению с таковой у здоровых лиц может служить предиктором чувствительности к терапии МТ.*

***Ключевые слова:** ревматоидный артрит; DAS28, ремиссия; экспрессия генов; периферическая кровь; воспаление; энергетический метаболизм; циклин D1; метотрексат.*

Контакты:** Елена Васильевна Четина; **etchetina@mail.ru

***Для ссылки:** Метаболические аспекты прогнозирования достижения ремиссии по базальной экспрессии генов в крови у больных ревматоидным артритом при терапии метотрексатом. Четина ЕВ, Демидова НВ, Маркова ГА. Современная ревматология. 2019;13(2):47–54.*

[1]Предварительные результаты исследования доложены на Конгрессе с международным участием «Дни ревматологии в Санкт-Петербурге-2017», 8–10 октября 2017 г.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Metabolic aspects of clinical remission prediction from baseline blood gene expression in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate

Chetina E.V., Demidova N.V., Markova G.A.
V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia
34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease of unknown etiology, which is characterized by chronic erosive arthritis (synovitis) and systemic inflammation of the viscera. Methotrexate (MTX) is the drug of choice for RA treatment. However, it is currently impossible to predict the efficacy of MTX in a particular patient; the drug fails to produce the desired effect or causes adverse reactions in a considerable number of patients. The identification of patients who are responsive to MTX could significantly improve the results of therapy.
Objective: *to investigate the specific features of baseline (pretreatment) expression of genes responsible for major metabolic and energy production pathways in RA patients with different disease activity and to identify the genes, the baseline expression of which could serve as a predictor for remission attainment.*
Patients and methods. *Blood from 40 RA patients (mean age 47.5 years; mean disease duration 7.9 weeks) who had not previously received MTX and 26 healthy donors (mean age 45.1 years). All the patients had used MTX (15 mg/week) for 2 years. Clinical response was evaluated by DAS28 and the serum levels of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, C-reactive protein, and rheumatoid factor. Remission was diagnosed according to ACR/EULAR and DAS28 (DAS28 <2.6). Joint structural changes were radiographically evaluated. Gene expression was determined in peripheral blood cells by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction.*
A control group consisted of 26 randomly recruited gender- and sex-matched patients without autoimmune diseases and a family history.
Results and discussion. *MTX treatment significantly decreased disease activity according to DAS28. At the end of the investigation, the majority of patients had moderate disease activity (3.2⩽ DAS28 ⩽5.1), 4 had high disease activity, while 12 attained remission (DAS28 <2.6).*
Gene expression analysis showed that RA patients who had achieved clinical remission after MTX therapy displayed higher baseline expression of the genes associated with glycolysis (Glut1, PKM), inflammation (TNF-α), autophagy (ULK1), apoptosis (caspase 3, p21), and hypoxia (HIF1α), compared with patients who had not attained remission and with healthy individuals. In addition, in patients who had achieved remission, the baseline expression of the CD1 gene was significantly higher than in healthy individuals, while in the remaining patients the expression of this gene was significantly lower than in the controls. While the disease activity remained high, the baseline expression of the p21, caspase 3, TGFβ1, and RUNX2 genes was significantly lower than in healthy individuals and other patients with RA.
Conclusion. *Remission achievement in RA patients who had not previously received MTX was associated with higher baseline (pretreatment) gene expression associated with glycolytic activity, inflammation, autophagy, apoptosis, and hypoxia compared with patients who failed to attain remission. Elevated baseline expression of the CD1 gene compared with that in healthy individuals may serve as a predictor of sensitivity to MT therapy.*

Keywords: *rheumatoid arthritis; DAS28; remission; gene expression; peripheral blood; inflammation; energy metabolism; cyclin D1; methotrexate.*
Contact: *Elena Vasilyevna Chetina;* ***etchetina@mail.ru***
For reference: *Chetina EV, Demidova NV, Markova GA. Metabolic aspects of clinical remission prediction from baseline blood gene expression in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate. Sovremennaya Revmatologiya=Modern Rheumatology Journal. 2019;13(2):47–54.*
DOI: *10.14412/1996-7012-2019-2-47-54*

Современная стратегия терапии ревматоидного артрита (РА) состоит в ранней диагностике и активном лечении для наиболее полного подавления активности заболевания [1]. При этом «окно возможностей», когда больные наилучшим образом отвечают на терапию и достигают длительной ремиссии, существует на ранней стадии РА. Поскольку на этой стадии, в отличие от поздней стадии РА, больные более чувствительны к активной терапии базисными противовоспалительными препаратами (БПВП), существует возможность остановить прогрессирование заболевания. Кроме того, разрушение сустава быстрее развивается в начале заболевания [2]. Введение в клиническую практику стратегии лечения до достижения цели «T2T», состоящей в периодической регистрации активности заболевания и своевременной коррекции терапии, направлено на достижение ремиссии или низкой активности РА, что позволяет предотвращать разрушение суставов и потерю трудоспособности [3]. Целью лечения РА является достижение ремиссии, поэтому особое значение приобретает ее прогнозирование до начала терапии для определения стратегии лечения. Однако в настоящее время оптимальная стратегия индукции ремиссии при РА изучена недостаточно [4].

В некоторых исследованиях отмечалось, что низкая базальная активность РА, минимальные рентгенологические изменения, серонегативность по ревматоидному фактору (РФ) и антителам к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП) у больных РА, не получавших БПВП, коррелировали с ремиссией при лечении метотрексатом (МТ) [5, 6]. Кроме того, обнаружены некоторые биомаркеры, характеризующие патофизиологический процесс. В частности, высокая сывороточная концентрация хемокина CXCL13 – хемоаттрактанта В-лимфоцитов – оказалась маркером тяжелого течения и деструкции суставов при РА [7] и одновременно может служить предиктором ремиссии у больных ранним РА, не получавших БПВП [8, 9]. В другом исследовании более высокая концентрация наивных Т-лимфоцитов ассоциировалась с последующей ремиссией при терапии МТ [10]. А при лечении РА ингибиторами фактора некроза опухолей α оказалось, что базальные уровни мРНК ADAMTS5 [11], сывороточные концентрации RANKL [12], СРБ [13] и рецептора интерлейкина (ИЛ) 2 [14] были значительно ниже у больных, достигших ремиссии, по сравнению с пациентами, у которых сохранялась умеренная и высокая активность заболевания. В то же время неэффективность терапии МТ при РА может быть обусловлена повышенной экспрессией FcαRIIIa/CD16 на CD14++ моноцитах, что определяет повышенную чувстви-

тельность этих клеток к стимуляции иммунными комплексами [15]. Однако проведенные исследования характеризуются большой гетерогенностью в отношении определения ремиссии, времени ее достижения и длительности терапии РА. Поэтому в настоящее время надежные предикторы ремиссии отсутствуют.

Поскольку ответ на терапию зависит по крайней мере от трех параметров: концентрации лекарства, стадии и патофизиологии заболевания, каждый из которых опосредован многими другими факторами [16], для прогнозирования ремиссии необходимо понять характер изменений метаболизма, вызванных как заболеванием, так и терапией. Система генерации и потребления энергии в форме АТФ является наиболее универсальной, функционирует во всех клетках организма и определяет эффективность его жизнедеятельности. Способ продукции АТФ зависит от функциональных потребностей различных субтипов иммунных клеток, преимущественно лимфоцитов, поскольку разные подтипы Т-клеток с различными функциями активируют различные энергетические и биосинтетические метаболические программы [17]. В частности, покоящиеся непролиферирующие клетки: наивные Т-лимфоциты, Т-регуляторные клетки (T_{regs}), а также клетки памяти обычно генерируют АТФ путем окислительного фосфорилирования АТФ в митохондриальной цепи переноса электронов – самого эффективного способа продукции энергии [18]. При этом в аэробных условиях происходит окисление глюкозы (в гликолизе), аминокислот, глутамина (в глутаминолизе) до пирувата, который поступает в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), где генерируются высокоэнергоемкие восстановленные нуклеотиды, которые далее окисляются в цепи переноса электронов. Ввиду того, что в условиях окислительного фосфорилирования содержание глюкозы лимитировано, оно сопряжено с активностью глюконеогенеза, ответственного за восстановление пирувата до глюкозы для поддержания постоянной концентрации глюкозы в крови [19].

Напротив, активированные Т-лимфоциты и короткоживущие иммуностарческие T_{EMRA}-клетки, несмотря на присутствие кислорода, переключают метаболизм на использование гликолиза (аэробный гликолиз, эффект Варбурга) [20], который необходим для оптимальной продукции цитокинов Т-лимфоцитами. Особое состояние анергии Т-лимфоцитов также связано со спецификой энергетического метаболизма: с арестом цикла клеточного деления на фазе G1/S, а также с неспособностью активировать гликолиз и сократить использование глюкозы через окислительное фосфорилирование, что препятствует активации Т-лимфоцитов [21].

Основными регуляторами, ответственными за переключение энергетических потоков в лимфоцитах, являются белки mammalian target of rapamycin (mTOR), активирующий анаболические процессы для стимулирования роста и пролиферации клеток, включая инициацию клеточного цикла деления на уровне G1/S путем активации циклина CD1; AMPK, который активирует продукцию энергии за счет катаболических процессов; и HIF1α, участвующий в активации анаэробных путей получения энергии – гликолиза [17].

Ранее мы показали, что перед терапией у больных РА была значительно повышена экспрессия всех исследуемых генов в крови по сравнению с контролем. Терапия МТ приводила к снижению экспрессии генов *mTOR, каспазы 3* и фактора некроза опухоли α (*TNFα*) до их уровня у здоровых лиц. В то же время экспрессия генов индикатора аутофагии (*ULK1*), ингибитора циклин-зависимых киназ (*p21*), матрикной металлопротеиназы (*MMP9*), *катепсина K*, трансформирующего фактора роста (*TGFβ1*) и Runt-зависимого транскрипционного фактора (*RUNX2*) оставалась высокой. Более того, была обнаружена корреляция между базальной экспрессией ряда генов в крови и клиническими и иммунологическими показателями в конце терапии [22].

Цель исследования – анализ экспрессии генов, ответственных за основные пути метаболизма и генерации энергии, в крови больных РА с различной активностью заболевания, ранее не получавших МТ, и поиск маркеров для прогнозирования достижения ремиссии по базальной экспрессии генов при терапии МТ.

Пациенты и методы. В исследование включено 40 пациентов с РА, ранее не получавших МТ, с длительностью заболевания не более 2 лет. Среди них было 5 мужчин и 35 женщин в возрасте 18 лет и старше (средний возраст 47,5±15,5 года), не использовавших БПВП и системной терапии глюкокортикоидами. Больные проходили лечение в НИИР им. В.А. Насоновой в 2007–2008 гг. по программе «РАДИКАЛ». Регистрационный номер клинического исследования 0120.0810610. Протокол исследования одобрен локальным комитетом по этике, информированное согласие получено у всех больных.

Диагноз устанавливали согласно классификационным критериям ACR (American College of Rheumatology) 1987 г. *Критерием исключения* пациентов являлось наличие противопоказаний для назначения БПВП в эффективных терапевтических дозах.

Все больные получали МТ в дозе 10 мг/нед. После 2 нед лечения дозу увеличивали до 15 мг/нед и продолжали терапию в течение 2 лет. 11 из 40 больных РА в дополнение к МТ назначали метилпреднизолон 8 мг/сут. После включения больные наблюдались одним и тем же ревматологом каждые 6 мес в течение 2 лет.

Контрольную группу составили 26 произвольно набранных доноров крови без аутоиммунных заболеваний и отягощенной наследственности, сопоставимых по полу и возрасту с группой больных.

Клинические, лабораторные и инструментальные методы. Определяли число припухших суставов (ЧПС) из 44, число болезненных суставов (ЧБС) из 53, продолжительность утренней скованности (в минутах). Для количественной оценки активности РА использовали индекс DAS28.

Иммунологические методы. Концентрацию СРБ и IgM РФ в сыворотке определяли иммунонефелометрическим методом на автоматическом анализаторе BN-100 (Dade Behring, Германия). Концентрацию АЦЦП исследовали иммуноферментным методом с использованием коммерческого набора фирмы Axis-Shield Diagnostic Limited (Великобритания) согласно инструкции фирмы-производителя.

Инструментальные методы. Всем пациентам выполняли рентгенографию кистей и дистальных отделов стоп в прямой проекции. Прогрессирование изменений суставов при РА оценивали по методу Sharp в модификации van der Heijde. При этом подсчитывали число эрозий и сужения суставных щелей в 16 суставах каждой кисти и в 6 суставах каждой стопы. Счет числа эрозий и сужения суставных щелей регистрировали для каждой кисти и каждой стопы, вычисляя среднее значение оценок двух исследователей.

Исходная характеристика больных РА, достигших и не достигших ремиссии после терапии МТ, Me [25-й; 75-й перцентили]

Показатель	Больные РА, не достигшие ремиссии (n=28)	Больные РА, достигшие ремиссии (n=12)	p
РФ, МЕ/л	238,5 [9,5; 80]	110,2 [9,5; 81,2]	0,49
АЦЦП, ед/л	55,3 [0,3; 100]	44,7 [0,5; 98,5]	0,52
СРБ, мг/мл	19,6 [8; 17,8]	19,4 [2,7; 37,5]	0,98
DAS28	5,52 [5,0; 5,9]	5,04 [4,4; 5,6]	0,24
Скованность, мин	134,4 [40; 180]	97,1 [30; 150]	0,34
ЧПС	10,1 [4; 13]	8,4 [6; 9]	0,55
ЧБС	10,8 [6; 13]	9,9 [6; 11,5]	0,76
Число эрозий	0,59 [0; 1]	0,5 [0; 0,5]	0,79
Сужение суставной щели	15 [7; 21]	13 [6; 20]	0,56

Молекулярно-биологические методы. Общую РНК выделяли из цельной крови, используя коммерческий набор «РИБО-золь-А» (ИнтерЛабСервис, Москва). Обратнотранскриптазную (ОТ) реакцию проводили с помощью коммерческого набора «Реверта» (ИнтерЛабСервис, Москва). Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени применяли прибор модели 7300 Applied Biosystems и наборы для экспрессии генов (Applied Biosystems, USA): *mTOR (Hs0023522_m1), ULK1 (Hs00177504_m1), p21 (Hs00355782_m1), каспазы 3 (Hs00263337_m1), TNFα (Hs00174128_m1), MMP9 (Hs00234579_m1), катепсина K (Hs00166156_m1), TGFβ1 (Hs99999918_m1)* и *RUNX2 (Hs00231692_m1), циклина, CCND1 (Hs00233365_m1)*, транспортера глюкозы, *Glut1, SLC2A1 (Hs00197884_m1)*, пируват киназы, *PKM2 (Hs00987255_m1)*, фактора, индуцируемого гипоксией, *HIF1α* (*Hs00936368_m1*), малатдегидрогеназы, *MDH2* (*Hs00938918_m1*), пируваткарбоксилазы, *PC (Hs00559398_m1)*, как описано ранее [23]. В-актин использовали в качестве эндогенного контроля. При постановке ОТ ПЦР в реальном времени при каждом определении экспрессии каждого гена на планшет вносится кДНК 16 контрольных лиц и кДНК больных РА, поэтому экспрессия в контроле исследовалась при каждом определении экспрессии [23].

Исследование клинических, иммунологических и молекулярно-биологических показателей проводили до начала терапии МТ и через 24 мес.

Статистический анализ. Данные количественных экспериментов представлены как медиана – Me [25-й; 75-й перцентили]. Анализы выполняли в двух повторностях. Статистический анализ проводили с помощью пакета программ Statistica (версия 6.0 StatSoft). Для статистической обработки результатов использовали тесты Манна–Уитни и Вилкоксона. Различия считали значимыми при $p \leqslant 0,05$.

Результаты

Характеристика больных РА. Ранее нами была представлена подробная характеристика этой группы больных РА [24]. Сравнение исходных клинических и иммунологических показателей у больных РА, достигших ремиссии, и у пациентов с сохраняющейся умеренной или высокой активностью заболевания, не выявило статистически значимых различий (см. таблицу).

Ассоциация экспрессии генов с активностью заболевания до и после терапии. Для анализа ассоциации экспрессии генов с активностью заболевания больные РА были разделены на подгруппы с высокой (DAS28 >5,1), умеренной (3,2⩽ DAS28 ⩽5,1) активностью заболевания и ремиссией (DAS28 <2,6) до и после терапии МТ (рис. 1). Оказалось, что до терапии больные РА с высокой активностью заболевания имели более высокую экспрессию всех исследованных генов по сравнению с контролем. У больных с умеренной активностью экспрессия большинства исследованных генов до терапии также оказалась выше, чем у здоровых лиц, тогда как экспрессия генов *p21, ULK1* и *каспазы 3* существенно не отличалась от их экспрессии в контроле.

После терапии экспрессия большинства исследованных генов продолжала оставаться более высокой, чем у здоровых лиц (см. рис. 1). Так, подгруппа больных, у которых сохранялась высокая активность заболевания, имела значительно более высокую экспрессию всех исследованных генов по сравнению со здоровыми лицами. В подгруппах больных с умеренной активностью заболевания и пациентов, достигших ремиссии, экспрессия *TNFα* и *mTOR* снизилась до нормы. Кроме того, в подгруппе больных с умеренной активностью РА экспрессия генов *p21, каспазы 3* и *RUNX2* после терапии была сравнима с таковой в контроле. Напротив, экспрессия генов *ULK1, p21, каспазы 3, MMP9, катепсина K, TGFβ1* и *RUNX2* у пациентов, достигших ремиссии, оказалась выше, чем у здоровых лиц.

Анализ исходной (до терапии) экспрессии исследованных генов в подгруппах больных РА, разделенных в зависимости от активности заболевания после терапии МТ, показал, что пациенты, достигшие ремиссии или умеренной активности заболевания, имели более высокую исходную (до терапии) экспрессию всех исследованных генов по сравнению со здоровыми лицами (рис. 2). При этом наблюдалась тенденция к более высокому уровню экспрессии у больных, достигших ремиссии, по сравнению с пациентами, у которых отмечалась умеренная активность РА.

Напротив, при сохранении высокой активности заболевания после терапии исходная (до терапии) экспрес-

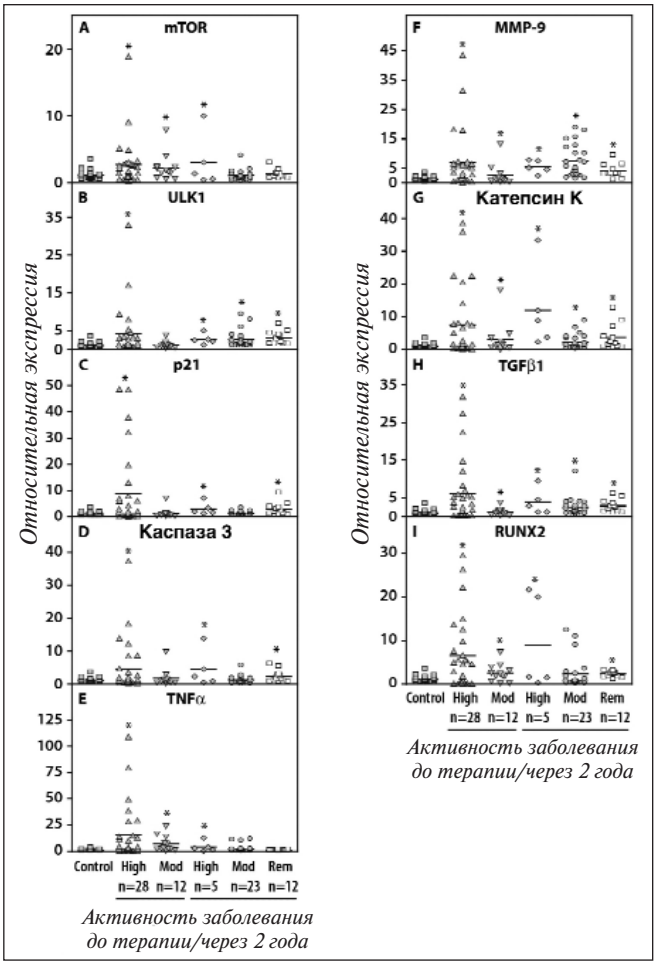

Рис. 1. *Относительная экспрессия генов mTOR (A), ULK1 (B), p21 (C), каспазы 3 (D), TNFα (E), MMP9 (F), катепсина K (G), TGFβ1 (H) и RUNX2 (I) по отношению к β-актину в крови больных РА (n=40) по сравнению со здоровыми лицами (n=26), измеренная до и после терапии МТ в ПЦР реального времени. Здесь и на рис. 2: больные разделены на подгруппы в соответствии с активностью заболевания (DAS28): высокая (В) – DAS28 >5,1; умеренная (У) – 3,2⩽DAS28⩽5,1; ремиссия (Р) – DAS28 <2,6. Звездочками обозначены статистически значимые различия по сравнению с контролем (К)*

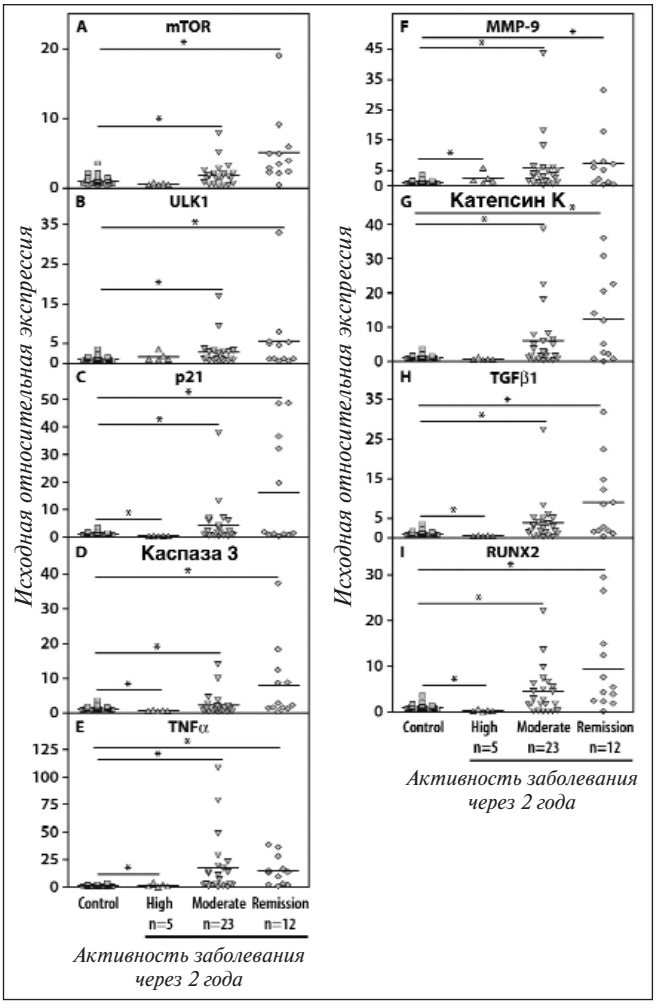

Рис. 2. *Исходная (до терапии) относительная экспрессия генов mTOR (A), ULK1 (B), p21 (C), каспазы 3 (D), TNFα (E), MMP9 (F), катепсина K (G), TGFβ1 (H) и RUNX2 (I) по отношению к β-актину в крови больных РА (n=40) по сравнению со здоровыми лицами (n=26), измеренная в ПЦР реального времени*

сия генов *mTOR, ULK1* и *катепсина K* оказалась сравнима с таковой в контроле. Экспрессия *MMP9* и *TNFα* превышала показатели контроля, а исходная экспрессия *p21, каспазы 3*, *TGFβ1* и *RUNX2* была значительно ниже, чем у здоровых лиц. Следовательно, низкая экспрессия данных генов может служить предиктором нечувствительности к МТ.

Особенности энергетического метаболизма у больных РА. Поскольку исходная (до терапии) экспрессия исследуемых генов у больных с умеренной активностью заболевания или достигших ремиссии после терапии выше, чем у здоровых лиц, анализ экспрессии перечисленных генов не позволил идентифицировать больных РА, которые достигнут ремиссии. Ввиду того, что развитие РА, возможно, связано с дефицитом энергии, обусловленным высокими энергетическими затратами для обеспечения активированного состояния иммунной системы [19], мы предположили, что достижение ремиссии у больных РА может быть связано с более высокой эффективностью их энергетического метаболизма.

Действительно, анализ экспрессии генов гликолитического пути получения энергии *Glut1* и *PKM* показал, что больные, достигшие ремиссии, имели значительно более высокие уровни исходной экспрессии этих генов по сравнению с остальными пациентами с РА (рис. 3). Напротив, исходная экспрессия гена ЦТК (*MDH2*) и гена, ответственного за глюконеогенез (*PC*), оказалась сравнимой в обеих подгруппах.

Анализ экспрессии регуляторов гликолиза *HIF1α*, *mTOR* и циклина *CD1* была повышена в группе больных, достигших ремиссии, по сравнению со здоровыми лицами. При этом различия с контролем были статистически значимы для генов *mTOR* и *CD1* (см. рис. 3). Более того, экспрессия гена *CD1* оказалась статистически значимо ниже, чем у

здоровых лиц, при сохранении высокой или умеренной активности заболевания после терапии. Следовательно, по исходной экспрессии гена циклина *CD1* в крови можно идентифицировать больных РА, которые достигнут ремиссии при условии, что они не получали ранее МТ.

Обсуждение. Поскольку применение лекарств часто сопряжено со значительными неблагоприятными последствиями, необходимо по возможности избегать их назначения тем пациентам, которые не могут ответить на данную терапию. Поэтому нужна точная и персонифицированная стратегия для прогнозирования ответа на терапию и достижения ремиссии до начала лечения [25].

Существуют разные определения ремиссии при РА. Хотя эксперты ACR и EULAR (European League Against Rheumatism) подвергают сомнению оценку ремиссии по индексу DAS28 и считают более приемлемым использование индексов SDAI и CDAI [26], недавние исследования показали, что, несмотря на ремиссию, подтвержденную по индексу CDAI, «выключенные» В-клетки памяти при их стимулировании в культуре клеток способны продуцировать АЦЦП (предиктор неблагоприятного прогноза) с активностью, сравнимой с таковой В-лимфоцитов пациентов с активным заболеванием [27]. В связи с этим в данном исследовании достижение ремиссии у больных РА, ранее не получавших МТ, оценивалось по индексу DAS28.

У больных, достигших ремиссии или умеренной активности заболевания, уменьшение экспрессии *TNFα*, опосредующего развитие воспаления, сопровождается снижением активности заболевания по DAS28. При этом исходная экспрессия *TNFα* у больных, достигших ремиссии, оказалась выше, чем у пациентов, не ответивших на лечение. Более высокие уровни исходной (до терапии) экспрессии провоспалительных цитокинов ранее также наблюдались у больных РА, у которых терапия антиревматическими препаратами была эффективна [28].

Значительно более низкая базальная экспрессия генов *p21, каспазы 3*, *TGFβ1* и *RUNX2* по сравнению с таковой у здоровых лиц (контроль) при сохранении высокой активности заболевания после терапии свидетельствует о низкой эффективности апоптоза и ослаблении процессов регенерации ткани, свойственных больным РА [29, 30].

В то же время сохранение повышенной экспрессии ряда генов у больных, достигших ремиссии после терапии МТ, по сравнению со здоровыми лицами подтверждает результаты предыдущих исследований, которые показали, что в период ремиссии заболевание не излечивается и сохраняется возможность обострения [31].

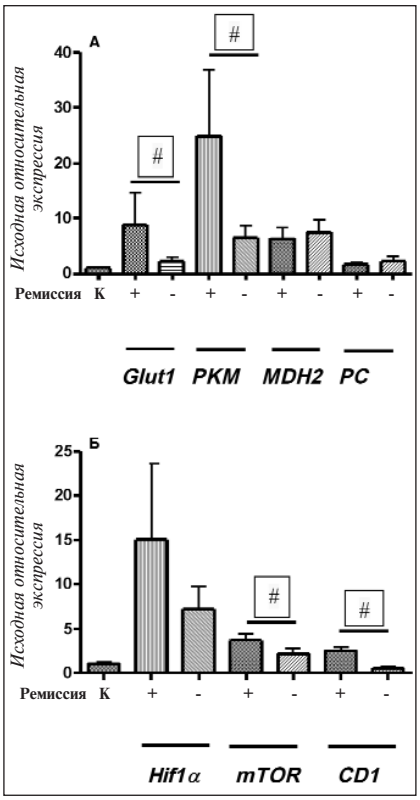

Рис. 3. *Исходная (до терапии) относительная экспрессия генов Glut1, PKM, MDH2, PC (А) и Hif1α, mTOR, CD1 (Б) по отношению к β-актину в крови больных РА, достигших ремиссии (+) после терапии МТ (n=12), или с сохранившейся (-) высокой или умеренной активностью заболевания (n=28) по сравнению со здоровыми лицами (контроль, К; n=26), измеренная в ПЦР реального времени. # – статистически значимые различия между группами больных*

Значительное превышение уровня экспрессии генов, ответственных за гликолитический путь получения энергии у больных РА, достигших ремиссии, по сравнению с остальными пациентами, указывает на то, что они способны активировать аэробный гликолиз и пролиферацию, свойственную здоровым Т-лимфоцитам [17]. Об этом свидетельствует более высокая экспрессия генов *Glut1, PKM, mTOR, CD1* и *HIF1α*, тогда как активность генов ЦТК (*MDH2*) и глюконеогенеза (*PC*) была сопоставима с соответствующими показателями у пациентов с персистирующей активностью заболевания. Следовательно, у больных, резистентных к терапии, наблюдается дефицит энергетических субстратов, как в случае анергии лимфоцитов [21].

Особый интерес представляет базальная экспрессия гена *CD1*. Хотя классической функцией циклина D1 является регуляция клеточного цикла [32], при которой он обеспечивает продвижение из G1- в S-фазу путем связывания и активации Cdk4/6, циклин D1 также влияет на многие клеточные метаболические процессы. В частности, CD1 способен активировать и/или репрессировать экспрессию многих генов [33]. Так, повышение экспрессии CD1 ведет к подавлению глюконеогенеза [34] и функции митохондрий (окислительное фосфорилирование) путем блокирования ассоциации белка анионного канала, зависимого от напряжения (VDAC), с гексокиназой 2, что снижает доступ АДФ к внутренней мембране митохондрий [35]. Кроме того, ранее было показано, что активация гена *CD1* стимулирует поглощение глюкозы и гликолиз в присутствии кислорода (эффект Варбурга – аэробный гликолиз) [36].

В клинической практике определение базальной (до терапии) экспрессии гена *CD1* может быть использовано для прогнозирования ремиссии у больных РА, ранее не получавших МТ, поскольку она оказалась значительно выше, чем в контроле, у больных РА, достигших ремиссии, и ниже нормы у остальных больных и здоровых лиц.

Выводы. Таким образом, наши исследования показали, что более высокая активность заболевания у больных РА, ранее не получавших МТ, ассоциируется с более высокой экспрессией всех исследованных генов как до, так и после терапии. При этом у больных, достигших ремиссии, исходная (до терапии) экспрессия генов была наиболее высокой. Это сопровождается активацией гликолитического пути генерации энергии. Исходная экспрессия гена

CD1 может служить предиктором достижения ремиссии больными РА, ранее не получавшими МТ, поскольку она оказалась значительно выше, чем в контроле, у пациентов, достигших ремиссии, в отличие от остальных больных, у которых исходная экспрессия этого гена была ниже, чем у здоровых лиц. Ввиду малочисленности обследованной выборки для подтверждения полученных результатов необходимо аналогичное исследование с большим количеством пациентов.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Espinoza F, Fabre S, Pers YM. Remission-induction therapies for early rheumatoid arthritis: evidence to date and clinical implications. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2016 Aug;8(4):107-18. doi: 10.1177/1759720X16654476. Epub 2016 Jun 13.
2. Boers M. Understanding the window of opportunity concept in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 Jul; 48(7):1771-4.
3. Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis.* 2010 Jun;69(6):964-75. doi: 10.1136/ard.2009.126532. Epub 2010 May 5.
4. Ma MH, Kingsley GH, Scott DL. A systematic comparison of combination DMARD therapy and tumour necrosis inhibitor therapy with methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2010 Jan;49(1):91-8. doi: 10.1093/rheumatology/kep331. Epub 2009 Nov 16.
5. Gossec L, Dougados M, Goupille P, et al. Prognostic factors for remission in early rheumatoid arthritis: a multiparameter prospective study. *Ann Rheum Dis.* 2004 Jun; 63(6):675-80.
6. Van der Kooij SM, Goekoop-Ruiterman YP, de Vries-Bouwstra JK, et al. Drug-free remission, functioning and radiographic damage after 4 years of response-driven treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009 Jun;68(6):914-21. doi: 10.1136/ard.2008.092254. Epub 2008 Jul 28.
7. Meeuwisse CM, van der Linden MP, Rullmann TA, et al. Identification of CXCL13 as a marker for rheumatoid arthritis outcome using an in silico model of the rheumatic joint. *Arthritis Rheum.* 2011 May;63(5): 1265-73. doi: 10.1002/art.30273.
8. Greisen SR, Schelde KK, Rasmussen TK, et al. CXCL13 predicts disease activity in early rheumatoid arthritis and could be an indicator of the therapeutic 'window of opportunity'. *Arthritis Res Ther.* 2014 Sep 24; 16(5):434. doi: 10.1186/s13075-014-0434-z.
9. Kuan WP, Tam LS, Wong CK, et al. CXCL 9 and CXCL 10 as Sensitive markers of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2010 Feb;37(2): 257-64. doi: 10.3899/jrheum.090769. Epub 2009 Dec 23.
10. Ponchel F, Goëb V, Parmar R, et al. An immunological biomarker to predict MTX response in early RA. *Ann Rheum Dis.* 2014 Nov; 73(11):2047-53. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-203566. Epub 2013 Aug 29.
11. Tsuzaka K, Itami Y, Takeuchi T, et al. ADAMTS5 is a biomarker for prediction of response to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2010 Jul;37(7):1454-60. doi: 10.3899/jrheum.091285. Epub 2010 Jun 1.
12. Gonzalez-Alvaro I, Ortiz AM, Tomero EG, et al. Baseline serum RANKL levels may serve to predict remission in rheumatoid arthritis patients treated with TNF antagonists. *Ann Rheum Dis.* 2007 Dec;66(12): 1675-8. Epub 2007 Jul 31.
13. Emery P, Gabay C, Kraan M, et al. Evidence-based review of biologic markers as indicators of disease progression and remission in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2007 Jul;27(9):793-806. Epub 2007 May 16.
14. Kuuliala A, Leirisalo-Repo M, Möttönen T, et al. Serum soluble interleukin-2 receptor predicts early remission in patients with recent-onset rheumatoid arthritis treated with a single disease-modifying antirheumatic drug. *Clin Exp Rheumatol.* 2005 Mar-Apr; 23(2):243-6.
15. Cooper DL, Martin SG, Robinson JI, et al. FcγRIIIa expression on monocytes in rheumatoid arthritis: role in immune-complex stimulated TNF production and non-response to methotrexate therapy. *PLoS One.* 2012;7(1):e28918. doi: 10.1371/journal.pone.0028918. Epub 2012 Jan 3.
16. Daïen CI, Morel J. Predictive factors of response to biological disease modifying antirheumatic drugs: towards personalized medicine. *Mediators Inflamm.* 2014;2014: 386148. doi: 10.1155/2014/386148. Epub 2014 Jan 12.
17. Gaber T, Strehl C, Sawitzki B, et al. Cellular energy metabolism in T-lymphocytes. *Int Rev Immunol.* 2015 Jan;34(1): 34-49. doi: 10.3109/08830185.2014.956358. Epub 2014 Sep 26.
18. Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR, et al. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets. *J Immunol.* 2011 Mar 15;186(6): 3299-303. doi: 10.4049/jimmunol.1003613. Epub 2011 Feb 11.
19. Straub RH. Interaction of the endocrine system with inflammation: a function of energy and volume regulation. *Arthritis Res Ther.* 2014 Feb 13;16(1):203. doi: 10.1186/ar4484.
20. Verbist KC, Wang R, Green DR. T cell metabolism and the immune response. *Semin Immunol.* 2012 Dec;24(6):399-404. doi: 10.1016/j.smim.2012.12.006. Epub 2013 Jan 11.
21. Crespo J, Sun H, Welling TH, et al. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol.* 2013 Apr;25(2):214-21. doi: 10.1016/j.coi.2012.12.003. Epub 2013 Jan 6.
22. Четина ЕВ, Демидова НВ, Каратеев ДЕ и др. Ассоциация экспрессии генов в крови больных ревматоидным артритом с клиническими и лабораторными показателями до и после терапии метотрексатом. Научно-практическая ревматология. 2016;54(2):155-63. [Chetina EV, Demidova NV, Karateev DE, et al. Association of blood gene expressions in rheumatoid arthritis patients with clinical and laboratory parameters before and after methotrexate therapy. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice.* 2016;54(2):155-63. (In Russ.)]. doi: 10.14412/1995-4484-2016-155-163
23. Tchetina EV, Poole AR, EM Zaitseva, 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.
24. Четина ЕВ, Демидова НВ, Каратеев ДЕ, Насонов ЕЛ. 2013. Анализ 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: 10.14412/1995-4484-2013-654-61
25. Liu D, Yuan N, Yu G, et al. Can rheumatoid arthritis ever cease to exist: a review of various therapeutic modalities to maintain drug-free remission? *Am J Transl Res.* 2017 Aug 15;9(8):3758-3775. eCollection 2017.
26. Felson D. Defining remission in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012 Apr;71 Suppl 2:i86-8. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200618.
27. Pelzek AJ, Grönwall C, Rosenthal P, et al. Persistence of Disease-Associated Anti-Citrullinated Protein Antibody-Expressing Memory B Cells in Rheumatoid Arthritis in

Clinical Remission. *Arthritis Rheumatol.* 2017 Jun;69(6):1176-1186. doi: 10.1002/art.40053. Epub 2017 May 3.
28. Tchetina EV, Markova GA. The clinical utility of gene expression examination in rheumatology. *Mediterranean J Rheumatol.* 2017;28(3):18-28.
29. Hohensinner PJ, Goronzy JJ, Weyand CM. Targets of immune regeneration in rheumatoid arthritis. *Mayo Clin Proc.* 2014 Apr; 89(4):563-75. doi: 10.1016/j.mayocp.2014.01.020.
30. Makrygiannakis D, Catrina AI. Apoptosis as a mechanism of action of tumor necrosis factor antagonists in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2012 Apr;39(4):679-85. doi: 10.3899/jrheum.110974. Epub 2012 Mar 15.
31. Knowlton N, Jiang K, Frank MB, et al. The meaning of clinical remission in polyarticular juvenile idiopathic arthritis: gene expression profiling in peripheral blood mononuclear cells identifies distinct disease states. *Arthritis Rheum.* 2009 Mar;60(3): 892-900. doi: 10.1002/art.24298.
32. Fu M, Wang C, Li Z, et al. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology.* 2004 Dec;145(12):5439-47. Epub 2004 Aug 26.
33. Sakamaki T, Casimiro MC, Ju X, et al. Cyclin D1 determines mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biol.* 2006 Jul;26(14):5449-69.
34. Lee Y, Dominy JE, Choi YJ, et al. Cyclin D1-Cdk4 controls glucose metabolism independently of cell cycle progression. *Nature.* 2014 Jun 26;510(7506):547-51. doi: 10.1038/nature13267. Epub 2014 May 25.
35. Tchakarska G, Roussel M, Troussard X, et al. Cyclin D1 inhibits mitochondrial activity in B cells. *Cancer Res.* 2011 Mar 1;71(5): 1690-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2564. Epub 2011 Feb 22.
36. Hydbring P, Malumbres M, Sicinski P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016 May;17(5):280-92. doi: 10.1038/nrm.2016.27. Epub 2016 Apr 1.

Поступила 20.03.2019

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.