

СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ И УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КАСПАЗ ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

© 2016 г. И. Е. Малышева¹, Л. В. Топчиева¹, О. Ю. Барышева², И. В. Курбатова¹,
О. А. Васькова², Н. Н. Везикова², И. М. Марусенко², член-корреспондент РАН Н. Н. Немова¹

Поступило 22.12.2015 г.

На фоне противовоспалительной терапии метотрексатом (МТ) содержание TNF α и IL6 в плазме крови больных ревматоидным артритом (РА) было достоверно ниже, чем у пациентов в дебюте заболевания без лечения. Показатели содержания транскриптов генов каспаз 6 и 9 в лимфоцитах периферической крови больных до и в процессе лечения МТ достоверно не различались, кроме показателя уровня экспрессии мРНК гена эффекторной каспазы 3, который был достоверно выше в клетках больных РА, находящихся на терапии МТ.

DOI: 10.7868/S0869565216180262

Процесс воспаления играет важную роль в развитии и прогрессии многих заболеваний, в том числе ревматоидного артрита (РА). Данная патология относится к хроническому иммуноопосредованному воспалительному заболеванию, в этиологии которого предположительно лежит ослабление программируемой клеточной смерти (апоптоз) и задержка элиминации апоптотических иммунокомпетентных клеток [1]. В роли индукторов воспаления выступают некоторые цитокины (провоспалительные цитокины), например, фактор некроза опухоли альфа (TNF α), интерлейкин 6 (IL6), интерлейкин 1 бета и С-реактивный белок. Эти белки также могут выступать в качестве модуляторов апоптоза, хотя их роль в этом процессе неоднозначна. Так, TNF α способен не только индуцировать, но и супрессировать апоптоз, например, через активацию транскрипционного фактора NF κ B и индуцируемых им генов, включая *TRAF1*, *TRAF2* и гены, кодирующие ингибиторы апоптоза [2]. Цитокин IL6 через STAT3-зависимый путь регулирует экспрессию антиапоптотического фактора Mcl-1L [3]. Однако его повышенная концентрация может вызвать образование активных форм кислорода, выступающих в качестве индукторов апоптоза, способствовать изменениям в составе липидов и их окисленным форм и, как следствие, приводить к атерогенезу [4]. Не исключено, что вышена-

званные провоспалительные белки регулируют экспрессию и активность протеолитических ферментов (каспаз), участвующих в апоптозе клеток. Как известно, активность каспаз повышается в ответ на определенные стимулы, индуцирующие апоптоз. Однако, что касается роли этих ферментов в патогенезе РА, то такого рода данные противоречивы [5–8]. Например, по данным некоторых авторов у больных РА наблюдаются более интенсивный апоптоз лимфоцитов периферической крови (ЛПК) и более высокая активность каспазы 8 [5]. По другим данным, уровни экспрессии гена каспазы 3 в ЛПК больных РА и здоровых доноров не различаются или значительно снижены [6–8]. Также до конца не ясна роль изменения уровня продукции про- и противовоспалительных цитокинов в модуляции экспрессии и активности указанных протеолитических ферментов [9–12].

В связи с этим целью настоящего исследования заключалась в определении содержания цитокинов (TNF α , IL6) в плазме крови и уровня экспрессии мРНК генов каспаз 3, 6 и 9 в ЛПК при РА.

Использовали образцы периферической крови, полученные от здоровых доноров (контроль), больных РА в дебюте заболевания (до лечения) и на фоне лечения базисным противовоспалительным препаратом – метотрексатом (МТ).

Содержание TNF α и IL6 в плазме крови определяли методом неконкурентного иммуоферментного анализа (ИФА) с использованием наборов фирмы “Вектор-Бест”, Россия. Выделение тотальной РНК из ЛПК проводили на колонках Axuprep Multisource Total RNA Miniprep Kit (“Axugen Scientific, Inc.”, США). Выделенную тоталь-

¹ Институт биологии
Карельского научного центра
Российской Академии наук, Петрозаводск
E-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

² Петрозаводский государственный университет

Таблица 1. Содержание цитокинов ($M \pm m$) в плазме крови у больных ревматоидным артритом и в контрольной группе

Показатель	Содержание цитокинов в плазме крови (пг/мл)		
	Контроль, $n = 25$	Больные РА до начала терапии, $n = 7$	Больные РА на фоне терапии МТ, $n = 25$
TNF α	3.84 \pm 0.41	7.12 \pm 0.95**	3.62 \pm 0.99
IL6	3.04 \pm 0.42	17.24 \pm 3.14*	8.89 \pm 1.34

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем, ** $p < 0.001$ по сравнению с контролем; n – число обследуемых лиц.

Таблица 2. Уровень экспрессии ($M \pm m$) мРНК генов каспаз 3, 6, 9 в ЛПК больных РА и контрольной группе здоровых доноров

Группа	CASP3	CASP6	CASP9
Контроль ($n = 28$)	0.055 \pm 0.007	0.005 \pm 0.001	0.019 \pm 0.002
Больные РА без лечения ($n = 14$)	0.048 \pm 0.004	0.005 \pm 0.001	0.023 \pm 0.005
Больные РА на фоне терапии МТ ($n = 27$)	0.092 \pm 0.013*	0.007 \pm 0.003	0.018 \pm 0.002

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем; n – число обследуемых лиц.

ную РНК обрабатывали ДНКазой (10 ед.). Синтез кДНК осуществляли с помощью набора MMLV RT kit (“Евроген”, Россия). Уровень экспрессии мРНК генов каспаз 3, 6, 9 оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе iCycler iQ5 (“Bio-Rad”, США). Для амплификации использовали наборы qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”). Последовательность праймеров, используемых для ПЦР-РВ, указана в работах [13, 14]. В качестве флуорофора для детекции продуктов был использован интеркалирующий краситель SYBR Green.

В результате проведенных исследований (табл. 1) было установлено, что концентрация TNF α и IL6 в плазме крови была статистически значимо выше у больных РА до лечения, чем в группе без клинических проявлений данного заболевания (контрольная группа). Уровни TNF α и IL6 в плазме крови больных РА, получавших МТ, были достоверно ниже, чем у пациентов без лечения.

У больных РА, не принимавших МТ, уровни транскриптов генов каспаз 3, 6 и 9 в ЛПК достоверно не отличались от таковых контрольной группы (табл. 2). Только содержание мРНК гена эффекторной каспазы 3 в ЛПК пациентов с РА,

получавших терапию МТ, был достоверно выше по сравнению с другими группами сравнения.

Для оценки влияния содержания провоспалительных цитокинов на уровень экспрессии генов каспаз мы использовали непараметрический однофакторный дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса, в результате которого мы выявили влияние концентрации TNF α на уровень экспрессии гена каспазы 3 у больных РА в дебюте заболевания ($H = 0.13, p = 0.043$). С помощью корреляционного анализа по Спирмену обнаружили статистически значимую отрицательную корреляцию между уровнем экспрессии мРНК гена каспазы 3 в ЛПК и содержанием TNF α в плазме крови больных РА ($r = -0.73, p = 0.0083$), т.е. чем выше уровень TNF α в плазме крови больных РА, тем ниже содержание транскриптов гена каспазы 3 в ЛПК.

Таким образом, мы обнаружили, что снижение уровня провоспалительных цитокинов в плазме крови с помощью МТ способствует повышению содержания транскриптов гена эффекторной каспазы 3 в ЛПК. Результаты, полученные в нашем исследовании, согласуются с данными других авторов. Например, в работе [12] показано, что в лимфоцитарной фракции периферической крови пациентов с РА, получающих терапию ритуксимабом (ингибитор TNF α), уровень экспрессии гена каспазы 3 и количество клеток, в которых наблюдаются признаки деградации, значительно выше, чем у пациентов, не принимающих этот препарат. Имеются и другие работы [10, 11], свидетельствующие о том, что противовоспалительные препараты способствуют увеличению активности эффекторной каспазы 3 и индуцируют апоптоз в некоторых типах клеток. Однако представленные в литературе данные о роли снижения уровня противовоспалительных цитокинов в активации апоптоза не так однозначны. Так, показано, что обработка клеток рекомбинантным TNF α в разной концентрации способствует увеличению клеток, в которых наблюдаются признаки апоптоза [15]. По данным Четиной и др. [9], в клетках периферической крови больных РА, получавших МТ, содержание транскриптов гена каспазы 3 существенно ниже, чем у пациентов без терапии, что противоречит полученным нами данным.

Известно, что активация каспазы 3 приводит к индукции апоптоза. В связи с этим можно предположить, что обнаруженный в нашем исследовании более высокий уровень транскриптов гена каспазы 3 в лимфоцитах крови больных РА, получавших терапию МТ, будет способствовать увеличению количества ЛПК, в которых наблюдаются признаки клеточной деградации. Поскольку при данном заболевании отмечено ослабление апоптоза, то можно ожидать, что повышение уровня экспрессии мРНК эффекторной каспазы 3, опосредованное снижением содержания провоспалительных

факторов, будет способствовать уменьшению воспалительных процессов в организме.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН в рамках Программы “Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера”.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось при поддержке гранта Правительства РФ № 11.G31.34.0052 и федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 0221–2014–0008).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Favaloro B., Allocati N., Graziano V., et al.* Role of Apoptosis in Disease // *Aging*. 2012. V. 4. № 5. P. 330–349.
2. *Papa S., Bubici C., Zazzeroni F., Franzoso G.* Mechanisms of Liver Disease: The Crosstalk between the NF- κ B and JNK Pathways // *Biol. Chem.* 2009. V. 390. № 10. P. 965–976.
3. *Gao B.* Hepatoprotective and Anti-Inflammatory Cytokines in Alcoholic Liver Disease // *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2012. V. 27. P. 89–93.
4. *Fernández-Real J.M., Broch M., Vendrell J., et al.* Interleukin 6 Gene Polymorphism and Lipid Abnormalities in Healthy Subjects // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000. V. 85. P. 1334–1339.
5. *Рябков В.А.* Апоптоз лимфоцитов при ревматоидном артрите. Автореф. дис. канд. мед. наук. Ярославль, 2007.
6. *Четина Е.В., Семенова Л.А., Логунов А.Л. и др.* Повышенная экспрессия регуляторных генов в крови и суставном хряще больных ревматоидным артритом // *Науч.-практ. ревматология*. 2012. Т. 53. № 4. С. 44–48.
7. *Малышева И.Е., Топчиева Л.В., Рахимбаева Н.У., Барышева О.Ю., Васькова О.А.* Экспрессия мРНК генов каспаз в лейкоцитах периферической крови при ревматоидном артрите. В сб.: *Современная медицина: традиции и инновации*. Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2013. С. 147–154.
8. *Yang J., Zhao S., Yang X., et al.* Inhibition of B-Cell Apoptosis Is Mediated through Increased Expression of Bcl-2 in Patients with Rheumatoid Arthritis // *Int. J. Rheum. Dis.* 2015. doi 10.1111/1756-185X.12706
9. *Четина Е.В., Демидова Н.В., Каратаев Д.Е., Насонов Е.Л.* Анализ экспрессии генов в крови как дополнительный инструмент мониторинга терапии метотрексатом больных ревматоидным артритом // *Науч.-практ. ревматология*. 2013. Т. 51. № 6. С. 654–661.
10. *Li R., Cai L., Xie X.-F., Peng L., Li J.* 3'-Dimethoxy Hesperetin Induces Apoptosis of Fibroblast-Like Synovocytes in Rats with Adjuvant Arthritis through Caspase 3 Activation // *Phytother. Res.* 2010. V. 24. P. 1850–1856.
11. *Lo S.Z., Steer J.H., Joyce D.A.* Tumor Necrosis Factor-Alpha Promotes Survival in Methotrexate-Exposed Macrophages by an NF- κ B-Dependent Pathway // *Arthr. Res. Therapy*. 2011. V. 13.:R24.
12. *Szodoray P., Alex P., Dandapani V., et al.* Apoptotic Effect of Rituximab on Peripheral Blood B Cells in Rheumatoid Arthritis // *Scan. J. Immunol.* 2004. V. 60. P. 209–218.
13. *Bozec A., Ruffion A., Decaussin M., et al.* Activation of Caspases-3, -6 and -9 during Finasteride Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005. V. 90. № 1. P. 17–25.
14. *Kolomeichuk S.N., Terrano D.T., Lyle C.S., Sabapathy K., Chambers T.C.* Distinct Signaling Pathways of Microtubule Inhibitors – Vinblastine and Taxol Induce JNK-Dependent Cell Death but through AP-1-Dependent and AP-1-Independent Mechanisms, Respectively // *FEBS J.* 2008. V. 275. № 8. P. 1889–1899.
15. *Чечина О.Е., Биктасова А.К., Сазонова Е.В. и др.* Роль цитокинов в редокс-зависимой регуляции апоптоза // *Бюл. сиб. медицины*. 2009. № 2. С. 67–72.