

# Апоптоз как фактор организации аутоиммунного воспаления при ревматоидном артрите

Дубиков А.И.<sup>1</sup>, Калининченко С.Г.<sup>2</sup>, Матвеева Н.Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Клиника ревматологии профессора Дубикова А.И., Владивосток, Россия; <sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Владивосток, Россия

<sup>1</sup>690080, Владивосток, бухта Патрокл, ул. Басаргина, 42В; <sup>2</sup>690002, Владивосток, просп. Острякова, 2

В статье суммированы данные литературы и собственных исследований авторов о молекулярно-клеточных механизмах апоптоза и их состоянии при ревматоидном артрите (РА). Нарушения процессов апоптоза при РА являются одной из причин гиперактивации синовиальных клеток, ведущей к усилению воспалительного процесса, гиперплазии синовиальной оболочки и прогрессированию заболевания в целом. Важнейшая особенность клеточного континуума пораженной синовиальной оболочки — сосуществование сразу двух механизмов контроля апоптоза: традиционного активационного, приводящего к прогрессированию воспаления и деструкции сустава, и ингибиторного, реализуемого через экспрессию проапоптотических молекул. Факторы апоптоза являются полезным инструментом для оценки прогноза РА и перспективной мишенью для фармакотерапии.

**Ключевые слова:** хронические ревматические заболевания; механизмы апоптоза; p53; Bcl-2; Mdm2; PUMA; каспазы; фармакотерапия.

**Контакты:** Александр Иванович Дубиков; [turch@rambler.ru](mailto:turch@rambler.ru)

**Для ссылки:** Дубиков АИ, Калининченко СГ, Матвеева НЮ. Апоптоз как фактор организации аутоиммунного воспаления при ревматоидном артрите. Современная ревматология. 2019;13(3):95–101.

## *Apoptosis as a factor for organizing autoimmune inflammation in rheumatoid arthritis*

*Dubikov A.I.<sup>1</sup>, Kalinichenko S.G.<sup>2</sup>, Matveeva N.Yu.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Professor A.I. Dubikov Clinic of Rheumatology, Vladivostok, Russia; <sup>2</sup>Pacific State Medical University, Ministry of Health of Russia, Vladivostok, Russia

<sup>1</sup>42B, Basargin St., Patroclus Bay, Vladivostok 690080; <sup>2</sup>2, Ostryakov Pros., Vladivostok 690002

The paper summarizes the data available in the literature and those from the authors' studies on the molecular and cellular mechanisms of apoptosis and their state in rheumatoid arthritis (RA). Impaired apoptotic processes in RA are one of the causes of synovial cell hyperactivation that leads to the increased inflammatory process, synovial hyperplasia, and progression of the disease as a whole. The most important feature of a cellular continuum in the affected synovial fluid is the coexistence of just two mechanisms that control apoptosis: 1) a traditional activation mechanism leading to progressive joint inflammation and destruction and 2) an inhibitory mechanism implemented through the expression of proapoptotic molecules. The apoptotic factors are a useful tool for assessing the prognosis of RA and a promising target for pharmacotherapy.

**Keywords:** chronic rheumatic diseases; mechanisms of apoptosis; p53; Bcl-2; Mdm2; PUMA; caspases; pharmacotherapy.

**Contact:** Aleksandr Ivanovich Dubikov; [turch@rambler.ru](mailto:turch@rambler.ru)

**For reference:** Dubikov AI, Kalinichenko SG, Matveeva NYu. Apoptosis as a factor for organizing autoimmune inflammation in rheumatoid arthritis. *Sovremennaya Revmatologiya=Modern Rheumatology Journal*. 2019;13(3):95–101.

**DOI:** 10.14412/1996-7012-2019-3-95-101

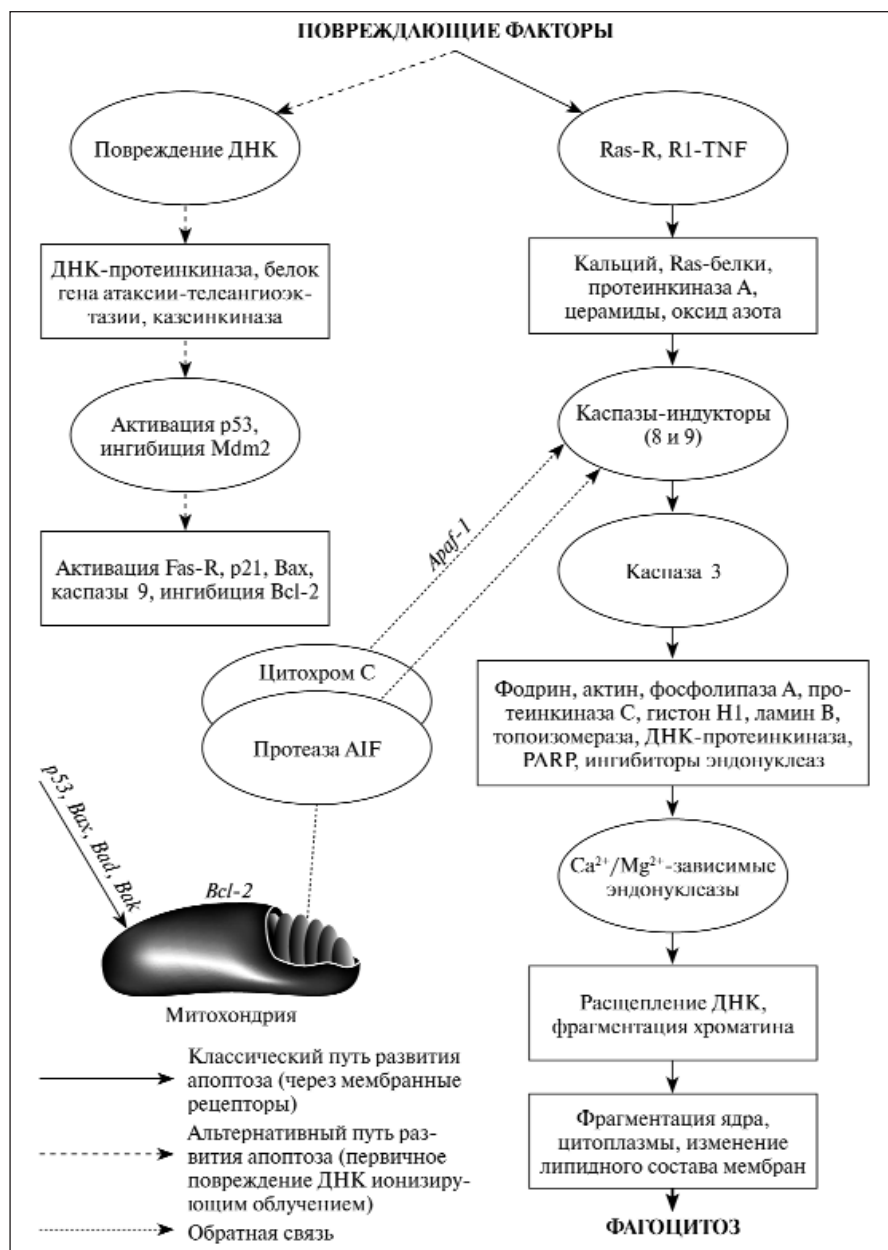
Первоначальные представления об апоптозе как основном механизме, регулирующем численность клеточных популяций и объем тканей, в настоящее время оформились в концепцию о патологических формах апоптоза, образующих основное патогенетическое звено хронического воспаления и пролиферативного компонента аутоиммунных заболеваний [1–4]. Включение факторов апоптоза в развитие ревматоидного артрита (РА) и коморбидной патологии показано в большинстве исследований, проведенных на материале тканей суставов человека и на моделях адьювантного артрита [5–7].

Опухолеподобная пролиферация синовиоцитов играет существенную роль в прогрессировании воспаления, а неадекватный апоптоз синовиальных фибробластов вносит весомый вклад в патоморфоз РА [8, 9]. Не исключено, что ин-

дукция апоптоза этих клеток — резонная инновационная стратегия в лечении РА [10]. Именно этим определяется перспективность дальнейшего и более детального изучения роли малых молекул p53, Mdm2, PUMA, p21 в патогенезе РА.

### **Феномен апоптоза и механизмы его регуляции**

Апоптоз характеризуется значимыми изменениями ядра и цитоплазмы, которые постепенно нарастают и зависят от стадии процесса. Видимым показателем начальной (сигнальной) стадии апоптоза можно считать уплотнение гиалоплазмы и образование различных цитоплазматических выпячиваний. При этом рибосомы объединяются в кристаллоидные структуры, а эндоплазматический ретикулум вакуолизируется. При запуске эффекторной стадии апопто-



**Рис. 1.** Этапы развития апоптоза. Индукция апоптоза повышает уровни цитозольного кальция, RAS-белков, протеинкиназы А, церамидазы и сфингомиелиназы. Каспазы-индукторы 8 и 9 активируют каспазу 3. Под влиянием каспазы 3 в апоптоз включаются цитоплазматические белки (фодрин, актин), ферменты (фосфолипаза А, протеинкиназа С), ядерные белки (гистон H1 и ламин В), ферменты репликации и репарации (топоизомеразы, ДНК-протеинкиназы, PARP), ингибиторы эндонуклеаз. Белок p53 инактивирует гены протеинов семейства Bcl-2 и активирует гены белков семейства Вах. Последние перемещаются к мембране митохондрий и образуют комплексы с Bcl-2. Происходит деблокирование каналов, и через открытые поры цитохром С и протеаза АIF выходят в цитозоль. Цитохром С через апоптоз-активирующий фактор (Апоф-1), а протеаза АIF напрямую активируют каспазу 9. В действие вступает Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-зависимая эндонуклеаза и процесс перемещается в ядро, где начинается фрагментация хроматина. Затем формируются апоптотные тельца, которые фагоцитируются макрофагами.

тельца. Апоптоз завершается фагоцитозом телец с помощью макрофагов [11, 12].

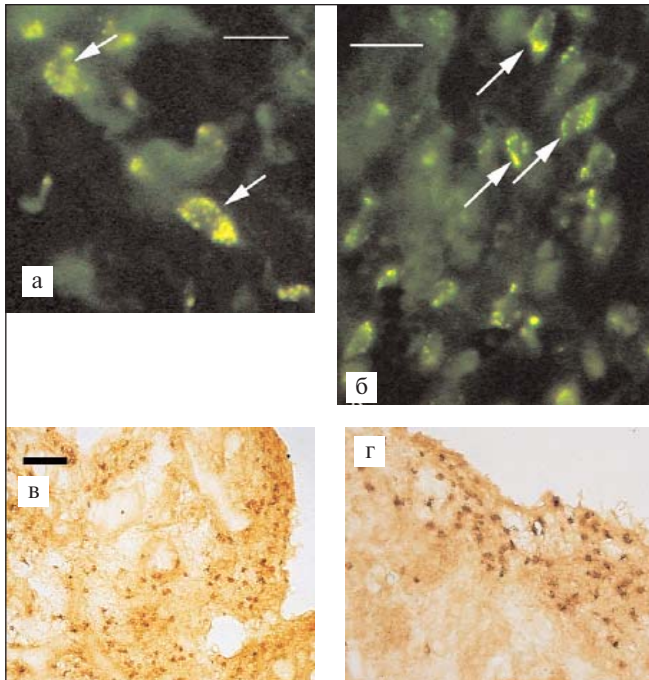
Каждая стадия программированной гибели клеток контролируется последовательным включением специфических про- и антиапоптотических факторов (рис. 1). Чаще всего процесс начинается с возбуждения мембранных «рецепторов смерти» (FasR, TNFR1, CAR1, DR3, DR4, DR5), которые стимулируют накопление проапоптотических индукторов семейства белка Bcl-2 [12, 13]. Эти белки можно разделить на три группы. Антиапоптотическая группа, содержащая четыре BH-домена, включает Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, Bcl-2A1 и Bcl-B [13]. К проапоптотическим белкам относят Вах, Вак и Вок, у которых отсутствует домен BH4. Белки третьей группы – Bik, Hrk, Vim, Bad, Bid, PUMA, NOXA и Bmf – имеют только домен BH3 и могут быть как активаторами, так и ингибиторами апоптоза [14]. Про- и антиапоптотические белки семейства Bcl-2 связываются друг с другом и формируют гомо- или гетеродимерные комплексы.

Большая часть белка Bcl-2 своими гидрофобными основаниями прикрепляется к наружной мембране митохондрий в местах сближения внутренней и наружной мембран и закрывает поры, препятствуя выходу проапоптотических макромолекул. Белки Вах, Вад или Вак, образуя комплексы, встраиваются в наружную мембрану митохондрий и формируют временные крупные мегаканалы, через которые освобождаются протеаза АIF (apoptosis inducing factor) и цитохром С [15]. Цитохром С связывается с цитоплазматическим адаптером Апоф-1 (apoptotic protease activating factor-1) и в комплексе с ним активирует каспазу 9 и каспазу 3.

Каспазы (цистеин-зависимые эндопротеазы) первоначально синтезируются как зимогены – мономеры с низкой или нулевой активностью [12, 16, 17]. После активации они гомодимеризуются. Различное участие каспаз в организации клеточной гибели позволяет разделить их на три основные группы [17]: а) индукторы апоптоза (каспазы 8 и 9); б) эффекторы апоптоза (каспазы 3, 6 и 7); в) провоспалительные каспазы (каспазы 1, 4, 5, 11 и 12L).

за отмечаются глубокие нарушения структуры митохондрий. Финальная (деструктивная) стадия сопровождается конденсацией хроматина, фрагментацией ядра и распадом клетки на окаймленные плотные фрагменты – апоптотные

Процесс активации ферментов начинается с включения каспаз 8 и/или 9, а их последующие формы последовательно активируются самопроизвольно, по принципу домино. Каспаза-2 может быть как индуктором, так и эффектором и



**Рис. 2.** Апоптотические синовиоциты и молекулярные факторы апоптоза в синовиальной оболочке коленного сустава при РА: а – TUNEL-иммунореактивные ядра (стрелки) в периваскулярном инфильтрате на ранней стадии РА; б – массивный апоптоз фибробластоподобных клеток в стромальном слое синовиальной оболочки на поздней стадии РА (стрелки); в – bcl-2-позитивные клетки в поверхностном слое синовиальной оболочки при раннем РА; г – локализация p53 в синовиальной оболочке при позднем РА. Масштаб: а, б – 25 мкм; в, г – 150 мкм

является мишенью для каспаз 3 и 8, которые также запускают высвобождение цитохрома С [16, 18].

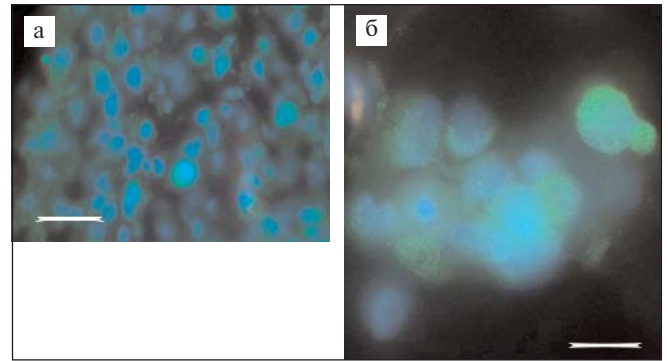
Последовательная активация каспазного каскада завершается включением  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ -зависимой эндонуклеазы (SPAN/DFF40). Последняя катализирует разрыв линкерных участков ДНК, фрагментацию ядра и конечное образование апоптотических тел [19].

В индукции митохондриального пути апоптоза важная роль принадлежит белку p53 [20], который в покоящейся клетке содержится в ничтожно малых количествах, а время его жизни не превышает 2 ч. Низкий уровень поддерживается также благодаря взаимодействию с белком Mdm2, получившим название по месту локализации его гена в малой двойной хромосоме 2 мыши (murine double minute 2). Связывание с белком Mdm2 способствует протеолитическому расщеплению p53 [21, 22]. Активация белка стимулирует экспрессию Bax, NOXA, PUMA и одновременно подавляет белки-ингибиторы апоптоза Bcl-2, Bcl-xL [23].

Таким образом, распространенность и клеточная специфичность апоптоза представляют собой совокупность разноплановых влияний проапоптотических (p53, PUMA) и антиапоптотических (Mdm2) факторов. Их баланс определяет остроту пролиферативных процессов и формирует важное звено цитотоксических и цитопротективных эффектов в фокусе хронического воспаления.

#### Факторы апоптоза в патогенезе РА

РА – хроническое воспалительное заболевание, характеризующееся гиперплазией синовиальной ткани и ее инва-

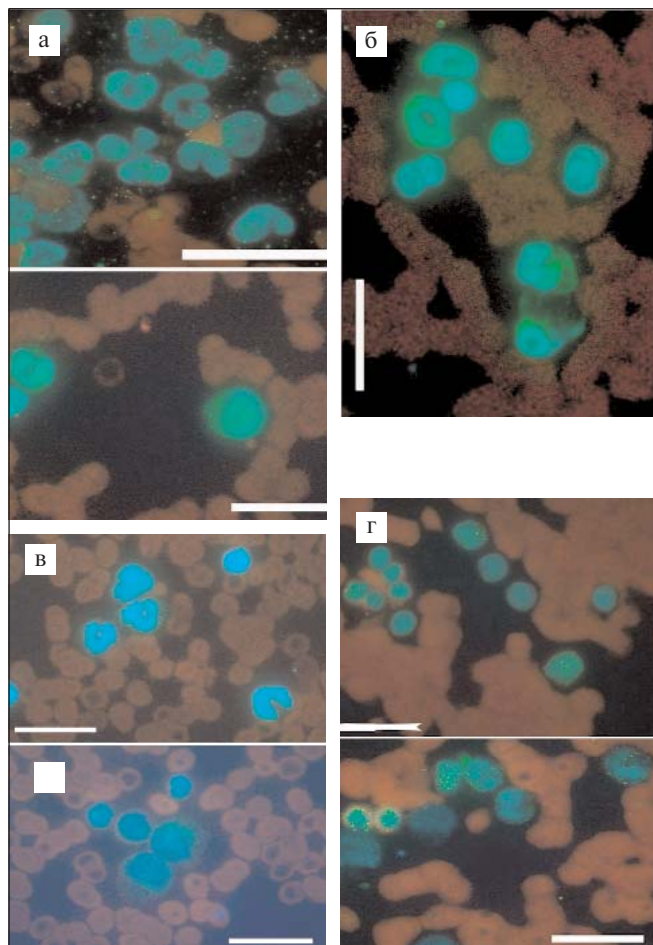


**Рис. 3.** Экспрессия p21 (а) и Mdm2 (б) в синовиоцитах на поздней стадии РА (зеленая флюоресценция). Ядра докрашены DAPI (синяя флюоресценция). Масштаб: 25 мкм

зией в хрящ и кость с последующей их деструкцией [23, 24]. Данные изменения являются следствием дисбаланса между пролиферацией клеток внутреннего слоя синовиальной оболочки – синовиальных макрофагов и фибробластов – и их апоптозом [5, 24]. В основном апоптоз клеток синовиальной оболочки касается А-клеток (макрофагов) и в значительно меньшей степени – В-клеток (фибробластов) [5].

Установлено, что распространенность апоптоза коррелирует с длительностью и выраженностью воспалительной инфильтрации синовиальной оболочки [25, 26]. Обычно на ранней стадии развития РА наблюдается угнетение механизмов апоптоза, а на поздней, – напротив, их активация [3, 5, 27–29]. Этот паттерн постоянно обнаруживается в клетках синовиальных оболочек (рис 2, а–г; 3, а, б) и красного костного мозга (рис. 4, а–г) у человека и в экспериментальных моделях РА при прямой идентификации апоптотических ядер с помощью метода TUNEL и при исследовании экспрессии p53, PUMA, p21 и Mdm2. Морфологический профиль апоптотических структур смещен в сторону фибробластов гипертрофированной синовиальной оболочки [5]. Обращает на себя внимание высокий апоптотический индекс хондроцитов. Очевидно, этот феномен может быть расценен как субстрат вторичного дегенеративного процесса в хряще с исходом в остеоартрит [30].

При тщательном анализе описанных изменений в костном мозге и синовиальной оболочке обнаруживается одновременное и однонаправленное регулирование механизмов клеточной смерти в миелоцитах и синовиоцитах, что указывает на системное нарушение механизмов апоптоза при РА [31]. Выявленная тенденция позволяет оценивать состояние апоптоза в клетках синовиальной оболочки у больных РА по уровню экспрессии этих факторов в клетках костного мозга. Экстраполяция этих данных дает возможность определять изменения в клетках синовиальной оболочки на любой стадии заболевания без внедрения в полость сустава. Образцы ткани синовиальной оболочки получают, как правило, при рецидивирующем артрите во время артроскопии или артротомии крупных суставов. Хирургическое вмешательство сопровождается анестезиологическим пособием и требует реабилитационного периода, что иногда ухудшает качество жизни пациента. Однако на ранних стадиях РА наблюдается преимущественное поражение мелких суставов кистей и стоп, нарушения в крупных суставах встречаются гораздо реже. Наиболее простым методом получения красного костного мозга является стерильная пункция, которая проводится без ане-



**Рис. 4.** Экспрессия регуляторов апоптоза в красном костном мозге на ранней стадии РА (зеленая флюоресценция). Ядра докрашены DAPI (синяя флюоресценция): а – p53-иммунореактивные клетки; б – PUMA-иммунореактивные клетки; в – p21-иммунореактивные клетки; г – Mdm2-иммунореактивные клетки. Масштаб: 20 мкм

стезии, при этом нет необходимости в динамическом наблюдении и длительном реабилитационном периоде и имеется гораздо меньше противопоказаний, чем при артроскопии. Таким образом, стерильная пункция с последующим исследованием костного мозга – эффективный метод системной оценки апоптоза у больных РА [32].

При сравнении количества Mdm2-позитивных клеток в образцах костного мозга и синовиальной оболочки (56,7 и 85,4% соответственно) складывается впечатление, что угнетение механизмов апоптоза в клетках синовиальной оболочки более интенсивное, чем в красном костном мозге. Весьма значительное присутствие молекул белка Mdm2 на ранней стадии не исключает того, что этот механизм угнетения апоптоза пролиферирующих клеток синовиальной оболочки является основным при РА [33].

Почему же механизмы активации проапоптотического p53-опосредованного пути оказываются неэффективными на ранней стадии РА? Многие авторы обсуждают роль лизинового остатка, расположенного в концевом сегменте С-окончания, в активации белка p53 [6, 34]. Первый, K120 (лизин 120), ацетируется в ответ на повреждение ДНК и увеличивает экспрессию гена белка PUMA, но не гена бел-

ка Mdm2 [35, 36]. Второй сайт ацетилирования, K164, модифицируется соактиватором транскрипции p300 и СВР (CREB-binding protein) и, очевидно, является необходимым для индукции экспрессии большинства целевых генов белка p53 [23]. В случае мутации всех шести лизинового остатков концевой сегмента С-окончания молекулы p53 в сочетании с мутацией K120 и K164 появляется новый протеин (p538KR), по сути инертный. Эта мутантная форма протеина утрачивает транскрипционную активность, необходимую для стимуляции экспрессии большого количества целевых генов, включая гены, кодирующие p21, PUMA, Вах и PIG3 (p53-inducible gene 3) [36, 37]. Mdm2-промоутер является существенным исключением: экспрессия Mdm2 индуцируется белком p538KR аналогично обычному белку p53 и обеспечивает антиапоптотический эффект.

Полученные нами результаты позволяют предполагать, что на ранней стадии РА происходит мутация белка p53, ведущая к тотальному угнетению основных механизмов апоптоза, реализуемых белками PUMA, p21 [38, 39]. Эта мутация, вероятно, не влияет на активность молекулы Mdm2, которую можно рассматривать в качестве перспективной мишени для разработки новых лекарственных препаратов, повышающих интенсивность апоптоза синовиальных клеток на ранней стадии РА. Перспектива регуляции активности белка p53 в случае его мутации невысока.

Другую потенциальную мишень для активации апоптоза синовиоцитов представляет белок PUMA. На всех стадиях РА у белка PUMA обнаруживается наименьший уровень экспрессии среди всех проапоптотических молекул [38]. Кроме того, количество клеток, экспрессирующих PUMA в красном костном мозге на поздней стадии РА, не превышает количества Mdm2-позитивных клеток, что указывает на угнетение митохондриального PUMA-опосредованного пути апоптоза в клетках красного костного мозга [38]. В синовиальной оболочке, однако, наблюдается прямо противоположная тенденция. Уровень экспрессии белка PUMA здесь наибольший и не зависит от стадии РА. Весьма значительное присутствие молекул белка PUMA на ранней стадии РА в синовиоцитах не исключает, что митохондриальный путь апоптоза пролиферирующих клеток синовиальной оболочки является основным при развитии РА [31].

#### Факторы апоптоза как маркеры гемопэтического статуса у больных РА

Механизмы апоптоза как системного феномена у больных РА вовлекаются не только в формирование структурных изменений тканей суставов. Они ведут также к альтерации костного мозга, анемии, тромбоцитопении, нейтропении и тромбоцитозу [30, 31].

Известно, что у 30–60% больных РА развивается анемия [31, 40], которая коррелирует с активностью заболевания. Анализ клеточного состава костного мозга показывает более высокий уровень апоптоза клеток эритроцитарного ростка [40]. Известно, что интерферон  $\beta$  способен индуцировать апоптоз клеток-предшественников эритроцитов и лимфоцитов [41].

Н.А. Papadaki и соавт. [42] исследовали роль фактора некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ) в эритропоэзе у пациентов с активным РА. Пациенты с РА имели меньшее количество клеток с иммунофенотипами CD34+/CD71+ и CD36-/glycophorin A+ (glycoA+) в костном мозге и большее количество

во апоптотических клеток с иммунофенотипами CD34+/CD71+ и CD36+/glycoA+, по сравнению с контрольной группой. Уровень бурсто-образующих единиц эритроцитов (БОЕ-Э), дающих начало эритробластам, полученных из костного мозга пациентов с РА, также был снижен при сравнении с контрольной группой. Эти нарушения наиболее выражены у пациентов с РА и анемией. Увеличение уровней ФНО $\alpha$  оказалось обратно пропорциональным уровням БОЕ-Э и гемоглобина и прямо пропорциональным проценту апоптотических клеток с иммунофенотипами CD34+/CD71+ и CD36+/glycoA+. Лечение больных моноклональными антителами к ФНО $\alpha$  приводило к увеличению количества клеток с иммунофенотипами CD34+/CD71+ и CD36-/glycoA+, БОЕ-Э и снижению количества апоптотических клеток с иммунофенотипами CD34+/CD71+ и CD36+/glycoA+, что ассоциировалось с увеличением уровня гемоглобина по сравнению с исходными. Авторы исследования пришли к выводу, что причиной анемии у больных РА является опосредованная ФНО $\alpha$  апоптотическая деплеция эритроидных клеток. Отметим, что при иммуногистохимическом исследовании эритроцитарного звена гемопоэза мы не смогли идентифицировать p53-, p21-, PUMA- или Mdm2-позитивные клетки. Возможно, данный факт указывает на существование других путей апоптоза, не связанных с малыми молекулами, которые регулируют эритропоэз на разных стадиях РА.

РА часто сопровождается нейтропенией [41, 43]. Нейтрофилы в больших количествах обнаруживаются в синовиальной ткани и синовиальной жидкости пораженных суставов. Они обладают значительным потенциалом влияния на воспалительный процесс, повреждающий кость, хрящ и периастикулярные ткани, за счет секреции протеаз, активных форм кислорода, цитокинов, хемокинов, простагландинов и лейкотриенов [43].

Нейтропения при РА обусловлена выработкой антинейтрофильных антител, которые при образовании иммунных комплексов способны индуцировать апоптоз [44]. Нейтрофилы связываются с иммунными комплексами посредством Fc-рецепторов и особенно с FcR $\gamma$ -II (CD32) — ключевым фактором апоптоза нейтрофилов. Апоптоз, индуцированный преципитированными иммунными комплексами, не зависит от классического Fas/Fas-L-пути, но определяется промежуточными продуктами перекисного окисления [44]. В этом случае угнетаются колониестимулирующие факторы и усиливается нейтропения.

#### Значение факторов апоптоза для оценки прогноза РА

Состояние про- и антиапоптотических молекул в клетках костного мозга и синовиальной оболочки на разных стадиях РА позволяет установить взаимосвязь апоптоза и системных изменений опорно-двигательного аппарата [45, 46]. Нам удалось выявить параллелизм между экспрессией p53, p21, PUMA, Mdm2 и активностью артрита, структурными изменениями суставов и иммунологическими маркерами РА.

Так, на ранней стадии РА обнаруживается ассоциация между индексом HAQ, находящимся в диапазоне 1,0–1,9, и экспрессией PUMA (+0,73), что может служить предиктором ухудшения качества жизни и нарастания активности заболевания [31].

Несмотря на тотальное угнетение путей апоптоза на ранней стадии РА, именно с проапоптотическими молеку-

лами прослеживаются сильные достоверные корреляции [47]. Выявлена ассоциация между молекулами p53 (+0,85), PUMA (+0,76) и высокой активностью РА по DAS28. Поэтому белки p53 и PUMA у больных с ранней стадией РА могут быть предикторами высокой активности заболевания [32].

К начальным рентгенологическим признакам РА относят периастикулярное утолщение и уплотнение мягких тканей и околоуставной остеопороз, что соответствует I стадии по Штейнброкеру. Обнаруженная нами сильная связь между ранними структурными изменениями суставов и проапоптотическими молекулами p53 (+0,83) и PUMA (+0,94) указывает на прямую зависимость между количеством клеток, экспрессирующих данные белки, и рентгенологическим прогрессированием РА [8]. Таким образом, повышение экспрессии p53 и PUMA можно рассматривать и в качестве предиктора прогрессирования структурных нарушений в суставах.

Исходя из утверждения об активации механизмов апоптоза на поздней стадии РА, наличие прямой связи между ведущим проапоптотическим фактором p53 и неэрозивным вариантом артрита (+0,8), а также эрозивным вариантом и антиапоптотической молекулой Mdm2 (+0,7) можно считать закономерным. Неэрозивная форма РА является более благоприятным вариантом течения артрита. Установлено, что предотвращение структурных повреждений в дебюте РА способствует сохранению функциональной активности пациентов в долговременной перспективе [48, 49]. Поэтому определение интенсивности экспрессии молекулы p53 на ранних стадиях РА может быть полезным для прогноза медленной деструкции суставов и сохранения высокого качества жизни пациентов. Однако нам не удалось выявить достоверную связь между экспрессией p53 и эрозивным вариантом РА на ранней стадии [33].

На ранней стадии РА обычно превалирует активность антиапоптотической молекулы Mdm2 [50, 51]. Однако эта активность может меняться на фоне специфической фармакотерапии.

Приводим собственное наблюдение вариантов экспрессии про- и антиапоптотических факторов у пациентки с РА в процессе лечения.

*Пациентка П., 1948 года рождения, с 1980 г. наблюдается по поводу РА: эрозивный вариант, серопозитивный по IgM-ревматоидному фактору (РФ) и антителам к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП), с внесуставными проявлениями (ревматоидные узелки). В 2009 г. больной было проведено эндопротезирование обоих коленных суставов в связи с вторичным остеоартритом коленных суставов IV стадии. На момент взятия костного мозга в рамках нашего исследования DAS28 соответствовал умеренной активности, индекс качества жизни HAQ составлял 0,75, рентгенологические изменения в суставах достигали IV стадии по Штейнброкеру, содержание РФ — 401 МЕ/мл, АЦЦП — 132,9 МЕ/мл. В течение всего времени болезни пациентка получала базисные противовоспалительные препараты: гидроксихлорохин 250 мг 1 раз в день (с октября 1980 г. по ноябрь 1990 г.), к которому был добавлен метотрексат в начальной дозе 15 мг 1 раз в неделю внутримышечно (с апреля 1990 г. по июнь 2002 г.) с постепенным повышением дозы до 30 мг. В 2003 г. препарат был отменен из-за плохой переносимости. В 2004 г. было принято решение о назначении генно-инженер-*

ного биологического препарата. На момент взятия ткани костного мозга больной было проведено два курса анти-В-клеточной терапии ритуксимабом по 2000 мг в течение года с хорошим клиническим эффектом.

При иммуногистохимическом исследовании костного мозга количество p53-, PUMA-, p21- и Mdm2-позитивных клеток составило 16,7; 46,2; 66,7 и 0% соответственно. Численное превосходство клеток, экспрессирующих проапоптотические молекулы на поздней стадии РА, можно расценивать как закономерное явление, сопровождающееся снижением активности антиапоптотических механизмов. Однако интересен факт полного угнетения антиапоптотического фактора Mdm2 на фоне гиперэкспрессии p21 и незначительной выработки основной проапоптотической молекулы p53, активность которой в этой ситуации должна быть доминирующей [32]. Этот пара-

докс, очевидно, объясняется проведенной ранее фармакотерапией (ритуксимаб). Прием нестероидных противовоспалительных препаратов вряд ли мог послужить причиной подобных изменений [31]. Скорее всего, активатором апоптоза здесь стало введение ритуксимаба, который активировал p21-зависимые механизмы старения клеток [52–54].

Таким образом, активность процессов апоптоза при РА имеет определенную стадийность и закономерности, которые доказывают их полноценное присутствие в патофизиологии РА. Более важно то, что выявленные особенности экспрессии про- и антиапоптотических молекул на ранней и поздней стадиях РА позволяют предложить обоснованную стратегию лечения, мишенями которой могут стать молекула Mdm2 и факторы стимуляции PUMA- и p21-опосредованных механизмов программированной клеточной смерти.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Матвеева НЮ, Матвеев ЮА, Калининченко СГ, и др. Значение апоптоза энтероцитов при воспалительных заболеваниях кишечника. Бюллетень сибирской медицины. 2018;17(1):121-30. [Matveeva NYu, Matveev YuA, Kalinichenko SG, et al. The value of enterocyte apoptosis in inflammatory bowel diseases. *Byulleten' Sibirskoi Meditsiny*. 2018;17(1):121-30. (In Russ.)].
2. Каминский ЮВ, Матвеев ЮА, Матвеева НЮ. Склеродермическая энцефалопатия. Тихоокеанский медицинский журнал. 2016;(2):108-12. [Kaminskiy YuV, Matveev YuA, Matveeva NYu. Scleroderma encephalopathy. *Tikhookeanskii Meditsinskii Zhurnal*. 2016;(2):108-12. (In Russ.)].
3. Malemud CJ, Pearlman E. Targeting JAK/STAT signaling pathway in inflammatory diseases. *Curr Signal Transduct Ther*. 2009;(4):201-21.
4. Jiao Y, Ding H, Huang S, et al. Bcl-XL and Mcl-1 upregulation by calreticulin promotes apoptosis resistance of fibroblast-like synoviocytes via activation of PI3K/Akt and STAT3 pathways in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2018 Sep-Oct;36(5):841-849. Epub 2018 Apr 13.
5. Dubikov AI, Kalinichenko SG. Small molecules regulating apoptosis in the synovium in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2010;39(5):368-72. doi: 10.3109/03009741003742771.
6. Korb A, PavenstKdt H, Pap T. Cell death in rheumatoid arthritis. *Apoptosis*. 2009 Apr;14(4):447-54. doi: 10.1007/s10495-009-0317-y.
7. Wei XJ, Li XW, Lu JL, et al. MiR-20a regulates fibroblast-like synovioocyte proliferation and apoptosis in rheumatoid arthritis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017 Oct;21(17):3886-3893.
8. Дубиков АИ, Белоголовых ЛА, Медведь ЕЭ. Апоптоз как механизм развития аутоиммунного воспаления в коленном суставе человека. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004;(12):641-4. [Dubikov AI, Belogolovkykh LA, Medved' EE. Apoptoz kak mekhanizm razvitiya autoimmunnogo vospaleniya v kolennom sustave cheloveka. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*. 2004;(12):641-4. (In Russ.)].
9. Wylie MA, Malemud CJ. Perspective: Deregulation of apoptosis in arthritis by altered signal transduction. *Int J Clin Rheumatol*. 2013;(8):483-90.
10. Vomero M, Manganelli V, Barbati C, et al. Reduction of autophagy and increase in apoptosis correlates with a favorable clinical outcome in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF drugs. *Arthritis Res Ther*. 2019 Jan 29;21(1):39. doi: 10.1186/s13075-019-1818-x.
11. Калининченко СГ, Матвеева НЮ. Морфологическая характеристика апоптоза и его значение в нейрогенезе. Морфология. 2007;(2):16-28. [Kalinichenko SG, Matveeva NYu. Morphological characteristics of apoptosis and its significance in neurogenesis. *Morfologiya*. 2007;(2):16-28. (In Russ.)].
12. Grilo AL, Mantalaris A. Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnol Adv*. 2019 May-Jun;37(3):459-475. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.02.012. Epub 2019 Feb 20.
13. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Mar;9(3):231-41.
14. Hutcheson J, Perlman H. Apoptotic regulators and RA. *Curr Rheum Rev*. 2008;(4):254-8.
15. Birbes H, El Bawab S, Obeid LM, Hannun YA. Mitochondria and ceramide: intertwined roles in regulation of apoptosis. *Adv Enzyme Regul*. 2002;42:113-29.
16. Fussenegger M, Bailey JE, Varner J. A mathematical model of caspase function in apoptosis. *Nat Biotechnol*. 2000 Jul;18(7):768-74.
17. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Apr 1;7(4). pii: a026716. doi: 10.1101/cshperspect.a026716.
18. Fava LL, Bock FJ. Caspase-2 at a Glance. *J Cell Sci*. 2012 Dec 15;125(Pt 24):5911-5. doi: 10.1242/jcs.115105.
19. Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD, Souers AJ. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2017 Apr;16(4):273-284. doi: 10.1038/nrd.2016.253. Epub 2017 Feb 17.
20. Yamanishi Y, Boyle DL, Pinkoski MJ, et al. Regulation of joint destruction and inflammation by p53 in collagen-induced arthritis. *Am J Pathol*. 2002 Jan;160(1):123-30.
21. Taranto E, Xue JR, Lacey D, et al. Detection of the p53 regulator murine double-minute protein 2 in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2005 Mar;32(3):424-9.
22. Tang Y, Zhao W, Chen Y, et al. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell*. 2008 May 16;133(4):612-26. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.025.
23. You X, Boyle DL, Hammaker D, Firestein GS. PUMA-mediated apoptosis in fibroblast-like synoviocytes does not require p53. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(6):R157.
24. Cha HS, Bae EK, Ahn JK, et al. Slug suppression induces apoptosis via Puma transactivation in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes treated with hydrogen peroxide. *Exp Mol Med*. 2010 Jun 30;42(6):428-36.
25. Firestein GS, Echeverri F, Yeo M, et al. Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 30;94(20):10895-900.
26. Tong WW, Zhang C, Hong T, et al. Silibinin alleviates inflammation and induces apoptosis in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and has a therapeutic effect on arthritis in rats. *Sci Rep*. 2018 Feb 19;8(1):3241. doi: 10.1038/s41598-018-21674-6.
27. Malemud CJ. The PI3K/Akt/PTEN/mTOR pathway: a fruitful target for inducing cell death in rheumatoid arthritis? *Future Med Chem*. 2015;7(9):1137-47. doi: 10.4155/fmc.15.55.
28. Boyle DL, Soma K, Hodge J, et al. The JAK inhibitor tofacitinib suppresses synovial JAK1-STAT signalling in rheumatoid

## О Б З О Р Ы

- arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015 Jun;74(6):1311-6. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206028. Epub 2014 Nov 14.
29. Hutcheson J, Perlman H. BH3-only proteins in rheumatoid arthritis: potential targets for therapeutic intervention. *Oncogene*. 2008 Dec;27 Suppl 1:S168-75. doi: 10.1038/onc.2009.54.
30. Дубиков АИ. Ревматоидный артрит, апоптоз, оксид азота: новые аспекты патогенеза: монография. Владивосток: Издательство Дальневосточного университета; 2004. 132 с. [Dubikov AI. *Revmatoidnyi artrit, apoptoz, oksid azota: novye aspekty patogeneza: Monografiya* [Rheumatoid arthritis, apoptosis, nitric oxide: new aspects of pathogenesis: Monograph]. Vladivostok: Izdatel'stvo Dal'nevostochnogo universiteta; 2004. 132 p.]
31. Дубиков АИ, Белоголовых ЛА, Медведь ЕЭ. Роль апоптоза в патогенезе ревматоидного артрита и остеоартроза. *Научно-практическая ревматология*. 2005;43(1):64-8. [Dubikov AI, Belogolovikh LA, Medved' EE. Role of apoptosis in pathogenesis of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2005;43(1):64-8. (In Russ.). doi: 10.14412/1995-4484-2005-560
32. Дубиков АИ. Малые молекулы – регуляторы апоптоза клеток синовиальной оболочки у больных ревматоидным артритом. *Научно-практическая ревматология*. 2006;44(1):4-8. [Dubikov AI. Small molecules – regulators of synovial membrane cell apoptosis in patients with rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2006;44(1):4-8. (In Russ.).]
33. Дубиков АИ. Апоптоз клеток синовиальной оболочки у больных ревматоидным артритом. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2008;(4):20-3. [Dubikov AI. Apoptosis of synovial cells in patients with rheumatoid arthritis. *Tikhookeanskii meditsinskii zhurnal*. 2008;(4):20-3. (In Russ.).]
34. Tu Y, Xue H, Xia Z, et al. Effect of different concentrations of dexamethasone on apoptosis and expression of Fas/FasL in human osteoarthritis chondrocytes. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2012 May;26(5):536-41.
35. Tang Y, Luo J, Zhang W, et al. Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell*. 2006 Dec 28;24(6):827-39.
36. Krummel KA, Lee CJ, Toledo F, et al. The C-terminal lysines fine-tune p53 stress responses in a mouse model but are not required for stability control or transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul 19;102(29):10188-93. Epub 2005 Jul 8.
37. Feng L, Lin T, Uranishi H, et al. Functional analysis of the roles of posttranslational modifications at the p53 C terminus in regulating p53 stability and activity. *Mol Cell Biol*. 2005 Jul;25(13):5389-95.
38. Дорошевская АЮ, Кондратовский ПМ, Дубиков АИ. Малые молекулы – ключевые участники патогенеза ревматоидного артрита. *Клиническая медицина*. 2012;(6):12-8. [Doroshevskaya AYU, Kondratovskii PM, Dubikov AI. Small molecules – key participants in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Klinicheskaya meditsina*. 2012;(6):12-8. (In Russ.).]
39. Cha HS, Rosengren S, Boyle DL, Firestein GS. PUMA regulation and proapoptotic effects in fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum*. 2006 Feb;54(2):587-92.
40. Al-Ghamdi A, Attar SM. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: a hospital-based study. *Ann Saudi Med*. 2009 May-Jun;29(3):189-93.
41. Blanchong CA, Olshefski R, Kahwash S. Large granular lymphocyte leukemia: case report of chronic neutropenia and rheumatoid arthritis-like symptoms in a child. *Pediatr Dev Pathol*. 2001 Jan-Feb;4(1):94-9.
42. Papadaki HA, Kritikos HD, Valatas V, et al. Anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor-alpha antibody therapy. *Blood*. 2002 Jul 15;100(2):474-82.
43. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Sep;49(9):1618-31. doi: 10.1093/rheumatology/keq045. Epub 2010 Mar 24.
44. Berliner N, Horwitz M, Loughran TP. Congenital and acquired neutropenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004:63-79.
45. Arend WP, Firestein GS. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 Oct;8(10):573-86. doi: 10.1038/nrrheum.2012.134. Epub 2012 Aug 21.
46. Peng SL. Fas (CD95)-related apoptosis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006 Jan;45(1):26-30. Epub 2005 Sep 13.
47. Zhang X, Feng H, Du J, et al. Aspirin promotes apoptosis and inhibits proliferation by blocking G0/G1 into S phase in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via downregulation of JAK/STAT3 and NF-κ B signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2018 Dec;42(6):3135-3148. doi: 10.3892/ijmm.2018.3883. Epub 2018 Sep 17.
48. Амирджанова ВН, Кайгородцева ЕЮ, Савенкова НА, Насонов ЕЛ. Качество жизни как критерий эффективности терапии базисными противовоспалительными и генно-инженерными препаратами: результаты международных и российских исследований. *Научно-практическая ревматология*. 2009;47(2):54-66. [Amirdzhanova VN, Kaigorodtseva EYu, Savenkova NA, Nasonov EL. Quality of life as a criterion of disease modifying anti-rheumatic drug and biological agents therapy efficacy: results of international and Russian studies. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*. 2009;47(2):54-66. (In Russ.). doi: 0.14412/1995-4484-2009-460
49. Newton K. RIPK1 and RIPK3: Critical regulators of inflammation and cell death. *Trends Cell Biol*. 2015 Jun;25(6):347-53. doi: 10.1016/j.tcb.2015.01.001. Epub 2015 Feb 4.
50. Assmann G, Wagner AD, Monika M, et al. Single-nucleotide polymorphisms p53 G72C and Mdm2 T309G in patients with psoriasis, psoriatic arthritis, and SAPHO syndrome. *Rheumatol Int*. 2010 Aug;30(10):1273-6. doi: 10.1007/s00296-009-1136-8. Epub 2009 Sep 25.
51. Malemud CJ. Defective T-Cell Apoptosis and T-Regulatory Cell Dysfunction in Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 2018 Nov 22;7(12). pii: E223. doi: 10.3390/cells7120223.
52. Cosme-Blanco W, Shen MF, Lazar AJ, et al. Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence. *EMBO Rep*. 2007 May;8(5):497-503. Epub 2007 Mar 30.
53. Van Nguyen T, Puebla-Osorio N, Pang H, et al. DNA damage-induced cellular senescence is sufficient to suppress tumorigenesis: a mouse model. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1453-61. Epub 2007 May 29.
54. Hong LZ, Zhao XY, Zhang HL. p53-mediated neuronal cell death in ischemic brain injury. *Neurosci Bull*. 2010;26(3):232-40.

Поступила 27.05.2019

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.