

УДК 616.72-002.77 : 615.015.6 : 577.122

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ НА ФОНЕ ПРИЕМА МЕТОТРЕКСАТА

О. В. Балан^{1*}, И. Е. Малышева¹, М. В. Зарецкая¹,
И. М. Марусенко², О. Ю. Барышева²

¹ Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН» (ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910), *ovbalan@mail.ru

² Петрозаводский государственный университет (пр. Ленина, 33, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910)

Некодирующие РНК играют важную роль в регуляции врожденной и адаптивной иммунной системы в норме и при развитии различных патологий, в том числе аутоиммунных заболеваний. Некоторые некодирующие РНК были идентифицированы как перспективные биомаркеры для диагностики ревматоидного артрита. Тем не менее многие вопросы, связанные с механизмом действия, а также особенностями их функционирования при взаимодействии с различными лекарственными препаратами, все еще остаются нерешенными. В настоящей работе получены новые данные об особенностях экспрессии длинных некодирующих РНК BLACAT1, DANCR1, MALAT1 и GAS5 в лейкоцитах периферической крови пациентов с ревматоидным артритом до назначения терапии и на фоне приема базисного противовоспалительного антиревматического препарата метотрексат. Статистически значимое повышение уровня транскриптов BLACAT1, DANCR1 и MALAT1 и снижение GAS5 в лейкоцитах периферической крови выявлено у пациентов с ревматоидным артритом до назначения терапии и у пациентов, резистентных к метотрексату, в сравнении с контрольной группой здоровых доноров и больных ревматоидным артритом с положительным ответом на данный препарат ($p = 0,05$). Выявлена положительная корреляционная зависимость между содержанием днРНК DANCR1, уровнем экспрессии *IL6* ($r = 0,55$, $p = 0,01$) и концентрацией С-реактивного белка ($r = 0,48$, $p = 0,03$). Обнаружена корреляционная зависимость между исследуемыми днРНК и экспрессией генов, кодирующих мембранные транспортеры сем. ABC (*ABCB1*) и SLC (*RFC1*). Уровень экспрессии *ABCB1* находится в тесной положительной связи с MALAT1 и BLACAT1 ($r = 0,49$, $p < 0,001$; $r = 0,64$, $p < 0,05$), а гена *SLC19A1*, кодирующего фолатный переносчик RFC1, – с GAS5 ($r = 0,55$; $p < 0,001$). Таким образом, результаты исследований свидетельствуют не только о вовлечении днРНК MALAT1, BLACAT1 и GAS5 в патогенез ревматоидного артрита, но и о вероятном участии их в формировании ответа пациентов на базисный антиревматический препарат метотрексат.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; метотрексат; лекарственная устойчивость; длинные некодирующие РНК; BLACAT1; DANCR1; MALAT1; GAS5

Для цитирования: Балан О. В., Малышева И. Е., Зарецкая М. В., Марусенко И. М., Барышева О. Ю. Изменение экспрессии длинных некодирующих РНК в лейкоцитах периферической крови больных ревматоидным артритом на фоне приема метотрексата // Труды Карельского научного центра РАН. 2024. № 7. С. 112–122. doi: 10.17076/eb1975

Финансирование. Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (FMEN-2022-0009).

**O. V. Balan^{1*}, I. E. Malysheva¹, M. V. Zaretskaya¹, I. M. Marusenko², O. Yu. Barysheva².
CHANGES IN THE EXPRESSION OF LONG NON-CODING RNAs IN PERIPHERAL BLOOD
LEUCOCYTES OF RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS DURING METHOTREXATE
TREATMENT**

¹ Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences (11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia), *ovbalan@mail.ru

² Petrozavodsk State University (33 Lenin Ave., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia)

Non-coding RNAs play an important role in the regulation of the innate and adaptive immune system both in health and in the development of various pathologies, including autoimmune diseases. Some non-coding RNAs have been identified as promising biomarkers for the rheumatoid arthritis diagnosis. However, many issues related to the mechanism of action, as well as the features of their functioning during interaction with various drugs, still remain unresolved. In this study new data about the expression of long non-coding RNAs BLACAT1, DANCR1, MALAT1 and GAS5 in peripheral blood leukocytes of patients with rheumatoid arthritis before therapy and during treatment with the disease-modifying antirheumatic drug methotrexate were obtained. The BLACAT1, DANCR1 and MALAT1 transcripts in peripheral blood leukocytes were significantly overexpressed while GAS5 was underexpressed in patients with rheumatoid arthritis before therapy and in patients resistant to methotrexate compared to the control group of healthy donors and patients with rheumatoid arthritis with a positive response to this treatment ($p < 0.05$). A positive correlation was found between DANCR1 content, the level of IL6 expression ($r = 0.55$, $p = 0.01$) and the concentration of C-reactive protein ($r = 0.48$, $p = 0.03$). Also, the studied lncRNAs correlated with the expression of the genes encoding membrane transporters of the ABC (ABCB1) and SLC (RFC1) families. The expression level of ABCB1 was in close positive correlation with MALAT1 and BLACAT1 ($r = 0.49$, $p < 0.001$; $r = 0.64$, $p < 0.05$), and the expression of the *SLC19A1* gene, encoding the folate transporter RFC1, correlated with GAS5 ($r = 0.55$; $p < 0.001$). Thus, the results of this study indicate not only the involvement of lncRNAs MALAT1, BLACAT1 and GAS5 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, but also their probable participation in the formation of patients' response to the disease-modifying antirheumatic drug methotrexate.

Keywords: rheumatoid arthritis; methotrexate; drug resistance; long non-coding RNAs; BLACAT1; DANCR1; MALAT1; GAS5

For citation: Balan O. V., Malysheva I. E., Zaretskaya M. V., Marusenko I. M., Barysheva O. Yu. Changes in the expression of long non-coding RNAs in peripheral blood leukocytes of rheumatoid arthritis patients during methotrexate treatment. *Trudy Karelskogo nauchnogo tsentra RAN = Transactions of the Karelian Research Centre RAS*. 2024. No. 7. P. 112–122. doi: 10.17076/eb1975

Funding. This study was carried out under state assignment to KarRC RAS (FMEN-2022-0009).

Введение

Ревматоидный артрит (РА) – хроническое аутоиммунное воспалительное заболевание соединительной ткани, характеризующееся преимущественным поражением периферических

суставов, развитием эрозивно-деструктивных изменений хрящевой и костной ткани, а также быстрым развитием внесуставных изменений [Насонов, 2006]. Современная концепция терапии ревматоидного артрита, «Treat to Target» – «лечение до достижения цели», стойкой

длительной ремиссии, предполагает использование как традиционных болезнь-модифицирующих препаратов в сочетании с противовоспалительными лекарственными средствами стероидной и нестероидной природы, так и биологических, а также таргетных синтетических препаратов (ингибиторы JAK, SYR). Несмотря на активное внедрение новых генно-инженерных биологических лекарственных средств, базисный антиревматический препарат метотрексат (MT) продолжает оставаться «золотым стандартом» лечения данного заболевания [Kreemer, 2004; Ranganathan, McLeod, 2006]. В терапии РА используются относительно низкие дозы (10–20 мг/нед) MT, тогда как при различных онкологических заболеваниях дозировка препарата существенно выше (100–1000 мг/м²). Однако и в том, и другом случае, действуя в качестве антагониста фолиевой кислоты, метотрексат ингибирует синтез ДНК, РНК и белка в клетке в результате конкурентного, относительно необратимого связывания с дигидрофолатредуктазой, что препятствует восстановлению дигидрофолата в тетрагидрофолат [Cutolo et al., 2001; Montesinos et al., 2003]. Мощная противовоспалительная активность MT реализуется за счет индукции образования эндогенного противовоспалительного медиатора аденозина, в результате чего происходит снижение синтеза интерлейкинов 1, 2, 6, 8 и фактора некроза опухоли (ФНО). Несмотря на длительное и весьма разностороннее применение метотрексата, весь спектр его эффектов до конца не ясен. Тем не менее понимание механизмов действия MT важно с точки зрения выявления пациентов с первичной и нередко возникающей в процессе терапии вторичной резистентностью к ранее эффективному препарату. Ответ пациентов на MT связан прежде всего с функционированием системы поглощения, внутриклеточного распределения и выведения лекарственных препаратов, ключевыми детерминантами которой являются трансмембранные белки семейства АТФ-связывающей кассеты (ABC) и переносчиков растворенных веществ (SLC). ABC-транспортеры, прежде всего MDR1 и MRP1 (кодируемые генами *ABCB1* и *ABCC1* соответственно), модулируют фармакокинетику MT посредством его выведения через клеточные мембраны, в то время как SLC-переносчики, преимущественно RFC1 (кодируемый геном *SLC19A1*), обеспечивают внутриклеточный транспорт MT [Puris et al., 2023]. Следует отметить, что наиболее распространенными механизмами приобретенной резистентности к MT являются нарушение транспорта основным его переносчиком RFC1 (Reduced folate carrier 1),

повышенные уровни дигидрофолатредуктазы (DHFR) и нарушение процессов полиглутамилирования [Ranganathan, McLeod, 2006]. На сегодняшний день идентифицировано множество полиморфных вариантов генов, кодирующих ферменты и транспортеры, метаболизирующие MT. Однако большие межиндивидуальные различия в ответе на лекарственный препарат не могут быть объяснены лишь генетическими факторами.

Все больше внимания в последние годы уделяется изучению роли эпигенетических механизмов в формировании терапевтического ответа пациентов. В отличие от генетических aberrаций, сохраняющихся на протяжении всей жизни, эпигенетические изменения крайне динамичны, строго индивидуальны и могут различаться на организменном, тканевом и клеточном уровнях, а также в одной и той же клетке в зависимости от микроокружения, позволяя быстро адаптироваться к меняющимся условиям среды. Как одни из важнейших эпигенетических факторов, участвующих в модификации хроматина, регуляции транскрипции и посттрансляционных изменений, длинные некодирующие РНК (днРНК) играют важную роль во многих биологических процессах, таких как пролиферация, рост, дифференцировка, апоптоз, в норме и при развитии различных патологий [Lipovich et al., 2010; Wang et al., 2020] и могут рассматриваться в качестве перспективных маркеров терапевтического ответа на тот или иной препарат, в том числе MT. Было высказано предположение, что модуляция воспалительных состояний различными дозами метотрексата действует посредством изменения активности сигнальных путей JAK/STAT, WNT/b-catenin AKT/mTOR, которые могут контролироваться непосредственно нкРНК. Например, WNT/b-catenin-сигнальный путь, приводящий к развитию ABCB1-опосредованной резистентности, может быть активирован повышением экспрессии и содержания днРНК MALAT1 [Li et al., 2019]. Помимо непосредственного связывания со своими целевыми мишенями днРНК могут выступать в роли конкурентных РНК при взаимодействии с миРНК, формируя так называемые эндогенные сети circRNA/lncRNA/miR/mRNA и модулируя экспрессию и активность миРНК и их целевых генов [Fabian et al., 2010]. Так, GAS5 участвует в формировании эндогенных сетей GAS5/miR-361-5p/PDK4 и GAS5/miR-103/FGF21/PI3/AKT в хондроцитах, снижая пролиферацию и стимулируя в них апоптоз, что приводит к ускорению разрушения хряща [Chen et al., 2020a; Gao et al., 2020; Zhang et al., 2021b].

Недавние исследования выявили связь между фенотипом лекарственной устойчивости и регуляцией экспрессии генов посредством днРНК. Показано, что днРНК могут динамически изменяться в ответ на различные лекарственные препараты и влиять на экспрессию генов, участвующих в остановке клеточного цикла, ингибировании апоптоза и восстановлении повреждений ДНК [Zhang et al., 2017]. Однако следует отметить, что большая часть данных, представленных в литературе, посвящены изучению роли днРНК в формировании лекарственной устойчивости опухолевыми клетками различного генеза и локализации. Так, в клетках гепатоцеллюлярной карциномы показана способность днРНК H19 взаимодействовать непосредственно с промоторной областью гена *ABCB1*, защищая его от метилирования и обеспечивая высокий уровень его экспрессии [Tsang, Kwok, 2007]. При колоректальном раке H19 активирует путь β -катенина путем секвестрации miR-141 [Ren et al., 2018], а TUG1 опосредует устойчивость к метотрексату через эндогенную ось miR-186/CPEB2 [Li et al., 2017]. Повышение уровня днРНК BLACAT1 в оксалиплатин-резистентных клетках рака желудка блокирует miR-361, способствуя экспрессии генов *ABCB1* и *ABCC1* [Wu et al., 2018]. В клетках рака легкого днРНК MALAT1, связывая miR-101, повышает экспрессию SOX9 через Wnt-сигнальный путь. В то же время SOX9 может напрямую взаимодействовать с промотором *MALAT1*, активируя его транскрипцию. Таким образом, MALAT1, miR-101 и SOX9 образуют петлю обратной связи, участвуя в развитии резистентности клеток рака легких к цисплатину [Chen et al., 2017]. Учитывая тот факт, что фибробластоподобные синовиальные клетки больных ревматоидным артритом подобно раковым клеткам характеризуются высокой пролиферативной активностью, повышенной миграционной и инвазивной способностью, а также устойчивостью к апоптозу, можно предположить, что спектр нкРНК и механизмы, посредством которых они участвуют в регуляции экспрессии генов, в том числе отвечающих за формирование фенотипа лекарственной устойчивости, могут быть сходны. Подтверждением этому служат исследования, проведенные Чжан и коллегами, которые продемонстрировали, что днРНК TUG1 способствует повышению скорости потребления глюкозы и снижению апоптоза в синовиальных фибробластах больных ревматоидным артритом посредством ингибирования miR-34a-5p и активации LHDA, ключевого фермента метаболизма глюкозы, подобно

тому, как это происходит в опухолевых клетках [Zhang et al., 2021a]. В связи с этим целью данного исследования является анализ экспрессии длинных некодирующих РНК BLACAT1, DANCR1, MALAT1 и GAS5 в лейкоцитах периферической крови больных ревматоидным артритом на фоне приема метотрексата.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы периферической венозной крови здоровых доноров и больных ревматоидным артритом, полученные при содействии Центра медико-биологических исследований КарНЦ РАН и Кафедры госпитальной терапии Медицинского института им. профессора А. П. Зильбера ПетрГУ. Диагноз ревматоидный артрит устанавливался врачами отделения ревматологии на основании критериев ACR/EULAR 2010 г. Активность заболевания оценивали по индексу DAS28 (Disease Activity Score). Эффективность терапии оценивали на основании клинико-лабораторных показателей. Критерии исключения общие для доноров изучаемых групп: перенесенные в последний месяц инфекционно-воспалительные заболевания, курение, сахарный диабет, беременность и лактация, индекс массы тела ≥ 30 кг/м². Информационное согласие получено от всех участников исследования. Работа утверждена комитетом по медицинской этике при ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет» и Министерстве здравоохранения Республики Карелия (протокол № 2 от 09.09.2024 г.). Включенные в исследование пациенты (72 человека) были разделены на 4 группы: I гр. – контроль/здоровые доноры; II гр. – больные РА до назначения терапии, III гр. – больные РА с положительным ответом на терапию МТ в сочетании с фолиевой кислотой, IV гр. – больные РА с неэффективной терапией МТ. Подробное описание представлено в табл. 1. Содержание С-реактивного белка (СРБ-ИФА-БЕСТ высокочувствительный, «ВекторБест», Россия) и уровень антител к циклическому цитруллинированному пептиду (АЦЦП-ИФА-IgG-LP, «ЛабПэк», Россия) в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа по протоколам производителя. Измерения оптической плотности проводили на планшетном мультимодальном ридере SuPerMax3100 (Flash Spectrum, KHP).

Тотальную РНК выделяли из лейкоцитов периферической крови (ЛПК) с использованием реагента PureZOL (Bio-Rad, США) и обрабатывали ДНКазой (1 ед. а.) («Евроген», Россия).

Таблица 1. Клинико-лабораторные показатели пациентов, включенных в исследование

Table 1. Clinical and laboratory parameters of the patients enrolled in the study

Показатель Parameter	Условно здоровые доноры Conditionally healthy donors	Пациенты с ревматоидным артритом Patients with rheumatoid arthritis		
		Без терапии Without therapy	На терапии метотрексатом Methotrexate treatment	
			С положительной динамикой Methotrexate sensitive	Резистентные к метотрексату Methotrexate resistance
Количество Number	18	12	21	21
Средний возраст, л. Average age, yrs	46,56 ± 2,69	54,71 ± 3,19	58,14 ± 4,23	60,14 ± 1,95
Дозировка МТ, мг/нед MTX dose, mg/w	-	-	12,5 ± 1,32	6,25 ± 1,25
DAS28 DAS28	-	5,82 ± 1,38	4,07 ± 0,39	4,87 ± 0,79
СОЭ, мм/час ESR, mm per hour	7,17 ± 0,88	106,50 ± 5,73*	20,44 ± 4,78*	45,67 ± 7,89*Δ
СРБ, мг/л CRP, mg/L	1,2 ± 0,8	43,35 ± 4,73*	8,42 ± 4,92*	15,24 ± 8,67*Δ
АЦЦП, ед/мл ACCP, U/ml	2,63 ± 0,27	86,56 ± 13,15*	20,19 ± 2,45*	234,41 ± 8,87*Δ

Примечание. Данные представлены в М ± m. P < 0,05 по сравнению с: * – условно здоровыми донорами; Δ – больными РА с положительной динамикой на терапию МТ.

Note. Data are presented as M ± m. P < 0.05 compared with: * – conditionally healthy donors; Δ – RA patients with positive dynamics on MTX therapy.

Синтез комплементарной цепи ДНК проводили с применением готового набора реагентов M-MLV RT kit («Евроген», Россия). Контроль количества и качества выделенной РНК и синтезированной ДНК проводили на спектрофотометре Nano-500 (Allsheng, КНР). Нуклеотидные последователь-

ности праймеров сконструированы в программе Beacon Designer 5.0 и представлены в табл. 2.

Уровень экспрессии днРНК определяли в ЛПК методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием LightCycler 96 (Roche, Швейцария).

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР в реальном времени

Table 2. Oligonucleotide sequences of primers for Real-Time PCR

№ п/п No.	Название гена Gene name	Номер доступа в NCBI Accession number	Последовательности прямого и обратного праймеров Sequences of forward and reverse primers	Размер ПЦР фрагмент, н. п. PCR-fragment length, b. p.
1	<i>BLACAT1</i>	NM_001397426	5'-atcccctggaggagtgctca-3' 5'-cccacgaggaaaaccctga-3'	125
2	<i>DANCR1</i>	NR_024031.2	5'-agcgcaggttgacaactaca-3' 5'-ggacacgtggtgctacaag-3'	156
3	<i>MALAT1</i>	NR_144567.1	5'-acgagttgtcgtctatcttag-3' 5'-gattctgtttatgcctggttag-3'	180
4	<i>GAS5</i>	NR_002578.4	5'-gactcctgtgaggtatggtg-3' 5'-gctattctcatcctccttggg-3'	94
5	<i>ABCB1</i>	NM_001348945.2	5'-gaaagtgtgctgtgatggc-3' 5'-ggcatgatgttggcctcct-3'	194
6	<i>SLC19A1</i>	NM_194255.4	5'-gctaccttggctctacggc-3' 5'-gatctcgttcgtgacctgctc-3'	116
7	<i>IL6</i>	NM_000600.5	5'-ccaccgggaacgaaagagaa-3' 5'-gagaaggcaactggaccgaa-3'	92
8	<i>18s RNA</i>	NR_146119	5'-agaaacggctaccacatcca-3' 5'-caccagacttgcctcca-3'	169
9	<i>RPL19</i>	NM_000981.4	5'-aatcgccaatgccaactc-3' 5'-ccttccgcttacctatgc-3'	155

В качестве референсных генов использовали 18s RNA и RPL19. Специфичность продуктов амплификации оценивали по кривым плавления ПЦР продуктов. Количество технических повторов не менее 2. Расчет относительного уровня экспрессии проводили по методу $\Delta\Delta Ct$. Все используемые в работе олигонуклеотиды синтезированы в компании «Синтол», Россия. Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statgraphics Centurion. Критерий Вилкоксона – Манна – Уитни применяли для сравнения показателей в исследуемых группах, коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r) использовали для выявления взаимосвязи исследуемых показателей. Различия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Исследования выполнены на научном оборудовании ЦКП КарНЦ РАН.

Результаты и обсуждение

Известно, что снижение экспрессии гена *SLC19A1*, кодирующего основной транспортный белок RFC1, обеспечивающий перенос МТ внутрь клетки, и изменение транскрипционной активности *ABCB1* и *ABCC1* приводит к уменьшению внутриклеточной концентрации МТ и, как следствие, к снижению эффективности терапии [Ranganathan, McLeod, 2006]. Особенности экспрессии *ABCB1*, *SLC19A1* и *IL6* в лейкоцитах периферической крови условно здоровых доноров и пациентов с ревматоидным

артритом до назначения терапии и на фоне приема МТ представлены в табл. 3. В свою очередь, регуляция транскрипционной активности вышеуказанных генов может контролироваться как генетическими, так и эпигенетическими факторами. Участие днРНК в этом процессе обуславливается их способностью не только к непосредственному взаимодействию с ДНК, но и к формированию так называемых внутриклеточных эндогенных сетей, оказывающих регуляторное влияние на основные сигнальные пути, инициирующие экспрессию генов-мишеней.

В настоящей работе получены новые данные об особенностях экспрессии длинных некодирующих РНК BLACAT1, DANCR1, MALAT1 и GAS5 в лейкоцитах периферической крови пациентов с ревматоидным артритом до назначения терапии и на фоне приема базисного противовоспалительного антиревматического препарата метотрексат. Результаты исследования представлены на рисунке. Показано статистически значимое повышение уровня транскриптов днРНК BLACAT1, DANCR1, MALAT1 в ЛПК больных РА как в дебюте заболевания, так и в группе пациентов, не отвечающих на терапию МТ в сравнении с контрольной группой здоровых доноров и больных РА с положительным ответом на данный препарат.

С использованием электронной базы данных ENCORI (<https://rnasysu.com/encori>) для прогнозирования взаимодействия днРНК-миРНК-мРНК были выявлены потенциальные

Таблица 3. Особенности экспрессии генов *ABCB1*, *SLC19A1* и *IL6* в лейкоцитах периферической крови условно здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом

Table 3. Features of *ABCB1*, *SLC19A1* and *IL6* gene expression in peripheral blood leukocytes of the conditionally healthy donors and patients with rheumatoid arthritis

Показатель Parameter	Условно здоровые доноры (группа 1) Conditionally healthy donors (group 1)	Пациенты с ревматоидным артритом Patients with rheumatoid arthritis		
		Без терапии (группа 2) Without therapy (group 2)	На терапии метотрексатом Methotrexate treatment	
			С положительной динамикой (группа 3) Methotrexate sensitive (group 3)	Резистентные к метотрексату (группа 4) Methotrexate resistance (group 4)
<i>ABCB1</i> (<i>MDR1</i>)	0,013 (0,005 ± 0,055)	0,115* (0,083 ± 0,194)	0,031 (0,027 ± 0,060)	0,081*Δ (0,050 ± 0,101)
<i>SLC19A1</i> (<i>RFC1</i>)	0,066 (-0,041 ± 0,080)	0,036* (0,001 ± 0,083)	0,139* (0,055 ± 0,265)	0,042Δ (0,005 ± 0,072)
<i>IL6</i>	0,0013 (0,0008 ± 0,0014)	0,0193* (0,0152 ± 0,0259)	0,0025* (0,0018 ± 0,0038)	0,0100*Δ (0,0080 ± 0,0120)

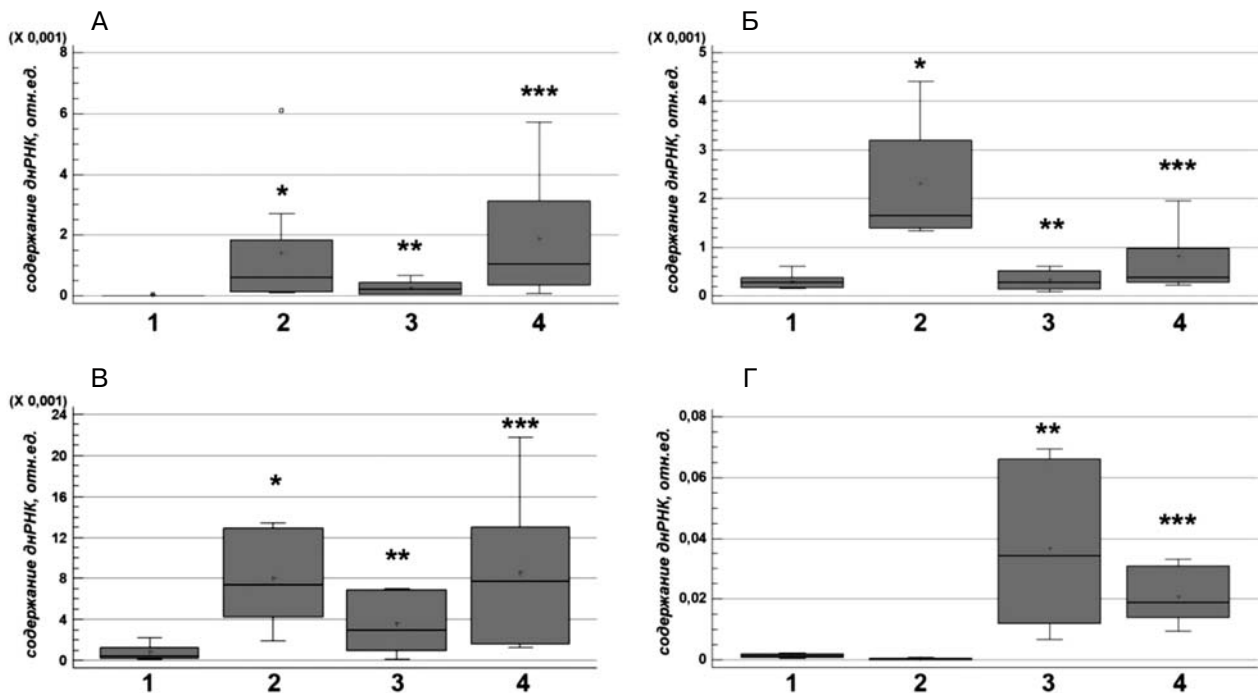
Примечание. Данные представлены в виде медианы, в скобках указаны первый и третий квартиль. Различия статистически значимы ($p < 0,01$) в сравнении с: * – группой 1; Δ – группой 3.

Note. Data are presented as median, first and third quartiles are given in brackets. Differences are statistically significant ($p < 0.01$) in comparison with: * – group 1; Δ – group 3.

мишени для исследуемых днРНК. Так, в отношении MALAT1 идентифицировано 18 сайтов связывания с *ABCB1*, 2 сайта – с RFC1 (*SLC19A1*); для GAS5 показаны 2 сайта связывания с *ABCC1* и 1 – с RFC1. Проанализировав влияние вышеуказанных днРНК на содержание мРНК генов, кодирующих мембранные транспортеры семейства ABC и SLC, мы обнаружили, что уровни экспрессии *ABCB1* и *SLC19A1* находятся в тесной положительной связи с MALAT1 и GAS5. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена $r = 0,49$ и $0,55$ соответственно, $p < 0,001$. Положительная корреляционная зависимость выявлена между уровнем экспрессии *ABCB1* и содержанием днРНК BLACAT1 ($r = 0,64$, $p < 0,05$), а также между DANCR1 и BLACAT1 ($r = 0,80$, $p < 0,05$). Как оказалось, днРНК DANCR1, взаимодействуя с РНК-связывающим белком QK, повышает стабильность нкРНК BLACAT1 [Xiong et al., 2021]. Следует отметить, что уровень экспрессии днРНК DANCR1 в ЛПК пациентов с РА до назначения терапии в несколько раз превышал значение этого показателя в контрольной

группе и в группе пациентов, находящихся на лечении. Выявленная положительная корреляционная зависимость между содержанием днРНК DANCR1, уровнем экспрессии *IL6* ($r = 0,55$, $p = 0,01$) и концентрацией С-реактивного белка ($r = 0,48$, $p = 0,03$) может указывать на вовлечение этой днРНК в патогенез РА.

Содержание транскриптов днРНК GAS5, напротив, было меньше в ЛПК пациентов с РА в дебюте заболевания по сравнению с контрольной группой. Понижение уровня этой нкРНК в синовиальных фибробластах больных РА показано и в работах других авторов [Peng et al., 2021; Yang et al., 2021]. Действуя как эндогенная конкурирующая РНК, GAS5 связывает miR-128-3p и miR-222-3p, снимая блок с мРНК генов *HDAC4* и *Sirt1*, участвующих в регуляции процессов пролиферации и апоптоза. Таким образом, GAS5 может принимать участие в формировании фенотипа синовиальных фибробластов, характерных для РА, – активно делящихся клеток с низким уровнем апоптотической активности. В группе пациентов с РА, находящихся на терапии МТ, количество



Содержание транскриптов днРНК BLACAT1 (А), DANCR1 (Б), MALAT1 (В) и GAS5 (Г) в ЛПК условно здоровых доноров (1) и пациентов с ревматоидным артритом: до назначения терапии (2), с положительной динамикой на терапию МТ (3) и резистентных к МТ (4):

различия достоверны в сравнении: * – с группой 1; ** – с группой 2; *** – с группой 3

Transcripts level of long non-coding RNAs BLACAT1 (A), DANCR1 (B), MALAT1 (C) and GAS5 (D) in PBL of the conditionally healthy donors (1) and patients with rheumatoid arthritis: before therapy (2), with positive dynamics on MTX therapy (3) and resistant to MTX (4):

the differences are significant in comparison: * – with group 1; ** – with group 2; *** – with group 3

транскриптов этой нкРНК значительно возросло по сравнению с контрольной группой и группой с РА до назначения препарата. Следует отметить, что только пациенты с положительной динамикой на данный вид терапии сохраняют высокий уровень GAS5. На примере клеток рака молочной железы показано, что понижение уровня данной нкРНК приводит к высвобождению miR-221-3p, последующему блокированию DKK2 и активации WNT/b-catenin-сигнального пути, способствующего развитию ABCB1-опосредованной устойчивости к адриамицину [Chen et al., 2020b].

WNT/b-catenin является одним из ключевых сигнальных путей в регуляции транскрипционной активности ABCB1, базальный (коровый) промотор которого имеет несколько участков связывания с β -катенином [Correa et al., 2012]. В регуляции экспрессии и ядерной локализации β -катенина может принимать участие и днРНК MALAT1. Действуя через фактор эпигенетической репрессии генов, MALAT1, как предполагается, запускает неканоническую функцию EZH2, вызывая гиперактивацию сигнала β -катенина и способствуя экспрессии его целевых генов, в том числе ABCB1 [Hirata et al., 2015]. Таким образом, демонстрируя повышенные уровни экспрессии, MALAT1 участвует не только в модуляции иммунных реакций и развитии воспалительных процессов, но и в формировании резистентности к лекарственным препаратам, в частности к МТ. Увеличение транскриптов днРНК BLACAT1, наблюдаемое в группе пациентов, не отвечающих на терапию МТ, также приводит к активации экспрессии ABCB1 и, как следствие, к увеличению транспортной активности и истощению внутриклеточных запасов МТ. Тогда как уменьшение днРНК GAS5 сопровождается снижением уровня МТ, поступающего в клетку опосредованно через фолатный переносчик RFC1, кодируемый геном SLC19A1.

Подводя итог, на основании полученных нами данных и данных, представленных в мировой литературе, можно сделать вывод о том, что длинные некодирующие РНК BLACAT1, DANCR1, MALAT1 и GAS5 не только вовлечены в патогенез ревматоидного артрита, но и могут принимать участие в формировании ответа пациентов на базисный антиревматический препарат метотрексат.

Заключение

Таким образом, длинные некодирующие гены могут рассматриваться в качестве ключевых участников формирования лекарственной

устойчивости, а также в качестве потенциальных биомаркеров эффективности терапии РА. Однако следует помнить, что эпигенетический профиль индивидуален в каждом типе клеток и может быть изменен как вследствие естественных физиологических реакций, протекающих в клетках, так и под воздействием различных факторов среды.

Литература

Насонов Е. Л. Ревматология 2006. Клинические рекомендации. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 264 с.

Chen H., He C., Liu Y., Li X., Zhang C., Qin Q., Pang Q. lncRNA-GAS5 inhibits expression of miR 103 and ameliorates the articular cartilage in adjuvant-induced arthritis in obese mice // Dose-Response. 2020a. Vol. 18(4). Art. 1559325820942718. doi: 10.1177/1559325820942718

Chen W., Zhao W., Zhang L., Wang L., Wang J., Wan Z., Hong Y., Yu L. MALAT1-miR-101-SOX9 feedback loop modulates the chemo-resistance of lung cancer cell to DDP via Wnt signaling pathway // Oncotarget. 2017. Vol. 8, no. 55. P. 94317–94329. doi: 10.18632/oncotarget.21693

Chen Z., Pan T., Jiang D., Jin L., Geng Y., Feng X., Shen A., Zhang L. The lncRNA-GAS5/miR-221-3p/DKK2 axis modulates ABCB1-mediated Adriamycin resistance of breast cancer via the Wnt/ β -catenin signaling pathway // Mol. Ther. 2020b. Vol. 19. P. 1434–1448. doi: 10.1016/j.omtn.2020.01.030

Correa S., Binato R., Du Rocher B., Castelo-Branco M. T., Pizzatti L., Abdelhay E. Wnt/ β -catenin pathway regulates ABCB1 transcription in chronic myeloid leukemia // BMC Cancer. 2012. Vol. 12. P. 303. doi: 10.1186/1471-2407-12-303

Cutolo M., Sulli A., Pizzomi C., Seriola B., Struub R. H. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis // Ann. Rheum. Dis. 2001. Vol. 60, no. 8. P. 729–735.

Fabian M. R., Sonenberg N., Filipowich W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs // Annu. Rev. Biochem. 2010. Vol. 79. P. 351–379. doi: 10.1146/annurev-biochem-060308-103103

Gao S. T., Yu Y. M., Wan L. P., Liu Z. M., Lin J. X. lncRNA GAS5 induces chondrocyte apoptosis by down-regulating miR-137 // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2020. Vol. 24. P. 10984–10991. doi: 10.26355/eurrev_202011_23582

Hirata H., Hinoda Y., Shahryari V., Deng G., Nakajima K., Tabatabai Z. L., Ishii N., Dahiya R. Long noncoding RNA MALAT1 promotes aggressive renal cell carcinoma through Ezh2 and interacts with miR-205 // Cancer Res. 2015. Vol. 75, no. 7. P. 1322–1331. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2931

Kreemer J. M. Toward a better understanding of methotrexate // Arthritis Rheum. 2004. Vol. 50, no. 5. P. 1357–1700. doi: 10.1002/art.20278

Li C., Gao Y., Li Y., Ding D. TUG1 mediates methotrexate resistance in colorectal cancer via miR-186/CPEB2 axis // Biochem. Biophys. Res. Commun.

2017. Vol. 491, no. 2. P. 552–557. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.042

Li G. Q., Fang Y. X., Liu Y., Meng F.-R., Wu X., Zhang Ch.-W., Zhang Y., Liu D., Gao B. MALAT1-driven inhibition of WNT signal impedes proliferation and inflammation in fibroblast-like synoviocytes through CTNNB1 promoter methylation in rheumatoid arthritis // *Hum. Gene Ther.* 2019. Vol. 30. P. 1008–1022. doi: 10.1089/hum.2018.212

Lipovich L., Johnson R., Lin C. Y. MacroRNA underdogs in a microRNA world: evolutionary, regulatory, and biomedical significance of mammalian long non-protein-coding RNA // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. Vol. 1799. P. 597–615. doi: 10.1016/j.bbagr.2010.10.001

Montesinos M. C., Desai A., Delano D., Chen J.-F., Fink J. S., Jacobson M. A., Cronstein B. N. Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68 // *Arthritis Rheum.* 2003. Vol. 48, no. 1. P. 240–247. doi: 10.1002/art.10712

Peng T., Ji D., Jiang Y. Long non-coding RNA GAS5 suppresses rheumatoid arthritis progression via miR-128-3p/HDAC4 axis // *Mol. Cell. Biochem.* 2021. Vol. 476. P. 2491–2501. doi: 10.1007/s11010-021-04098-1

Puris E., Fricker G., Gynther M. The role of solute carrier transporters in efficient anticancer drug delivery and therapy // *Pharmaceutics.* 2023. Vol. 15, no. 2. P. 364. doi: 10.3390/pharmaceutics15020364

Ranganathan P., McLeod H. L. Methotrexate pharmacogenetics: the first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* 2006. Vol. 54, no. 5. P. 1366–1377. doi: 10.1002/art.21762

Ren J., Ding L., Zhang D., Shi G., Xu Q., Shen S., Wang Y., Wang T., Hou Y. Carcinoma-associated fibroblasts promote the stemness and chemoresistance of colorectal cancer by transferring exosomal lncRNA H19 // *Theranostics.* 2018. Vol. 8. P. 3932–3948. doi: 10.7150/thno.25541

Tsang W. P., Kwok T. T. Riboregulator H19 induction of MDR1-associated drug resistance in human hepatocellular carcinoma cells // *Oncogene.* 2007. Vol. 26, no. 33. P. 4877–4881. doi: 10.1038/sj.onc.1210266

Wang L. M., Zhang Y. W., Xin X. Y. Long non-coding RNA MALAT1 aggravates human retinoblastoma by sponging miR-20b-5p to upregulate STAT // *Pathol. Res. Pract.* 2020. Vol. 216, no. 6. P. 152977. doi: 10.1016/j.prp.2020.152977

Wu X., Zheng Y., Han B., Dong X. Long noncoding RNA BLACAT1 modulates ABCB1 to promote oxaliplatin resistance of gastric cancer via sponging miR-361 // *Biomed. Pharmacother.* 2018. Vol. 99. P. 832–838. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.130

Xiong M., Wu M., Dan Peng H., Huang W., Chen Z., Ke H., Chen Z., Song W., Zhao Y., Xiang A. P., Zhong X. LncRNA DANCR represses Doxorubicin-induced apoptosis through stabilizing MALAT1 expression in colorectal cancer cells // *Cell Death Dis.* 2021. Vol. 12, no. 1. P. 24. doi: 10.1038/s41419-020-03318-8

Yang Z., Lin S. D., Zhan F., Liu Y., Zhan Y. W. LncRNA GAS5 alleviates rheumatoid arthritis through regulating miR-222-3p/Sirt1 signalling axis // *Autoim-*

munity. 2021. Vol. 54. P. 13–22. doi: 10.1080/08916934.2020.1846183

Zhang H. J., Wei Q. F., Wang S. J., Zhang H.-J., Zhang X.-Y., Geng Q., Cui Y.-H., Wang X.-H. LncRNA HOTAIR alleviates rheumatoid arthritis by targeting miR-138 and inactivating NF-kappaB pathway // *Int. Immunopharmacol.* 2017. Vol. 50. P. 283–290. doi: 10.1016/j.intimp.2017.06.021

Zhang M., Lu N., Guo X. Y., Li H. J., Guo Y., Lu L. Influences of the lncRNA TUG1-miRNA-34a-5p network on fibroblast-like synoviocytes (FLSs) dysfunction in rheumatoid arthritis through targeting the lactate dehydrogenase A (LDHA) // *J. Clin. Lab. Anal.* 2021a. Vol. 35, no. 9. e23969. doi: 10.1002/jcla.23969

Zhang W., Li B., Xia N., Zhu L., Zhang Z., Ren Z., Zhang L., Xu P., Meng F., Feng L., Yang L. LncRNA GAS5 suppresses rheumatoid arthritis by inhibiting miR-361-5p and increasing PDK4 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021b. Vol. 583. P. 7–13. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.10.040

References

Chen H., He C., Liu Y., Li X., Zhang C., Qin Q., Pang Q. LncRNA-GAS5 inhibits expression of miR-103 and ameliorates the articular cartilage in adjuvant-induced arthritis in obese mice. *Dose-Response.* 2020;18(4):1559325820942718. doi: 10.1177/1559325820942718

Chen W., Zhao W., Zhang L., Wang L., Wang J., Wan Z., Hong Y., Yu L. MALAT1-miR-101-SOX9 feedback loop modulates the chemo-resistance of lung cancer cell to DDP via Wnt signaling pathway. *Oncotarget.* 2017;8(55):94317–94329. doi: 10.18632/oncotarget.21693

Chen Z., Pan T., Jiang D., Jin L., Geng Y., Feng X., Shen A., Zhang L. The lncRNA-GAS5/miR-221-3p/DKK2 axis modulates ABCB1-mediated Adriamycin resistance of breast cancer via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mol. Ther.* 2020;19:1434–1448. doi: 10.1016/j.omtn.2020.01.030

Correa S., Binato R., Du Rocher B., Castelo-Branco M. T., Pizzatti L., Abdelhay E. Wnt/ β -catenin pathway regulates ABCB1 transcription in chronic myeloid leukemia. *BMC Cancer.* 2012;12:303. doi: 10.1186/1471-2407-12-303

Cutolo M., Sulli A., Pizzomi C., Serio B., Struub R. H. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2001;60(8):729–735.

Fabian M. R., Sonenberg N., Filipowich W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 2010;79:351–379. doi: 10.1146/annurev-biochem-060308-103103

Gao S. T., Yu Y. M., Wan L. P., Liu Z. M., Lin J. X. LncRNA GAS5 induces chondrocyte apoptosis by down-regulating miR-137. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020;24:10984–10991. doi: 10.26355/eurrev_202011_23582

Hirata H., Hinoda Y., Shahryari V., Deng G., Nakajima K., Tabatabai Z. L., Ishii N., Dahiya R. Long noncoding RNA MALAT1 promotes aggressive renal cell carcinoma through Ezh2 and interacts with

miR-205. *Cancer Res.* 2015;75(7):1322–1331. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2931

Kreemer J. M. Toward a better understanding of methotrexate. *Arthritis Rheum.* 2004;50(5):1357–1700. doi: 10.1002/art.20278

Li C., Gao Y., Li Y., Ding D. TUG1 mediates methotrexate resistance in colorectal cancer via miR-186/CPEB2 axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017;491(2):552–557. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.042

Li G. Q., Fang Y. X., Liu Y., Meng F.-R., Wu X., Zhang Ch.-W., Zhang Y., Liu D., Gao B. MALAT1-driven inhibition of WNT signal impedes proliferation and inflammation in fibroblast-like synoviocytes through CTNBN1 promoter methylation in rheumatoid arthritis. *Hum. Gene Ther.* 2019;30:1008–1022. doi: 10.1089/hum.2018.212

Lipovich L., Johnson R., Lin C. Y. MacroRNA underdogs in a microRNA world: evolutionary, regulatory, and biomedical significance of mammalian long non-protein-coding RNA. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010;1799:597–615. doi: 10.1016/j.bbagr.2010.10.001

Montesinos M. C., Desai A., Delano D., Chen J.-F., Fink J. S., Jacobson M. A., Cronstein B. N. Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. *Arthritis Rheum.* 2003;48(1):240–247. doi: 10.1002/art.10712

Nasonov E. L. Rheumatology 2006. Clinical guidelines. Moscow: GEOTAR-Media; 2006. 264 p. (In Russ.)

Peng T., Ji D., Jiang Y. Long non-coding RNA GAS5 suppresses rheumatoid arthritis progression via miR-128-3p/HDAC4 axis. *Mol. Cell. Biochem.* 2021;476:2491–2501. doi: 10.1007/s11010-021-04098-1

Puris E., Fricker G., Gynther M. The role of solute carrier transporters in efficient anticancer drug delivery and therapy. *Pharmaceutics.* 2023;15(2):364. doi: 10.3390/pharmaceutics15020364

Ranganathan P., McLeod H. L. Methotrexate pharmacogenetics: the first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(5):1366–1377. doi: 10.1002/art.21762

Ren J., Ding L., Zhang D., Shi G., Xu Q., Shen S., Wang Y., Wang T., Hou Y. Carcinoma-associated fibroblasts promote the stemness and chemoresistance

of colorectal cancer by transferring exosomal lncRNA H19. *Theranostics.* 2018;8:3932–3948. doi: 10.7150/thno.25541

Tsang W. P., Kwok T. T. Riboregulator H19 induction of MDR1-associated drug resistance in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene.* 2007;26(33):4877–4881. doi: 10.1038/sj.onc.1210266

Wang L. M., Zhang Y. W., Xin X. Y. Long non-coding RNA MALAT1 aggravates human retinoblastoma by sponging miR-20b-5p to upregulate STAT. *Pathol. Res. Pract.* 2020;216(6):152977. doi: 10.1016/j.prp.2020.152977

Wu X., Zheng Y., Han B., Dong X. Long noncoding RNA BLACAT1 modulates ABCB1 to promote oxaliplatin resistance of gastric cancer via sponging miR-361. *Biomed. Pharmacother.* 2018;99:832–838. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.130

Xiong M., Wu M., Dan Peng H., Huang W., Chen Z., Ke H., Chen Z., Song W., Zhao Y., Xiang A. P., Zhong X. LncRNA DANCR represses Doxorubicin-induced apoptosis through stabilizing MALAT1 expression in colorectal cancer cells. *Cell Death Dis.* 2021;12(1):24. doi: 10.1038/s41419-020-03318-8

Yang Z., Lin S. D., Zhan F., Liu Y., Zhan Y. W. LncRNA GAS5 alleviates rheumatoid arthritis through regulating miR-222-3p/Sirt1 signalling axis. *Autoimmunity.* 2021;54:13–22. doi: 10.1080/08916934.2020.1846183

Zhang H. J., Wei Q. F., Wang S. J., Zhang H.-J., Zhang X.-Y., Geng Q., Cui Y.-H., Wang X.-H. LncRNA HOTAIR alleviates rheumatoid arthritis by targeting miR-138 and inactivating NF-kappaB pathway. *Int. Immunopharmacol.* 2017;50:283–290. doi: 10.1016/j.intimp.2017.06.021

Zhang M., Lu N., Guo X. Y., Li H. J., Guo Y., Lu L. Influences of the lncRNA TUG1-miRNA-34a-5p network on fibroblast-like synoviocytes (FLSs) dysfunction in rheumatoid arthritis through targeting the lactate dehydrogenase A (LDHA). *J. Clin. Lab. Anal.* 2021a;35(9):e23969. doi: 10.1002/jcla.23969

Zhang W., Li B., Xia N., Zhu L., Zhang Z., Ren Z., Zhang L., Xu P., Meng F., Feng L., Yang L. LncRNA GAS5 suppresses rheumatoid arthritis by inhibiting miR-361-5p and increasing PDK4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021b;583:7–13. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.10.040

Поступила в редакцию / received: 18.10.2024; принята к публикации / accepted: 05.11.2024.
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflict of interest.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Балан Ольга Викторовна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник
e-mail: ovbalan@mail.ru

Малышева Ирина Евгеньевна

канд. биол. наук, старший научный сотрудник
e-mail: I.E.Malysheva@yandex.ru

Зарецкая Марина Витальевна

канд. биол. наук, научный сотрудник
e-mail: genmg@mail.ru

CONTRIBUTORS:

Balan, Olga

Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher

Malysheva, Irina

Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher

Zaretskaya, Marina

Cand. Sci. (Biol.), Researcher

Марусенко Ирина Михайловна

д-р биол. наук, профессор кафедры госпитальной
терапии Медицинского института им. профессора
А. П. Зильбера

e-mail: imarusenko@yandex.ru

Барышева Ольга Юрьевна

д-р биол. наук, профессор кафедры госпитальной
терапии Медицинского института им. профессора
А. П. Зильбера

e-mail: barysheva@petsu.ru

Marusenko, Irina

Dr. Sci. (Biol.), Professor

Barysheva, Olga

Dr. Sci. (Biol.), Professor