

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»



*На правах рукописи*

ШНАЙДЕР МАРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**«ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯТОРОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК НА  
СВОЙСТВА ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ СИНОВИАЛЬНЫХ  
КЛЕТОК БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ IN VITRO»**

14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук  
И.В. Ширинский

Новосибирск

2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>4</b>
Актуальность темы исследования .....	4
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫЕ СИНОВИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ – МИШЕНЬ ТЕРАПИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА.....</b>	<b>13</b>
1.1. Роль стромальных клеток в патогенезе ревматоидного артрита (РА) ..13	
1.1.1. Общие представления о строении синовиальной оболочки суставов у здоровых людей и больных РА.....	13
1.1.2. Синовиальный фибробласт – основная клетка, участвующая в развитии воспаления и его исходов у больных РА .....	17
1.2. Использование культуры ФСК в качестве модели доклинического скрининга <i>in vitro</i> лекарств-кандидатов для терапии РА.....	23
1.2.1. Морфология, фенотип, функциональные свойства культуры ФСК ..23	
1.2.2. Особенности фибробластоподобных синовиальных клеток больных РА в культуре <i>in vitro</i> .....	25
1.2.3. Влияние препаратов для терапии РА на ФСК <i>in vitro</i> .....	25
1.3. Стабильный фенотип ФСК больных РА как результат эпигенетических нарушений, возможности терапевтических воздействий .....	28
1.3.1. Роль метилирования ДНК в изменениях фенотипа ФСК.....	28
1.3.2. Доклиническое и клиническое использование препаратов, действующих на метилирование ДНК в ФСК .....	32
1.3.2.1. Влияние модуляторов метилирования ДНК на фенотип ФСК в исследованиях <i>in vitro</i> .....	32

1.3.2.2. Экспериментальные данные на животных .....	33
1.3.2.3. Клинические данные .....	35
1.3.2.4. Влияние модуляторов метилирования ДНК на функциональные свойства ФСК в исследованиях <i>in vitro</i> .....	36
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....</b>	<b>38</b>
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>43</b>
3.1. Спонтанная и IL-1 $\beta$ -стимулированная продукция цитокинов ФСК.....	44
3.2. Влияния модуляторов метилирования ДНК на продукцию ФСК про- и противовоспалительных цитокинов.....	50
3.3. Влияние метилирующих и гипометилирующих агентов на систему RANKL/остеопротегерин ФСК больных РА.....	60
3.4. Оценка влияния модуляторов метилирования ДНК на уровень инвазивной и миграционной способности ФСК <i>in vitro</i> .....	64
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....</b>	<b>67</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>77</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>79</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>79</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>83</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Ревматоидный артрит (РА) является хроническим аутоиммунным заболеванием и характеризуется развитием полиартрита с преимущественным поражением мелких суставов. Распространённость РА среди взрослого населения в разных странах колеблется от 0,5 до 2% [177].

РА ассоциирован с повышением риска ряда нежелательных исходов:

- Нарушение физической функции и развитие инвалидности, около 40% больных РА становятся инвалидами в течение 10 лет после постановки диагноза [48].
- У пациентов с РА регистрируются снижение показателей физических и психических доменов качества жизни [131].
- Проведение операции по замене сустава, необходимость эндопротезирования суставов возникает у 25 % больных РА в течение 20 лет после начала болезни [203].
- Развитие полиморбидности. РА является независимым фактором риска возникновения ряда других хронических заболеваний – сердечно-сосудистой патологии [10], болезней легких [18], психиатрических болезней [129], остеопоротических переломов [205] и некоторых злокачественных новообразований (лимфома, рак легкого, немеланомный рак кожи) [173].
- Преждевременная смертность. РА приводит к снижению выживаемости вследствие повышенной частоты сердечно-сосудистых заболеваний, болезней легких и злокачественных опухолей [52].

Распространенность РА и разнообразие его осложнений определяют большое экономическое влияние этого заболевания на общество. Так,

показано, что общие ежегодные расходы, связанные с РА, превышают в США 39 миллиардов долларов [15].

В последние десятилетия были достигнуты определенные успехи в терапии РА, появились новые классы эффективных препаратов – моноклональные антитела к TNF $\alpha$  и IL-6, низкомолекулярные ингибиторы янус-киназ. Тем не менее, проблема лечения РА далека от решения. Около 90% пациентов в течение 10 лет прекращают прием генно-инженерных препаратов из-за развития побочных эффектов и из-за отсутствия эффективности [115]. Десятилетние наблюдения за больными РА до и после появления в клинической практике новых классов препаратов показали, что частота нарушений функции суставов и частота общей смертности не изменились [67]. Кроме того, за последние 20 лет распространенность инвалидности, вызванной РА, продолжает расти, несмотря на уменьшение активности болезни с помощью современных препаратов [144]. Неудовлетворительные результаты терапии РА обуславливают необходимость поиска новых подходов к лечению.

Одним из таких подходов может быть таргетная терапия, направленная на определенный тип клеток, принимающих участие в патогенезе РА [46].

Воспаление при РА локализовано преимущественно в синовиальной оболочке суставов. Клеточный ансамбль воспаления при РА характеризуется выраженной гетерогенностью, описано несколько морфологических вариантов синовита [162]. Общей чертой, характерной для всех субтипов синовита при РА, является активация и пролиферация фибробластоподобных синовиальных клеток (ФСК). ФСК - доминирующая популяция клеток в гиперплазированной ревматоидной синовии и в месте инвазии синовиальной оболочки в хрящевую и костную ткань. Традиционно ФСК больных РА считались эффекторами, опосредующими разрушение хряща. Данные последнего десятилетия указывают на то, что ФСК выполняют функции клеток врожденного иммунитета и могут быть первым

типом клеток, реагирующим на аутоантиген при раннем или доклиническом РА [58].

В настоящее время показано, что ФСК играют ключевую роль в поддержании воспаления и деструкции суставов [12]. Синовиоциты больных РА отличаются от синовиоцитов здоровых людей и больных остеоартритом рядом особенностей [80]:

- Автономностью функционирования (для активации ФСК не обязательны экстраклеточные сигналы).
- Способностью к инвазивному росту, сохраняющемуся после ряда пассажей в культуре [143].
- Способностью к миграции в различные, в том числе интактные суставы, лежащей в основе полиартикулярного поражения при РА [111].

Активированные цитокинами ФСК являются основным источником провоспалительных медиаторов, металлопротеиназ, других биологически активных веществ, принимают участие в деструкции хрящевой и костной ткани, способствуют миграции и пролиферации в синовиальной оболочке антигенпрезентирующих клеток, субпопуляций Т и В-лимфоцитов, нейтрофилов, NK - клеток, участвуют в ангиогенезе [80].

Вовлеченность ФСК в патогенез РА на всех этапах заболевания, преобладание этого типа клеток в воспаленном синовии, определяют перспективу поиска новых вмешательств, направленных на изменение фенотипа ФСК. Существует ряд потенциальных мишеней, с помощью которых возможно модулирование свойств ФСК - поверхностные молекулы, внутриклеточные сигнальные пути, гистоны, ДНК, микро РНК и тд.

Свойства ФСК больных РА позволяют предположить, что эффективных результатов можно достичь с помощью воздействия на эпигеном этих клеток. Показано, что ФСК больных РА характеризуются стабильным, возникающим *in vivo* и сохраняющимся после неоднократных пассажей *in vitro* фенотипом, обусловленным тотальным

гипометилированием ДНК, сопоставимым по выраженности с гипометилированием ДНК в опухолевых клетках [94].

К числу веществ, усиливающих метилирование ДНК, относится донатор метиловой группы адеметионин - S-аденозилметионин (SAdMe) [163]. Одним из деметилирующих ДНК препаратов, воздействующих на ДНК - метилтрансферазы, является препарат гидралазин, оказывающий противоопухолевое действие в некоторых экспериментальных моделях [8]. Исследования, изучавшие влияние модуляторов метилирования ДНК на свойства ФСК больных РА, малочисленны. В работе Neidhart et al было показано, что SAdMe в сочетании с дименазин ацетуратом уменьшает провоспалительные и инвазивные свойства ФСК пациентов с РА [147]. Действие других модуляторов метилирования ДНК на ФСК не исследовалось.

Ряд препаратов растительного происхождения могут влиять на метилирование ДНК различных типов клеток. В частности, биофлавоноид сои генистеин в зависимости от экспериментальной модели повышает или понижает метилирование ДНК [132]. Эффективность генистеина показана при коллаген-индуцированном артрите у мышей [77]. Влияние генистеина на ФСК больных РА не изучалось.

Сведения о распространенности РА, большое число его неблагоприятных исходов, неудовлетворительные результаты современной терапии, понимание ключевой роли ФСК в патогенезе этого заболевания, небольшое число данных об эпигенетических изменениях в ФСК при РА обуславливают актуальность темы исследования и определяют ее цель и задачи.

### **Цель исследования**

Изучить влияние веществ, модулирующих метилирование ДНК, на функциональные свойства фибробластоподобных синовиальных клеток

больных РА и обосновать возможность клинического применения этой группы соединений.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Изучить уровень спонтанной и стимулированной продукции про- и противовоспалительных цитокинов, остеопротегерина, RANKL, GM-CSF ФСК больных РА в культуре *in vitro*.
2. Оценить действие метилирующих и гипометилирующих агентов на спонтанную и IL-1 $\beta$  индуцированную продукцию ФСК больных РА про- и противовоспалительных цитокинов.
3. Изучить влияние модуляторов метилирования ДНК на синтез RANKL и остеопротегерина в культурах ФСК больных РА
4. Оценить действие модуляторов метилирования ДНК на инвазивную и миграционную способность ФСК *in vitro*.

### **Научная новизна**

Впервые выявлено, что синтез синовиальными фибробластами провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-17, IL-18) снижался только при добавлении в культуры донатора метильных групп SAdMe в определенных дозах. Деметилиатор гидралазин практически не менял синтез цитокинов, а генистеин в некоторых дозах снижал продукцию IL-6 и IL-17. Модуляторы метилирования ДНК не влияли на продукцию клетками ФСК противовоспалительного цитокина IL-10, за исключением генистеина, внесение которого в культуры в средней дозировке снижало продукцию цитокина.

Впервые показано, что метилирующее ДНК соединение SAdMe и биофлавоноид сои генистеин снижают продукцию остеопротегерина и



RANKL в культуре ФСК. Впервые выявлено, что SAME усиливает синтез GM-CSF в культурах ФСК больных РА. Впервые установлено, что 40-45% ФСК больных РА в культуре способны к миграции и инвазии, внесение в культуры метилирующих и деметилирующих соединений уменьшают их миграционную и инвазивную активность.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость работы заключается в получении новых знаний о патогенезе РА на основе оценки характеристик провоспалительного потенциала стромальных клеточных элементов синовиальной оболочки больных РА - фибробластоподобных синовиальных клеток, их способности продуцировать спонтанно и при стимуляции IL-1 $\beta$  провоспалительные цитокины в высокой концентрации, остеопротегерин и RANKL. Эти патогенетические нарушения обратимы после действия донатора метиловой группы SAME и генистеина, которые способны влиять на эпигеном ФСК. Полученные данные раскрывают новые механизмы стойкой провоспалительной активности ФСК, обусловленные гипометилированием ДНК.

Изучен обратимый механизм прогрессии РА и вовлечения в процесс интактных суставов, обусловленный способностью ФСК к миграции и инвазии через коллагеновую мембрану, которая существенно снижается под влиянием модуляторов метилирования ДНК. Показано, что 45-50% ФСК могут участвовать в процессах миграции и инвазии.

Практическое значение работы заключается в том, что ФСК больных РА могут быть мишенью для таргетной терапии, а культура ФСК моделью доклинического скрининга новых лекарственных препаратов для лечения РА. Возможность эффективного скрининга продемонстрирована в работе на примере использования метилирующего соединения SAME и генистеина,

обладающих противовоспалительными свойствами, снижающие процессы миграции и инвазии клеток.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. ФСК больных РА в культуре *in vitro* обладают спонтанной и IL-1 $\beta$  индуцированной провоспалительной активностью, способностью продуцировать остеопротегерин и RANKL, высоким уровнем миграции и инвазии.

2. Внесение в культуры ФСК метилирующих соединений приводит к уменьшению синтеза провоспалительных цитокинов, остеопротегерина и RANKL, увеличению уровня GM-CSF, уменьшению миграционной и инвазивной активности ФСК.

### **Методология и методы исследования**

Диссертационная работа базировалась на исследованиях *in vitro*, которые включали: получение первичной культуры из эксплантата, субкультивирование культуры ФСК, оценка клеточных реакций на добавление модуляторов метилирования ДНК (изменение синтеза цитокинов, влияние на миграционные и инвазивные способности ФСК).

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов и выводов. Материал изложен на 111 страницах машинописного текста, включающего 4 таблицы 31 рисунков и 2 микрофотографии. Прилагаемая библиография содержит ссылки на 214 литературных источников, в том числе 210 иностранных.

Работа выполнена в лаборатории клинической иммунофармакологии НИИФКИ СО РАМН (заведующий лабораторией – доктор медицинских

наук Ширинский И.В.).

Автор благодарит сотрудников отделения эндопротезирования и эндоскопической хирургии суставов ФГБУ “ННИИТО им. Я.Л.Цивьяна” Минздрава России, старших медицинских сестер ФГБУ “ННИИТО им. Я.Л.Цивьяна” Минздрава России Корниенко Г. В. и Слюсарь Е. В. за помощь в предоставлении материалов исследования.

### **Апробация материалов диссертации**

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» (Новосибирск, 2015 г), на Объединённом иммунологическом форуме (Новосибирск, 2019 г). Апробация диссертации состоялась 13.05.2021 г. на семинаре клинического отдела ФГБНУ НИИ фундаментальной и клинической иммунологии.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, включая 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ.

### **Степень достоверности, апробация результатов и личное участие автора**

Достоверность полученных результатов подтверждается продуманным дизайном исследования, использованием современных иммунологических методов с автоматизированной оценкой результатов и адекватных методов статистической обработки. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии

в Сибири» (Новосибирск, 2015 г), на Объединённом иммунологическом форуме (Новосибирск, 2019 г).

Автор участвовал в разработке идеи исследования и дизайна всех экспериментов. Результаты, представленные в работе, получены автором лично, либо при непосредственном его участии на базе лаборатории клинической иммунофармакологии НИИФКИ. Автор проводил выделение ФСК из синовиальной ткани больных РА полученной во время операции эндопротезирования коленного или тазобедренного суставов, культивирование ФСК путем адгезии на пластике до 3-7 пассажей, стимуляцию синовиальных фибробластов ИЛ-1 $\beta$ , инкубацию ФСК с модуляторами метилирования ДНК, иммуноферментный анализ, подготовку и проведение исследования клеточной миграции и инвазии ФСК с помощью модифицированных камер Бойдена. Автор лично заполнял все протоколы исследования и проводил статистическую обработку полученных результатов.

## **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫЕ СИНОВИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ – МИШЕНЬ ТЕРАПИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА**

### **1.1. Роль стромальных клеток в патогенезе ревматоидного артрита (РА)**

#### **1.1.1. Общие представления о строении синовиальной оболочки суставов у здоровых людей и больных РА**

Под термином синовиальная оболочка (СО) следует понимать весь лежащий внутри от фиброзной капсулы и ограничивающий полость сустава пласт соединительной ткани, состоящей из клеток и основного вещества и содержащий кровеносные и лимфатические сосуды, нервные волокна и окончания [2]. Этот соединительнотканый пласт не покрыт эпителием и не имеет ограничительной базальной мембраны. Он выстилает все внутрисуставные структуры, кроме контактирующих между собой суставных хрящей. Покровный слой содержит примерно равные пропорции клеток двух различных типов: клетки типа А или макрофагоподобные синовиальные клетки и клетки типа В или фибробластоподобные синовиальные клетки (ФСК) [85].

Последние ответственны за синтез внеклеточных матриксных белков, включая коллагены, фибронектин, гиалуроновую кислоту и другие молекулы, которые облегчают смазывание и скольжение поверхностей хряща [2]. Клетки типа А являются фагоцитирующими клетками и экспрессируют маркеры, характерные для клеток системы мононуклеарных фагоцитов (CD11b, CD68, CD14, CD163, MСН II) [49,12]. При электронной микроскопии регистрируются пищеварительные вакуоли, указывающие на их фагоцитарную активность [128].

При РА в синовиальной оболочке многократно повышается содержание резидентных клеток и клеток-мигрантов [75]. Повышение количества синовиоцитов типа А и В увеличивает толщину покровного слоя, а иммунокомпетентные клетки (Т и В-лимфоциты, дендритные клетки, плазмоциты, NK-клетки) распределяются в субсиновиальном слое диффузно или организуются в лимфоидные агрегаты [101,212]. В инфильтратах преобладают CD4+Т-клетки, в основном представленные клетками памяти CD45RO+ и обладающие хемокиновыми рецепторами CXCR3 CCR5, характерными для Th1 клеток. У 15-20% пациентов выявляются структуры, типичные для вторичных лимфоидных фолликулов [55,187]. Следует отметить, что Т и В-клеточные инфильтраты не специфичны для РА и встречаются при других хронических воспалительных заболеваниях суставов.

ФСК являются доминирующей популяцией клеток в гиперплазированном ревматоидном синовии (паннус) и в месте инвазии синовиальной оболочки в хрящевую и костную ткань. ФСК представляют собой уникальный тип клеток, который отличает ревматоидный артрит от других воспалительных заболеваний суставов и СО здоровых людей [80]. Активированные цитокинами ФСК являются главным источником провоспалительных медиаторов и металлопротеиназ при РА, принимая участие в деструкции хрящевой и костной ткани, миграции и пролиферации в СО антигенпрезентирующих клеток, субпопуляций Т и В-лимфоцитов, нейтрофилов, NK-клеток, ангиогенезе. Кратко рассмотрим эти процессы.

В разрушении внеклеточного матрикса хряща участвуют различные ферменты, секретируемые в первую очередь ФСК: коллагеназы, желатиназы, агрекиназы, стромелизин; сериновые протеазы (трипсин, химотрипсин), катепсины, металлопротеиназы (ММР) [55]. В пораженном суставе присутствуют также ингибиторы протеаз, однако их активность подавляется массивным синтезом деградирующих ферментов [21,68]. Таким

образом, относительный баланс между уровнем протеаз и антипротеаз в СО больных РА нарушается и может быть стабилизирован приемом болезнью-модифицирующих препаратов [37,200]. Если главными клетками эффекторами деструкции матрикса хряща являются ФСК, хондроциты, нейтрофилы, то разрушение костной ткани происходит с участием в первую очередь остеокластов, которые накапливаются в субхондральном костном мозге и в зоне контакта паннуса и кости [164,24,64]. Резорбция кости осуществляется в субсистеме клеточных лиганд-рецепторных взаимодействий, в которых роль рецептора выполняет рецептор активатор NFkB (RANK), экспрессирующийся остеокластами, а роль лиганда – RANKL [20,185,60]. RANKL относится к семейству факторов некроза опухоли, экспрессируется на поверхности остеобластов, стромальных клеток костного мозга, ФСК, а также секретируется активированными Т-клетками при стимуляции провоспалительными цитокинами (TNF, IL-1, IL-17) [168,38]. Антагонистом субсистемы RANK-RANKL является растворимый рецептор – «ловушка» остеопротегерин (OPG), который связывает RANKL [209,109].

Провоспалительный потенциал СО больных РА обусловлен активностью макрофагов и ФСК, являющихся источником синтеза разнообразных цитокинов [9,56], в меньшей степени субпопуляций Т и В-лимфоцитов. Следует отметить, что содержание «классических» цитокинов профиля Th1 и Th2 (IFN, IL-2 и IL-4, IL-10) в синовиальной оболочке больных РА невысокое [54,84,196]. В СО пораженных суставов определяют Т-клеточные цитокины, усиливающие дифференцировку Th1 лимфоцитов и поддерживающие воспаление (IL-12 и IL-17) [169,47]. В синовиальной жидкости и ткани больных РА обнаруживают многочисленные провоспалительные цитокины (IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-32), GM-CSF и множество хемокинов, синтезируемых преимущественно активированными А-клетками и ФСК [172]. Цитокины участвуют в

аутокринной и паракринной регуляции активности различных клеток, усиливая персистенцию воспаления в синовиальной оболочке, способствуя разрушению хряща и кости. Потенциально воспаление СО может быть лимитировано влиянием противовоспалительных цитокинов (IL-10, TGFb), действием растворимых рецепторов цитокинов, антител к цитокинам, однако их локальные концентрации ниже необходимых для подавления воспаления [172].

Важная роль в формировании паннуса у больных РА принадлежит нарушениям механизмов апоптоза. Физиологической гиперплазии ткани и пролиферации клеток в процессе иммунного ответа обычно противодействует запрограммированная смерть клеток, или апоптоз, который предотвращает избыточное накопление клеточных популяций. Однако в гиперплазированной СО больных РА присутствуют относительно немного клеток в состоянии апоптоза, несмотря на наличие таких мощных стимулов смерти клетки, как гипоксия и TNF- $\alpha$ . Происходит активное подавление апоптоза, обусловленное избытком антиапоптотических молекул, которые вырабатываются ФСК [12,103,150]. Напомним, что существуют два основных пути апоптоза в клетке: митохондриальный и путь через рецепторы апоптоза [65,123].

Bcl-2 регулирует клеточную смерть, контролируя проницаемость митохондриальной мембраны. Bcl-2 в значительном количестве экспрессируются в синовиальной оболочке больных РА [133,159]. IL-15 - цитокин с плеiotропным действием на клетки врожденного и адаптивного иммунитета, увеличивает уровни экспрессии мРНК Bcl-2 и Bcl-XL. Блокада IL-15 увеличивает апоптоз в ФСК и одновременно подавляет экспрессию Bcl-2 [103,107]. Bcl-2 оказывает антиапоптогенный эффект на уровне митохондрий, тем самым способствуя пролиферативным процессам в синовиальной оболочке у больных РА.



Обсуждается нарушение апоптоза синовиоцитов у больных РА, связанное с геном супрессором опухолей p53 [181,207,3]. Продукт p53 гена ответственен за целостность генома, участвуя в репарации ДНК, делении клеток и клеточную смерть. В клетках ревматоидной синовиальной оболочки экспрессия p53 повышена, вероятно, вследствие разрушительного влияния токсических факторов микросреды воспаленного сустава на ДНК [59].

Необходимо отметить, что культуры ФСК больных РА *in vitro*, их свойства не являются той моделью, которая полностью отражает всю сложность клеточных взаимодействий в СО больных РА. Об этих ограничениях всегда следует помнить, используя культуры ФСК для решения тех или иных задач.

### **1.1.2. Синовиальный фибробласт – основная клетка, участвующая в развитии воспаления и его исходов у больных РА**

Начиная с 40х годов 20 века, когда Э. Ваалером и Х. Роуз был открыт ревматоидный фактор, доминирующая теория патогенеза РА основывалась на развитии иммунного ответа к аутоантигенам. Согласно этой теории, первым этапом развития РА является возникновение аутоиммунитета, за которым следует стадия хронического воспаления. Хроническое воспаление вызывает пролиферацию и активацию ФСК, обладающих способностью разрушать хрящ и субхондральную кость, приводя к деструкции суставов. Однако в начале 21 столетия возникла альтернативная гипотеза, утверждающая, что антиген-специфическая стимуляция не обязательна для возникновения РА. В пользу этой гипотезы свидетельствовало незначительное содержание Т-клеточных цитокинов в синовиальной жидкости больных РА, преобладание медиаторов ФСК и макрофагов [35,58,113] и отсутствие эффекта от анти - CD4 терапии [34,35]. В настоящее время обе теории не считаются взаимоисключающими (Рисунок 1).

В соответствии с современными представлениями, активация ФСК происходит уже в стадию инициации РА и может предшествовать развитию адаптивного иммунного ответа [58]. Более того, на моделях у мышей показана способность ФСК приводить к развитию артрита без участия клеток иммунной системы [113]. Таким образом, синовиальные фибробласты (СФ) при РА обладают разнообразными функциями, а не являются исключительно клетками-эффекторами.



**Рисунок 1.** Роль клеток стромы и клеток иммунной системы в возникновении и развитии РА

Каковы механизмы участия ФСК в инициации и развитии раннего РА и поддержании воспаления при РА на поздних стадиях? Во-первых, ФСК выполняют ряд функций клеток врожденного иммунитета. Во-вторых, ФСК взаимодействуют с другими клетками иммунной системы.

Об участии ФСК в реакциях врожденного иммунитета свидетельствует экспрессия этими клетками различных образ-распознающих рецепторов, взаимодействующих с патогенами и продуктами деградации тканей сустава. В частности, на мембране СФ показано повышение экспрессии Toll-like рецепторов (TLR) 1–7 типов [156,30]. Лигандами TLR3 и TLR7 является двух- и одноцепочечная РНК. Также в

СФ выявляются цитозольные образ-распознающие рецепторы RIG-I и MDA5, активируемые двухцепочечной ДНК [30]. Предполагается, что при РА некротизированные клетки синовиальной жидкости являются источником эндогенных лигандов, приводящих к активации TLR3-опосредованных сигнальных путей [23]. Помимо этого, TLR2 и TLR4 активируются бактериальными липопротеинами и, в тоже время, могут реагировать на ряд эндогенных лигандов, содержание которых повышено в синовиальной жидкости больных РА [153,102,72,79,39].

Основной мишенью приобретенного аутоиммунного ответа при РА являются цитруллинированные пептиды, которые способны активировать и клетки врожденного иммунитета, включая ФСК. Посттрансляционная трансформация белка-лиганда, в частности цитруллинирование, усиливает активацию TLR, а для некоторых белков является необходимым условием успешной активации TLR. Так, цитруллинированный виментин активирует пролиферацию ФСК и экспрессию на них RANKL, у нативного виментина эти свойства отсутствуют [53]. Цитруллинирование фибриногена повышает его способность активировать ФСК [166]. Активационные свойства свободных гистонов в отношении TLR2 и TLR4 также усиливаются в результате цитруллинирования [178].

В последние годы показано, что важную роль в передаче информации между клетками играют малые экстраклеточные везикулы диаметром 30-100 нм, или экзосомы. Экзосомы принимают участие в патогенезе ряда заболеваний суставов, включая РА [119]. В экзосомах синовиальной жидкости больных РА, ОА и реактивным артритом было продемонстрировано повышенное содержание цитруллинированных пептидов, что указывает на роль внеклеточных везикул в переносе этих пептидов к различным клеткам [176]. Хотя отличий в содержании экзосом у больных РА, ОА и реактивным артритом выявлено не было, цитруллинированные  $\alpha$ 2-макрглобулин, IgG1  $\gamma$ -цепь и фибронектин определяются только у больных РА [176]. Показано, что ФСК продуцируют

провоспалительные медиаторы в ответ на инкубацию с внеклеточными везикулами [13,135,90]. Таким образом, данные этих исследований подтверждает способность экзосом, содержащих цитруллинированные пептиды, активировать ФСК, воздействуя на TLR.

Внеклеточные нейтрофильные ловушки (Neutrophil Extracellular Traps, NET) образуются в результате программируемой клеточной гибели нейтрофилов (нетоза). Роль нетоза в развитии аутоиммунных заболеваний в настоящее время является предметом интенсивного изучения [120]. Показано, что NET могут быть интернализованы ФСК после взаимодействия с рецепторами продвинутых продуктов гликирования (RAGE) и TLR9 [29]. Интернализация NET приводит к повышению экспрессии МНС класса II на ФСК и презентации этими клетками цитруллинированных пептидов антиген-специфичным Т-лимфоцитам. Инъекции гуманизированным HLA-DRB\*04:01 трансгенным мышам ФСК, содержащих NET, приводит к формированию аутоантител к цитрулинированным гистонам H3 и H4 и цитрулинированной миелопероксидазе NET. Эти данные свидетельствуют об эффективности презентации антигена ФСК [29]. В других работах было показано, что ФСК экспрессируют МНС II и способны презентировать различные артритогенные антигены Т лимфоцитам [190] *in vivo* и *in vitro* [214].

Активация TLR на поверхности ФСК индуцирует продукцию цитокинов, хемокинов и матриксных металлопротеиназ [88,160]. Вызванное активацией TLR3 повышение синтеза ФСК фактора активации В-клеток (BAFF) и лиганда, индуцированного пролиферацией (APRIL) усиливает синтез антител В-лимфоцитами [16]. Важной особенностью активации ФСК, отличающей их от макрофагов, является экспоненциальное усиление активационного сигнала при взаимодействии лигандов с образ-распознающими рецепторами на ФСК. Это усиление происходит за счет того, что стимуляция одного типа образ-распознающих рецепторов приводит к стимуляции рецепторов другого типа. Так, при активации TLR3

на ФСК дополнительно активируются TLR2 и цитоплазматические NOD1 и NOD2, являющиеся сенсорами бактериальных продуктов [155,211]. Активация NOD1, в свою очередь, приводит к активации TLR2 и TLR4 [211]. В отличие от макрофагов, продукция провоспалительных цитокинов ФСК не уменьшается после повторной стимуляции TLRs [211]. Эти свойства ФСК обуславливают их высокий провоспалительный потенциал.

К активации СФ также могут приводить ряд других стимулов – различные цитокины, ростовые факторы [112] и адипокины [50,19,134].

ФСК и Т-лимфоциты обмениваются информацией с помощью растворимых медиаторов и контактных межклеточных взаимодействий, что приводит, как правило, к взаимной стимуляции. Совместная инкубация ФСК и Т-лимфоцитов усиливает продукцию Т-лимфоцитами IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-17 [137,33] за счет активации внутриклеточных сигнальных путей мембранного IL-15 [137] и CD40 [33]. СФ также поддерживают Т-лимфоциты в G0/G1 фазе клеточного цикла и способствуют их выживанию [89,170]. Контактные взаимодействия между СФ и Т-лимфоцитами опосредованы рядом пар лигандов/рецепторов [154] (Табл. 1).

**Таблица 1**

Рецепторы и их лиганды на поверхности ФСК и Т-лимфоцитов

Молекула на поверхности Т-лимфоцита	Молекула на поверхности ФСК
ТКР	МНС II
LFA-1	ICAM-1
CD2	LFA-3
CD6	ALCAM
VLA-4	VCAM-1
CD40L	CD40
Мембранная форма TNF	TNFR1/2

В процессах инфильтрации и хоминга Т-лимфоцитов в воспаленном синовии принимают участие поверхностные молекулы VLA-4 и VCAM-1. Взаимодействие LFA-1/ICAM-1, LFA-3/CD2 и ALCAM/CD166 стимулирует презентацию антигена и активацию Т-лимфоцитов [106,140,73]. Связывание LFA-1/ICAM-1 снижает порог активации Т-лимфоцитов при презентации антигена, в результате чего Т-лимфоциты могут активироваться одним антигеном без ко-стимуляции [25]. Презентация суперантигена вместе с ICAM-1 в выраженной степени ингибирует продукцию IL-10 Т-лимфоцитами, что способствует поддержанию иммунного ответа [108].

Т-лимфоциты также способны модулировать функции ФСК. Ко-культивирование СФ и Т-лимфоцитов приводит к повышению синтеза IL-6 и IL-8 в СФ [137,206,191]. Блокада TNF уменьшает стимулирующее действие ФСК на Т-лимфоциты, вероятно, вследствие ингибирования мембран-связанного TNF, т.к. в изучаемых культурах растворимый TNF не выявлялся [191].

ФСК играют важную роль в формировании и поддержании эктопических лимфоидных структур в синовиальной оболочке. У больных РА выделяют три типа гистологических изменений в синовиальной ткани. Фиброидный тип характеризуется незначительной инфильтрацией клеток иммунной системы, при миелоидном типе наблюдается диффузная инфильтрация преимущественно моноцитами/макрофагами, для лимфоидного типа характерно наличие эктопических лимфоидных структур (ЭЛС), состоящих из агрегатов Т- и В-лимфоцитов [16,162]. О важной роли ЭЛС в патогенезе РА свидетельствует локальная продукция аутоантител в ЭЛС [81,167]. Медиаторы, синтезируемые СФ, способствуют формированию и функционированию ЭЛС. Так, ФСК больных РА продуцируют повышенное количество CCL19, CCL21, RANKL и IL-7, от которых зависит функционирование ЭЛС [17]. Также СФ способствуют хомингу и выживанию плазматических клеток в ЭЛС благодаря продукции CXCL12, BAFF и APRIL [16,152].

ФСК находятся в тесной взаимосвязи с моноцитами/макрофагами. Эта взаимосвязь опосредована синтезом СФ ряда хемокинов и гематопоэтических факторов, способствующих миграции и активации макрофагов-моноцитарного хемоаттрактантного протеина 1 (MCP-1) [88], макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) [88], IL-34 [82] и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) [114].

Таким образом, ФСК принимают активное участие в развитии врожденного и адаптивного иммунного ответа, индукции и поддержании воспаления, деструкции суставов при РА. Следует помнить, что ФСК являются основной клеткой, входящей в состав особой грануляционной ткани -паннус, который неизбежно появляется в пораженных суставах больных после 8-12 месяцев течения болезни независимо от проводимой терапии. Паннус сопровождает больного всю жизнь, способствует деструкции хряща и кости, деформации и дефигурации суставов. Описанные свойства ФСК позволяют расценивать их как одну из перспективных мишеней для терапии РА, а культуры ФСК - как информативную модель для скрининга *in vitro* лекарств-кандидатов для терапии РА.

## **1.2. Использование культуры ФСК в качестве модели доклинического скрининга *in vitro* лекарств-кандидатов для терапии РА.**

### **1.2.1. Морфология, фенотип, функциональные свойства культуры ФСК**

При световой микроскопии ФСК в культуре представляют собой удлинённые, иногда овальные или полигональные клетки, с небольшим количеством цитоплазматических отростков, хорошо выраженным ядром. Редко, клетки имеют древовидную или звездчатую форму. При электронной

микроскопии, ФСК содержат большое количество эндоплазматического ретикулума, отсутствуют пищеварительные вакуоли [165].

Гетерогенная природа ФСК в культуре усложняет определение точного фенотипа. Его идентифицируют по наличию типичной морфологии и ультраструктуры, отсутствию макрофагальных маркёров, таких как CD14 и CD68, а также неспособностью поглощать частички латекса [26]. ФСК являются мезенхимальными клетками, которые обладают признаками фибробластов, включая экспрессию виментина и CD90 (Thy-1), а также продукцию IV и V типов коллагена [55,57]. Но помимо этого ФСК обладают рядом уникальных свойств *in situ*, которые отличают их от многих других клеточных линий фибробластов. Относительно специфическими маркерами ФСК, являются васкулярно клеточные адгезивные молекулы (VCAM-1) [141], CD55 (белковый регулятор C3/C5-конвертазы) [69], а также уридин дифосфоглюкозо-дегидрогеназа (UDPGD) [161]. Специфической адгезивной молекулой, экспрессируемой ФСК, является кадгерин-11, отвечающий за формирование синовиальной выстилки, и способствующий разрушению хряща [194,110].

ФСК пролиферируют в культуре прилипших клеток и скорость пролиферации увеличивается под действием фактора роста тромбоцитов (PDGF), трансформирующего ростового фактора (TGF- $\beta$ ). Умеренный пролиферативный эффект наблюдается также после воздействия TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  [6]. Эти цитокины усиливают синтез ФСК простагландина E2 [43,130], продукцию IL-6, IL-8, GM-CSF, матриксных металлопротеиназ MMP-1, MMP-3 [5], экспрессию молекул адгезии, а именно VCAM-1, ICAM-1, интегринов [55,57].



### **1.2.2. Особенности фибробластоподобных синовиальных клеток больных РА в культуре *in vitro***

Использование ФСК вне организма для изучения патогенеза ревматоидного артрита является логическим продолжением метода биопсии, при котором изъятый из организма фрагмент ткани подвергается немедленному, преимущественно морфологическому, исследованию. Благодаря длительному культивированию возможности исследования расширяются практически беспредельно, так как становится реальной оценка не только морфологических и биохимических изменений, но и изменений в поведении клеток, их реакций на различные агенты, в том числе на воздействия лекарств.

Преимущества изучения ФСК *in vitro*:

1. Они сохраняют важнейшие черты, свойственные этим клеткам в организме; более того, они сохраняют онтогенетические индивидуально-генотипические свойства организма-донора;
2. Изучение культивированных *in vitro* ФСК дает возможность понять механизмы сигнальной трансдукции, выделения медиаторов, пролиферации и апоптоза [165];
3. Изменения, которые претерпевают ФСК культуре *ex vivo*, легко контролируются путем создания соответствующих условий.

### **1.2.3. Влияние препаратов для терапии РА на ФСК *in vitro***

Большинство препаратов, одобренных для лечения РА, непосредственно не нацелены на изменение функций ФСК. Синтетические болезнь-модифицирующие препараты и биологическая терапия фокусируются на ингибировании активации иммунных клеток или воспалительных цитокинов. Применение препаратов этих групп, вероятно,

снижает воспалительный потенциал ФСК, но не напрямую, а опосредованно, путем модуляции регуляторных цитокинов синтезируемых активированными лимфоцитами, фагоцитирующими клетками. Поэтому здесь мы лишь кратко коснемся описания влияния препаратов из группы DMARDs и биологических агентов на некоторые функции ФСК, поскольку такие исследования не многочисленны.

Класс DMARDs представлен (основные метотрексат, лефлуномид, сульфасалазин, аминохинолиновые препараты), их противовоспалительное действие реализуется влиянием на разные клетки-мишени, в том числе ФСК, через различные механизмы. Обобщая данные литературы, следует отметить, что влияние перечисленных препаратов приводит в целом к ингибированию активности ревматоидных ФСК по выработке провоспалительных цитокинов и разрушающих матрикс ферментов, что способствует достижению клинического эффекта [66,40,44,179,14,124,11,136,98,198,125,28,22].

При анализе данных о действии биологических препаратов на ФСК больных РА заслуживает внимания работа Noack et al [151]. Авторы использовали моноклеарные клетки периферической крови, культивированные совместно с синовиоцитами больных РА, а затем к культурам добавляли различные биопрепараты (Инфликсимаб, Этанерцепт, Адалимумаб, Тоцилизумаб, Абатацепт и Ритуксимаб) по отдельности или в комбинации с метилпреднизолоном. Добавление стероидов в кокультуры подавляло продукцию и провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Продукция IL-17 была ингибирована только Тоцилизумабом, в то время как IL-6 был снижен только Инфликсимабом. Уровень IL-1 $\beta$  был снижен во всех условиях. Продукция IFN $\gamma$  в основном снижалась при добавлении инфликсимаба, а IL-10 при добавлении инфликсимаба с тоцилизумабом. Противовоспалительный эффект биопрепаратов зависел от механизмов их действия. Сочетание метилпреднизолона и биотерапии не усиливало ингибирующего действия на провоспалительные цитокины, но

могло оказывать благоприятное действие за счет увеличения продукции IL-10 [151].

Несколько работ были посвящены действию на ФСК ингибиторов внутриклеточных «сигнальных» молекул – Янус-киназ (JAK). В исследовании, изучающем активность ФСК при РА, было показано, что барицитиниб подавляет IFN $\gamma$ -индуцированную инвазивность ФСК [92]. Diller и др. показали, что селективные ингибиторы JAK пефицитиниб и филготиниб снижали продукцию IL-6 ФСК активированными IL-1 $\beta$ . Более того, пефицитиниб был единственным ингибитором JAK, подавляющим пролиферацию активированных ФСК *in vitro* при концентрациях, хорошо переносимых доз *in vivo*. В отличие от филготиниба, пефицитиниб снижал миграцию ФСК без цитотоксичности или проапоптоза и без изменения клеточной адгезии [45].

Таким образом, современная противовоспалительная терапия РА направлена также на подавление провоспалительного потенциала ФСК.

В последние годы стремительно возрос интерес к ФСК как потенциальной терапевтической мишени при РА [1], обобщенный в обзоре Михайловой А.С. и Лесняк О.М. Обсуждаются возможности применения моноклональных антител к молекулам клеточной адгезии (кадгерин-11), IL-21, стимулирующему активность, пролиферацию, инвазию ФСК, фактору роста соединительной ткани, регулирующему гомеостаз хряща и пролиферацию ФСК, гену IEX-1, участвующему в регуляции апоптоза и пролиферации ФСК. Наиболее перспективным считается получение моноклональных антител к кадгерину-11, иницированы два клинических исследования 1 и 2 фаз оценки безопасности и эффективности этих антител у больных РА.

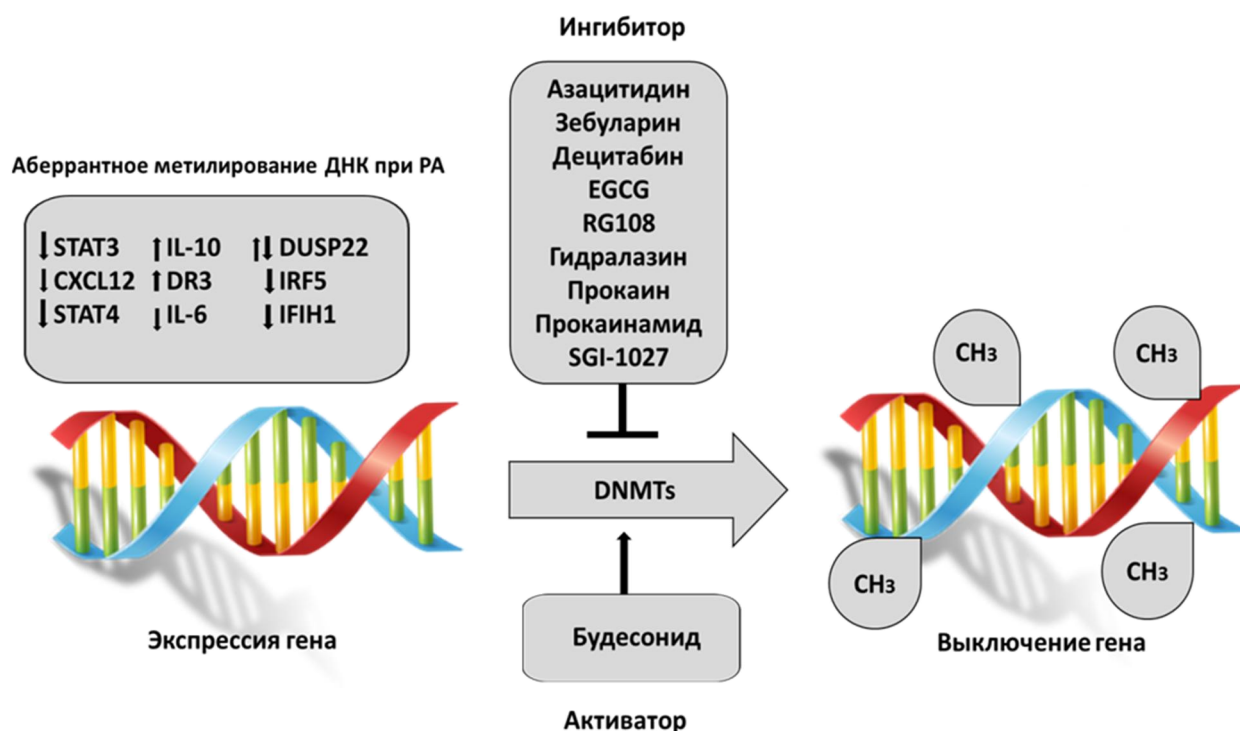
### **1.3. Стабильный фенотип ФСК больных РА как результат эпигенетических нарушений, возможности терапевтических воздействий**

Предполагается, что в основе стабильно измененного фенотипа ФСК лежат эпигенетические изменения [157], в частности нарушения метилирования ДНК [183].

#### **1.3.1. Роль метилирования ДНК в изменениях фенотипа ФСК**

Метилирование ДНК-эпигенетический механизм экспрессии генов, не затрагивающий последовательность ДНК [183]. Метилирование ДНК является наиболее часто изучаемой эпигенетической модификацией. Метилирование ДНК может быть стабильно унаследовано через множественные клеточные деления. Кроме того, метилирование ДНК является единственной эпигенетической модификацией, которая переживает процесс экстракции и очистки ДНК, даже три десятилетия хранения архивных образцов, в отличие от РНК или белков [105]. Метилирование ДНК индуцируется семейством ДНК-метилтрансфераз (DNA methyltransferases, DNMTs). DNMTs являются «эффекторами» метилирования ДНК и катализируют либо метилирование *de novo* (т.е. в новых сайтах), либо поддерживают метилирование полуметилированной ДНК после репликации ДНК. Утрата способности поддерживать метилирование ДНК или дерегуляция в уровнях метилирования ДНК может приводить к различным заболеваниям [36,183].

Метилирование ДНК-это процесс, при котором метильные группы (CH<sub>3</sub>) добавляются к цитозину в положении углерода 5. Добавление метильной группы в последовательность ДНК приводит к модификации структуры хроматина и, в конечном счете, к выключению гена (рис.2).



**Рисунок 2.** Потенциальный механизм дифференцированно метилированных генов при ревматоидном артрите регулируется различными препаратами влияющими на эпигеном. Метилирование ДНК осуществляется с помощью DNMTs. На DNMTs оказывают влияние различные эпигенетические препараты, либо ингибирующие, либо активирующие DNMTs, что в последствии приводит к модуляции экспрессии генов. Стрелка вниз указывает на гипометилированные гены (*STAT3*, *IL-6*, *CXCL12*, *DUSP22*, *STAT4*, *IRF5*, *IFIH1*), а стрелка вверх-на гиперметилированные гены (*DR3*, *IL-10*, *DUSP22*) при РА [36].

У людей метилирование ДНК в основном обнаружено в островках CpG. Островки CpG - это области с высокой частотой цитозин-фосфат-гуаниновых динуклеотидных сайтов (CpG). В геноме человека насчитывается около 30 000 CpG-островков. Важно отметить, что примерно 60-70% аннотированных промоторов генов связаны с CpG-островками и это позволяет предположить, что метилирование CpG-островков является важным компонентом регуляции экспрессии генов [78].

Показано, что ФСК больных РА характеризуются стабильным, возникающим *in vivo* и сохраняющимся после неоднократных пассажей *in*

vitro тотальным гипометилированием ДНК, сопоставимым по выраженности с гипометилированием ДНК в опухолевых клетках [94].

В исследовании Neidhart и его коллег была продемонстрирована повышенная экспрессия ретротранспозонов LINE-1 (длинных диспергированных нуклеотидных элементов-1) в клетках синовиальной оболочки больных РА, особенно в местах инвазии [148]. Ретротранспозоны - это мобильные последовательности ДНК, которые могут перемещаться внутри генома и при этом подавлять метилирование ДНК. Экспрессия LINE-1 элементов в ФСК индуцирует транскрипцию p38 $\delta$ , галектин-3 связывающего белка и met протоонкогена, демонстрируя, что наличие функциональной LINE-1 может вызывать изменения в экспрессии генов [148]. Гипотеза, что экспрессия LINE-1 в ФСК связана с потерей метилированных меток, была подтверждена исследованиями, показавшими, что геномная ДНК ФСК от больных РА была глобально гипометилирована по сравнению с ФСК при остеоартрите (ОФСК) или ФСК здоровых пациентов [94]. При этом в ОФСК уровень DNMT1 увеличивался в процессе пролиферации, обеспечивая тем самым полноценное восстановление метилирования в недавно синтезированной цепи ДНК, тогда как пролиферирующие ФСК больных РА характеризуются относительным недостатком DNMT1. Этот недостаток DNMT1 может привести к утрате метилирования в дочерних клетках, что с течением времени способствует прогрессивному преобразованию фенотипа ФСК в клетку с высоким провоспалительным потенциалом.

В некоторых исследованиях сообщалось о полиморфизме гипометилированных и гиперметилированных участков ДНК у больных РА. Так ряд промоторов специфических генов, играющих существенную роль в патогенезе РА, находится в состоянии гипометилирования. Продemonстрирована конститутивно повышенная экспрессия CXCL12 в РФСК за счет гипометилирования его промоторной области [96]. Высокие

уровни CXCL12, в свою очередь, стимулируют выработку ММР, ферментов, которые частично могут отвечать за деструктивное действие ФСК. Было показано, что у пациентов с РА, получавших блокаторы TNF- $\alpha$ , уровень CXCL12 оставался высоким и активность болезни сохранялась, в то время как после синовэктомии уровень CXCL12 значительно снижался [195,91]. Последние публикации показали, что деметилирование даже одного CpG-мотива в промоторах генов IL-6 [149,83] и IL-10 [61,122] коррелирует с их уровнем экспрессии, и, следовательно, способствует увеличению уровня цитокинов во время болезни.

В тоже время, в ФСК выявляются и гиперметилированные промоторы некоторых генов. Специфические CpG островки в промоторе гена рецептора смерти 3 (DR3) находились в состоянии гиперметилирования, обеспечивая устойчивость синовиальных клеток к апоптозу при РА [184].

Nakano и др. [146] продемонстрировали комплексный анализ метилирования ДНК в ФСК при РА, в котором было идентифицировано 1 859 различных метилированных локусов. Некоторые из гипометилированных локусов, важные для патогенеза РА, располагались в генах CHI3L1, CASP1, STAT3, MAP3K5, MEFV и WISP3. И наоборот, гены TGFB2 и FOXO1 были гиперметилированы. Как показал анализ регуляторных путей, абберрантно метилированные гены были вовлечены в миграцию клеток, адгезию, трансэндотелиальное проникновение и взаимодействие во внеклеточном матриксе [146].

Whitaker и др. описали метод, в котором объединили данные полногеномного поиска ассоциаций (GWAS), с исследованиями выявления ФСК при РА и ОА, а также исследование уровня метилирования ДНК ФСК при этих заболеваниях [201]. Результатом является идентификация так называемых «мульти-доказательных генов» ‘multievidence genes’ [201], которые затем могут быть индивидуально изучены в ФСК с целью понимания патогенеза РА. Первый мульти-доказательный ген, который был

обнаружен - ELMO1, кодирующий белок, участвующий в клеточной подвижности и поглощении, и чей промотор гиперметилован в ФСК при РА [201]. Ген LBN был идентифицирован как мульти-доказательный ген, выявлено гипометилирование его промотора в ФСК при РА. Используя эксперименты нокдауна, было обнаружено, что LBN влияет на транскриптом этих клеток, изменяя их дифференцировку и пролиферацию. [51]. Последующие исследования, идентифицировали LBN как мульти-доказательный ген, показали гипометилирование его энхансерной области [70]. Другим геном идентифицированным в этом исследовании, был RTPN11, который кодирует белок тирозин фосфатазу SHP2 и экспрессируется в ФСК при РА [180]. Анализ энхансерной области в RTPN11 в ФСК при РА выявил гиперметилование, за счет которого повышается чувствительность клеток к глюкокортикоидам и увеличивается их противовоспалительная активность[127].

### **1.3.2. Доклиническое и клиническое использование препаратов, действующих на метилирование ДНК в ФСК**

#### **1.3.2.1. Влияние модуляторов метилирования ДНК на фенотип ФСК в исследованиях *in vitro***

Патогенетическое значение процессов метилирования и деметилирования ДНК в ФСК от больных РА подтверждается небольшим числом работ, в которых показана коррекция нарушений метилирования с помощью различных модуляторов. Так предполагают, что генистеин (органическое вещество растительного происхождения из класса изофлавонов, ингибитор метилирования) является перспективным агентом для лечения РА [116,213], на основании данных о том, что это соединение ингибирует IL-1 $\beta$ , TNF- или EGF-индуцированную пролиферацию и экспрессию MMP-9 ФСК больных ревматоидным артритом [213]. Li и др. продемонстрировали ингибирующее действие генистеина на ФНО- $\alpha$ -



индуцированное воспаление в клетках МН7А (иммортиализованных ревматоидных фибробластоподобных синовиоцитах человека). Генистеин также ингибировал TNF- $\alpha$ -индуцированное фосфорилирование Ser536 NF- $\kappa$ B-p65, а также ядерную транслокацию NF- $\kappa$ B [87].

### 1.3.2.2. Экспериментальные данные на животных

В настоящее время наиболее часто используемыми ингибиторами DNMT (DNMTi) являются цитидиновые аналоги, такие как 5-азацитидин, 5-аза-2'-дезоксцитидин (децитабин) и пиримидин-2-он рибонуклеозид (зебуларин). DNMTi были первоначально протестированы и одобрены FDA для лечения различных типов рака [97,86,31]. Действительно, азацитидин участвует в гипометилировании генов опухолевого супрессора и впоследствии в их активации. В исследовании Toth и др. было показано, что лечение низкими дозами 5-азацитидина оказывает заметное влияние на прогрессирование заболевания, при протеогликан-индуцированном артрите (PGIA) у мышей - экспериментальной модели РА. Авторы исследовали связанные с артритом гиперметилированные участки в В-клетках мыши и показали, что деметилирование ДНК оказывает благоприятное влияние на аутоиммунный артрит, который ассоциировался со снижением выработки антител IgG1. По мнению авторов, гиперметилирование ДНК играет ведущую роль в патогенезе аутоиммунного артрита, и его целевое ингибирование обладает терапевтическим потенциалом в лечении артрита [189].

В другом исследовании авторы использовали крыс с адъювант-индуцированным артритом (AIA) в качестве моделей РА. Считается, что гиперметилирование гена PTCH1 связано с постоянной активацией ФСК и воспалением у крыс с AIA. Метил-CpG-связывающий белок 2 (MeCP2) обеспечивает гиперметилирование гена PTCH1 и снижает экспрессию белка PTCH1 в ФСК AIA, тем самым активируя путь передачи сигналов Hedgehog

и увеличивая секрецию IL-6 и TNF- $\alpha$ . В исследовании в качестве ингибитора метилирования ДНК был использован децитабин. Показано, что децитабин препятствовал снижению экспрессии PTCH1 за счет нокдауна MeCP2. При добавлении 5-аза-2'-дезоксцитидин в ФСК AIA, также угнетался синтез провоспалительных цитокинов. Авторы считают, что применение препаратов, способствующих модуляции метилирования ДНК открывают новые возможности контроля воспаления у больных РА. [182].

По мнению Tseng и др. дисфункция Treg клеток приводит к нарушению иммунологической толерантности и участвует в патогенезе РА. Функция Treg регулируется эпигенетическими факторами. В исследовании [192] была оценена эффективность применения ряда ингибиторов метилирования ДНК для лечения коллаген-индуцированного артрита у мышей (CIA). Лечение зебуларином привело к устойчивому снижению тяжести артрита, сопровождающегося увеличением экспрессии связанных с Treg генов FOXP3, CTLA-4 и TGFb1 в дренирующих лимфатических узлах. Лечение децитабином вызывало более выраженное снижение тяжести заболевания, тогда как терапевтический эффект псаммаплина А был более кратковременным. Все три ингибитора метилирования ДНК могут превращать *in vitro* CD4 + CD25- T-клетки в CD4 + FOXP3 + Tregs в зависимости от дозы. Это исследование показало, что лечение с помощью ДНК-деметилирующих препаратов вызывает устойчивое снижение тяжести артрита и способствует генерации Treg [192]. Показан клинический эффект применения генистеина при адъювантном артрите у крыс. Клиническое улучшение ассоциировалось с подавлением секреции IFN- $\gamma$  и увеличении выработки IL-4 в МНК ПК, т.е. поляризацией иммунного ответа [199].

Показан также эффект от лечения генистеином мышей с коллаген-индуцированным артритом. Генистеин снижал содержание IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  в сыворотке крови и уменьшал рентгенологическую прогрессию заболевания [210].

Болезнь модифицирующее действие модулятора метилирования ДНК эпигаллокатехин 3-галлата (EGCG) обнаружено в исследовании, в котором употребление экстракта зеленого чая, содержащего EGCG в питьевой воде, уменьшало выраженность коллаген-индуцированного артрита у мышей [71]. Клинический эффект был сопряжен с выраженным уменьшением содержания медиаторов воспаления COX-2, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  в синовиальной жидкости суставов. В другом исследовании показано, что EGCG введенный в брюшину ослабляет течение коллаген-индуцированного артрита у мышей, уменьшает инфильтрацию синовии макрофагами и вызывает снижение количества остеобластов, синтезирующих MCP-1 / CCL2 [121].

### **1.3.2.3. Клинические данные**

Примером клинически эффективных препаратов, способствующих метилированию ДНК при РА является будесонид, который относится к классу глюкокортикоидов. Показано, что будесонид активируя ДНК-метилтрансферазу [7,158], вызывает стойкое клиническое улучшение при приеме небольших доз препарата, однако эффект будесонида был меньше, чем у преднизолона [99].

Эффективность применения донора метильной группы SAME при ревматоидном артрите еще предстоит проверить. Однако, следует указать работу, где сравнивалась эффективность SAME с ингибитором циклооксигеназы-2 - целекоксибом у 61 пациента с диагнозом остеоартрит коленного сустава. По большинству показателей функционального состояния здоровья обе группы показали заметное улучшение по сравнению с исходным уровнем, значительного различия между SAME и целекоксибом не наблюдалось [145].

#### **1.3.2.4. Влияние модуляторов метилирования ДНК на функциональные свойства ФСК в исследованиях *in vitro***

Существуют единичные работы, посвященные коррекции нарушений метилирования ДНК в ФСК больных РА в доклинических исследованиях. Предполагают, что генистеин является перспективным соединением для лечения РА [116,213] на основании данных о том, что генистеин ингибирует IL-1 $\beta$ , TNF- или EGF-индуцированную пролиферацию и экспрессию MMP-9 ФСК больных ревматоидным артритом [213]. Li и др. продемонстрировали ингибирующее действие генистеина на ФНО- $\alpha$ -индуцированное воспаление в клетках MN7A (иммortalизованных ревматоидных фибробластоподобных синовиоцитах человека). Показано, что генистеин способен подавлять TNF- $\alpha$ -индуцированное фосфорилирование Ser536 NF- $\kappa$ B-p65, а также ядерную транслокацию NF- $\kappa$ B в ФСК больных РА [87].

Заслуживает внимание работа, показывающая связь усиления метаболизма полиаминов в ФСК больных РА, со сниженным уровнем донора метильных групп S-аденозилметионина (SAMe), вызывающим глобальное гипометилирование ДНК [93].

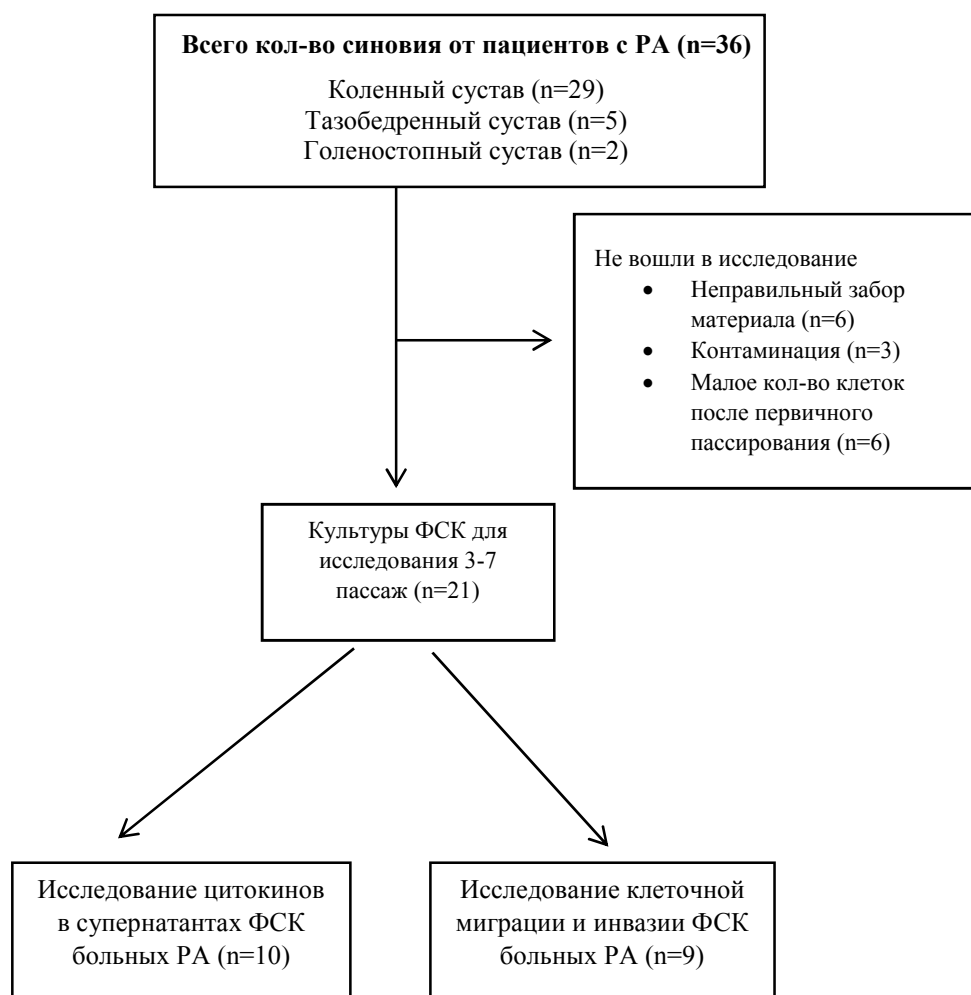
Таким образом, ФСК больных РА являются частью большого ансамбля клеток, принимающих участие в инициации и персистенции воспаления. Их провоспалительный потенциал реализуется уже на ранних этапах развития болезни, где они функционируют как клетки врожденного иммунитета, наряду с другими клетками способствуя воспалению. На поздних стадиях болезни они приобретают, уже в составе паннуса, коллаген-синтезирующие свойства, играя ключевую роль в развитии фиброза. ФСК, являясь стромальными клетками-резидентами, способны к миграции и инвазии у больных РА, однако их свойства чаще всего исследуют в культурах *ex vivo*. В последние годы, в связи с бурным развитием эпигенетики, внимание исследователей привлекают эпигенетические механизмы контроля многообразных функций ФСК, в

частности процессы метилирования ДНК. Патогенетическое значение процессов метилирования и деметилирования ДНК в ФСК от больных РА подтверждается небольшим числом исследований, в которых показана коррекция нарушений метилирования с помощью различных модуляторов. Помимо этого, представленные данные носят противоречивый характер. Несомненно, исследование модели культур ФСК от больных РА может быть полезным для получения новых данных о патогенезе, доклинического скрининга новых лекарственных препаратов для лечения РА, в том числе модуляторов метилирования ДНК.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культуры фибробластоподобных синовиальных клеток коленных и тазобедренных суставов от 21 больного активным РА выделены из материала, полученного в результате операции тотального эндопротезирования суставов с 2012г. по 2017г. (Рисунок 3).

### Объекты исследования



Материалы предоставлены сотрудниками ФГБУ “ННИИТО им. Я. Л. Цивьяна” Минздрава России (в соответствии с договором между ФГБНУ “НИИФКИ” и ФГБУ “ННИИТО им. Я. Л. Цивьяна” Минздрава России).

### **Культивирование фибробластоподобных синовиальных клеток**

Метод культивирования ФСК отработан достаточно давно, со временем претерпел ряд модификаций и на сегодняшний день является стандартным [165,214].

1. Ткань, полученную из синовиальной оболочки коленного или тазобедренного сустава больных РА во время операции, помещали в контейнер при  $t +4^{\circ}\text{C}$ .
2. Ткань промывали холодным PBS и помещали в 150-мм чашку Петри, для удаления нежелательных тканей - жир и т. д
3. Перемещали ткань в чистую 150-мм чашку Петри и нарезали кусочками, образцы ткани переносили в колбу содержащую раствор 0,1% трипсина и фосфатно-буферного раствора (PBS). Инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин, после инкубации удаляли супернатант.
4. К оставшейся в колбе ткани добавляли раствор 0,1% коллагеназы Р со средой DMEM (Биолот) содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Hyclone) и продолжали инкубацию в течении двух часов при  $37^{\circ}\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ .
5. Пипетировали смесь через клеточный фильтр в пробирку объемом 50 мл, клеточную взвесь центрифугировали при 250g 10 мин. Затем удаляли супернатант, взвесь клеток размешивали, промывали добавлением 15 мл DMEM и вновь центрифугировали. Количество жизнеспособных клеток подсчитывали с помощью трипанового синего.
6. Взвесь ресуспендировали в среднем  $1 \times 10^6$  клеток в 15 мл DMEM, добавляли взвесь в Т-75 флакон содержащий 5 мл DMEM, 10% FBS, 100 ед /мл пенициллина (Синтез), 100 мг/мл стрептомицина (Синтез), 50 мг/мл

гентамицина (Микроген), 2 ммоль L-глутамин (Sigma-Aldrich) и 2,5 мкг/мл амфотерицина В (Биолот), инкубировали флакон при температуре 37°C и 5% CO<sup>2</sup>.

7. 90% конфлюентность появлялась через 10-14 дней.

### **Культивирование ФСК с модуляторами метилирования ДНК**

Для исследования применялись ФСК культивированные между 3-7 пассажами. В 24-луночный планшет вносили клетки в количестве  $5 \times 10^5$  кл/мл в питательную среду DMEM и инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C и 5% CO<sup>2</sup>. После инкубации вносили в лунки ИЛ-1 $\beta$  (R&D Systems) в дозе 10 нг/мл на 48 часов. В опытные лунки добавляли генистеин (LC Laboratories) в -дозах 5, 10, 20 мкг/мл, гидралазин (Sigma-Aldrich) 5, 10, 20 мкмоль/мл, SAME (Abbot) 25, 50, 100 мкг/мл. После инкубации в супернатантах клеточных культур оценивали уровень синтезируемых цитокинов.

Уровень спонтанной и ИЛ-1-стимулированной продукции ИЛ-6, ИЛ-18, ИЛ-17, ИЛ-10 в супернатантах культур ФСК, помещенных в 96-луночные планшеты, оценивали с помощью стандартных наборов Вектор-Бест (Россия), согласно инструкции фирмы производителя.

Количество GM-CSF в супернатантах клеточных культур определяли с помощью набора Human GM-CSF ELISA Kit PicoKine (Boster Biological Technology Ltd.), согласно инструкции фирмы производителя.

Уровень остеопротегерина в супернатантах клеточных культур определяли с помощью набора Osteoprotegerin Human ELISA Kit (Abcam), согласно инструкции фирмы производителя.

Уровень RANKL в супернатантах клеточных культур определяли с помощью набора Human TNFSF11/RANKL ELISA Kit PicoKine (Boster Biological Technology Ltd.), согласно инструкции фирмы производителя.



## Исследование клеточной миграции и инвазии ФСК

Для исследования клеточной миграции и инвазии ФСК использовали модифицированные камеры Бойдена, состоящей из двух отсеков, разделенных 8-мкм пористой мембраной (Transwell 96, фирма Trevigen, Gaithersburg, USA). Основные этапы оценки миграции ФСК следующие. За 24 ч до начала эксперимента ФСК находились в бессывороточной питательной среде DMEM. После «сывороточного голодания», клетки трипсинизировали, считали и вновь ресуспендировали до  $1 \times 10^6$  кл/мл. В каждую лунку верхней камеры добавляли  $5 \times 10^4$  клеток (50 мкл клеточной взвеси), в нижние камеры, в качестве хемоаттрактанта, вносили 150 мкл питательной среды DMEM с 10% FBS и модуляторы метилирования ДНК: SAME (Abbot) 25, 100 мкг/мл, генистеин (LC Laboratories) 5, 20 мкг/мл или гидралазин (Sigma-Aldrich) 5, 20 мкмоль/мл. Планшет инкубировали при 37°C и 5% CO<sup>2</sup> в течение 48 часов, затем ФСК верхней и нижней камеры аспирировали и промывали промывочным фосфатным буфером. К нижней камере добавляли Cell Dissociation/ Calcein-AM (способствует флуоресценции клеток за счет образования свободного кальцеина) и инкубировали при 37°C и 5% CO<sup>2</sup> в течение 1 часа. Оценку уровня миграции проводили на флуоресцентном ридере (Multiskan Ascent, Thermo Electron).

Количество мигрировавших клеток выражалось в процентах от общего числа клеток, вносимых в верхний отсек камеры Бойдена.

Для оценки уровня инвазии разделительную пористую мембрану предварительно покрывали раствором коллагена I, который вносили в верхний отсек камеры и инкубировали планшет в течение 8 часов при 37°C и 5% CO<sup>2</sup>. Дальнейшие манипуляции проводили аналогично этапам при оценке миграции ФСК. Количество инвазировавших клеток также выражалось в процентах от общего числа клеток, вносимых в верхний отсек камеры Бойдена.

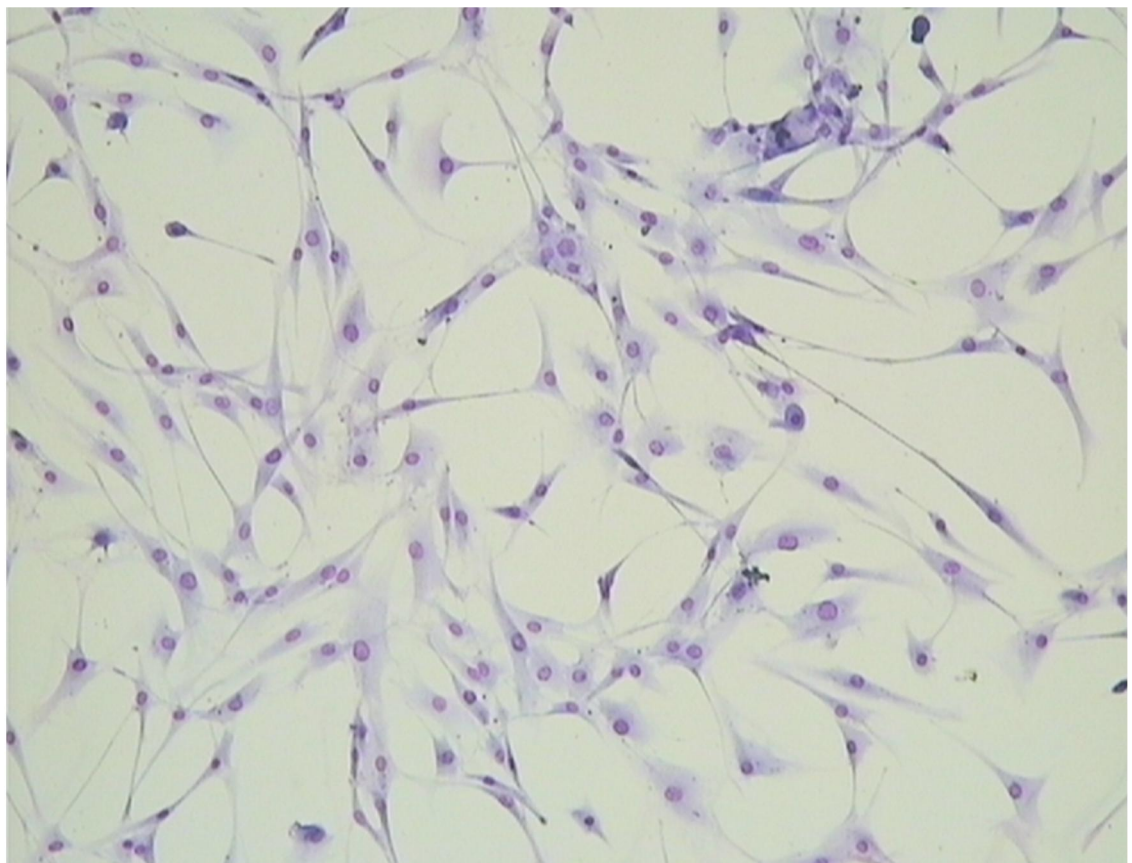
## **Статистическая обработка полученных результатов**

Описательная статистика представлена средней арифметической и ее ошибкой. Уровень статистической значимости различий между группами оценивалась с помощью парного t-теста. Выбранные методы статистического анализа являются предпочтительной даже в случае ненормального распределения данных [126]. Для статистических вычислений и построения графиков использовался программный пакет GraphPad Prism, версия 6.

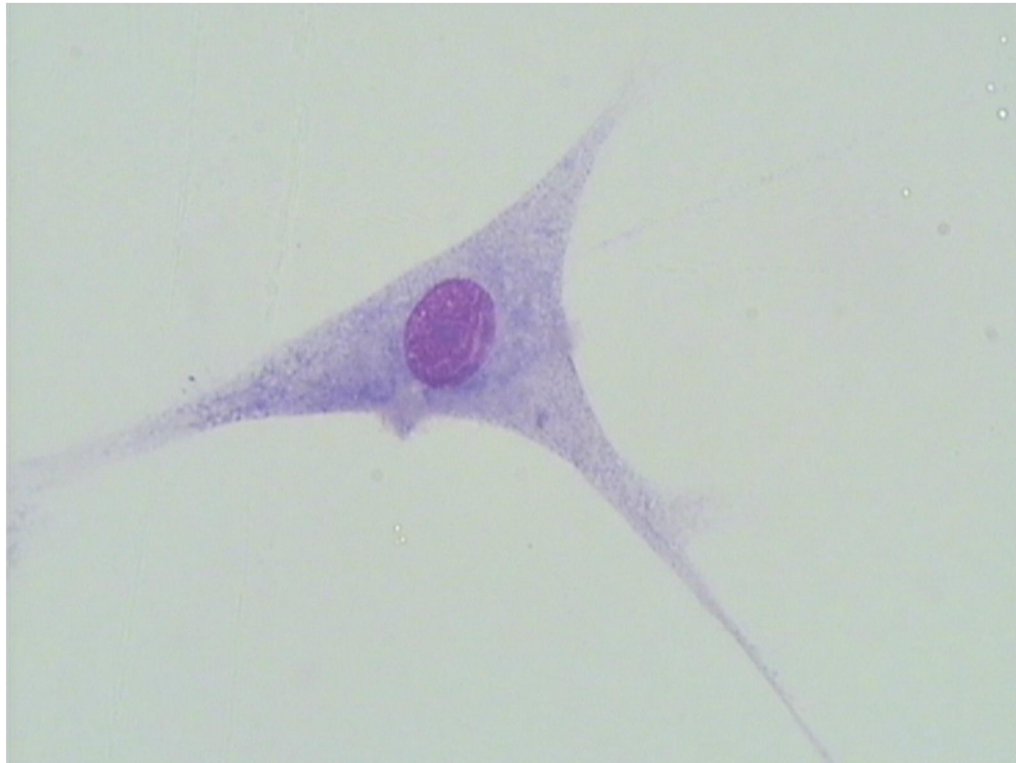
### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для подтверждения адекватности выбранных условий культивирования проводилась оценка морфологических свойств полученных в культуре клеток с помощью световой микроскопии.

На микрофотографиях 1 и 2 представлена культура фибробластоподобных синовиальных клеток синовиальной оболочки больных активным РА. При световой микроскопии ФСК в культуре представляют собой удлинённые, иногда овальные или полигональные клетки, с небольшим количеством цитоплазматических отростков, хорошо выраженным ядром, отсутствием пищеварительных вакуолей (микрофотография 1 и 2).



**Микрофотография 1.** Культура фибробластоподобных синовиальных клеток синовиальной оболочки больных РА (3 пассаж). Окраска по Романовскому-Гимза. Объектив микрофотографии 10х.



**Микрофотография 2.** Культура фибробластоподобных синовиальных клеток синовиальной оболочки больных РА (3 пассаж). Окраска по Романовскому-Гимза. Объектив микрофотографии 100х.

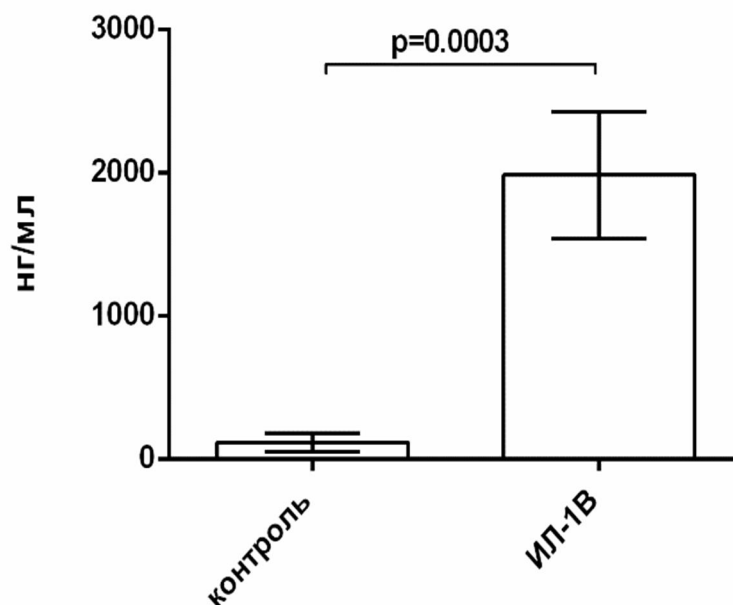
Таким образом, клетки в полученных культурах имеют характерные для СФ морфологические свойства.

Для дальнейшей характеристики полученных в культуре клеток изучалась спонтанная и IL- $\beta$ -стимулированная продукция цитокинов.

### **3.1. Спонтанная и IL-1 $\beta$ -стимулированная продукция цитокинов ФСК**

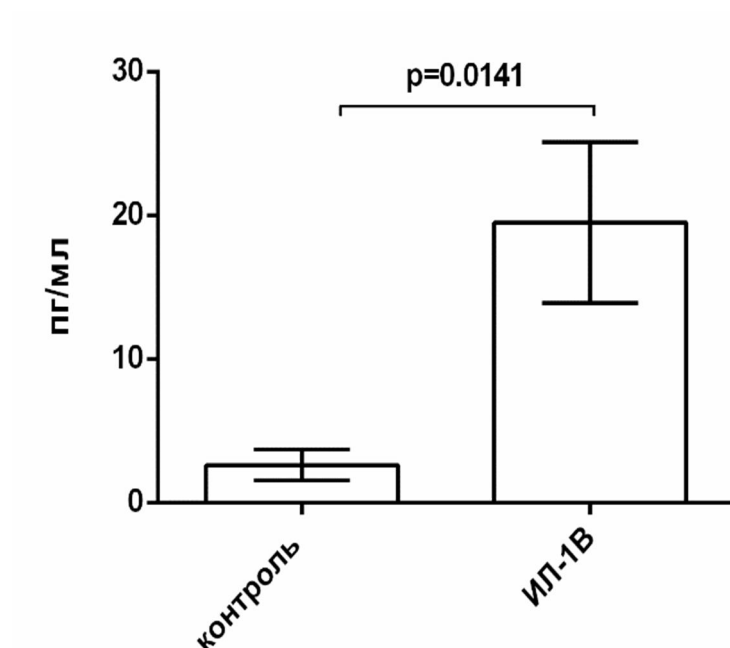
Как следует из рисунка 4, ФСК обладают выраженной способностью спонтанно синтезировать IL-6, концентрация этого цитокина в

надосадочной жидкости выражалась в нанограммах. Добавление в культуры IL-1 $\beta$  приводило к значительному (в 17 раз) увеличению продукции клетками IL-6 (рис. 4).



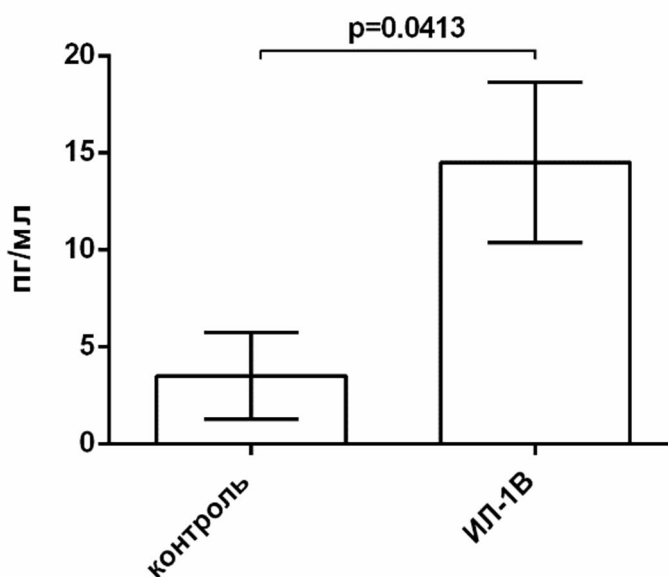
**Рисунок 4.** Спонтанная и IL-1 $\beta$  стимулированная продукция IL-6 ФСК больных РА (n=10). Примечание. На этом и последующих аналогичных рисунках данные представлены средней арифметической и ее ошибкой.

В меньшей степени ФСК спонтанно синтезировали другой провоспалительный цитокин, IL-18 (рис.5). Стимуляция клеток IL-1 $\beta$  приводила к почти 7-кратному усилению продукции IL-18.



**Рисунок 5.** Спонтанная и IL-1 $\beta$  стимулированная продукция IL-18 ФСК больных РА (n=10).

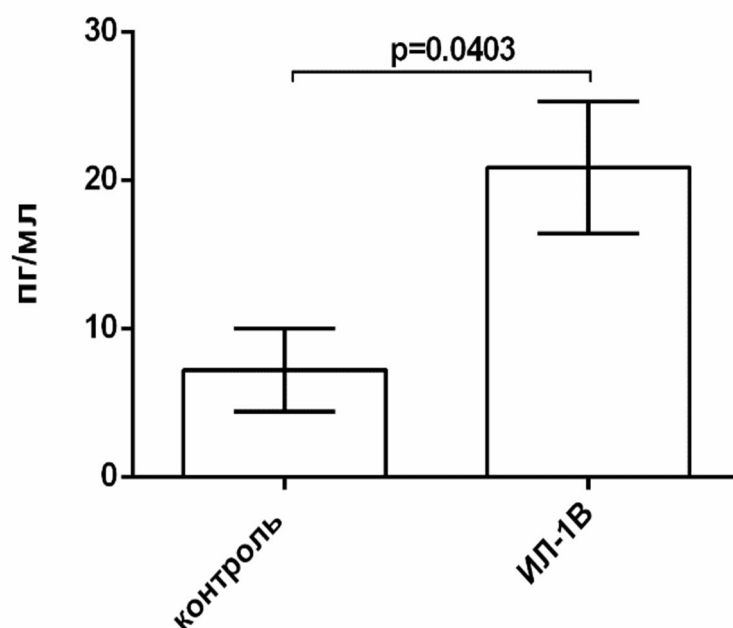
На рисунке ниже представлена спонтанная и IL-1 $\beta$  стимулированная продукция IL-17 ФСК больных РА (рис.6). Без стимуляции ФСК продуцировали низкое количество IL-17, после добавления в культуры IL-1 $\beta$  синтез IL-17 повышался в 5 раз.



**Рисунок 6.** Спонтанная и IL-1 $\beta$  стимулированная продукция IL-17 ФСК больных РА (n=10).

Следует подчеркнуть, что спонтанная продукция IL-6 культур ФСК больных РА в тысячу раз превышала продукцию IL-18 и IL-17, содержание IL-6 исчислялось в нанограммах.

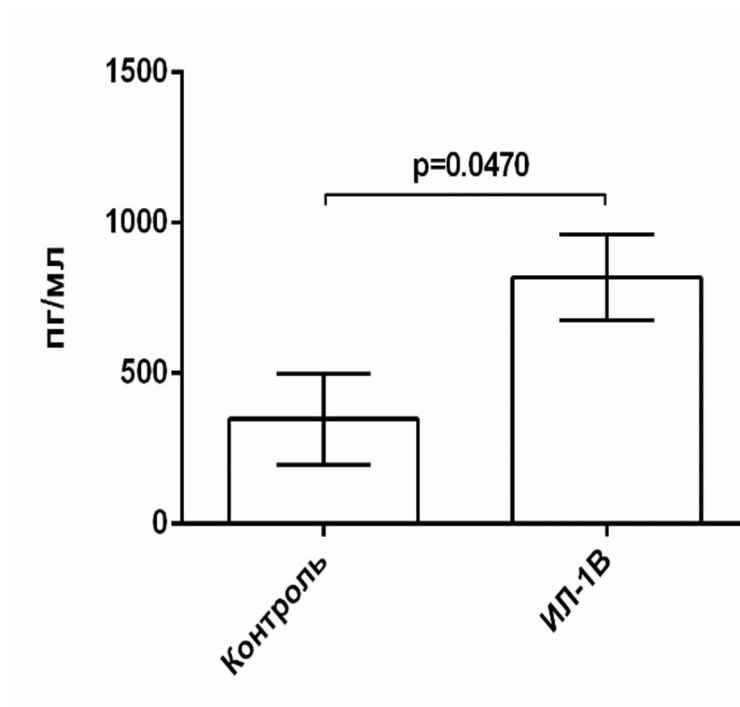
По сравнению с провоспалительными цитокинами IL-1 $\beta$  в меньшей степени (в 2 раза) стимулировал синтез IL-10, спонтанная продукция этого цитокина была незначительной (рис.7).



**Рисунок 7.** Спонтанная и IL-1 $\beta$  стимулированная продукция IL-10 ФСК больных РА (n=10).

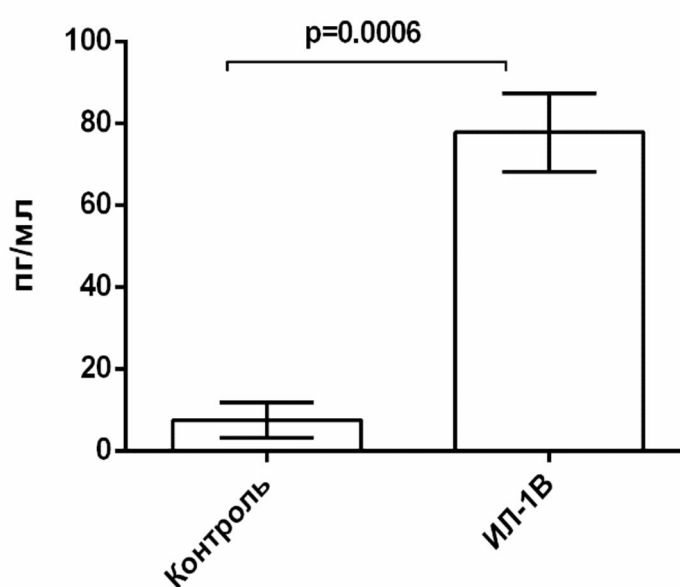
На рисунке 8 представлены данные о спонтанной и IL-1 $\beta$  стимулированной продукции остеопротегина (OPG) в культурах ФСК больных РА.

Из рисунка следует, что внесение в культуры ФСК IL-1 $\beta$  увеличивает продукцию OPG более чем в 1,5 раза



**Рисунок 8.** Спонтанная и IL-1 $\beta$  стимулированная продукция OPG ФСК больных РА (n=10).

На рисунке ниже показано, что добавление в культуры ФСК больных РА IL-1 $\beta$  приводило к значительному (в 10 раз) увеличению продукции клетками RANKL (рис.9).

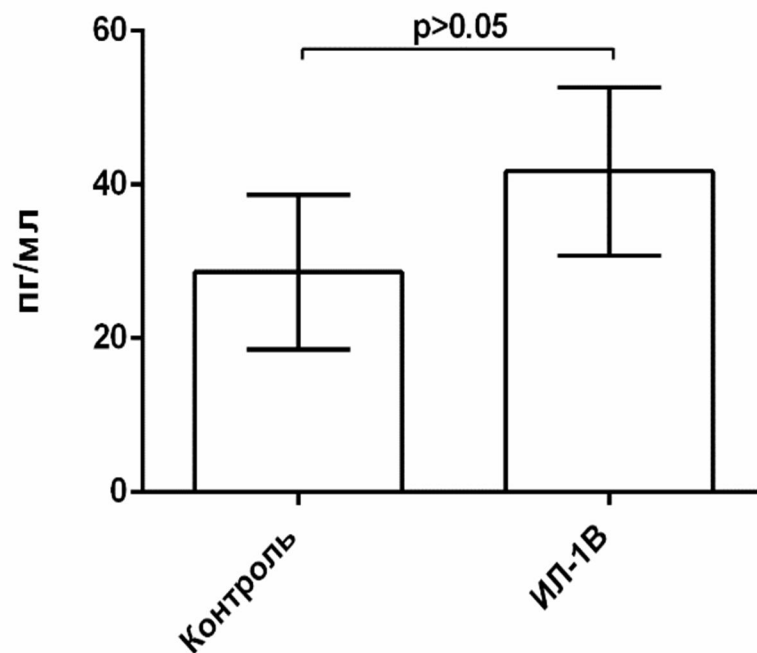


**Рисунок 9.** Спонтанная и IL-1 $\beta$  стимулированная продукция RANKL ФСК больных РА (n=10).



Таким образом, ФСК больных РА являются существенным источником RANKL и OPG. Выработка этих медиаторов повышается при стимуляции IL-1 $\beta$ .

На рисунке 10 представлены результаты спонтанной продукции ростового фактора GM-CSF в культурах ФСК больных РА. Статистически значимых различий между уровнем спонтанной и стимулированной продукции зарегистрировано не было (рис.10).



**Рисунок 10.** Спонтанная и IL-1 $\beta$  стимулированная продукция GM-CSF ФСК больных РА (n=10).

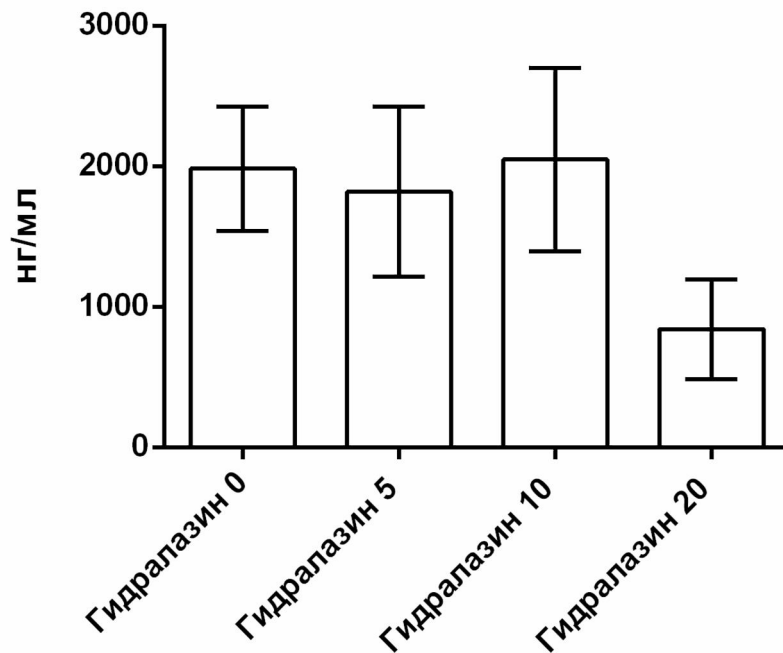
Таким образом, культуры ФСК больных РА *in vitro* обладали характерными морфологическими признаками, спонтанно и под воздействием стимуляции синтезировали в различных концентрациях про- и противовоспалительные цитокины, ростовой фактор GM-CSF, остеопротогерин («ловушка» для RANK лиганда), RANKL. Это свидетельствует о том, что выбранная модель адекватна решению поставленных в работе задач, поскольку в условиях культур клеток, с

известными ограничениями, воспроизводит те события, которые происходят в синовиальной ткани больных РА.

Глобальное метилирование ДНК клетки является интегральным показателем, отражающим метилирование и деметилирование множества генов. Модулирование метилирования ДНК может оказывать влияние на экспрессию этих генов и приводить к изменению синтеза клеткой различных медиаторов. В следующем разделе работы будет показано влияние модуляторов метилирования ДНК на продукцию ФСК больных РА различных про- и противовоспалительных цитокинов.

### **3.2. Влияния модуляторов метилирования ДНК на продукцию ФСК про- и противовоспалительных цитокинов**

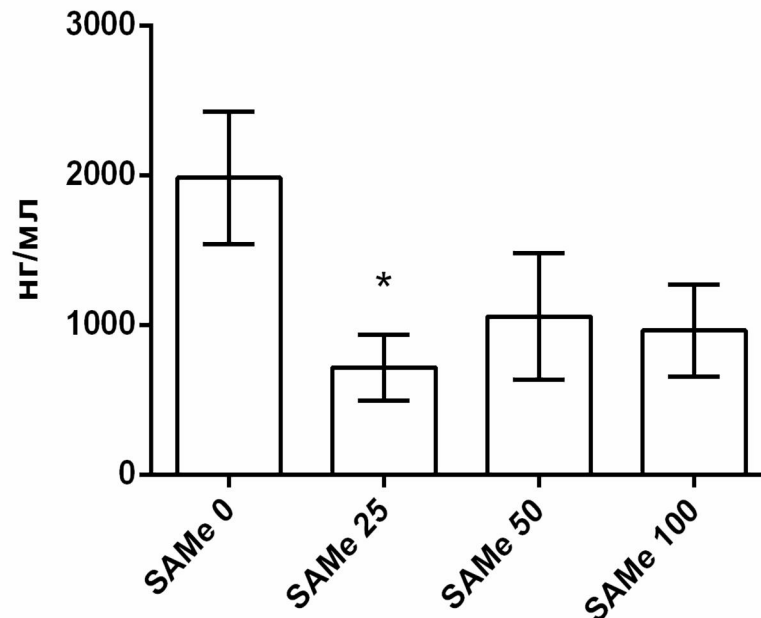
На рисунке 11 представлены данные о влиянии гидралазина на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию ФСК IL-6 (рис.11).



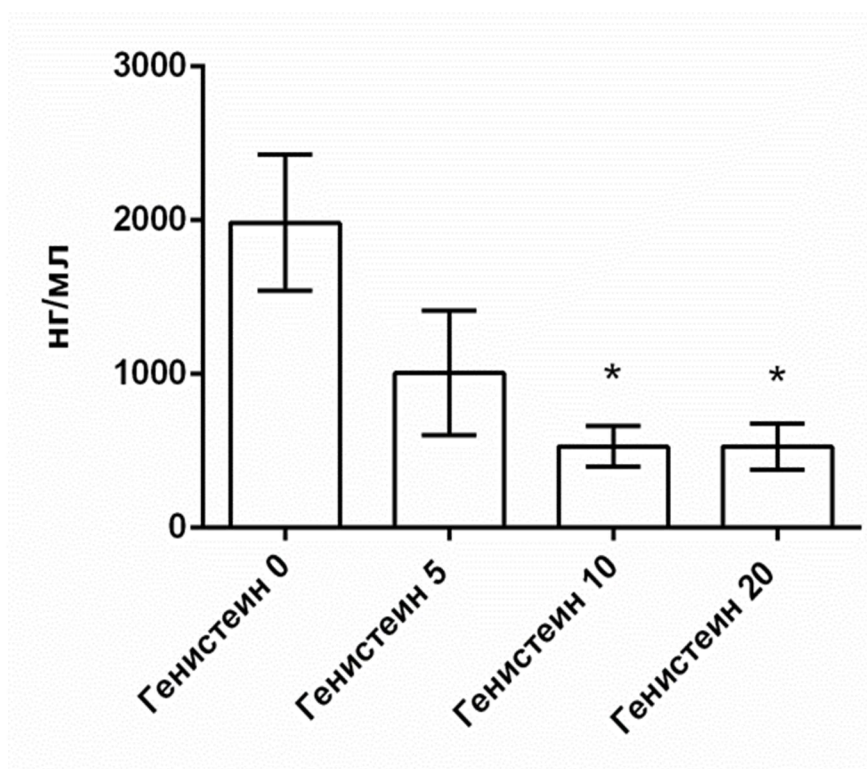
**Рисунок 11.** Влияние гидралазина в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию ФСК IL-6 (n=10).

Установлено, что внесение в культуры ФСК демитилирующего ДНК соединения гидралазина в разных концентрациях не изменяло уровень продукции IL-6.

Добавление SAME и генистеина в определенных концентрациях существенно и статистически значимо снижало синтез цитокина (рис.12-13).

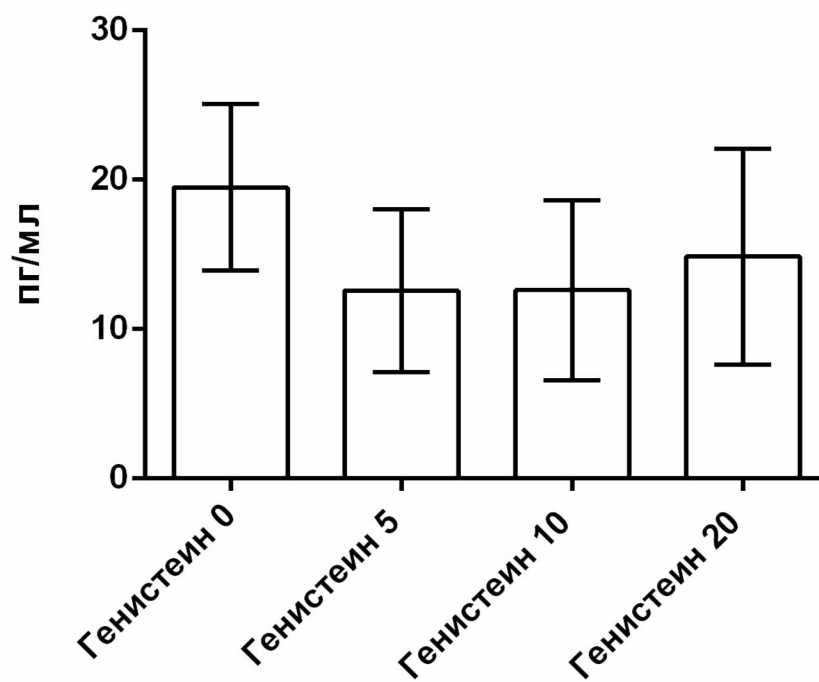


**Рисунок 12.** Влияние SAME в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию ФСК IL-6 (n=10). Примечание. На этом и последующих аналогичных рисунках \* -  $p < 0,05$  между стимулированной продукцией и добавлением модуляторов.

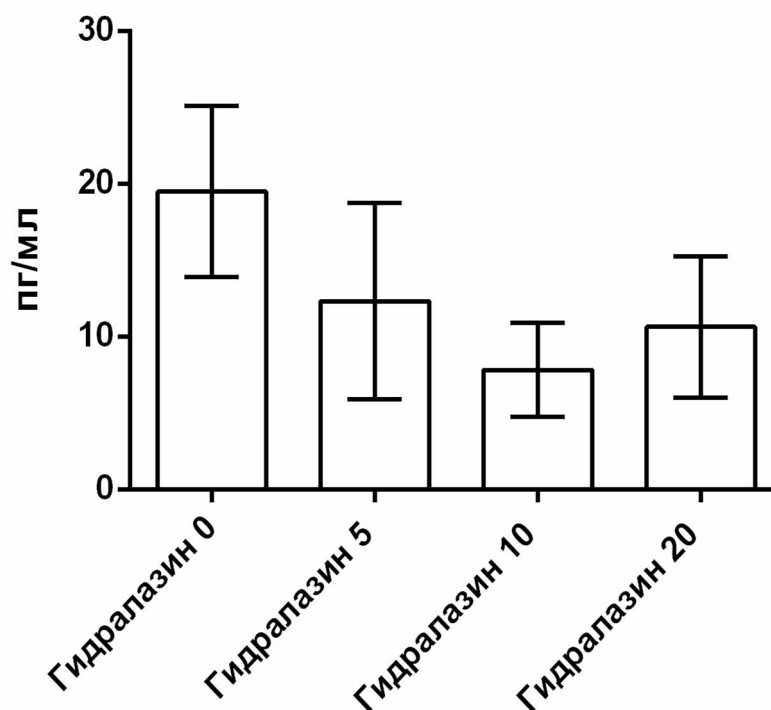


**Рисунок 13.** Влияние генистеина в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию ФСК IL-6 (n=10).

Генистеин и гидралазин не изменял уровень провоспалительного цитокина IL-18 в супернатантах культур ФСК (рис. 14-15).

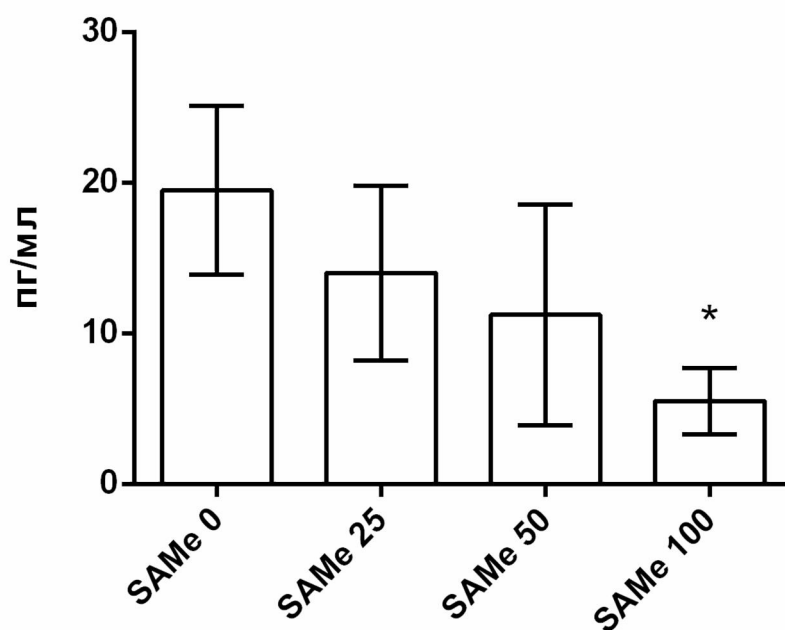


**Рисунок 14.** Влияние генистеина в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию ФСК IL-18 (n=10).



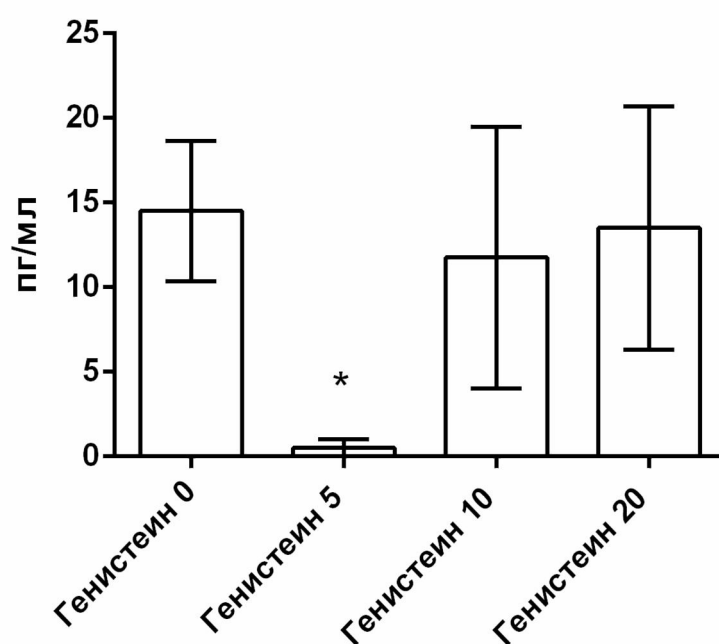
**Рисунок 15.** Влияние гидралазина в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию ФСК IL-18 (n=10).

Отмечена тенденция снижения продукции цитокина при добавлении в культуры донатора метильных групп SAmе, достигающая статистически значимых значений при использовании SAmе в максимальной концентрации (рис. 16).

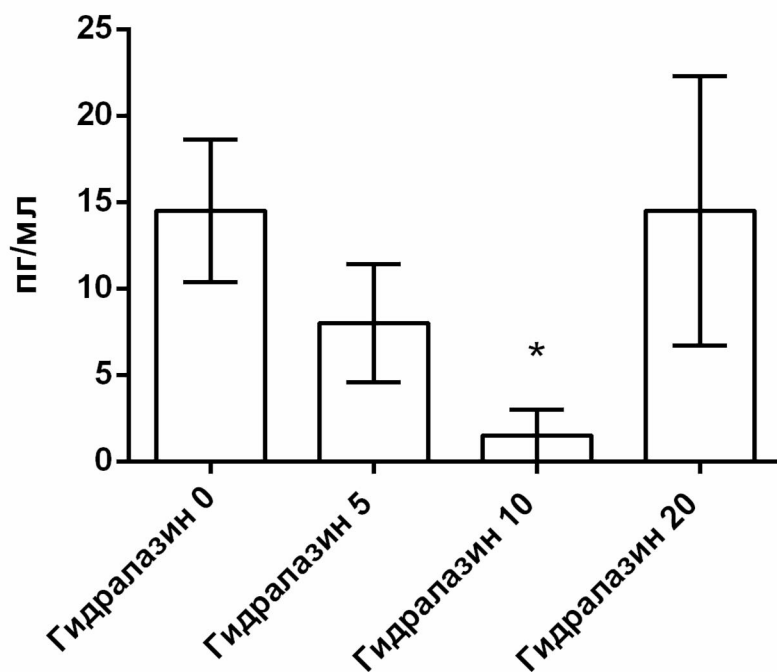


**Рисунок 16.** Влияние SAME в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию ФСК IL-18 (n=10).

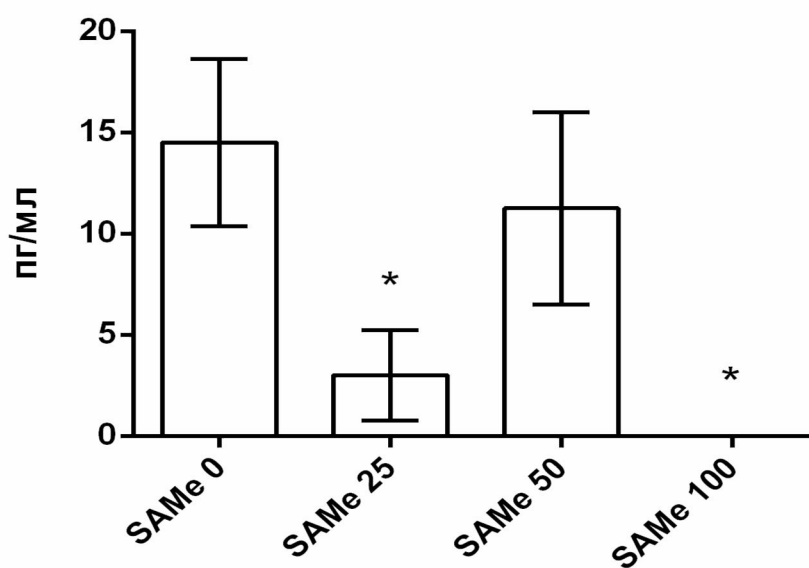
Продукция IL-17 снижалась при внесении в культуры ФСК используемых модуляторов преимущественно в малых дозах (рис. 17-19).



**Рисунок 17.** Влияние генистеина в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию ФСК IL-17 (n=10).

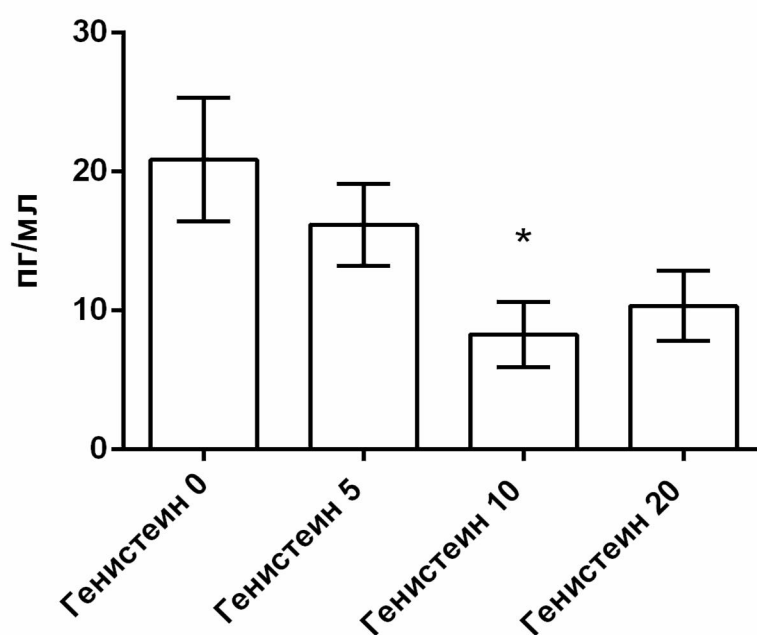


**Рисунок 18.** Влияние гидралазина в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию ФСК IL-17 (n=10).



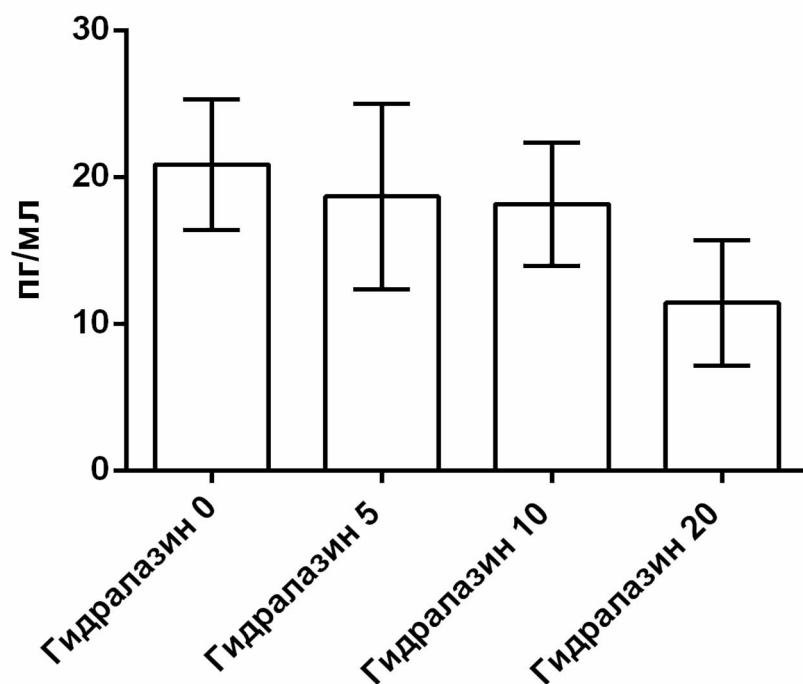
**Рисунок 19.** Влияние SАМе в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию ФСК IL-17 (n=10).

На рисунке 20-22 представлены данные о влиянии модуляторов метилирования ДНК на продукцию клетками культур ФСК IL-10 (рис.20-22).

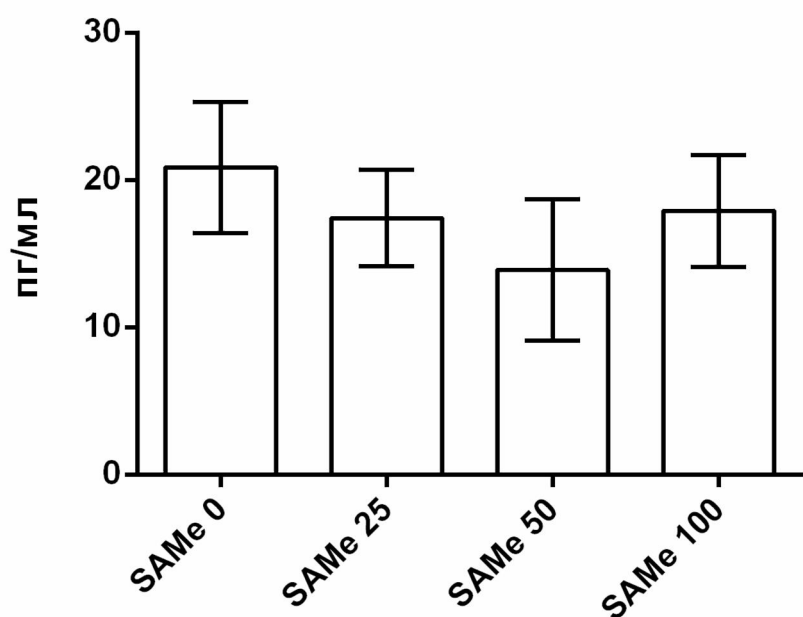


**Рисунок 20.** Влияние генистеина в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию ФСК IL-10 (n=10).





**Рисунок 21.** Влияние гидралазина в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию ФСК IL-10 (n=10).

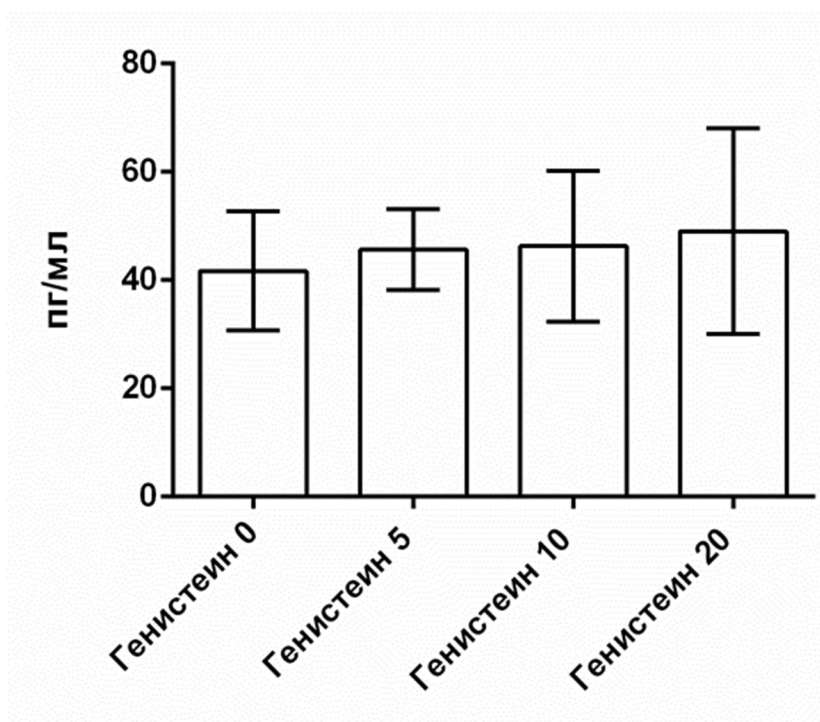


**Рисунок 22.** Влияние SAdMe в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию ФСК IL-10 (n=10).

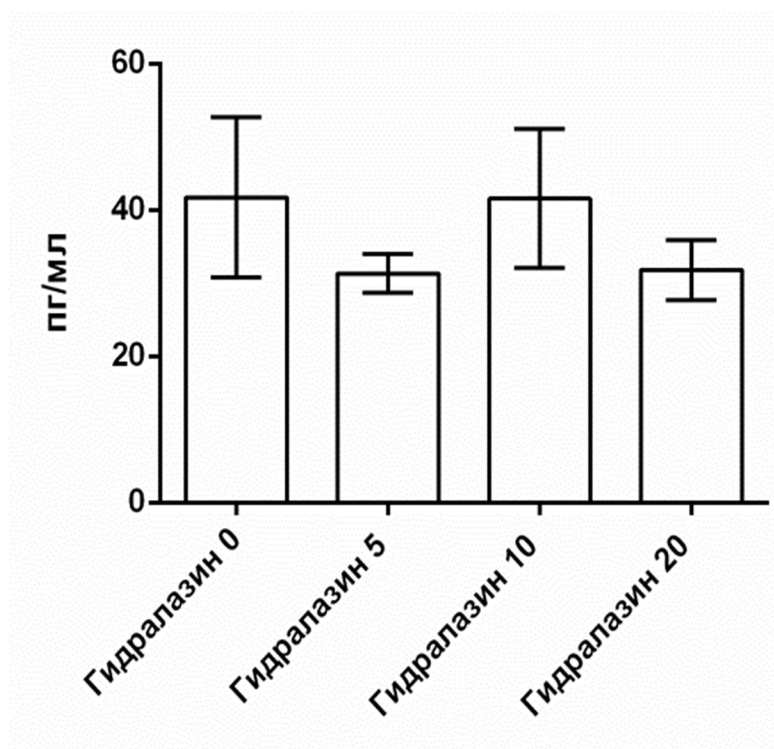
Внесение в культуры модуляторов метилирования ДНК в разных концентрациях практически не меняло уровень продукции IL-10, за

исключением статистически значимого снижения синтеза цитокина в ответ на средние дозы генистеина.

Генистеин и гидралазин не изменяли уровень GM-CSF в супернатантах культур ФСК (рис. 23-24).

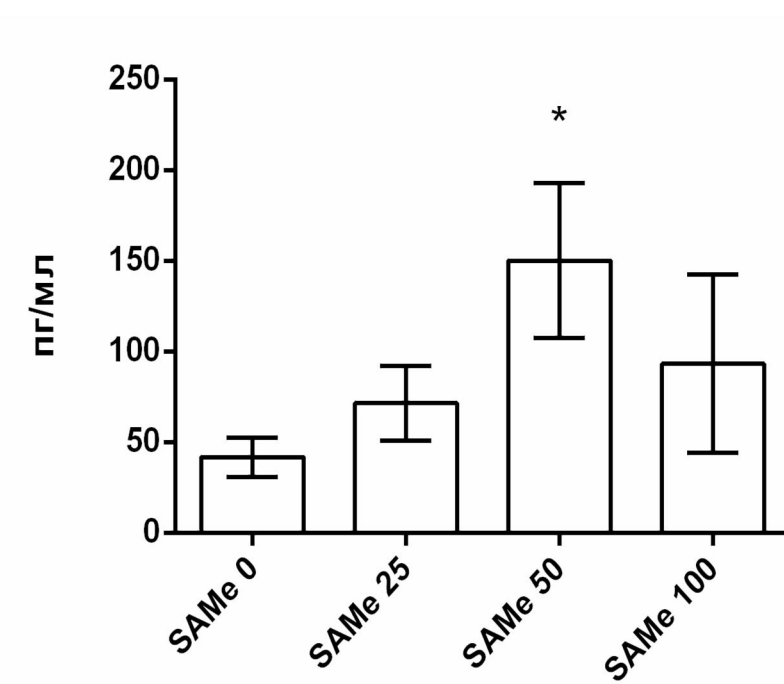


**Рисунок 23.** Влияние генистеина в разных концентрациях на  $IL-1\beta$  стимулированную продукцию ФСК GM-CSF (n=10).



**Рисунок 24.** Влияние гидралазина в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию ФСК GM-CSF (n=10).

Однако SAME в дозе 50 мкг/мл статистически значимо увеличивал стимулированный синтез GM-CSF в супернатантах культур СФ (рис.25).

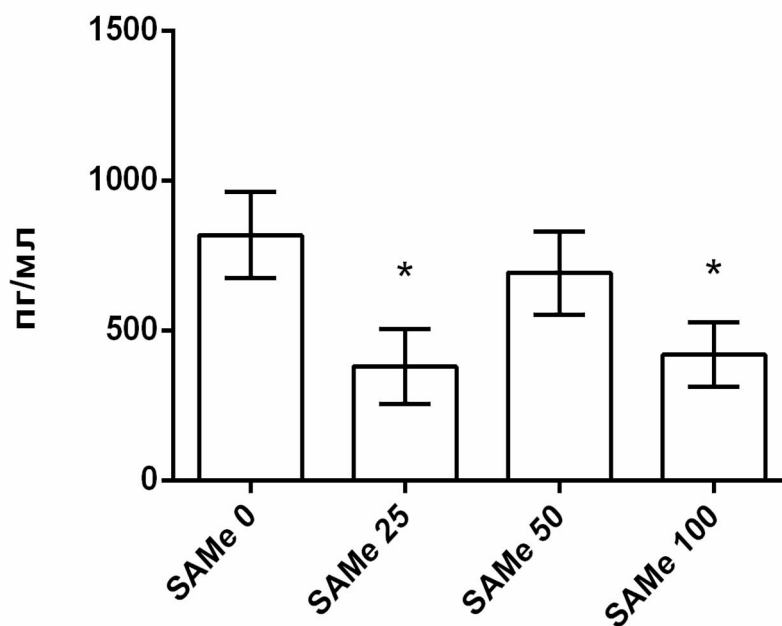


**Рисунок 25.** Влияние SAMe в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию ФСК GM-CSF (n=10).

Важнейшей эффекторной функцией ФСК у больных РА является стимуляция остеокластов, которая приводит к развитию околоуставного остеопороза и деструкции кости. Эта функция опосредована синтезом СФ двух молекул – RANKL и остеопротегерина. Влияние веществ, модулирующих метилирование ДНК, на баланс RANKL и остеопротегерина будет рассматриваться в следующем разделе работы.

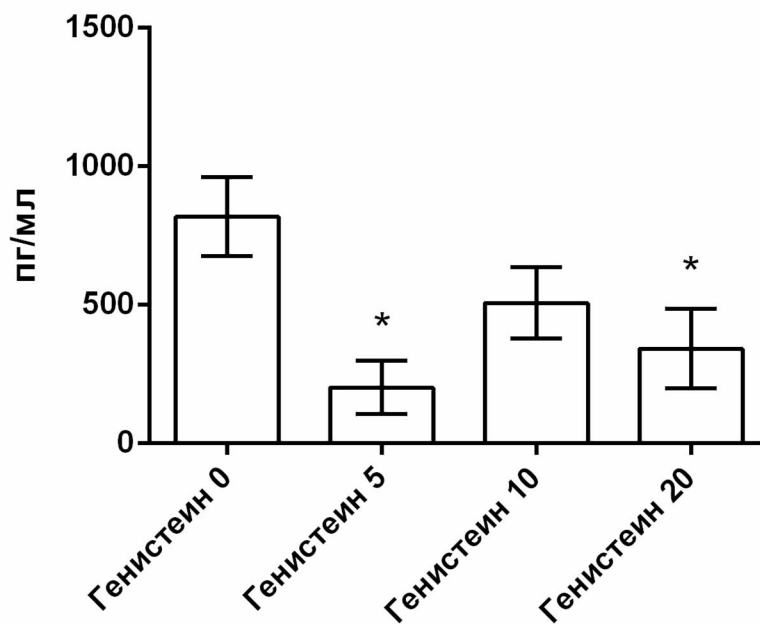
### 3.3. Влияние метилирующих и гипометилирующих агентов на систему RANKL/остеопротегерин ФСК больных РА

На рисунке 26-28 представлены данные о влиянии модуляторов метилирования ДНК в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию остеопротегерина фибробластоподобными синовиальными клетками (рис. 26-28).



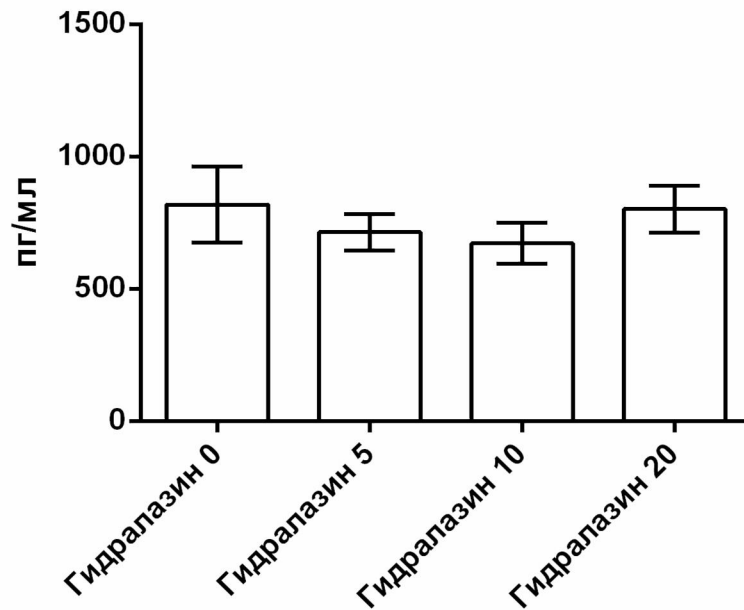
**Рисунок 26.** Влияние SАМе в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию остеопротегерина ФСК (n=10).

Добавление в культуры донатора метильных групп SАМе в дозах 25 и 100 мкг/мл статистически значимо снижало стимулированный синтез OPG. Сходным эффектом обладал другой модулятор ДНК генистеин в дозах 5 и 20 мкг/мл.



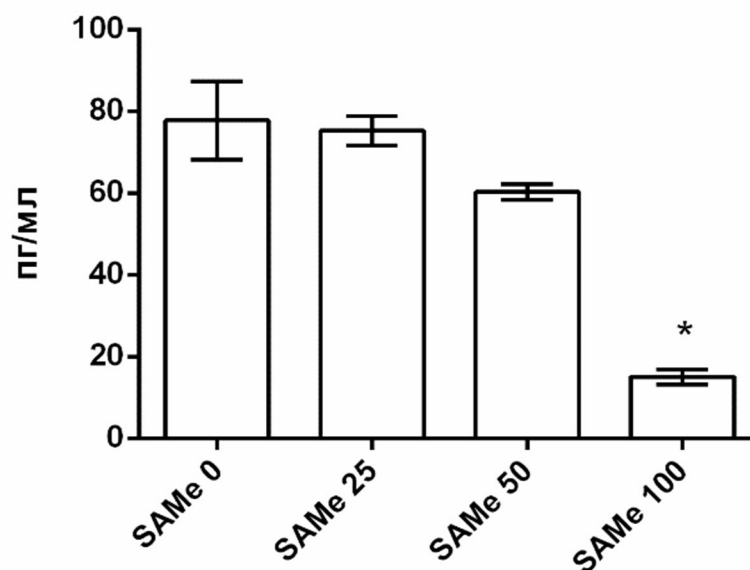
**Рисунок 27.** Влияние генистеина в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию остеопротегерина ФСК (n=10).

Добавление к клеткам различных доз деметилирующего агента гидралазина не изменяло уровень OPG в супернатантах культур ФСК (рис. 28).

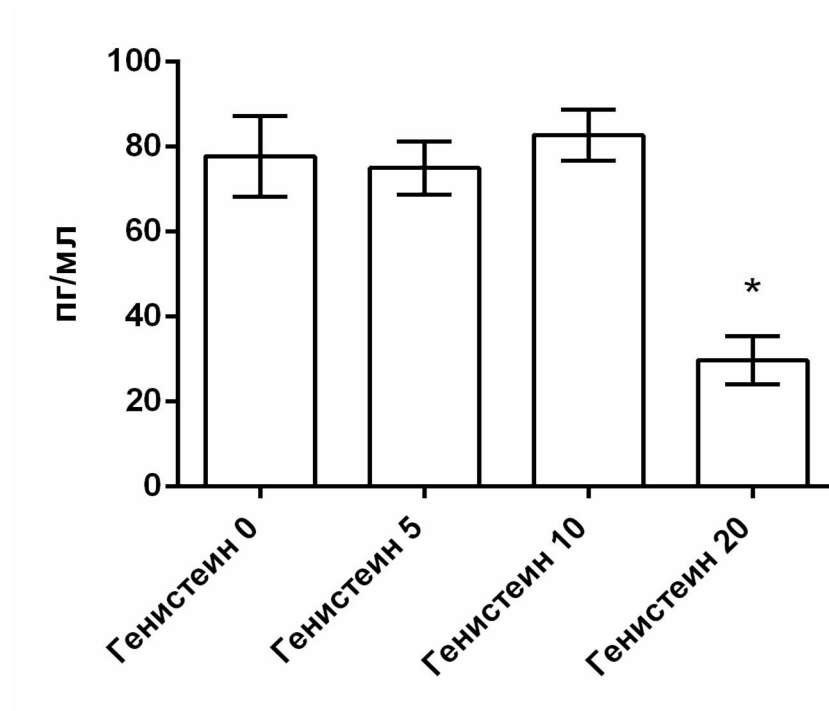


**Рисунок 28.** Влияние гидралазина в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию ФСК остеопротегерина (n=10).

На рисунке ниже представлены данные о влиянии модуляторов метилирования ДНК в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию RANKL фибробластоподобными синовиальными клетками (рис.29-31).

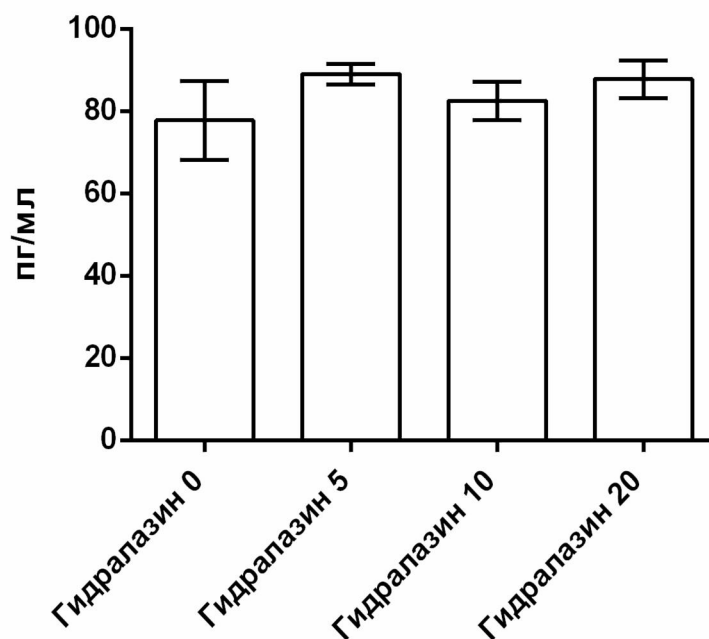


**Рисунок 29.** Влияние SAMe в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию RANKL ФСК (n=10).



**Рисунок 30.** Влияние генистеина в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию RANKL ФСК (n=10).

Показано, что добавление в культуры донатора метильных групп SАМе и генистеина в максимальных концентрациях статистически значимо снижало стимулированный синтез RANKL (рис.29-30).



**Рисунок 31.** Влияние гидралазина в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию RANKL ФСК (n=10).

Добавление деметилирующего агента гидралазина в культуры ФСК не изменяло уровень продукции RANKL.

Таким образом, SAME и генистеин уменьшают продукцию остеопротегерина и RANKL ФСК больных РА in vitro.

Процессы образования паннуса и разрушения хряща зависят от двух свойств ФСК – способности к миграции и инвазии. О потенциальном влиянии веществ-кандидатов для терапии РА на суставную деструкцию можно судить по их действию на миграцию и инвазию ФСК in vitro. Обладают ли таким действием изучаемые модуляторы метилирования ДНК?

### 3.4. Оценка влияния модуляторов метилирования ДНК на уровень инвазивной и миграционной способности ФСК in vitro.

В таблицах 2-4 представлены данные о влиянии модуляторов метилирования ДНК на способность ФСК к миграции и инвазии в камере Бойдена (Таб. 2-4).

**Таблица 2**

Влияние SAME на миграцию и инвазию фибробластоподобных синовиальных клеток больных РА in vitro

\* **Примечание.** В данной таблице и последующих представлен средний процент (ошибка средней) клеток, осуществивших миграцию/инвазию. Абсолютное значение величины, принятой за 100%- $5 \times 10^4$  (количество клеток, внесенных в лунку).

Модуляторы		Миграция ( $M \pm m$ ) %, $n=9$	$p$	Инвазия ( $M \pm m$ ) %, $n=9$	$p$
Контроль		45.21 $\pm$ 4.63		38.34 $\pm$ 7.37	
SAME	25 мкг/мл	39.15 $\pm$ 1.84	<0.001	21.03 $\pm$ 4.2	<0.001
	100 мкг/мл	38.79 $\pm$ 3.02	<0.001	23.72 $\pm$ 4.51	<0.001



Установлено, что миграционной способностью обладали в среднем 45% ФСК внесенных в камеры Бойдена для культур клеток, способностью к инвазии через матрицу коллагена 1 типа - 38% клеток.

**Таблица 3**

Влияние гидралазина на миграцию и инвазию фибробластоподобных синовиальных клеток больных РА in vitro

Модуляторы		Миграция ( $M \pm m$ ) %, $n=9$	$p$	Инвазия ( $M \pm m$ ) %, $n=9$	$p$
Контроль		45.21 $\pm$ 4.63		38.34 $\pm$ 7.37	
Гидралазин	5 мкмоль/ мл	38.88 $\pm$ 1.78	<0.001	21.7 $\pm$ 3.67	<0.001
	20 мкмоль/ мл	38.8 $\pm$ 1.72	<0.001	22.34 $\pm$ 4.39	<0.001

**Таблица 4**

Влияние генистеина на миграцию и инвазию фибробластоподобных синовиальных клеток больных РА in vitro

Модуляторы		Миграция ( $M \pm m$ ) %, $n=9$	$p$	Инвазия ( $M \pm m$ ) %, $n=9$	$p$
Контроль		45.21 $\pm$ 4.63		38.34 $\pm$ 7.37	
Генистеин	5 мкг/мл	37.58 $\pm$ 1.6	<0.001	16.88 $\pm$ 8.01	<0.001
	20	38.36 $\pm$ 1.7	<0.001	21.94 $\pm$ 6.42	<0.001

	МКГ/МЛ				
--	--------	--	--	--	--

Как показано в таблицах 2-4 SAmе, гидралазин, генистеин статистически значимо уменьшали показатель инвазии, в среднем на 55%, а показатель миграции на 15%. Дозозависимого эффекта не отмечено (Таб. 2-4).

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Адгезивные клетки, полученные из эксплантата синовиальной ткани, содержат два легко различимых типа клеток, которые напоминают основные клеточные популяции, обнаруживаемые в синовиальной оболочке интимы (макрофагоподобные синовиоциты и фибробластоподобные синовиоциты). В то время как ФСК пролиферируют *in vitro*, синовиальные макрофаги окончательно дифференцируются и не размножаются в культуре. Следовательно, относительно однородная популяция синовиальных фибробластов в культурах доступна после трех-четырех пассажей. Как правило, выделение культур ФСК при РА происходит с помощью ферментативной дезагрегации синовиальной ткани коллагеназой и повторными пассажами [165]. В отличие от макрофагов, ФСК имеют типичную морфологию и ультраструктуры: при световой микроскопии ФСК в культуре представляют собой удлинённые, иногда овальные или полигональные клетки, с небольшим количеством цитоплазматических отростков, хорошо выраженным ядром, отсутствуют пищеварительные вакуоли. Ещё одной отличительной чертой ФСК от макрофагов является неспособность поглощать частички латекса.

Резидентные стромальные ФСК больных РА в культурах демонстрируют основные свойства, которые характерны для них *in vivo*. В нашем исследовании показано, что ФСК культур от больных РА спонтанно продуцируют провоспалительные цитокины, преимущественно IL-6, содержание которого в супернатантах клеток оценивается в нанограммах, что согласуется с результатами зарубежных исследований [188]. Продукция провоспалительного цитокина существенно увеличивается при стимуляции культур IL-1 $\beta$  - одним из активаторов фибробластов синовиальной ткани *in*

*vivo*. В работе Georganas и др. было показано, что транскрипционные механизмы являются ответственными за спонтанную и IL-1 $\beta$ -стимулированную секрецию IL-6 в ФСК больных РА. Экспрессия IkB $\alpha$  ингибировала ядерную локализацию и активацию всех связывающих комплексов кВ IL-6. Кроме того, экспрессия IkB $\alpha$  приводила к подавлению транскрипции гена IL-6, а также к заметному снижению конститутивной и IL-1 $\beta$ -стимулированной секреции IL-6 в ФСК больных РА. Эти наблюдения указывают на важную роль NF-кВ в экспрессии IL-6 в ФСК больных РА [62,138,139]. Другой, не менее важный провоспалительный цитокин, IL-18 также спонтанно вырабатывается в культуре ФСК, продукция цитокина значительно увеличивается при стимуляции IL-1 $\beta$ , что показано в нашем исследовании и в работе Gracie et al. [63]. Нет данных в отечественной и зарубежной литературе о продукции IL-17 и IL-10 культур ФСК больных РА, в нашей работе продемонстрирована спонтанная и IL-1 $\beta$ -стимулированная продукция данных цитокинов. GM-CSF является мощным стимулятором макрофагов и нейтрофилов и продуцируется синовиальной оболочкой больных ревматоидным артритом. В исследовании Alvaro-Gracia и др. было показано, что GM-CSF определялся в супернатантах IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ -стимулированных культурах ФСК больных РА, но не в культивируемой среде без стимуляции или стимулированных каким-либо другим цитокином. IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  оказывали синергическое действие на продукцию GM-CSF [5]. В нашей работе определялась спонтанная и IL-1 $\beta$ -стимулированная продукция GM-CSF. Результаты наших исследований подтверждают данные литературы о том, что провоспалительный цитокин IL-1 $\beta$  усиливает синтез OPG и RANKL ФСК. В исследовании Tunyogi-Csapo было показано, что IL-1 $\beta$  стимулировал в ревматоидных синовиальных фибробластах человека более высокий уровень продукции RANKL и OPG, чем в нормальных синовиоцитах [193]. В другом исследовании было выявлено, что провоспалительные цитокины, такие как IL-1 $\beta$ , IL-6 совместно с растворимым рецептором sIL-6R, IL-17 и TNF- $\alpha$ , стимулируют продукцию

остеопротегерина ФСК больных РА до уровня (5-20 нг/мл), достаточного для ингибирования остеокластогенеза *in vitro* [208]. Эти провоспалительные цитокины повышают продукцию OPG прямо или косвенно, путем стимуляции синтеза простагландина E2 (PGE2) [208]. В противоположность действию указанных цитокинов, основной фактор роста фибробластов (bFGF) ингибирует продукцию OPG ФСК за счет подавления прямого стимулирующего действия провоспалительных цитокинов [208]. Данные литературы и результаты нашей работы демонстрируют, что ФСК больных РА являются существенным источником RANKL и OPG.

В использованной модели уровень всех изученных провоспалительных цитокинов снижался только при добавлении в культуры классического донатора метильных групп S-AdoMet в определенных дозах. Генистеин также в некоторых дозах снижал продукцию IL-6 и IL-17. Наши данные согласуются с результатами зарубежных исследований, например, Cheng в своей работе показал, что генистеин дозозависимо ингибировал экспрессию и секрецию IL-6 и VEGF в МН7А [32]. В других исследованиях *in vitro* и *in vivo* генистеин также продемонстрировал свои противовоспалительные, антиангиогенные, антипролиферативные, антиоксидантные, иммуномодулирующие и обезболивающие свойства, обусловленные его влиянием на процесс метилирования ДНК и позволяющими отнести препарат к числу перспективных препаратов в лечении РА [199,116]. Деметилятор гидралазин практически не менял синтез цитокинов в IL-1 $\beta$  стимулированных ФСК больных РА. Ху и его коллеги культивировали эксплантаты ворсинок плаценты и мононуклеарные клетки периферической крови PBMC женщин с нормальной беременностью с различными дозами гидралазина. Было показано, что известный деметилятор гидралазин стимулирует выработку противовоспалительного цитокина IL-10 в мононуклеарах периферической крови женщин с нормальной беременностью. Было также показано, что с увеличением доз гидралазина продукция TNF- $\alpha$  и IL-6 плацентой и PBMC у беременных

постепенно снижалась [204]. Разницу в продукции цитокинов можно объяснить различными экспериментальными моделями и дозами препарата.

Что касается действия модуляторов метилирования ДНК на продукцию клетками ФСК противовоспалительного цитокина IL-10, то она не корректируется модуляторами, за исключением генистеина, внесение которого в средней дозировке снижал продукцию цитокина. Возможно, этим можно объяснить неудавшиеся попытки достичь клинического эффекта у больных РА путем изменения баланса активности провоспалительных и противовоспалительных цитокинов?

При РА фибробластоподобные синовиальные клетки активно пролиферируют, образуя агрессивную грануляционную ткань - паннус, которая в процессе роста разрушает кость, хрящ, связки, что приводит к деструкции и деформации сустава. Важно отметить, что паннус, сохраняющийся у больных в течение всего времени болезни, формируется после «иммунной» фазы развития РА, продолжающейся около года [4]. В разрушении внеклеточного матрикса хряща участвуют различные ферменты, секретируемые в первую очередь ФСК паннуса: коллагеназы, желатиназы, агреканазы, стромелизин; сериновые протеазы (трипсин, химотрипсин), катепсины, MMP [55].

Помимо деструкции хряща происходит разрушение костной ткани с участием остеокластов, которые накапливаются в субхондральном костном мозге и в зоне контакта паннуса и кости [164,24,64]. Резорбция кости осуществляется путем взаимодействия рецептора активатора NFkB (RANK) на мембране остеокластов [20], с лигандом - RANKL [186], который относится к семейству факторов некроза опухоли и представлен на поверхности остеобластов, стромальных клеток костного мозга, ФСК [41]. Он также секретируется активированными Т-клетками при стимуляции провоспалительными цитокинами (TNF, IL-1, IL-17) [80,111]. Антагонистом субсистемы RANK - RANKL является растворимый рецептор - остеопротегерин [209] - гликопротеин, относящийся к семейству фактора

некроза опухоли [109]. Он ингибирует связывание RANK и RANKL, тем самым угнетая мобилизацию, пролиферацию и активацию остеокластов. У взрослых людей остеопротегерин выделяется остеобластами после их активации [174], также обнаруживается в эндотелиальных клетках и макрофагах синовиальной ткани и субсиновиальном слое [74, 76].

Нами показано, что в сложной цепи регуляции продукции OPG и RANKL ФСК важная роль принадлежит процессам метилирования и деметилирования ДНК, в частности, донаторы метильных групп способствуют снижению синтеза OPG и RANKL ФСК *in vitro*. В исследовании Viereck и др. было показано, что генистеин увеличивал уровень мРНК OPG и секрецию белка до двух-шести раз в зависимости от дозы и времени в первичных трабекулярных остеобластах человека, полученных от здоровых доноров. По мнению автора, стимуляция экспрессии мРНК OPG и секреции белка в клеточной линии остеобластов человека происходит посредством активации эстрогеновых рецепторов альфа [197]. Li и его коллеги обнаружили, что генистеин значительно усиливал противоопухолевую, антиинвазивную и антиметастатическую активность доцетаксела как в культуре, так и в SCID-человеческой модели экспериментальных костных метастазов рака предстательной железы. Было показано, что экспрессия OPG индуцируется генистеином и ингибируется доцетакселом, при этом генистеин значительно подавлял экспрессию и секрецию RANKL, а также ингибировал образование остеокластов [117]. В исследовании Li. Y было показано дозозависимое (10 и 50 мг/кг) влияние генистеина на гомеостаз субхондральной кости мышелка нижней челюсти крысы. Как в низких, так и в высоких дозах генистеин значительно увеличивал минеральную плотность и объем костной ткани и приводил к увеличению толщины субхондральной трабекулярной кости *in vivo*. В данном исследовании лечение генистеином в низких дозах увеличивало экспрессию OPG на уровне сыворотки крови и уровне мРНК как *in vivo*, так и *in vitro*. Лечение генистеином в низких дозах также снижало экспрессию

RANKL и соотношение RANKL/OPG. Эти данные свидетельствуют о том, что нормальные дозы генистеина улучшают формирование костей и ингибируют резорбцию костей. Однако лечение генистеином в высоких дозах снижало не только экспрессию RANKL и соотношение RANKL/OPG, но OPG. Это указывает на то, что избыток генистеина ингибирует как резорбцию кости, так и образование кости в субхондральной кости нижней челюсти крысы [118]. В нашем исследовании генистеин снижает продукцию остеопротегерина и RANKL ФСК больных РА, что подтверждается данными зарубежной литературы. Уместно заметить, что по данным Skoumal M. et al. содержание OPG значительно снижено в синовиальной жидкости больных РА, в результате чего увеличивается содержание RANKL [175]. По мнению авторов исследования, уменьшение концентрации OPG в синовиальной жидкости отражает низкий защитный эффект OPG на кость, что способствует более раннему и более выраженному разрушению кости у больных РА. Таким образом, регуляция продукции OPG и RANKL различными клетками, в том числе ФСК, происходит с участием большого числа стимулирующих и ингибирующих факторов, механизмы координации действия которых нам еще предстоит уточнить. Несомненно, что среди этих факторов важная роль принадлежит регуляторам процесса метилирования ДНК.

ФСК способны к миграции в различные, в том числе интактные суставы, лежащей в основе полиартикулярного поражения при РА [111]. Кроме этого, синовиоциты больных РА характеризуются инвазивным ростом, сохраняющимся после ряда пассажей в культуре [143]. Предполагается, что в основе формирования стабильно активированного деструктивного, апоптозустойчивого фенотипа ФСК при РА, способного к миграции и инвазии, лежат эпигенетические изменения, включая изменения в метилировании ДНК [100]. Эпигенетические нарушения ФСК больных РА влекут за собой внутриклеточные метаболические изменения, касающиеся



содержания глюкозы, липидов, кислорода, ферментов, цитокинов и др. [27], обеспечивая высокий провоспалительный потенциал клеток [12].

Анализ миграции и инвазии различных типов клеток *in vitro* первоначально осуществлялся в предложенных Бойденом камерах, состоящих из двух отсеков [104]. В последующем были разработаны улучшенные и упрощенные одноразовые варианты оригинальных камер, однако основной принцип метода сохранен во всех модификациях, описанных в подробном обзоре Kramer и др. [104]. Обязательным является наличие двух отсеков камеры, содержащих питательную среду и разделенных пористой мембраной, через которую клетки перемещаются. Миграция определяется как направленное перемещение клеток на субстрате, таких как базальные мембраны, волокна внеклеточного матрикса или пластиковая поверхность планшета [104]. При этом разные типы клеток могут использовать различные варианты моторики, которые обязательно включают прочную фокальную фиксацию к внеклеточному матриксу, цитоскелетное сокращение и удлинение веретеноподобных клеточных тел.

Инвазия определяется как движение клеток с помощью 3D матрицы, которое сопровождается реструктуризацией 3D среды. Для того, чтобы путешествовать через матрицу, клетка должна изменить свою форму и взаимодействовать с внеклеточным матриксом, который с одной стороны дает возможность клеткам прикрепиться к субстрату, с другой стороны, представляет собой барьер для движущихся клеток. Процесс инвазии многокомпонентен. Он включает в себя адгезию, протеолиз внеклеточных компонентов матрикса и собственно миграции [142,104]. Основным отличием анализа миграции от анализа инвазии в камере Бойдена является то, что пористую мембрану между верхней и нижней камерой покрывают тонким слоем внеклеточного матрикса, перед тем как клеточную взвесь добавляют в верхнюю камеру. Внеклеточный матрикс может быть разным, в наших экспериментах использовалась водорастворимая пленка коллагена I.

Внеклеточный матрикс закупоривает поры мембраны, блокируя тем самым миграцию не инвазивных клеток.

Следует отметить, что современные способы стандартизации и автоматизации методов миграции и инвазии различных клеток, в том числе опухолевых, позволили использовать их для эффективного доклинического скоростного скрининга большого числа потенциальных лекарственных средств, имеющих разные мишени [142]. Ограничением метода является отсутствие соответствия между результатами доклинических и клинических исследований. Показано, например, что металлопротеиназы способствуют инвазии опухолевых клеток через окружающие ткани *in vitro*, а применение ингибиторов металлопротеиназ у больных не снижает риска метастазирования [142]. В исследовании Shelef и др. установлено, что ингибиторы фокальной адгезионной киназы (ФАК) уменьшают миграцию и инвазию ФСК *in vitro*, но не снижают тяжесть экспериментального артрита у мышей [171]. Эти данные свидетельствуют о том, что в многокомпонентной цепи механизмов миграции и инвазии клеток одно эффективное селективное вмешательство в эти процессы *in vitro* не гарантирует развития клинического эффекта. В наших исследованиях показано, что модуляция глобального метилирования и деметилирования ДНК в ФСК больных РА, с помощью известных фармакологических соединений приводит к одинаковому результату: снижению миграции и инвазии. Neidhart и соавторы показали, что подавление пути рециркуляции полиаминов диминазен ацетуратом, ингибитором спермин/спермидин-N1-ацетилтрансферазы (SSAT), способствует увеличению уровня 5-метилцитозина и DNMT1, следовательно, восстанавливает метилирование ДНК в ревматоидном синовии. Этот агент в сочетании с S-аденозилметионином снижает экспрессию MMP1, а также инвазивность синовиоцитов, имплантированных иммунодефицитным мышам на 70% [147]. В исследовании Cui и др. было показано, что генистеин ингибировал инвазивные и миграционные способности клеток меланомы B16F10

дозозависимым образом. С одной стороны, высокая концентрация генистеина (100  $\mu\text{M}$ ) значительно ингибировала клеточную адгезию и миграцию, как показал анализ заживления раны, а также анализ трансвелл-миграции и инвазии. Было продемонстрировано, что генистеин резко подавляет миграционные и инвазивные способности клеток B16F10 через путь FAK / paxillin. Кроме того, уровни p-p38, p-ERK и p-JNK также были значительно снижены при лечении генистеином. С другой стороны, более низкая концентрация генистеина (12,5  $\mu\text{M}$ ), наоборот, способствовала как инвазии, так и миграции клеток активируя сигнальные каскады FAK/paxillin и MAPK. Это исследование показало, что генистеин оказывает двойное функциональное воздействие на клетки меланомы. [42]. Эти исследования свидетельствуют о том, что модуляторы метилирования ДНК подавляют инвазивные и миграционные свойства клеток. А механизм можно объяснить сложностью этапов миграции и инвазии, каждый из которых контролируется различными факторами, включая гипометилирование и гиперметилирование промоторных участков генов ДНК, ответственных за экспрессию белков, участвующих в миграции и инвазии. Следует также помнить, что регуляцию экспрессии генов в промоторных участках ДНК ФСК осуществляют не только механизмы метилирования ДНК, но и ацетилирования гистонов, малые некодирующие РНК и другие факторы эпигенома [100]. Пока не ясно, как координируются процессы нарушения метилирования ДНК, ацетилирования гистонов, активности малых РНК, обеспечивая стабильность фенотипа ФСК, их провоспалительный потенциал. В то же время, консерватизм только метилирования ДНК ФСК в промоторных участках генов провоспалительных медиаторов, проапоптотических факторов, факторов роста и пр. обеспечивает как фенотипическую, так и функциональную стабильность клеток при 3 - 7 пассажах [202]. Надо помнить, что большинство приобретенных эпигенетических нарушений - обратимые процессы, регулируемые специфическими ферментами и кофакторами, которые позволяют клеткам

изменять экспрессию генов в ответ на различные раздражители. И это значит, что ферменты и молекулярные комплексы, участвующие в этих процессах, являются потенциальными терапевтическими мишенями, а культура ФСК больных РА *in vitro* - адекватная модель для доклинического скрининга новых, разных по механизму лекарственных соединений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стромальные ФСК больных РА являются частью большого ансамбля клеток, принимающих участие в начале болезни и ее неуклонной прогрессии, способствуют реализации персистирующего воспаления. Роль ФСК в патогенезе значительно возрастает в развернутую стадию болезни, когда происходит формирование паннуса. Спонтанная продукция ряда медиаторов культур ФСК больных РА, усиление синтеза под действием IL-1 $\beta$  свидетельствуют о том, что культуры отражают некоторые звенья патогенеза и возможности их коррекции с помощью различных вмешательств, в том числе модуляторов метилирования ДНК. ФСК пока недостаточно используются в качестве терапевтической мишени, а культуры ФСК могут быть полезны для доклинического скрининга новых, потенциально эффективных, препаратов.

Проведенные исследования позволяют заключить, что используемая модель культуры ФСК от больных РА является чувствительным методом оценки действия метилирующих и деметилирующих соединений. В этой модели синтез всех изученных провоспалительных цитокинов снижался только при добавлении в культуры донатора метильных групп SAME в определенных дозах. Деметилятор гидралазин практически не менял синтез цитокинов, а генистеин в некоторых дозах снижал продукцию IL-6 и IL-17. Модуляторы метилирования ДНК не влияли на продукцию клетками ФСК противовоспалительного цитокина IL-10, за исключением генистеина, внесение которого в средней дозировке снижал продукцию цитокина. Внесение в культуры метилирующего соединения SAME и генистеина приводило к статистически значимому снижению продукции OPG и RANKL, а добавление гидралазина не меняло синтеза цитокинов. SAME, гидралазин и генистеин уменьшали миграционную и инвазивную способность ФСК больных РА. В работе мы руководствовались решением поставленных задач, в то же время отчетливо понимали, что уровень синтеза про- и противовоспалительных

цитокинов, других медиаторов ФСК, а также их миграционная и инвазивная способность ФСК больных РА *in vitro* определяется не только процессами метилирования и деметилирования ДНК, но и опосредована другими эпигенетическими механизмами.

## ВЫВОДЫ

1. ФСК больных РА в культуре *in vitro* спонтанно и под воздействием IL-1 $\beta$  продуцируют провоспалительные цитокины IL-6, IL-18, IL-17, противовоспалительный цитокин IL-10, RANKL, остеопротегерин и GM-CSF, мигрируют в камере Бойдена и проникают через коллагеновую мембрану. Это свидетельствует о цитокин-продуцирующих свойствах и способности к миграции и инвазии у ФСК больных РА.
2. Ингибитор DNMT1 гидралазин не влияет на продукцию IL-6, IL-18, IL-10, GM-CSF, RANKL и остеопротегерина; донатор метильной группы SAME уменьшает синтез IL-6, IL-17 и IL-18. Эти данные указывают на то, что гены IL-6, IL-18, IL-17, GM-CSF, RANKL и остеопротегерина находятся в гипометилированном состоянии, SAME повышает метилирование генов IL-6, IL-17 и IL-18 в культурах ФСК больных РА.
3. Фитоэстроген генистеин уменьшает продукцию IL-6 в 3 раза, IL-17 в 25 раз и IL-10 в 2 раза, это свидетельствует о преимущественном ингибирующем действии генистеина на синтез провоспалительных цитокинов ФСК больных РА.
4. Донатор метильной группы SAME и генистеин уменьшают синтез остепротегерина в 2 раза и RANKL в 3-5 раз, что указывает на преимущественно ингибирующее действие SAME и генистеина на продукцию RANKL ФСК больных РА.
5. Гидралазин, генистеин и SAME в одинаковой степени снижают процент ФСК, мигрирующих в камере Бойдена и проникающих через коллагеновую мембрану. Это свидетельствует об ингибирующем действии гидралазина, генистеина и SAME на миграционную и инвазивную способность ФСК больных РА.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НПВП	Нестероидные противовоспалительные препараты
ОА	Остеоартрит
РА	Ревматоидный артрит
СО	Синовиальная оболочка
СФ	Синовиальный фибробласт
ТКР	Т-клеточный рецептор
ФСК	Фибробластоподобные синовиальные клетки
ЭЛС	Эктопические лимфоидные структуры
AIA	Адьювант-индуцированный артрит
ALCAM	Молекула клеточной адгезии активированных лейкоцитов
APRIL	Индукующий пролиферацию лиганд
BAFF	В-клеточный активационный фактор
bFGF	Основной фактор роста фибробластов
BSA	Бычий сывороточный альбумин
CAIA	Артрит, индуцированный антителом против коллагена
CCL	СС-мотивный хемокиновый лиганд
CCR5	СС-рецептор хемокина 5
CD	Кластер дифференцировки
CIA	Коллаген-индуцированный артрит
COX	Циклооксигеназа
CrG	Цитозин и гуанин, соединенные через фосфатную группу
CXCL12	Хемокин подсемейства С-Х-С лиганд 12
CXCR3	Хемокиновый рецептор семейства С-Х-С 3
DMEM	Минимальная среда Игла модифицированная Dulbecco
DNMTi	Ингибиторы DNMTs
DNMTs	ДНК-метилтрансферазы
DR3	Ген рецептора смерти 3



EGCG	Эпигаллокатехин 3-галлат
EGF	Эпидермальный фактор роста
ERK	Внеклеточная сигнально-регулируемая киназа
FAK	Фокальная адгезионная киназа
FBS	Фетальная бычья сыворотка
FDA	Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов
GM-CSF	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
GRO- $\alpha$	Рост-регулируемый онкоген-альфа
GTPase	Гидролазы связывающие и гидролизующие гуанозинтрифосфат
GWAS	Полногеномный поиск ассоциаций
HLA	Группа антигенов гистосовместимости
ICAM-1	Молекулы межклеточной адгезии -1
IGFBP-3	Белок-3, связывающий инсулиноподобный фактор роста
JAK	Янус-киназы
LFA	Лимфоцитарный функционально-ассоциированный антиген
LINE-1	Длинные диспергированные нуклеотидные элементы - 1
LPS	Липополисахарид
MCP-1	Моноцитарный хемоаттрактантный протеин - 1
M-CSF	Макрофагальный колониестимулирующий фактор
MeCP 2	Метил-CpG-связывающий белок 2
MFAP2	Микрофибрилярно-ассоциированный белок 2
MMP	Матриксные металлопротеиназы
MTX	Метотрексат
NET	Внеклеточные нейтрофильные ловушки
NK	Натуральный киллер
NOD	Нуклеотидсвязывающий домен олигомеризации
OPG	Остеопротегерин

PBS	Фосфатно-буферный раствор
PDGF	Фактор роста тромбоцитов
PGE2	Простагландин E2
PGIA	Протеогликан - индуцированный артрит
PPAR	Рецепторы, активируемые пероксисомным пролифератором
RAGE	Рецепторы продвинутых продуктов гликирования
RANK	Активатор рецептора ядерного фактора каппа- $\beta$
RANKL	Активатор рецептора лиганда ядерного фактора каппа- $\beta$
SAMe	S-аденозилметионин
SCID	Тяжелый комбинированный иммунодефицит
SEN1	Сентрин специфическая протеаза 1
SH2	Фосфатаза 2, содержащая SH2 домены
SNP	Однонуклеотидный полиморфизм
SUMO-1	Малый убиквитин-подобный модификатор -1
TGF $\beta$	Трансформирующий ростовой фактор бета
TLR	Toll-like рецептор
TNF- $\alpha$	Фактор некроза опухоли-альфа
TRAIL	TNF-связанный апоптозиндуцирующий лиганд
TRAP	Тартрат-резистентная кислая фосфатаза
UDPGD	Уридин дифосфоглюкозо-дегидрогеназа
VCAM-1	Васкулярная молекула клеточной адгезии 1
VEGF	Фактор роста эндотелия сосудов
VLA-4	Очень поздний антиген-4

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Михайлова А.С., Лесняк О.М. Регуляторы роста паннуса при ревматоидном артрите, являющиеся потенциальными мишенями биологической терапии // Современная ревматология. - 2018. - Т. 12. - № 4. - С. 55-59.
2. Павлова В.Н. Синовиальная среда суставов. 1980, Москва: Медицина. 294 стр.
3. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме // Успехи биологической химии. - 2007. - Т. 47. - С. 3-52.
4. Шнайдер М.А., Ширинский В.С., Ширинский И.В. Культура фибробластоподобных синовиальных клеток больных ревматоидным артритом: свойства и возможности // Медицинская иммунология. - 2016. - Т. 18. - № 2. - С. 107-118.
5. Alvaro-Gracia J.M., Zvaifler N.J., Brown C.B., Kaushansky K., Firestein G.S. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. VI. Analysis of the synovial cells involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and gene expression in rheumatoid arthritis and its regulation by IL-1 and tumor necrosis factor-alpha // J. Immunol. - 1991. - V. 146. - № 10. - P. 3365-3371.
6. Alvaro-Gracia J.M., Zvaifler N.J., Firestein G.S. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes // J. Clin. Invest. - 1990. - V. 86. - № 6. - P. 1790-1798.
7. Alyaqoub F.S., Tao L., Kramer P.M., Steele V.E., Lubet R.A., Gunning W.T., Pereira M.A. Prevention of mouse lung tumors and modulation of DNA

methylation by combined treatment with budesonide and R115777 (Zarnestra MT) // *Carcinogenesis*. - 2007. - V 28. - P. 124-129.

8. Arce C., Segura-Pacheco B., Perez-Cardenas E., Taja-Chayeb L., Candelaria M., Duennas-Gonzalez A. Hydralazine target: from blood vessels to the epigenome // *J. Transl. Med.* - 2006. - V. 4. - P. 10-22.

9. Arend W.P., Dayer J.M. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* - 1990. - V. 33. - P. 305-315.

10. Avina-Zubieta J.A., Thomas J., Sadatsafavi M., Lehman A.J., Lacaille D. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies // *Ann Rheum Dis.* - 2012. - V. 71. - № 9. - P. 1524-1529.

11. Bagdonas E., Karouzakis E., Gay R. et al. AB0348. The adverse effect of methotrexate on synovial fibroblasts in vitro // *Ann Rheum Dis.* - 2013. - V. 72. - P. A893-A894.

12. Bartok B., Firestein G.S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis // *Immunol. Rev.* - 2010. - V. 233. - № 1. - P. 233-255.

13. Berckmans R.J., Nieuwland R., Kraan M.C., Schaap M.C., Pots D., Smeets T.J. et al. Synovial microparticles from arthritic patients modulate chemokine and cytokine release by synoviocytes // *Arthritis Res Ther.* - 2005. - V. 7. - P. R536-544.

14. Bergström B., Carlsten H., Hultgård Ekwall A. Methotrexate inhibits effects of platelet-derived growth factor and interleukin-1 $\beta$  on rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes // *Arthritis Res Ther.* - 2018. - V. 20. - P. 49.

15. Birnbaum H., Pike C., Kaufman R., Marynchenko M., Kidolezi Y., Cifaldi M. Societal cost of rheumatoid arthritis patients in the US // *Curr Med Res Opin.* - 2010. - V. 26. - № 1. - P. 77-90.

16. Bombardieri M., Kam N.W., Brentano F., Choi K., Filer A., Kyburz D. et al. A BAFF/APRIL-dependent TLR3-stimulated pathway enhances the capacity of rheumatoid synovial fibroblasts to induce AID expression and Ig class-switching in B cells // *Ann Rheum Dis.* - 2011. - V. 70. - P. 1857-1865.
17. Bombardieri M., Lewis M., Pitzalis C. Ectopic lymphoid neogenesis in rheumatic autoimmune diseases // *Nature Reviews Rheumatology.* - 2017. - V. 13. - P. 141.
18. Bongartz T., Nannini C., Medina-Velasquez Y.F., Achenbach S.J., Crowson C.S., Ryu J.H., Vassallo R., Gabriel S.E., Matteson E.L. Incidence and mortality of interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: a population-based study // *Arthritis Rheum.* - 2010. - V. 62. - № 6. - P. 1583-1591.
19. Bostrom E.A., Svensson M., Andersson S., Jonsson I.M., Ekwall A.K., Eisler T. et al. Resistin and insulin/insulin-like growth factor signaling in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* - 2011. - V. 63. - P. 2894-2904.
20. Boyle W.J., Simonet W.S., Lacey D.L. Osteoclast differentiation and activation // *Nature.* - 2003. - V. 423. - P. 337-342.
21. Brackertz D., Hagmann J., Kueppers F. Proteinase inhibitors in rheumatoid arthritis // *Ann. Rheum. Dis.* - 1975. - V. 34. - P. 225-230.
22. Brennan F.M., Chantry D., Jackson A., Maini R., Feldmann M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis // *Lancet.* - 1989. - V. 2. - P. 244-247.
23. Brentano F., Schorr O., Gay R.E., Gay S., Kyburz D. RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3 // *Arthritis Rheum.* - 2005. - V. 52. - P. 2656-2665.
24. Bromley M., Woolley D.E. Chondrocytes and osteoclasts at subchondral sites of erosions in the rheumatoid joint // *Arthritis Rheum.* - 1984. - V. 27. - P. 968-975.

25. Brunmark A., O'Rourke A.M. Augmentation of mature CD4<sup>+</sup> T cell responses to isolated antigenic class II proteins by fibronectin and intercellular adhesion molecule-1 // *The Journal of Immunology*. - 1997. - V. 159. - P. 1676-1685.
26. Burmester G.R., Jahn B., Rohwer P., Zacher J., Winchester R.J. and Kalden J.R. Differential expression of Ia antigens by rheumatoid synovial lining cells // *J. Clin. Invest.* - 1987. - V. 80. - P. 595-604.
27. Bustamante M.F., Garcia-Carbonell R., Whisenant K.D., Guma M. Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis // *Arthritis Res Ther.* - 2017. - V. 19. - № 1. - P. 110.
28. Butler D.M., Maini R.N., Feldmann M., Brennan F.M. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist // *Eur Cytokine Netw.* - 1995. - V. 6. - P. 225-230.
29. Carmona-Rivera C., Carlucci P.M., Moore E., Lingampalli N., Uchtenhagen H., James E. et al. Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis // *Sci Immunol.* - 2017. - V. 2. - P. eaag3358.
30. Carrion M., Juarranz Y., Perez-Garcia S., Jimeno R., Pablos J.L., Gomariz R.P. et al. RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide // *Arthritis Rheum.* - 2011. - V. 63. - P. 1626-1636.
31. Cheng J.C., Matsen C.B., Gonzales F.A., Ye W., Greer S., Marquez V.E., Jones P.A., Selker E.U. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine // *J. Natl. Cancer Inst.* - 2003. - V. 95. - P. 399-409.
32. Cheng W.X., Huang H., Chen J.H., Zhang T.T., Zhu G.Y., Zheng Z.T., Lin J.T., Hu Y.P., Zhang Y., Bai X.L., Wang Y., Xu Z.W., Song B., Mao Y.Y., Yang F., Zhang P. Genistein inhibits angiogenesis developed during rheumatoid

arthritis through the IL-6/JAK2/STAT3/VEGF signalling pathway // J Orthop Translat. - 2019. - V. 22. - P. 92-100.

33. Cho M.L., Yoon C.H., Hwang S.Y., Park M.K., Min S.Y., Lee S.H. et al. Effector function of type II collagen–stimulated T cells from rheumatoid arthritis patients: Cross-talk between T cells and synovial fibroblasts // Arthritis Rheum. - 2004. - V. 50. - P. 776-784.

34. Choy E.H., Chikanza I.C., Kingsley G.H., Corrigall V., Panayi G.S. Treatment of rheumatoid arthritis with single dose or weekly pulses of chimaeric anti-CD4 monoclonal antibody // Scand J Immunol. - 1992. - V. 36. - P. 291-298.

35. Choy E.H., Pitzalis C., Cauli A., Bijl J.A., Schantz A., Woody J. et al. Percentage of anti-CD4 monoclonal antibody-coated lymphocytes in the rheumatoid joint is associated with clinical improvement. Implications for the development of immunotherapeutic dosing regimens // Arthritis Rheum. - 1996. - V. 39. - P. 52-56.

36. Ciechomska M., Roszkowski L., Maslinski W. DNA Methylation as a Future Therapeutic and Diagnostic Target in Rheumatoid Arthritis // Cells. - 2019. - V. 8. - P. 953.

37. Close D.R. Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases // Ann. Rheum. Dis. - 2001. - V. 60. - P. iii62-iii67.

38. Collin-Osdoby P., Rothe L., Anderson F., Nelson M., Maloney W., Osdoby P. Receptor activator of NF- $\kappa$ B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis // J. Biol. Chem. - 2001. - V. 276. - P. 20659-20672.

39. Connolly M, Rooney PR, McGarry T, Maratha AX, McCormick J, Miggin SM, et al. Acute serum amyloid A is an endogenous TLR2 ligand that mediates inflammatory and angiogenic mechanisms // Ann Rheum Dis. - 2016. - V. 75. - P. 1392-1398.

40. Cronstein B.N., Naime D., Ostad E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation // J Clin Invest. - 1993. - V. 92. - P. 2675-2682.
41. Crotti T.N., Ahern M.J., Lange K., Weedon H., Coleman M., Roberts-Thomson P.J., Haynes D.R., Smith M.D. Variability of RANKL and osteoprotegerin staining in synovial tissue from patients with active rheumatoid arthritis: quantification using color video image analysis // J. Rheumatol. - 2003. - V. 30. - P. 2319-2324.
42. Cui S., Wang J., Wu Q., Qian J., Yang C., Bo P. Genistein inhibits the growth and regulates the migration and invasion abilities of melanoma cells via the FAK/paxillin and MAPK pathways // Oncotarget. - 2017. - V. 8. - № 13. - P. 21674–21691.
43. Dayer J.M., Beutler B., Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts // J. Exp. Med. - 1985. - V.162. - P. 2163-2168.
44. de Andres M.C., Perez-Pampin E., Calaza M., Santaclara F.J., Ortea I., Gomez-Reino J.J. et al. Assessment of global DNA methylation in peripheral blood cell subpopulations of early rheumatoid arthritis before and after methotrexate // Arthritis Res Ther. - 2015. - V. 17. - P. 233.
45. Diller M., Hasseli R., Hülser M.L., Aykara I., Frommer K., Rehart S., Müller-Ladner U., Neumann E. Targeting Activated Synovial Fibroblasts in Rheumatoid Arthritis by Peficitinib // Front Immunol. - 2019. - V. 26. - P. 541.
46. Ding T., Niu H., Zhao X., Gao C., Li X., Wang C. T-follicular regulatory cells: potential therapeutic targets in rheumatoid arthritis // Front Immunol. - 2019. - V. 10. - P. 2709.



47. Dolhain R.J., van der Heiden A.N., ter Haar N.T., Breedveld F.C., Miltenburg A.M. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* - 1996. - V. 39. - №. 12. - P. 1961-1969.
48. Eberhardt K., Larsson B.M., Nived K., Lindqvist E. Work disability in rheumatoid arthritis-development over 15 years and evaluation of predictive factors over time // *J Rheumatol.* - 2007. - V. 34. - №. 3. - P. 481-487.
49. Edwards J.C., Willoughby D.A. Demonstration of bone marrow derived cells in synovial lining by means of giant intracellular granules as genetic markers // *Ann. Rheum. Dis.* - 1982. - V. 41. - P. 177-182.
50. Ehling A., Schaffler A., Herfarth H., Tarner I.H., Anders S., Distler O. et al. The potential of adiponectin in driving arthritis // *J Immunol.* - 2006. - V. 176. - P. 4468-4478.
51. Ekwall A.K., Whitaker J.W., Hammaker D., Bugbee W.D., Wang W., Firestein G.S. The rheumatoid arthritis risk gene LBH regulates growth in fibroblast-like synoviocytes // *Arthritis Rheumatol.* - 2015. - V. 67. - № 5. - P. 1193-1202.
52. England B.R., Sayles H., Michaud K., Caplan L., Davis L.A., Cannon G.W., Sauer B.C., Solow E.B., Reimold A.M., Kerr G.S., Schwab P., Baker J.F., Mikuls T.R. Cause-Specific Mortality in Male US Veterans With Rheumatoid Arthritis // *Arthritis Care Res (Hoboken).* - 2016. - V. 68. - № 1. - P. 36-45.
53. Fan L.Y., He D.Y., Wang Q., Zong M., Zhang H., Yang L. et al. Citrullinated vimentin stimulates proliferation, pro-inflammatory cytokine secretion, and PADI4 and RANKL expression of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis // *Scand J Rheumatol.* - 2012. - V. 41. - P. 354-358.
54. Feldmann M., Brennan F.M., Maini R.N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis // *Annu. Rev. Immunol.* - 1996. - V. 14. - P. 397-440.

55. Firestein G.S. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Firestein G.S., Budd R.C., Harris T., McInnes I.B., Ruddy S., Sargent J.S., editors. *Kelly's Textbook of Rheumatology*. 8. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2009. - P. 1035-1086.
56. Firestein G.S., Alvaro-Garcia J.S., Maki R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis // *J. Immunol.* - 1990. - V. 144. - P. 3347-3353.
57. Firestein G.S., Gary S. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? // *Arthritis Rheum.* - 1996. - V. 39. - P. 1781-1790.
58. Firestein G.S., McInnes I.B. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis // *Immunity.* - 2017. - V. 46. - P. 183-196.
59. Firestein G.S., Nguyen K., Aupperle K.R., Yeo M., Boyle D.L., Zvaifler N.J. Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium // *Am. J. Pathol.* - 1996. - V. 149. - P. 2143-2151.
60. Fonseca J.E., Cortez-Dias N., Francisco A., Sobral M., Canhão H., Resende C., Castelhão W., Macieira C., Sequeira G., Saraiva F., Pereira da Silva J.A., Carmo-Fonseca M., Viana Queiroz M. Inflammatory cell infiltrate and RANKL/OPG expression in rheumatoid synovium: comparison with other inflammatory arthropathies and correlation with outcome // *Clin Exp Rheumatol.* - 2005. - V. 23. - P. 185-192.
61. Fu L.H., Ma C.L., Cong B., Li S.J., Chen H.Y., Zhang J.G. Hypomethylation of proximal CpG motif of interleukin-10 promoter regulates its expression in human rheumatoid arthritis // *Acta. Pharmacol. Sin.* - 2011. - V. 32. - P. 1373-1380.
62. Georganas C., Liu H., Perlman H., Hoffmann A., Thimmapaya B., Pope R.M. Regulation of IL-6 and IL-8 expression in rheumatoid arthritis synovial

fibroblasts: the dominant role for NF-kappa B but not C/EBP beta or c-Jun // J Immunol. - 2000. - V. 165. - № 12. - P. 7199-7206.

63. Gracie J.A., Forsey R.J., Chan W.L., Gilmour A., Leung B.P., Greer M.R., Kennedy K., Carter R., Wei X.Q., Xu D., Field M., Foulis A., Liew F.Y., McInnes I.B. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis // J Clin Invest. - 1999. - V. 10. - P. 1393-1401.

64. Gravallesse E.M., Manning C., Tsay A., Naito A., Pan C., Amento E., Goldring S.R. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor // Arthritis Rheum. - 2000. - V. 43. - P. 250-258.

65. Green D.R., Knight R.A., Melino G., Finazzi-Agro A., Orrenius S. Ten years of publication in cell death // Cell Death Differ. - 2004. - V. 11. - P. 2-3.

66. Grennan D.M., Gray J., Loudon J., Fear S. Methotrexate and early postoperative complications in patients with rheumatoid arthritis undergoing elective orthopaedic surgery // Ann. Rheum. Dis. - 2001. - V. 60. - P. 214-217.

67. Gwinnutt J.M., Symmons D.P.M., MacGregor A.J., Chipping J.R., Marshall T., Lunt M., Verstappen S.M.M. Have the 10-year outcomes of patients with early inflammatory arthritis improved in the new millennium compared with the decade before? Results from the Norfolk Arthritis Register // Ann Rheum Dis. - 2018. - V. 77. - № 6. - P. 848-854.

68. Hadler N.M., Johnson A.M., Spitznagel J.K., Quinet R.J. Protease inhibitors in inflammatory synovial effusions // Ann. Rheum. Dis. - 1981. - V. 40. - P. 55-59.

69. Hamann J., Wishaupt J.O., van Lier R.A., Smeets T.J., Breedveld F.C., Tak P.P. Expression of the activation antigen CD97 and its ligand CD55 in rheumatoid synovial tissue // Arthritis Rheum. - 1999. - V. 42. - P. 650-658.

70. Hammaker D., Whitaker J.W., Maeshima K. et al. Limb bud and heart development gene transcription is regulated by the interplay of an enhancer risk

allele and DNA methylation in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheumatol.* - 2016. - V. 68. - № 11. - P. 2637-2645.

71. Haqqi T.M., Anthony D.D., Gupta S., Ahmad N., Lee M.S., Kumar G.K., Mukhtar H. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea // *Proc Natl Acad Sci USA.* - 1999. - V. 96. - P. 4524–4529.

72. Hasegawa M., Nakoshi Y., Muraki M., Sudo A., Kinoshita N., Yoshida T. et al. Expression of large tenascin-C splice variants in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis // *J Orthop Res.* - 2007. - V. 25. - № 5. - P. 563-568.

73. Hassan N.J., Simmonds S.J., Clarkson N.G., Hanrahan S., Puklavec M.J., Bomb M. et al. CD6 regulates T-cell responses through activation-dependent recruitment of the positive regulator SLP-76 // *Mol Cell Biol.* - 2006. - V. 26. - № 17. - P. 6727-6738.

74. Haynes D.R., Barg E., Crotti T.N., Holding C., Weedon H., Atkins G.J., Zannettino A., Ahern M.J., Coleman M., Roberts-Thomson P.J., Kraan M., Tak P.P., Smith M.D. Osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls // *Rheumatology (Oxford).* - 2003. - V. 42. - P. 123-134.

75. Hitchon C.A., El-Gabalawy H.S. The synovium in rheumatoid arthritis // *Open Rheumatol. J.* - 2011. - V. 5. - P. 107-114.

76. Hofbauer L.C., Khosla S., Dunstan C.R., Lacey D.L., Boyle W.J., Riggs B.L. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption // *J. Bone Miner Res.* - 2000. - V. 15. - P. 2-12.

77. Hu Y., Li J., Qin L., Cheng W., Lai Y., Yue Y., Ren P., Pan X., Zhang P. Study in treatment of collagen-induced arthritis in DBA/1 mice model by genistein // *Curr Pharm Des.* - 2016. - V. 22. - № 46. - P. 6975-6981.

78. Hua X.M., Wang J., Qian D.M., Song J.Y., Chen H., Zhu X.L., Zhou R., Zhao Y.D., Zhou L., Li X.Z. et al. DNA methylation level of promoter region of activating transcription factor 5 in glioma // J. Zhejiang Univ. Sci. - 2015. - V. 16. - P. 757–762.
79. Huang Q-Q., Sobkoviak R., Jockheck-Clark A.R., Shi B., Mandelin A.M., Tak P.P. et al. Heat shock protein 96 is elevated in rheumatoid arthritis and activates macrophages primarily via TLR2 signaling. The Journal of Immunology // - 2009. - V. 182. - № 8. - P. 4965-4973.
80. Huber L.C., Distler O., Tarner I., Gay R.E., Gay S., Pap T. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis // Rheumatology (Oxford). - 2006. - V. 45. - P. 669-675.
81. Humby F., Bombardieri M., Manzo A., Kelly S., Blades M.C., Kirkham B. et al. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium // PLoS medicine. - 2009. - V. 6. - № 1. - P. e1.
82. Hwang S.J., Choi B., Kang S.S., Chang J.H., Kim Y.G., Chung Y.H. et al. Interleukin-34 produced by human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis supports osteoclastogenesis // Arthritis Res Ther. - 2012. - V. 14. - № 1. - P. R14.
83. Ishida K., Kobayashi T., Ito S., Komatsu Y., Yokoyama T., Okada M., Abe A., Murasawa A., Yoshie H. Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis // J. Periodontol. - 2012. - V. 83. - P. 917-925.
84. Isomaki P., Punnonen J. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis // Ann. Med. - 1997. - V. 29. - P. 499-507.

85. Iwanaga T., Shikichi M., Kitamura H., Yanase H., Nozawa-Inoue K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint // Arch. Histol. Cytol. - 2000. - V. 63. - № 1. - P. 17-31.
86. Jabbour E., Issa J.P., Garcia-Manero G., Kantarjian H. Evolution of decitabine development: Accomplishments, ongoing investigations, and future strategies // Cancer. - 2008. - V. 112. - P. 2341–2351.
87. Jinchao L., Jun L., Ye Y., Yiping H., Wenxiang C., Ruoxi L., Xiaohua P. and Peng Z. Genistein suppresses tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced inflammation via modulating reactive oxygen species/Akt/nuclear factor  $\kappa$ B and adenosine monophosphate-activated protein kinase signal pathways in human synovocyte MH7A cells // Drug Des Devel Ther. - 2014. - V. 8. - P. 315–323.
88. Jones D.S., Jenney A.P., Swantek J.L., Burke J.M., Lauffenburger D.A., Sorger P.K. Profiling drugs for rheumatoid arthritis that inhibit synovial fibroblast activation // Nature chemical biology. - 2017. - V. 13. - № 1. - P. 38.
89. Jones S., Horwood N., Cope A., Dazzi F. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells // The Journal of Immunology. - 2007. - V. 179. - № 5. - P. 2824-2831.
90. Jungel A., Distler O., Schulze-Horsel U., Huber L.C., Ha H.R., Simmen B. et al. Microparticles stimulate the synthesis of prostaglandin E(2) via induction of cyclooxygenase 2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 // Arthritis Rheum. - 2007. - V. 56. - № 11. - P. 3564-3574.
91. Kanbe K., Takemura T., Takeuchi K., Chen Q., Takagishi K., Inoue K. Synovectomy reduces stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1) which is involved in the destruction of cartilage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis // J. Bone Joint. Surg. Br. - 2004. - V. 86. - P. 296-300.
92. Karonitsch T., Beckmann D., Dalwigk K., Niederreiter B., Studenic P., Byrne R.A. et al. Targeted inhibition of Janus kinases abates interferon gamma-induced

invasive behaviour of fibroblast-like synoviocytes // *Rheumatology*. - 2017. - V. 57. - P. 572–577.

93. Karouzakis E., Gay R.E., Gay S., Neidhart M. Increased recycling of polyamines is associated with global DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts // *Arthritis Rheum.* - 2012. - V. 64. - P. 1809-1817.

94. Karouzakis E., Gay R.E., Michel B.A., Gay S., Neidhart M. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts // *Arthritis Rheum.* - 2009. - V. 60. - P. 3613-3622.

95. Karouzakis E., Gay R.E., Gay S., Neidhart M. Epigenetic deregulation in rheumatoid arthritis // *Adv Exp Med Biol.* - 2011. - V. 711. - P. 137–149.

96. Karouzakis E., Rengel Y., Jungel A., Kolling C., Gay R.E., Michel B.A., Tak P.P., Gay S., Neidhart M., Ospelt C. DNA methylation regulates the expression of CXCL12 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts // *Genes Immun.* - 2011. - V. 12. - P. 643-652.

97. Khan H., Vale C., Bhagat T., Verma A. Role of DNA methylation in the pathogenesis and treatment of myelodysplastic syndromes // *Semin. Hematol.* - 2013. - V. 50. - P. 16-37.

98. Kim W.U., Yoo S.A., Min S.Y., Park S.H., Koh H.S., Song S.W. and Cho C.S. Hydroxychloroquine potentiates Fas-mediated apoptosis of rheumatoid synoviocytes // *Clin Exp Immunol.* - 2006. - V. 144. - № 3. - P. 503-511.

99. Kirwan J.R., Hållgren R., Mielants H. et al. A randomised placebo controlled 12 week trial of budesonide and prednisolone in rheumatoid arthritis // *Ann Rheum Dis.* - 2004. - V. 63. - №. 6. - P. 688-695.

100. Klein K., Ospelt C., Gay S. Epigenetic contributions in the development of rheumatoid arthritis // *Arthritis Res Ther.* - 2012. - V.14. - №. 6. - P. 227.

101. Kobayashi I. and Ziff M. Electron microscopic studies of lymphoid cells in the rheumatoid synovial membrane // *Arthritis Rheum.* - 1973. - V. 16. - P. 471-486.
102. Kokkola R., Sundberg E., Ulfgren A.K., Palmblad K., Li J., Wang H. et al. High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis // *Arthritis Rheum.* - 2002. - V. 46. - № 10. - P. 2598-2603.
103. Korb A., Pavenstädt H. and Pap T. Cell death in rheumatoid arthritis // *Apoptosis.* - 2009. - V. 14. - № 4. - P. 447-454.
104. Kramer N., Walzl A., Unger C., Rosner M., Krupitza G., Hengstschläger M., Dolznig H. In vitro cell migration and invasion assays // *Mutat Res.* - 2013. - V. 752. - № 1. - P. 10-24.
105. Kristensen L.S., Wojdacz T.K., Thestrup B.B., Wiuf C., Hager H., Hansen L.L. Quality assessment of DNA derived from up to 30 years old formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue for PCR-based methylation analysis using SMART-MSP and MS-HRM // *BMC Cancer.* - 2009. - V. 9. - P. 453.
106. Krzesicki R.F., Fleming W.E., Winterrowd G.E., Hatfield C.A., Sanders M.E., Chin J.E. T lymphocyte adhesion to human synovial fibroblasts. Role of cytokines and the interaction between intercellular adhesion molecule 1 and CD11a/CD18 // *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology.* - 1991. - V. 34. - № 10. - P. 1245-1253.
107. Kurowska M., Rudnicka W., Kontny E., Janicka I., Chorazy M., Kowalczewski J., Ziółkowska M., Ferrari-Lacraz S., Strom T.B., Maśliński W. Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex: endogenous IL-15 in autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-x (L) and Bcl-2 // *J. Immunol.* - 2002. - V. 169. - P. 1760-1767.



108. Labuda T., Wendt J., Hedlund G., Dohlsten M. ICAM-1 costimulation induces IL-2 but inhibits IL-10 production in superantigen-activated human CD4+ T cells // *Immunology*. - 1998. - V. 94. - № 4. - P. 496.
109. Lacey D.L., Timms E., Tan H-L., Kelley M.J., Dunstan C.R., Burgess T., Elliot R., Colombero A., Elliot G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian Y.X., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J., Boyle W.J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation // *Cell*. - 1998. - V. 93. - P. 165-176.
110. Lee D.M., Kiener H.P., Agarwal S.K., Noss E.H., Watts G.F., Chisaka O., Takeichi M., Brenner M.B. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis // *Science*. - 2007. - V. 315. - P. 1006-1010.
111. Lefèvre S., Knedla A., Tennie C., Kampmann A., Wunrau C., Dinser R., Korb A., Schnäker E.M., Tarner I.H., Robbins P.D., Evans C.H., Stürz H., Steinmeyer J., Gay S., Schölmerich J., Pap T., Müller-Ladner U., Neumann E. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints // *Nat. Med.* - 2009. - V. 15. - № 12. - P. 1414-1420.
112. Lefèvre S., Schwarz M., Meier F.M., Zimmermann-Geller B., Tarner I.H., Rickert M. et al. Disease-specific effects of matrix and growth factors on adhesion and migration of rheumatoid synovial fibroblasts // *The Journal of Immunology*. - 2017. - V. 198. - № 12. - P. 4588-4595.
113. Lehmann J., Jungel A., Lehmann I., Busse F., Biskop M., Saalbach A. et al. Grafting of fibroblasts isolated from the synovial membrane of rheumatoid arthritis (RA) patients induces chronic arthritis in SCID mice-A novel model for studying the arthritogenic role of RA fibroblasts in vivo // *J Autoimmun.* - 2000. - V. 15. - № 3. - P. 301-313.
114. Leizer T., Cebon J., Layton J.E., Hamilton J.A. Cytokine regulation of colony-stimulating factor production in cultured human synovial fibroblasts: I.

Induction of GM-CSF and G-CSF production by interleukin-1 and tumor necrosis factor // *Blood*. - 1990. - V. 76. - № 10. - P. 1989-1996.

115. Leon L., Rodriguez-Rodriguez L., Rosales Z., Gomez A., Lamas J.R., Pato E., Jover J.A., Abasolo L. Long-term drug survival of biological agents in patients with rheumatoid arthritis in clinical practice // *Scand J Rheumatol*. - 2016. - V. 45. - № 6. - P. 456-460.

116. Li J., Gang D., Yu X., Hu Y., Yue Y., Cheng W., Pan X., Zhang P. Genistein: the potential for efficacy in rheumatoid arthritis // *Clin. Rheumatol*. - 2013. - V. 32. - P. 535-540.

117. Li Y., Kucuk O., Hussain M., Abrams J., Cher M.L., Sarkar F.H. Antitumor and antimetastatic activities of docetaxel are enhanced by genistein through regulation of osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/MMP-9 signaling in prostate cancer // *Cancer Research*. - 2006. - V. 66. - № 9. - P. 4816-4825.

118. Li Yq., Xing Xh., Wang H. et al. Dose-dependent effects of genistein on bone homeostasis in rats' mandibular subchondral bone // *Acta Pharmacol Sin*. - 2012. - V. 33. - P. 66-74.

119. Li Z., Wang Y., Xiao K., Xiang S., Weng X. Emerging Role of Exosomes in the Joint Diseases // *Cell Physiol Biochem*. - 2018. - V. 47. - № 5. - P. 2008-2017.

120. Lightfoot Y.L., Kaplan M.J. Disentangling the role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases // *Curr Opin Rheumatol*. - 2017. - V. 29. - № 1. - P. 65-70.

121. Lin S.K., Chang H.H., Chen Y.J., Wang C.C., Galson D.L., Hong C.Y., Kok S.H. Epigallocatechin-3-gallate diminishes CCL2 expression in human osteoblastic cells via up-regulation of phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Raf-1 interaction: a potential therapeutic benefit for arthritis // *Arthritis Rheum*. - 2008. - V. 58. - P. 3145-3156.

122. Lin S.Y., Hsieh S.C., Lin Y.C., Lee C.N., Tsai M.H., Lai L.C., Chuang E.Y., Chen P.C., Hung C.C., Chen L.Y., Hsieh W.S., Niu D.M., Su Y.N. and Ho H.N. A whole genome methylation analysis of systemic lupus erythematosus: hypomethylation of the IL10 and IL1R2 promoters is associated with disease activity // *Genes. Immun.* - 2012. - V. 13. - P. 214-220.
123. Liu H., Pope R.M. Apoptosis in rheumatoid arthritis: friend or foe // *Rheum. Dis. Clin. North Am.* - 2004. - V. 30. - P. 603-625.
124. Lories R.J., Derese I., De Bari C., Luyten F.P. In vitro growth rate of fibroblast-like synovial cells is reduced by methotrexate treatment // *Ann Reum Dis.* -2003. - V. 62. - № 6. - P. 568-571.
125. Lowin T., Straub R.H., Neumann E. et al. Glucocorticoids increase alpha5 integrin expression and adhesion of synovial fibroblasts but inhibit ERK signaling, migration, and cartilage invasion // *Arthritis Rheum.* - 2009. - V. 60. - P. 3623-3632.
126. Lydersen S. Statistical review: frequently given comments // *Ann. Rheum. Dis.* - 2015. - V. 74. - № 2. - P. 323-325.
127. Maeshima K., Stanford S.M., Hammaker D. et al. Abnormal PTPN11 enhancer methylation promotes rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte aggressiveness and joint inflammation // *JCI Insight.* - 2016. - V. 1. - № 7. - P. e86580.
128. Mapp P.I., Revell P.A. Ultrastructural characterisation of macrophages (type A cells) in the synovial lining // *Rheumatol. Int.* - 1988. - V. 8. - № 4. - P. 171-176.
129. Marrie R.A., Hitchon C.A., Walld R. et al. Increased burden of psychiatric disorders in rheumatoid arthritis // *Arthritis Care Res (Hoboken).* - 2018. - V. 70. - № 7. - P. 970-978.

130. Martel-Pelletier J., Pelletier J.P., Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues // *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. - 2003. - V. 33. - № 3. - P. 155-167.
131. Matcham F., Scott I.C., Rayner L., Hotopf M., Kingsley G.H., Norton S., Scott D.L., Steer S. The impact of rheumatoid arthritis on quality-of-life assessed using the SF-36: a systematic review and meta-analysis // *Semin Arthritis Rheum*. - 2014. - V. 44. - № 2. - P. 123-130.
132. Matsukura H., Aisaki K., Igarashi K., Matsushima Y., Kanno J., Muramatsu M., Sudo K., Sato N. Genistein promotes DNA demethylation of the steroidogenic factor 1 (SF-1) promoter in endometrial stromal cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. - 2011. - V. 412. - P. 366-372.
133. Matsumoto S., Müller-Ladner U., Gay R.E., Nishioka K., Gay S. Ultrastructural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts // *J. Rheumatol*. - 1996. - V. 23. - P. 1345-1352.
134. Meier F.M., Frommer K.W., Peters M.A., Brentano F., Lefèvre S., Schröder D. et al. Visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF), a proinflammatory and cell motility-changing factor in rheumatoid arthritis // *J Biol Chem*. - 2012. - V. 287. - № 34. - P. 28378-28385.
135. Messer L., Alsaleh G., Freyssinet J.M., Zobairi F., Leray I., Gottenberg J.E. et al. Microparticle-induced release of B-lymphocyte regulators by rheumatoid synoviocytes // *Arthritis Res Ther*. - 2009. - V. 11. - № 2. - P. R40.
136. Migita K., Miyashita T., Ishibashi H., Maeda Y., Nakamura M., Yatsuhashi H., Ida H., Kawakami A., Aoyagi T., Kawabe Y., Eguchi K. Suppressive effect of leflunomide metabolite (A77 1726) on metalloproteinase production in IL-1 $\beta$  stimulated rheumatoid synovial fibroblasts // *Clin Exp Immunol*. - 2004. - V. 137. - № 3. - P. 612-616.

137. Miranda-Carus M.E., Balsa A., Benito-Miguel M., Perez de Ayala C., Martin-Mola E. IL-15 and the initiation of cell contact-dependent synovial fibroblast-T lymphocyte cross-talk in rheumatoid arthritis: effect of methotrexate // J Immunol. - 2004. - V. 173. - № 2. - P. 1463-1476.
138. Miyazawa K., Mori A., Yamamoto K., Okudaira H. Constitutive transcription of the human interleukin-6 gene by rheumatoid synoviocytes: spontaneous activation of NF-kappaB and CBF1 // Am J Pathol. - 1998. - V. 152. - № 3. - P. 793-803.
139. Miyazawa K., Mori A., Yamamoto K., Okudaira H. Transcriptional roles of CCAAT/enhancer binding protein-beta, nuclear factor-kappaB, and C-promoter binding factor 1 in interleukin (IL)-1beta-induced IL-6 synthesis by human rheumatoid fibroblast-like synoviocytes // J Biol Chem. - 1998. - V. 273. - № 13. - P. 7620-7627.
140. Moingeon P., Chang H-C., Wallner B.P., Stebbins C., Frey A.Z., Reinherz E.L. CD2-mediated adhesion facilitates T lymphocyte antigen recognition function. Nature // - 1989. - V. 339. - P. 312-314.
141. Morales-Ducret J., Wayner E., Elices M.J., Alvaro-Gracia J.M., Zvaifler N.J., Firestein G.S. Alpha 4/beta 1 integrin (VLA-4) ligands in arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes // J. Immunol. - 1992. - V. 149. - № 4. - P. 1424-1431.
142. Moutasim K.A., Nystrom M.L., Thomas G.J. Cell migration and invasion assays // Methods in Molecular Biology. - 2011. - V. 731. - P. 333-343.
143. Müller-Ladner U., Kriegsmann J., Franklin B.N., Matsumoto S., Geiler T., Gay R.E., Gay S. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice // Am. J. Pathol. - 1996. - V. 149. - P. 1607-1615.

144. Myasoedova E., Davis J.M., Achenbach S.J., Matteson E.L., Crowson C.S. Trends in prevalence of functional disability in rheumatoid arthritis compared with the general population // *Mayo Clin Proc.* - 2019. - V. 94. - № 6. - P. 1035-1039.
145. Najm W.I., Reinsch S., Hoehler F., Tobis J.S., Harvey P.W. S-adenosyl methionine (SAME) versus celecoxib for the treatment of osteoarthritis symptoms: a double-blind cross-over trial [ISRCTN36233495] // *BMC Musculoskelet Disord.* - 2004. - V. 26. - № 5. - P. 6.
146. Nakano K., Boyle D.L. and Firestein G.S. Regulation of DNA methylation in rheumatoid arthritis synoviocytes // *J. Immunol.* - 2013. - V. 190. - P. 1297-1303.
147. Neidhart M., Karouzakis E., Jüngel A., Gay R.E., Gay S. Inhibition of spermidine/spermine N1-acetyltransferase activity: a new therapeutic concept in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheumatol.* - 2014. - V. 66. - № 7. - P. 1723-1733.
148. Neidhart M., Rethage J., Kuchen S., Künzler P., Crowl R.M., Billingham M.E. Retrotransposable L1 elements expressed in rheumatoid arthritis synovial tissue: association with genomic DNA hypomethylation and influence on gene expression // *Arthritis Rheum.* - 2000. - V. 43. - P. 2634-2647.
149. Nile C.J., Read R.C., Akil M., Duff G.W., Wilson A.G. Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* - 2008. - V. 58. - P. 2686-2693.
150. Nishioka K., Hasunuma T., Kato T., Sumida T. and Kobata T. Apoptosis in rheumatoid arthritis: A novel pathway in the regulation of synovial tissue // *Arthritis Rheum.* - 1998. - V. 41. - P. 1-9.
151. Noack M., Ndongo-Thiam N. and Miossec P. Evaluation of Anti-inflammatory Effects of Steroids and Arthritis-Related Biotherapies in an In Vitro Coculture Model with Immune Cells and Synoviocytes // *Front. Immunol.* - 2016. - V. 7. - P. 509.

152. Ohata J., Zvaifler N.J., Nishio M., Boyle D.L., Kalled S.L., Carson D.A. et al. Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines // *The Journal of Immunology*. - 2005. - V. 174. - № 2. - P. 864-870.
153. Okamura Y., Watari M., Jerud E.S., Young D.W., Ishizaka S.T., Rose J. et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4 // *J Biol Chem*. - 2001. - V. 276. - № 13. - P. 10229-10233.
154. Ospelt C. Synovial fibroblasts in 2017 // *RMD Open*. - 2017. - V. 3. - № 2. - P. e000471.
155. Ospelt C., Brentano F., Jungel A., Rengel Y., Kolling C., Michel B.A. et al. Expression, regulation, and signaling of the pattern-recognition receptor nucleotide-binding oligomerization domain 2 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts // *Arthritis Rheum*. - 2009. - V. 60. - № 2. - P. 355-363.
156. Ospelt C., Brentano F., Rengel Y., Stanczyk J., Kolling C., Tak P.P. et al. Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis // *Arthritis Rheum*. - 2008. - V. 58. - № 12. - P. 3684-3692.
157. Ospelt C., Reedquist K.A., Gay S., Tak P.P. Inflammatory memories: is epigenetics the missing link to persistent stromal cell activation in rheumatoid arthritis? // *Autoimmun. Rev*. - 2011. - V. 10. - № 9. - P. 519-524.
158. Pereira M.A., Tao L., Liu Y., Li L., Steele V.E., Lubet R.A. Modulation by budesonide of DNA methylation and mRNA expression in mouse lung tumors // *Int. J. Cancer*. - 2007. - V. 120. - P. 1150-1153.
159. Perlman H., Georganas C., Pagliari L.J., Koch A.E., Haines K., Pope R.M. Bcl-2 expression in synovial fibroblasts is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability // *J. Immunol*. - 2000. - V. 164. - P. 5227-5235.

160. Pierer M., Rethage J., Seibl R., Lauener R., Brentano F., Wagner U. et al. Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands // *The Journal of Immunology*. - 2004. - V. 172. - № 2. - P. 1256-1265.
161. Pitsillides A.A., Wilkinson L.S., Mehdizadeh S., Bayliss M.T., Edwards J.C. Uridine diphosphoglucose dehydrogenase activity in normal and rheumatoid synovium: the description of a specialized synovial lining cell // *Int. J. Exp. Pathol.* - 1993. - V. 74. - № 1. - P. 27-34.
162. Pitzalis C., Kelly S., Humby F. New learnings on the pathophysiology of RA from synovial biopsies // *Curr Opin Rheumatol.* - 2013. - V. 25. - № 3. - P. 334-344.
163. Portela A., Esteller M. Epigenetic modifications and human diseases // *Nat. Biotechnol.* - 2010. - V. 28. - P. 1057-1068.
164. Redlich K., Hayer S., Ricci R., David J.P., Tohidast-Akrad M., Kollias G., Steiner G., Smolen J.S., Wagner E.F., Schett G. Osteoclasts are essential for TNF- $\alpha$ -mediated joint destruction // *J. Clin. Invest.* - 2002. - V. 110. - P. 1419-1427.
165. Rosengren S., Boyle D.L., Firestein G.S. Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts // *Methods Mol. Med.* - 2007. - V. 135. - P. 365-375.
166. Sanchez-Pernaute O., Filkova M., Gabucio A., Klein M., Maciejewska-Rodrigues H., Ospelt C. et al. Citrullination enhances the pro-inflammatory response to fibrin in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts // *Ann Rheum Dis.* - 2013. - V. 72. - № 8. - P. 1400-1406.
167. Scheel T., Gursche A., Zacher J., Häupl T., Berek C. V-region gene analysis of locally defined synovial B and plasma cells reveals selected B cell expansion and accumulation of plasma cell clones in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* - 2011. - V. 63. - № 1. - P. 63-72.



168. Schett G., Hayer S., Zwerina J., Redlich K., Smolen J.S. Mechanisms of disease: the link between RANKL and arthritic bone disease // Nat. Clin. Pract. Rheumatol. - 2005. - V. 1. - P. 47-54.
169. Schulze-Koops H., Kalden J.R. The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis // Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. - 2001. - V. 15. - P. 677-691.
170. Scott S., Pandolfi F., Kurnick J.T. Fibroblasts mediate T cell survival: a proposed mechanism for retention of primed T cells // J Exp Med. - 1990. - V. 172. - № 6. - P. 1873-1876.
171. Shelef M.A., Bennin D.A., Yasmin N., Warner T.F., Ludwig T., Beggs H.E., Huttenlocher A. Focal adhesion kinase is required for synovial fibroblast invasion, but not murine inflammatory arthritis // Arthritis Res Ther. - 2014. - V. 16. - № 5. - P. 464.
172. Shirinsky I. V. and Shirinsky V. S. Cytokines in Rheumatoid Arthritis. In: Preedy V.R., Hunter R.J., editors. Science publishers Jersey, British Isles, Enfield, New Hampshire: Cytokines, 2011. - P. 403-417.
173. Simon T.A., Thompson A., Gandhi K.K., Hochberg M.C., Suissa S. Incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis // Arthritis Res Ther. - 2015. - V. 17. - № 1. - P. 212.
174. Simonet W.S., Lacey D.L., Dunstan C.R., Kelley M., Chang M.S., Lüthy R., Nguyen H.Q., Wooden S., Bennett L., Boone T., Shimamoto G., DeRose M., Elliott R., Colombero A., Tan H.L., Trail G., Sullivan J., Davy E., Bucay N., Renshaw-Gegg L., Hughes T.M., Hill D., Pattison W., Campbell P., Sander S., Van G., Tarpley J., Derby P., Lee R., Boyle W.J. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density // Cell. - 1997. - V. 89. - P. 309-319.

175. Skoumal M., Kolarz G., Haberhauer G., Woloszczuk W., Hawa G., Klingler A. Osteoprotegerin and the receptor activator of NF-kappa B ligand in the serum and synovial fluid. A comparison of patients with longstanding rheumatoid arthritis and osteoarthritis // *Rheumatol Int.* - 2005. - V. 26. - P. 63-69.
176. Skriner K., Adolph K., Jungblut P.R., Burmester G.R. Association of citrullinated proteins with synovial exosomes // *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology.* - 2006. - V. 54. - № 12. - P. 3809-3814.
177. Smolen J.S., Aletaha D., McInnes I.B. Rheumatoid arthritis // *Lancet.* - 2016. - V. 388. - P. 2023-2038.
178. Sohn D.H., Rhodes C., Onuma K., Zhao X., Sharpe O., Gazitt T. et al. Local Joint inflammation and histone citrullination in a murine model of the transition from preclinical autoimmunity to inflammatory arthritis // *Arthritis & rheumatology.* - 2015. - V. 67. - № 11. - P. 2877-2887.
179. Spurlock C.F., Tossberg J.T., Fuchs H.A., Olsen N.J., Aune T.M., Aune T.M. Methotrexate increases expression of cell cycle checkpoint genes via JNK activation // *Arthritis Rheum.* - 2012. - V. 64. - P. 1780–1789.
180. Stanford S.M., Maestre M.F., Campbell A.M. et al. Protein tyrosine phosphatase expression profile of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes: a novel role of SH2 domain-containing phosphatase 2 as a modulator of invasion and survival // *Arthritis Rheum.* - 2013. - V. 65. - № 5. - P. 1171-1180.
181. Sun Y., Cheung H.S. p53, proto-oncogene and rheumatoid arthritis // *Semin. Arthr. Rheum.* - 2002. - V. 31. - № 5. - P. 299-310.
182. Sun Z.H., Liu Y.H., Liu J.D., Xu D.D., Li X.F., Meng X.M., Ma T.T., Huang C., Li J. MeCP2 Regulates PTCH1 Expression Through DNA Methylation in Rheumatoid Arthritis // *Inflammation.* - 2017. - V. 40. - P. 1497–1508.

183. Szyf M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 2009. - V. 49. - P. 243-263.
184. Takami N., Osawa K., Miura Y., Komai K., Taniguchi M., Shiraishi M., Sato K., Iguchi T., Shiozawa K., Hashiramoto A., Shiozawa S. Hypermethylated promoter region of DR3, the death receptor 3 gene, in rheumatoid arthritis synovial cells // *Arthritis Rheum.* - 2006. - V. 54. - P. 779-787.
185. Takayanagi H., Iizuka H., Juji T., Nakagawa T., Yamamoto A., Miyazaki T., Koshihara Y., Oda H., Nakamura K., Tanaka S. Involvement of receptor activator of nuclear factor B ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* - 2000. - V. 43. - P. 259-269.
186. Takayanagi H., Oda H., Yamamoto S., Kawaguchi H., Tanaka S., Nishikawa T., Koshihara Y. A new mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis: synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis // *Biochem Biophys Res Commun.* - 1997. - V. 240. - P. 279-286.
187. Takemura S., Braun A., Crowson C., Kurtin P.J., Cofield R.H., O'Fallon W.M., Goronzy J.J., Weyand C.M. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis // *J. Immunol.* - 2001. - V. 167. - P. 1072-1080.
188. Tan, P. L., S. Farmiloe, S. Yeoman, J. D. Watson. Expression of the interleukin 6 gene in rheumatoid synovial fibroblasts // *J. Rheumatol.* - 1990. - V. 17. - P. 1608.
189. Tóth D.M., Ocskó T., Balog A., Markovics A., Mikecz K., Kovács L., Jolly M., Bukiej A.A., Ruthberg A.D., Vida A., Block J.A., Glant T.T., Rauch T.A. Amelioration of Autoimmune Arthritis in Mice Treated With the DNA Methyltransferase Inhibitor 5'-Azacytidine // *Arthritis Rheumatol.* - 2019. - V. 71. - № 8. - P. 1265-1275.

190. Tran C.N., Davis M.J., Tesmer L.A., Endres J.L., Motyl C.D., Smuda C. et al. Presentation of arthritogenic peptide to antigen-specific T cells by fibroblast-like synoviocytes // *Arthritis Rheum.* - 2007. - V. 56. - № 5. - P. 1497-1506.
191. Tran C.N., Lundy S.K., White P.T., Endres J.L., Motyl C.D., Gupta R. et al. Molecular interactions between T cells and fibroblast-like synoviocytes: role of membrane tumor necrosis factor-alpha on cytokine-activated T cells // *Am J Pathol.* - 2007. - V. 171. - № 5. - P. 1588-1598.
192. Tseng W., Huang I., Clanchy F. et al. SAT0005. DNA methylation inhibitors produce sustained remission of arthritis in mice and promote regulatory T cell responses // *Annals of the Rheumatic Diseases.* - 2017. - V. 76. - P. 770.
193. Tunyogi-Csapo M., Kis-Toth K., Radacs M., Farkas B., Jacobs J.J., Finnegan A., Mikecz K., Glant T.T. Cytokine-controlled RANKL and osteoprotegerin expression by human and mouse synovial fibroblasts: fibroblast-mediated pathologic bone resorption // *Arthritis Rheum.* - 2008. - V. 58. - № 8. - P. 2397-2408.
194. Valencia X., Higgins J.M., Kiener H.P., Lee D.M., Podrebarac T.A., Dascher C.C., Watts G.F., Mizoguchi E., Simmons B., Patel D.D., Bhan A.K., Brenner M.B. Cadherin-11 provides specific cellular adhesion between fibroblast-like synoviocytes // *J. Exp. Med.* - 2004. - V. 200. - P. 1673-1679.
195. van Oosterhout M., Levarht E.W., Sont J.K., Huizinga T.W., Toes R.E., van Laar J.M. Clinical efficacy of infliximab plus methotrexate in DMARD naive and DMARD refractory rheumatoid arthritis is associated with decreased synovial expression of TNF alpha and IL18 but not CXCL12 // *Ann. Rheum. Dis.* - 2005. - V. 64. - P. 537-543.
196. Vervoordeldonk M.J., Tak P.P. Cytokines in rheumatoid arthritis // *Curr. Rheumatol. Rep.* - 2002. - V. 4. - P. 208-217.

197. Viereck V., Gründker C., Blaschke S., Siggelkow H., Emons G., Hofbauer L.C. Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts // J Cell Biochem. - 2002. - V. 84. - № 4. - P. 725-735.
198. Volin M.V., Campbell P.L., Connors M.A., Woodruff D.C., Koch A.E. The effect of sulfasalazine on rheumatoid arthritic synovial tissue chemokine production // Exp Mol Pathol. - 2002. - V. 73. - P. 84-92.
199. Wang J., Zhang Q., Jin S., He D., Zhao S., Liu S. Genistein modulate immune responses in collagen-induced rheumatoid arthritis model // Maturitas. - 2008. - V. 59. - P. 405-412.
200. Weidauer E., Yasuda Y., Biswal B.K., Cherny M., James M.N., Brömme D. Effects of disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) on the activities of rheumatoid arthritis-associated cathepsins K and S // Biol. Chem. - 2007. - V. 388. - № 3. - P. 331-336.
201. Whitaker J.W., Boyle D.L., Bartok B. et al. Integrative omics analysis of rheumatoid arthritis identifies nonobvious therapeutic targets // PLoS ONE. - 2015. - V. 10. - № 4. - P. e0124254.
202. Whitaker J.W., Boyle D.L., Hillman J., Anderson D., Wang W., Firestein G. S. An imprinted rheumatoid arthritis methylome signature reflects pathogenic phenotype // Genome Med. - 2013. - V. 5. - № 4. - P. 40.
203. Wolfe F., Zvillich S.H. The long-term outcomes of rheumatoid arthritis: a 23-year prospective, longitudinal study of total joint replacement and its predictors in 1,600 patients with rheumatoid arthritis // Arthritis Rheum. - 1998. - V. 41. - № 6. - P. 1072-1082.
204. Xu B., Makris A., Thornton C., Ogle R., Horvath J.S., Hennessy A. Antihypertensive drugs clonidine, diazoxide, hydralazine and furosemide regulate

the production of cytokines by placentas and peripheral blood mononuclear cells in normal pregnancy // J Hypertens. - 2006. - V. 24. - № 5. - P. 915-922.

205. Xue A.L., Wu S.Y., Jiang L., Feng A.M., Guo H.F., Zhao P. Bone fracture risk in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis // Medicine (Baltimore). - 2017. - V. 96. - № 36. - P. e6983.

206. Yamamura Y., Gupta R., Morita Y., He X., Pai R., Endres J. et al. Effector function of resting T cells: activation of synovial fibroblasts // The Journal of Immunology. - 2001. - V. 166. - № 4. - P. 2270-2275.

207. Yamanishi Y., Boyle D.L., Rosengren S., Green D.R., Zvaifler N.J., Firestein G.S. Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2002. - V. 99. - № 15. - P. 10025-10030.

208. Yano K., Nakagawa N., Yasuda H., Tsuda E., Higashio K. Synovial cells from a patient with rheumatoid arthritis produce osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin: reciprocal regulation of the production by inflammatory cytokines and basic fibroblast growth factor // J Bone Miner Metab. - 2001. - V.19. - № 6. - P. 365-372.

209. Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., Mochizuki S-I., Tomoyasu A., Yano K., Goto M., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K., Udagawa N., Takahashi N., Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/ osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1998. - V. 95. - P. 3597-3602.

210. Yiping Hu, Jinchao Li, Ling Qin, Wenxiang Cheng, Yuxiao Lai, Ye Yue, Peigen Ren, Xiaohua Pan, Peng Zhang. Study in Treatment of Collagen-Induced Arthritis in DBA/1 Mice Model by Genistein // Current Pharmaceutical Design. - 2016. - V. 22. - P. 6975-6981.

211. Yokota K., Miyazaki T., Hemmatazad H., Gay R.E., Kolling C., Fearon U. et al. The pattern-recognition receptor nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 promotes production of inflammatory mediators in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts // *Arthritis Rheum.* - 2012. - V. 64. - № 5. - P. 1329-1337.
212. Young C.L., Adamson T.C., Vaughan J.H., Fox R.I. Immunologic characterization of synovial membrane lymphocytes in rheumatoid arthritis // *Arthritis Rheum.* - 1984. - V. 27. - P. 32-39.
213. Zhang Y., Dong J., He P., Li W., Zhang Q., Li N., Sun T. Genistein inhibit cytokines or growth factor-induced proliferation and transformation phenotype in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis // *Inflammation.* - 2012. - V. 35. - № 1. - P. 377-387.
214. Zimmermann T., Kunisch E., Pfeiffer R., Hirth A., Stahl H.D., Sack U., Laube A., Liesaus E., Roth A., Palombo-Kinne E., Emmrich F., Kinne R.W. Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture — primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells // *Arthritis Res.* - 2001. - V. 3. - P. 72-76.