

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук

Ширинский Иван Валерьевич

Официальные оппоненты:

Повещенко Ольга Владимировна - доктор медицинских наук, доцент, заведующая лабораторией клеточных технологий «Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии», филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук» (г. Новосибирск).

Сизякина Людмила Петровна - доктор медицинских наук, профессор, главный аллерголог-иммунолог министерства здравоохранения Ростовской области, заведующая кафедры клинической иммунологии и аллергологии, директор Научно-исследовательского института клинической иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Ростовский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 в НИИФКИ по адресу: 630099, г.Новосибирск, ул.Ядрицевская, 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте: <https://niikim.ru/ru/наука/объявления-диссовета>

Автореферат разослан «__» _____ 2022г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук**



**Облеухова Ирина
Александровна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность 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% [Smolen J.S. et al., 2016]. 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 [Birnbbaum H. et al., 2010].

В последние десятилетия были достигнуты определенные успехи в терапии РА, появились новые классы эффективных препаратов – моноклональные антитела к TNF α 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 [Leon L. et al., 2016]. 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 [Gwinnutt J.M. et al., 2018]. Кроме того, за последние 20 лет распространенность инвалидности, вызванной РА, продолжает расти, несмотря на уменьшение активности болезни с помощью современных препаратов [Myasoedova E. et al., 2019]. 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 [Ding T. et al., 2019].

Воспаление при РА локализовано преимущественно в синовиальной оболочке суставов. Клеточный ансамбль воспаления при РА характеризуется выраженной гетерогенностью, описано несколько морфологических вариантов синовиита [Pitzalis C. et al., 2013]. Общей чертой, характерной для всех субтипов синовиита при РА, является активация и пролиферация фибробластоподобных синовиальных клеток (ФСК). ФСК - доминирующая популяция клеток в гиперплазированном ревматоидном 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 [Firestein G.S. et al., 2017].

В настоящее время показано, что ФСК играют ключевую роль в поддержании воспаления и деструкции суставов [Bartok B. et al., 2010]. Синовиоциты больных РА отличаются от синовиоцитов здоровых людей и больных остеоартритом рядом особенностей [Huber L.C. et al., 2006]:

- Автономностью функционирования (для активации ФСК не обязательны экстраклеточные сигналы).
- Способностью к инвазивному росту, сохраняющемуся после ряда пассажей в культуре [Müller-Ladner U. et al., 1996].
- Способностью к миграции в различные, в том числе интактные суставы, лежащей в основе полиартикулярного поражения при РА [Lefèvre S. et al., 2009].

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 [Huber L.C. et al., 2006].

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 [Karouzakis E. et al., 2009].

К числу веществ, усиливающих метилирование ДНК, относится донатор метиловой группы адеметионин - S-аденозилметионин (SAMe) [Portela A. et al., 2010]. Одним из деметилирующих ДНК препаратов, воздействующих на ДНК - метилтрансферазы, является препарат гидралазин, оказывающий противоопухолевое действие в некоторых экспериментальных моделях [Arce C. et al., 2006]. Исследования, изучавшие влияние модуляторов метилирования ДНК на свойства ФСК больных РА, малочисленны. В работе

Neidhart et al было показано, что SAME в сочетании с дименазин ацетуратом уменьшает провоспалительные и инвазивные свойства ФСК пациентов с РА [Neidhart M. et al., 2014]. Действие других модуляторов метилирования ДНК на ФСК не исследовалось.

Ряд препаратов растительного происхождения могут влиять на метилирование ДНК различных типов клеток. В частности, биофлаванонид сои генистеин в зависимости от экспериментальной модели повышает или понижает метилирование ДНК [Matsukura H. et al., 2011]. Эффективность генистеина показана при коллаген-индуцированном артрите у мышей [Hu Y. et al., 2016]. 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 β 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 ФСК провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-17, IL-18) снижался только при добавлении в культуры донатора метильных групп SAME 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 SАМе и биофлавоноид сои генистеин снижают продукцию остеопротегерина (OPG) и RANKL в культуре ФСК. Впервые выявлено, что SАМе 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 β провоспалительные цитокины в высокой концентрации, остеопротегерин и RANKL. Эти патогенетические нарушения обратимы после действия донатора метиловой группы SАМе 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 SАМе 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 β 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, RANKL, увеличению уровня GM-CSF, уменьшению миграционной и инвазивной активности ФСК.

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 β , 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.

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 рисунок 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.

Публикации

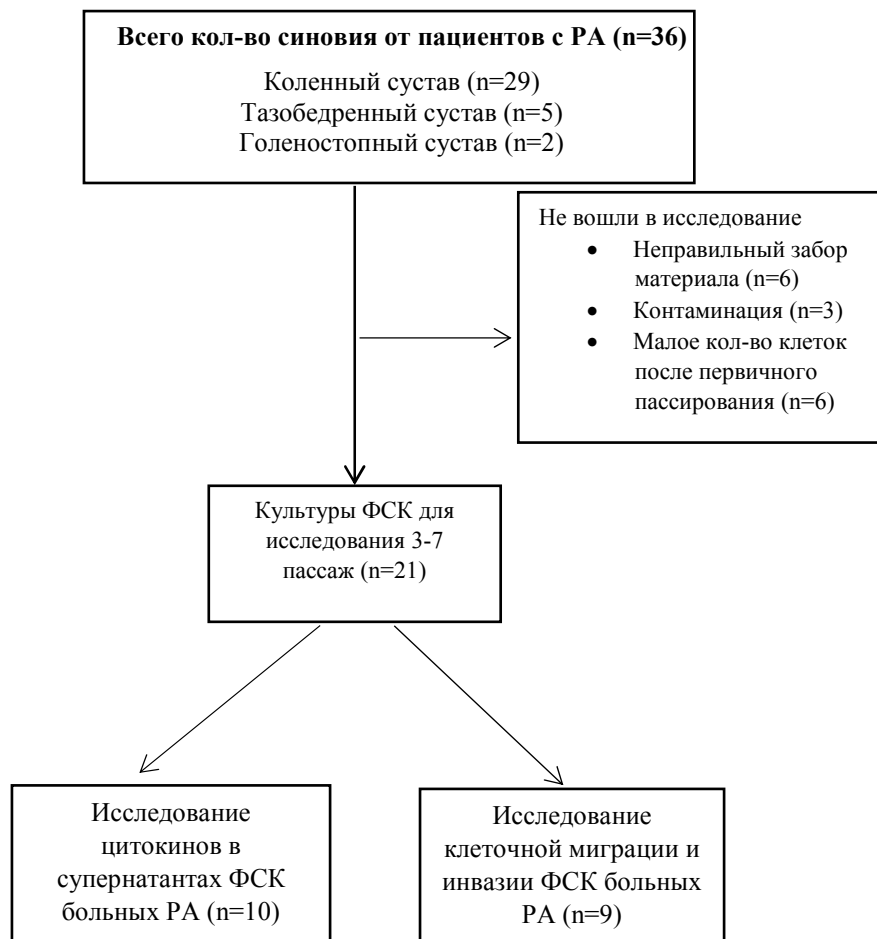
По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, включая 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертационных работ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы 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 1).

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).

Метод культивирования фибробластоподобных синовиальных клеток отработан достаточно давно, со временем претерпел ряд модификаций и на сегодняшний день является стандартным.

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°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°C и 5% 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 1×10^6 клеток в 15 мл DMEM, добавляли взвесь в T-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_2 .
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 5×10^5 кл/мл в питательную среду DMEM и инкубировали в течение 48 часов при температуре 37°C и 5% CO_2 . После инкубации вносили в лунки ИЛ-1 β (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 IL-1-стимулированной продукции IL-6, IL-18, IL-17, IL-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.

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 1×10^6 кл/мл. В каждую лунку верхней камеры добавляли 5×10^4 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% CO₂ 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% CO₂ 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

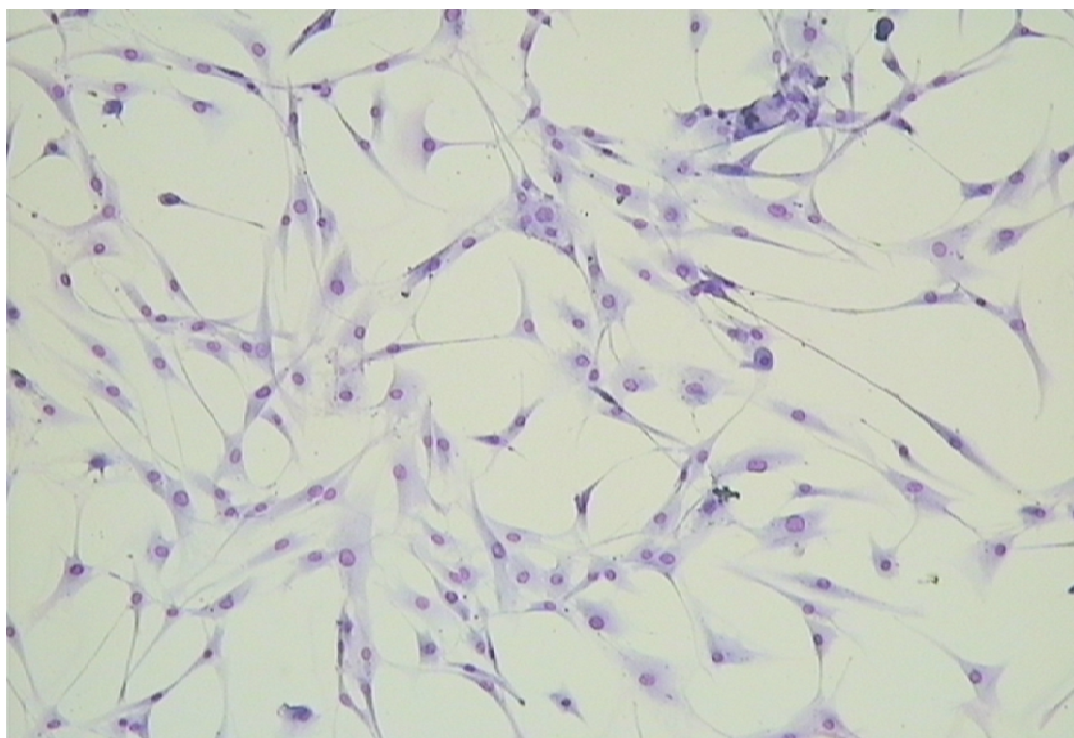
5% CO². Дальнейшие манипуляции проводили аналогично этапам при оценке миграции ФСК. Количество инвазировавших клеток также выражалось в процентах от общего числа клеток, вносимых в верхний отсек камеры Бойдена.

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 [Lydersen S., 2015]. Для статистических вычислений и построения графиков использовался программный пакет GraphPad Prism, версия 6.

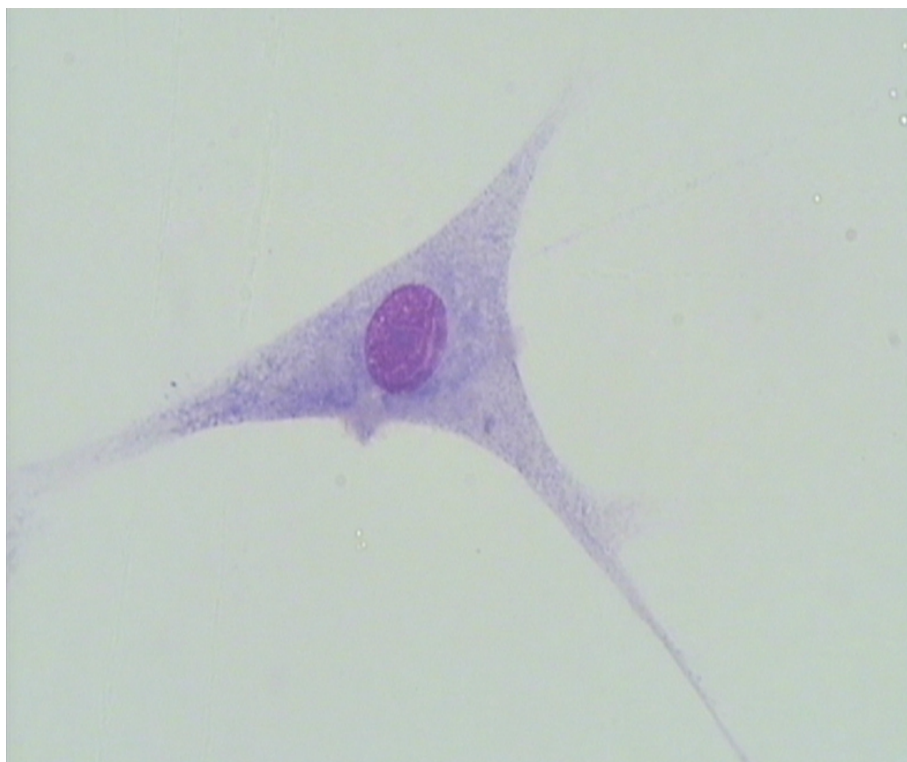
Результаты и обсуждение

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

На микрофотографиях 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.

Как следует из рисунка 2, 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. 2).

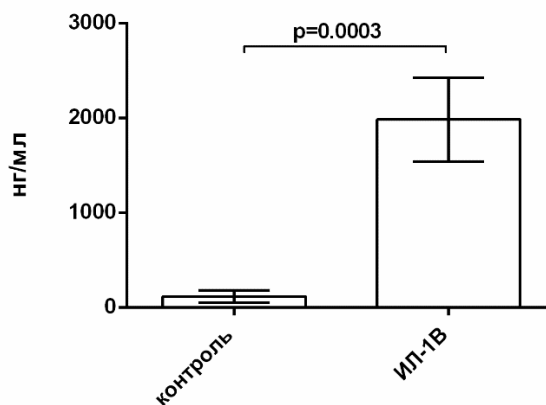


Рисунок 2. Спонтанная и IL-1 β стимулированная продукция IL-6 ФСК больных РА (n=10). Примечание. На этом и последующих аналогичных рисунках данные представлены средней арифметической и ее ошибкой.

В меньшей степени ФСК спонтанно синтезировали другой провоспалительный цитокин, IL-18 (рис.3). Стимуляция клеток IL-1 β приводила к почти 7-кратному усилению продукции IL-18.

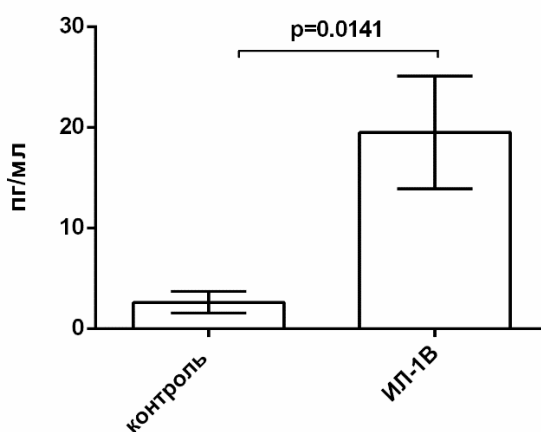


Рисунок 3. Спонтанная и IL-1 β стимулированная продукция IL-18 ФСК больных РА (n=10).

На рисунке ниже представлена спонтанная и IL-1 β стимулированная продукция IL-17 ФСК больных РА (рис.4). Без стимуляции ФСК продуцировали низкое количество IL-17, после добавления в культуры IL-1 β синтез IL-17 повышался в 5 раз.

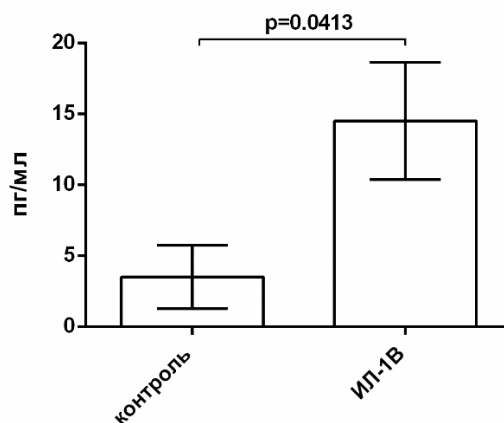


Рисунок 4. Спонтанная и IL-1 β стимулированная продукция IL-17 ФСК больных РА (n=10).

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 нанogramмах.

По сравнению с провоспалительными цитокинами IL-1 β в меньшей степени (в 2 раза) стимулировал синтез IL-10, спонтанная продукция этого цитокина была незначительной (рис.5).

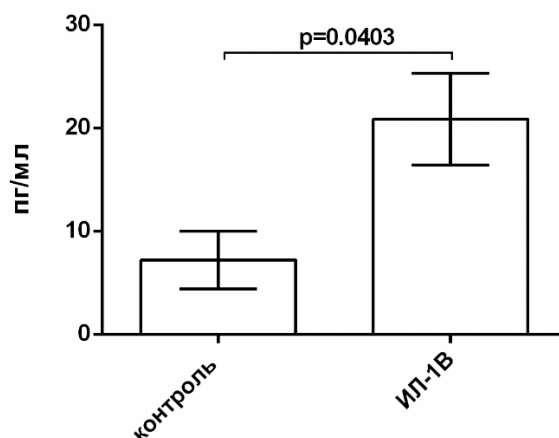


Рисунок 5. Спонтанная и IL-1 β стимулированная продукция IL-10 ФСК больных РА (n=10).

На рисунке 6 представлены данные о спонтанной и IL-1 β стимулированной продукции остеопротегина в культурах ФСК больных РА. Из рисунка следует, что внесение в культуры ФСК IL-1 β увеличивает продукцию OPG более чем в 1,5 раза.

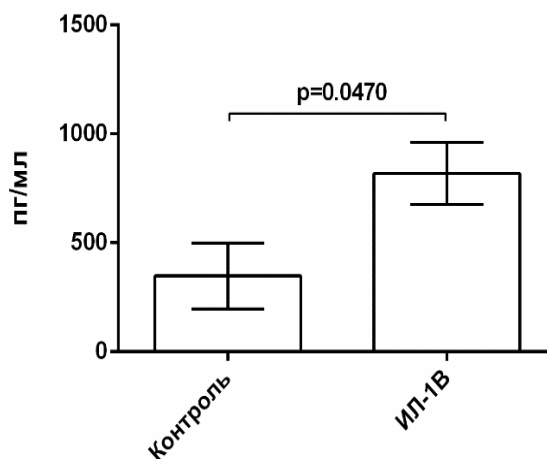


Рисунок 6. Спонтанная и IL-1 β стимулированная продукция OPG ФСК больных РА (n=10).

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

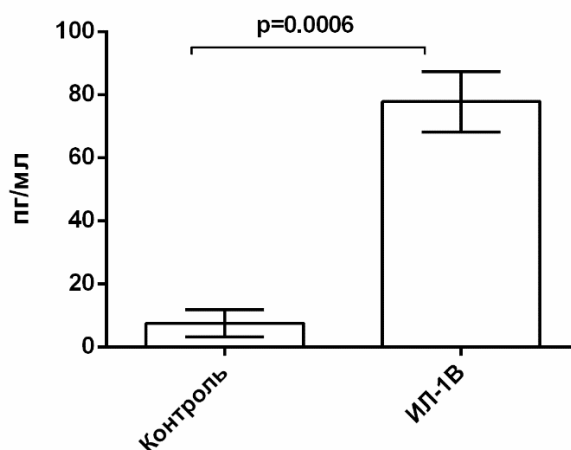


Рисунок 7. Спонтанная и IL-1 β стимулированная продукция RANKL ФСК больных РА (n=10).

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

На рисунке 8 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.8).

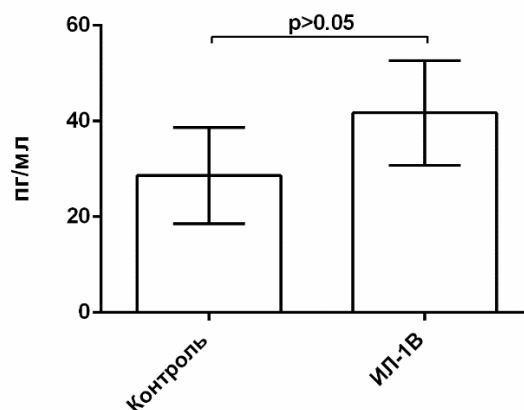
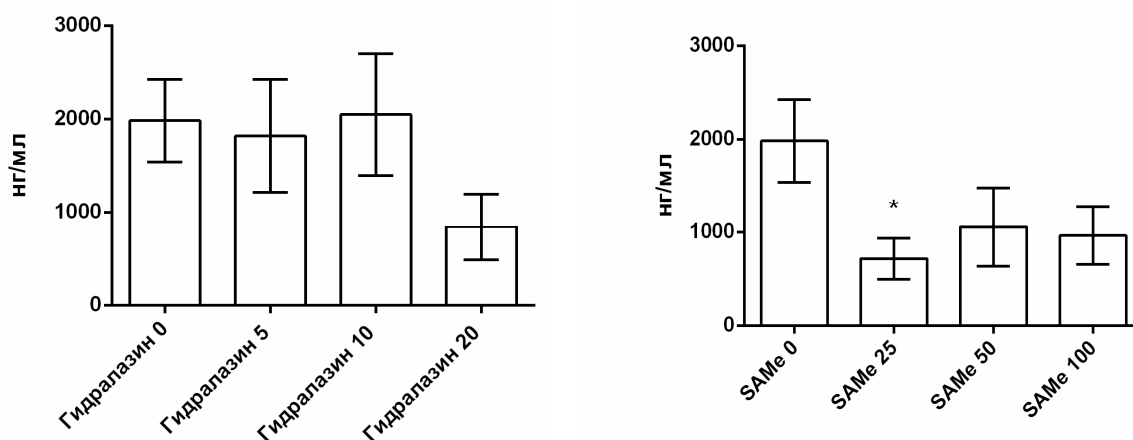


Рисунок 8. Спонтанная и IL-1 β стимулированная продукция GM-CSF ФСК больных РА (n=10).

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. В следующем разделе работы будет показано *влияние модуляторов метилирования ДНК на продукцию ФСК больных РА различных про- и противовоспалительных цитокинов.*

На рисунке 9 представлены данные о влиянии гидралазина, SAME и генистеина на IL-1 β стимулированную продукцию ФСК IL-6.



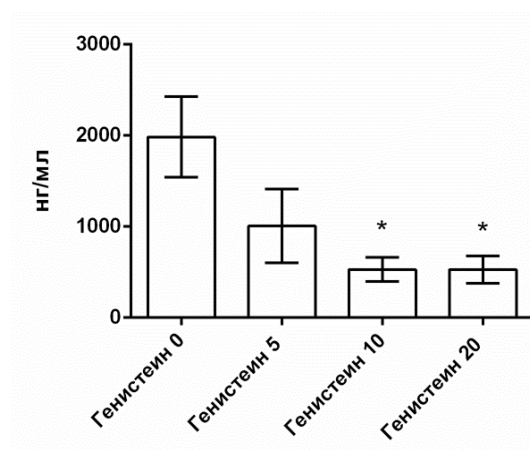


Рисунок 9. Влияние гидралазина, SAME и генистеина в разных концентрациях на $IL-1\beta$ стимулированную продукцию ФСК $IL-6$ (n=10). Примечание. На этом и последующих аналогичных рисунках * - $p < 0,05$ между стимулированной продукцией и добавлением модуляторов.

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 концентрация существенно и статистически значимо снижало синтез цитокина (рис.9).

Генистеин и гидралазин не изменял уровень провоспалительного цитокина $IL-18$ в супернатантах культур ФСК (рис. 10).

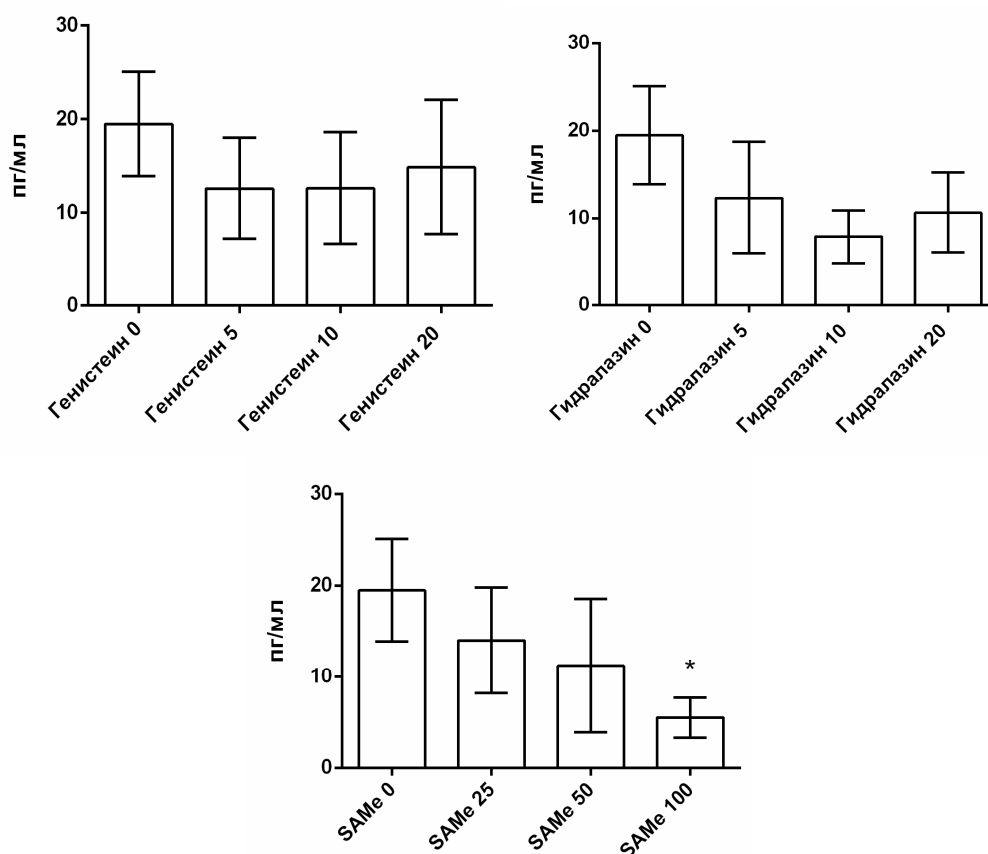


Рисунок 10. Влияние генистеина, гидралазина и SАМе в разных концентрациях на IL-1 β стимулированную продукцию ФСК IL-18 (n=10).

Отмечена тенденция снижения продукции цитокина при добавлении в культуры донатора метильных групп SАМе, достигающая статистически значимых значений при использовании SАМе в максимальной концентрации (рис. 10).

Продукция IL-17 снижалась при внесении в культуры ФСК используемых модуляторов преимущественно в малых дозах (рис. 11).

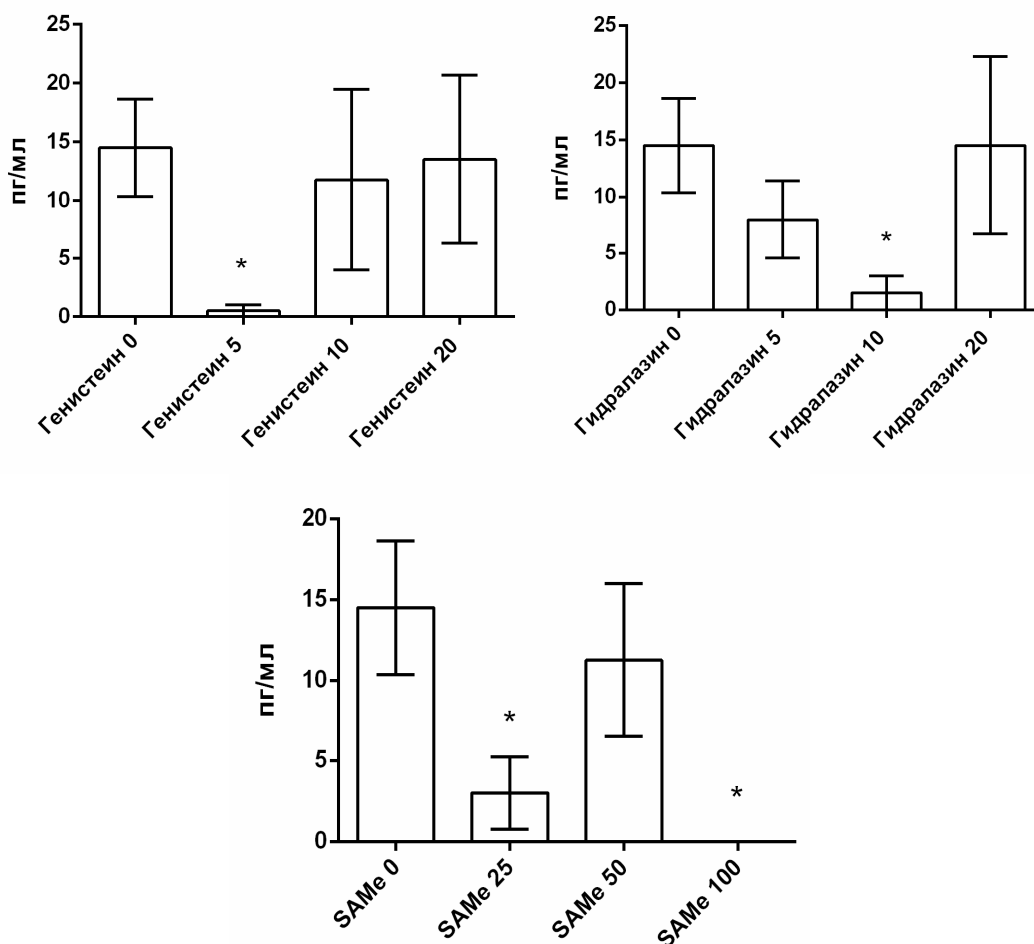


Рисунок 11. Влияние генистеина, гидралазина и SАМе в разных концентрациях на IL-1 β стимулированную продукцию ФСК IL-17 (n=10).

На рисунке 12 представлены данные о влиянии модуляторов метилирования ДНК на продукцию клетками культур ФСК IL-10 (рис.12).

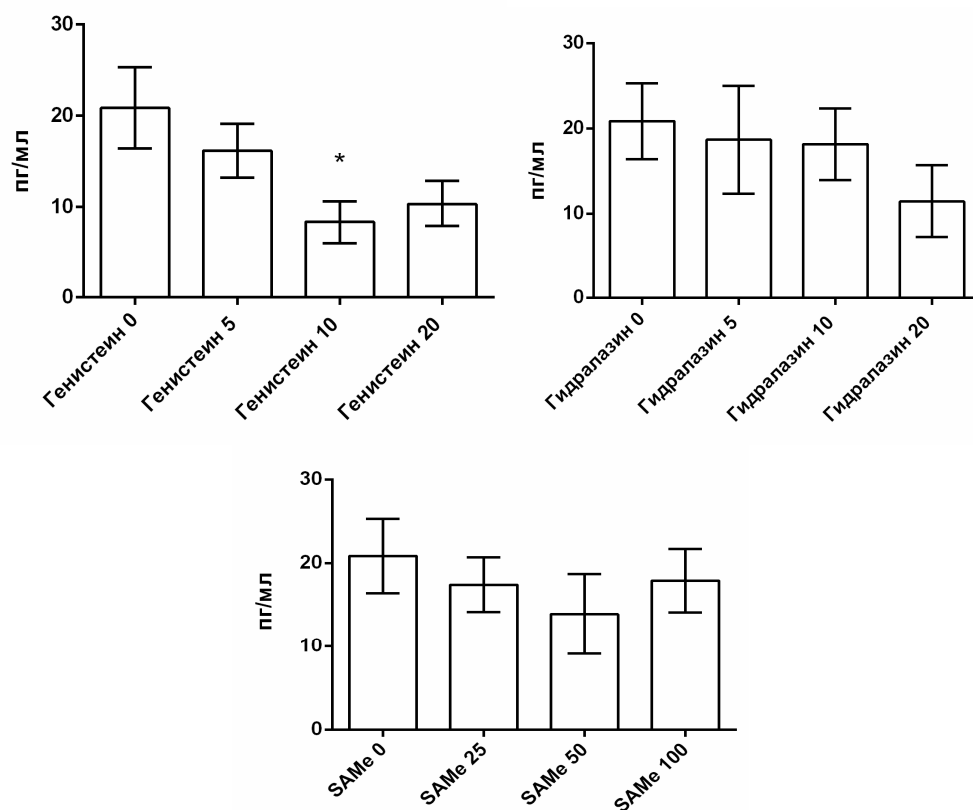
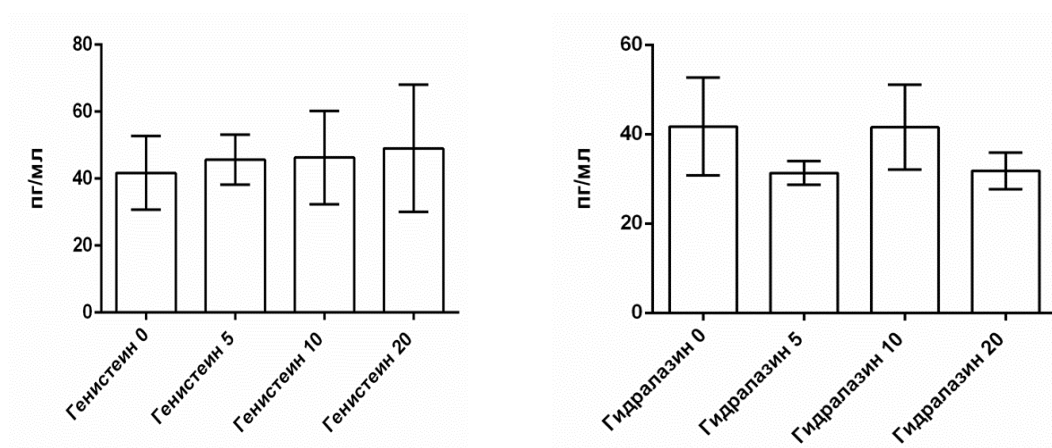


Рисунок 12. Влияние генистеина, гидралазина и S-AdoMet в разных концентрациях на IL-1 β стимулированную продукцию ФСК IL-10 (n=10).

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. 13).



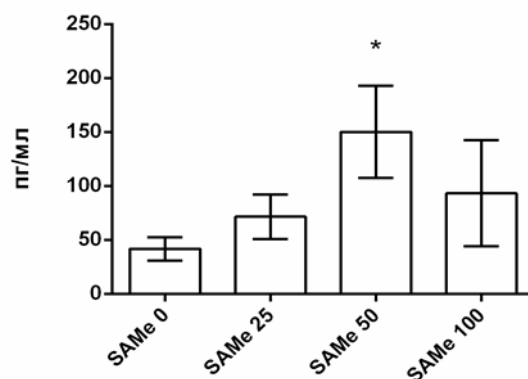
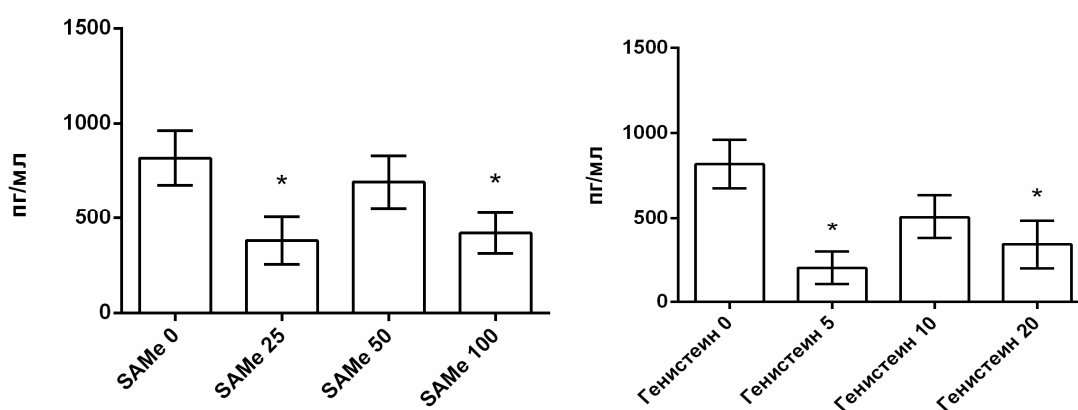


Рисунок 13. Влияние генистеина, гидралазина и SAMe в разных концентрациях на IL-1 β стимулированную продукцию ФСК GM-CSF (n=10).

Однако SAMe в дозе 50 мкг/мл статистически значимо увеличивал стимулированный синтез GM-CSF в супернатантах культур СФ (рис.13).

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.

На рисунке 14 представлены данные о влиянии модуляторов метилирования ДНК в разных концентрациях на IL-1 β стимулированную продукцию остеопротегерина фибробластоподобными синовиальными клетками.



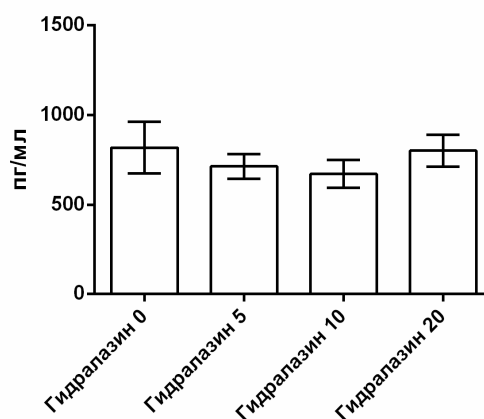
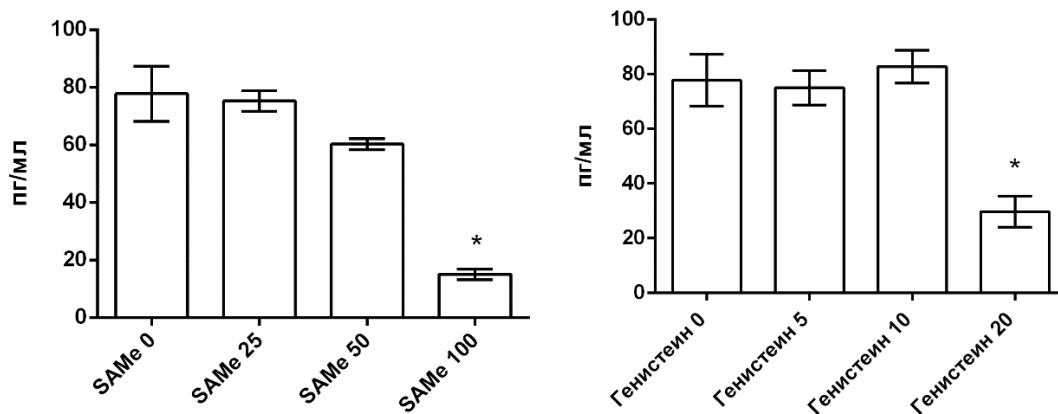


Рисунок 14. Влияние SAmе, гидралазина и генистеина в разных концентрациях на IL-1 β стимулированную продукцию остеопротегерина ФСК (n=10).

Добавление в культуры донатора метильных групп SAmе 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. Добавление к клеткам различных доз деметилирующего агента гидралазина не изменяло уровень OPG в супернатантах культур ФСК (рис. 14).

На рисунке ниже представлены данные о влиянии модуляторов метилирования ДНК в разных концентрациях на IL-1 β стимулированную продукцию RANKL фибробластоподобными синовиальными клетками (рис.15).



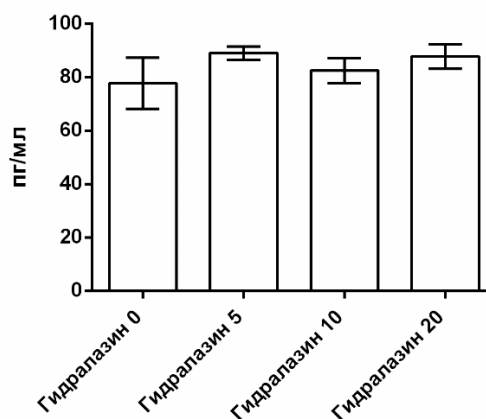


Рисунок 15. Влияние генистеина, гидралазина и SАМе в разных концентрациях на IL-1 β стимулированную продукцию RANKL ФСК (n=10).

Показано, что добавление в культуры донатора метильных групп SАМе и генистеина в максимальных концентрациях статистически значимо снижало стимулированный синтез RANKL. Добавление деметилирующего агента гидралазина в культуры ФСК не изменяло уровень продукции RANKL.

Таким образом, SАМе 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?

В таблицах 1-3 представлены данные о влиянии модуляторов метилирования ДНК на способность ФСК к миграции и инвазии в камере Бойдена (Таб. 1-3).

Таблица 1

Влияние SАМе 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%- 5×10^4 (количество клеток, внесенных в лунку).

Модуляторы	Миграция ($M \pm m$) %, n=9	p	Инвазия ($M \pm m$) %, n=9	p
------------	----------------------------------	---	---------------------------------	---

Контроль		45.21 ± 4.63		38.34 ± 7.37	
SAmе	25 мкг/мл	39.15 ± 1.84	<0.001	21.03 ± 4.2	<0.001
	100 мкг/мл	38.79 ± 3.02	<0.001	23.72 ± 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 2

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 ± 4.63		38.34 ± 7.37	
Гидралазин	5 мкмоль/мл	38.88 ± 1.78	<0.001	21.7 ± 3.67	<0.001
	20 мкмоль/мл	38.8 ± 1.72	<0.001	22.34 ± 4.39	<0.001

Таблица 3

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 ± 4.63		38.34 ± 7.37	
Генистеин	5 мкг/мл	37.58 ± 1.6	<0.001	16.88 ± 8.01	<0.001
	20 мкг/мл	38.36 ± 1.7	<0.001	21.94 ± 6.42	<0.001

Как показано в таблицах 1-3 SAME, гидралазин, генистеин статистически значимо уменьшали показатель инвазии, в среднем на 55%, а показатель миграции на 15%. Дозозависимого эффекта не отмечено (Таб. 1-3).

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 β 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. Деметилатор 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 противоспалительного 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 синтез 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 β 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 остеопротегерина 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 работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Шнайдер М.А.** AB0013 Effects of genistein and S-adenosyl-l-methionine on global DNA methylation and IL-18 production by RA synovial fibroblasts/ M. Shnayder, N. Kalinovskaya, I. Shirinsky, V. Shirinsky // Annals Of The Rheumatic Diseases (Genomics, genetics and epigenetics of rheumatic diseases), 2015, Volume 74, Issue Suppl 2.
2. **Шнайдер М.А.** Влияние генистеина и S-аденозил-1-метионина на глобальное метилирование ДНК и продукцию ИЛ-18 синовиальными фибробластами больных ревматоидным артритом/ М.А. Шнайдер, И.В. Ширинский, Н.Ю. Калиновская, В.С. Ширинский // Дни иммунологии в Сибири: материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Красноярск, 2015. Сборник тезисов. - 2015. - С.37.
3. **Шнайдер М.А.** Культура фибробластоподобных синовиальных клеток больных ревматоидным артритом-свойства и возможности (обзор литературы) / М.А. Шнайдер, В.С. Ширинский, И.В Ширинский // Медицинская иммунология. - 2016. -Т. 18. - № 2. - С.107-118. DOI: 10.15789/1563-0625-2016-2-107-118
4. **Шнайдер М.А.** Влияние модуляторов эпигенома на глобальное метилирование ДНК и продукцию ИЛ-18 фибробластоподобными синовиальными клетками больных ревматоидным артритом/ М.А. Шнайдер, В.С. Ширинский, И.В. Ширинский, Н.Ю. Калиновская // Медиаль, № 1 (19), раздел 9. Иммунология, инфекционная патология и эпидемиология. г. Н. Новгород, 15-16 марта 2017. Сборник тезисов. - 2017. - С.242.
5. **Шнайдер М.А.** Влияние модуляторов метилирования ДНК на миграционную и инвазивную способность фибробластоподобных синовиальных клеток больных ревматоидным артритом *in vitro*/ М.А. Шнайдер, В.С. Ширинский, И.В. Ширинский, Н.Ю. Калиновская // Медицинская Иммунология «Дни иммунологии в СПб 2017», 2017, Т. 19, специальный выпуск, раздел: аутоиммунные заболевания. Сборник тезисов. - 2017. - С.126.

6. **Шнайдер М.А.** Effects of pleiotropic compounds capable of modulating DNA-methylation on migration and invasion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts *in vitro*/ M. Shnayder, I. Shirinsky, V. Shirinsky, N. Kalinovskaya // Book of Abstracts of the International Conference clinical proteomics. Postgenome medicine. 2017. Moscow, Russia. P. 164.
7. **Шнайдер М.А.** Влияние модуляторов метилирования ДНК на продукцию про-и противовоспалительных цитокинов фибробластоподобными синовиальными клетками больных ревматоидным артритом *in vitro*, их миграцию и инвазию/ М.А. Шнайдер // Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: сборник материалов конгресса молодых ученых. г. Томск, 24–25 мая 2018. Сборник тезисов. - 2018. - С. 141-143.
8. **Шнайдер М.А.** Изменение свойств фибробластоподобных синовиальных клеток больных ревматоидным артритом *in vitro* под влиянием модуляторов метилирования ДНК/ М.А. Шнайдер, В.С. Ширинский, Н.Ю. Калиновская, И.В. Ширинский // Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: Материалы Восьмой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. г. Новосибирск, 16-18 октября 2018. Сборник тезисов. - 2018. - С. 182-183.
9. **Шнайдер М.А.** Плейотропное действие модуляторов метилирования ДНК на синовиальные фибробласты больных ревматоидным артритом *in vitro*/ М.А. Шнайдер, Н.Ю. Калиновская // Объединенный иммунологический форум - 2019. Российский иммунологический журнал. - 2019. - Т. 13 (22). - №2. - С. 663-665. DOI: 10.31857/S102872210007007-2
10. **Шнайдер М.А.** Продукция про- и противовоспалительных цитокинов синовиальными фибробластами больных ревматоидным артритом *in vitro* при использовании модуляторов метилирования ДНК – поисковое исследование/ М.А. Шнайдер, В.С. Ширинский, Н.Ю. Калиновская, И.В. Ширинский // Медицинская иммунология. - 2019. - Т. 21. - №2. - С. 231-238. DOI:10.15789/1563-0625-2019-2-231-238

11. **Шнайдер М.А.** Влияние модуляторов метилирования ДНК на продукцию остеопротегерина ревматоидными фибробластоподобными синовиоцитами *in vitro*, их миграцию и инвазию/ М.А. Шнайдер, В.С. Ширинский, Н.Ю. Калиновская, И.В. Ширинский // Бюллетень сибирской медицины. - 2019. - Т.18. - №3. - С. 116-124. DOI:10.20538/1682-0363-2019-3-116-124

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

РА	Ревматоидный артрит
СФ	Синовиальный фибробласт
ФСК	Фибробластоподобные синовиальные клетки
DMEM	Минимальная среда Игла модифицированная Dulbecco
FBS	Фетальная бычья сыворотка
GM-CSF	Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
NK	Натуральный киллер
OPG	Остеопротегерин
PBS	Фосфатно-буферный раствор
RANK	Активатор рецептора ядерного фактора каппа- β
RANKL	Активатор рецептора лиганда ядерного фактора каппа- β
SAMe	S-аденозилметионин
TNF- α	Фактор некроза опухоли-альфа