

## **Влияние модуляторов метилирования ДНК на продукцию остеопротегерина ревматоидными фибробластоподобными синовиоцитами *in vitro*, их миграцию и инвазию**

**Шнайдер М.А., Ширинский В.С., Калиновская Н.Ю., Ширинский И.В.**

*Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ) Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14*

### **РЕЗЮМЕ**

**Цель.** Изучить влияние модуляторов метилирования ДНК на продукцию провоспалительных цитокинов фибробластоподобными синовиальными клетками (ФСК).

**Материалы и методы.** Использовались клетки, полученные из синовиальной ткани шести больных активным ревматоидным артритом (РА) после 3–7 пассажей культивирования *in vitro*.

**Результаты.** Установлено, что культуры ФСК больных РА при стимуляции IL-1 $\beta$  увеличивают продукцию остеопротегерина (ОПГ). Внесение в культуры метилирующих соединений – S-аденозилметионина (SAMe) и генистеина – приводило к статистически значимому снижению продукции ОПГ, а добавление деметилирующего агента гидралазина не меняло синтез цитокина. Все три используемых модулятора метилирования ДНК в разных концентрациях статистически значимо снижали количество спонтанно мигрировавших и инвазивных ФСК в камере Бойдена.

**Заключение.** Ферменты и молекулярные комплексы, участвующие в процессах метилирования ДНК, являются потенциальными терапевтическими мишенями, а культура ФСК больных РА *in vitro* может быть моделью для доклинического скрининга новых лекарственных соединений.

**Ключевые слова:** фибробластоподобные синовиальные клетки, S-аденозилметионин, генистеин, гидралазин, остеопротегерин, инвазия, миграция.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

**Соответствие принципам этики.** Поскольку для исследования использовались анонимные ткани, предназначенные для утилизации, одобрения этического комитета и предоставление информированного согласия не требовалось.

**Для цитирования:** Шнайдер М.А., Ширинский В.С., Калиновская Н.Ю., Ширинский И.В. Влияние модуляторов метилирования ДНК на продукцию остеопротегерина ревматоидными фибробластоподобными синовиоцитами *in vitro*, их миграцию и инвазию. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (3): 116–124. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-116-124>.

УДК 616.71-007.234:577.213  
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-116-124>

## Effect of DNA methylation modulators on the production of osteoprotegerin by rheumatoid fibroblast-like synoviocytes *in vitro*: their migration and invasion

Shnayder M.A., Shirinsky V.S., Kalinovskaya N.Y., Shirinsky I.V.

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
14, Yadrintsevskaya Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation

### ABSTRACT

**Objective.** The purpose of the research was to study the effect of DNA methylation modulators on the production of proinflammatory cytokines by fibroblast-like synovial cells (FLC).

**Materials and methods.** We used the cells derived from the synovial tissue of 6 patients with active rheumatoid arthritis (RA) after 3–7 *in vitro* culturing passages.

**Results.** There was an IL-1 $\beta$ -induced up-regulation of osteoprotegerin (OPG) synthesis in the RA FLC cultures. The addition of methylating compounds S-Adenosyl methionine (SAMe) and genistein into the cultures resulted in a statistically significant decrease in the production of OPG, while the addition of the demethylating agent hydralazine did not change the synthesis of the cytokine. All three DNA methylation modulators used at different concentrations significantly reduced the percentage of spontaneous migration and invasion of FLC in the Boyden chamber.

**Conclusion.** Enzymes and molecular complexes involved in DNA methylation could be potential therapeutic targets, and *in vitro* FLC cultures of RA patients can be used as a model for preclinical screening of new drug compounds.

**Key words:** fibroblast-like synovial cells, S-Adenosyl methionine, genistein, hydralazine, osteoprotegerin, invasion, migration

**Conflict of interest.** The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Source of financing.** The authors state that there is no funding for the study.

**Conformity with the principles of ethics.** Since anonymous tissues intended for disposal were used for the study, the approval of the ethics committee and the provision of informed consent were not required.

**For citation:** Shnayder M.A., Shirinsky V.S., Kalinovskaya N.Y., Shirinsky I.V. Effect of DNA methylation modulators on the production of osteoprotegerin by rheumatoid fibroblast-like synoviocytes *in vitro*: their migration and invasion. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (3): 116–124. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-3-116-124>.

## ВВЕДЕНИЕ

Фибробластоподобные синовиальные клетки (ФСК) являются доминирующей популяцией клеток в гиперплазированном синовии больных ревматоидным артритом (РА) и в месте инвазии синовиальной оболочки (СО) в хрящевую и костную ткань. ФСК представляют собой уникальный тип клеток, который отличает РА от других воспалительных заболеваний суставов и СО здоровых людей [1], и характеризуются относительной автономностью функционирования и способностью

к инвазивному росту, сохраняющемуся после ряда пассажей в культуре *in vitro* [2], и миграции в различные, в том числе интактные суставы, лежащей в основе полиартикулярного поражения при РА [3].

Активированные цитокинами ФСК являются главным источником провоспалительных медиаторов, металлопротеиназ, других биологически активных веществ, принимая участие в деструкции хрящевой и костной ткани, миграции и пролиферации в СО антигенпрезентирующих клеток, субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, нейтрофилов,

НК-клеток, ангиогенезе [4]. Резорбция кости осуществляется в субсистеме клеточных лиганд – активатор NFκB (RANK), экспрессирующийся остеокластами [5], а роль лиганда – RANKL [6]. Антагонистом субсистемы RANK – RANKL является растворимый рецептор остеопротегерин (ОПГ) [7]. ОПГ представляет собой гликопротеин, относящийся к семейству факторов некроза опухоли, и выполняет роль «ловушки» рецепторов, ингибируя связывание RANK и RANKL, тем самым угнетая мобилизацию, пролиферацию и активацию остеокластов. Полагают, что характер ремоделирования костной ткани (анаболизм и катаболизм) во многом определяется балансом между продукцией RANKL и ОПГ [8–11].

Использование ФСК вне организма, в условиях культивирования *in vitro*, – продолжение метода биопсии, который существенно расширяет возможности изучения патогенеза РА [4] и является моделью для доклинического скрининга новых лекарственных средств [12].

Показано, что ФСК больных РА характеризуются стабильным, возникающим *in vivo* и сохраняющимся после неоднократных пассажей *in vitro* фенотипом, обусловленным глобальным гипометилированием ДНК, сопоставимым по выраженности с гипометилированием ДНК в опухолевых клетках [13]. Известны ряд соединений растительного и синтетического происхождения, которые *in vitro* способны изменять глобальное метилирование ДНК. К их числу относятся донаторы метильной группы S-аденозилметионин (SAME) [14] и изофлавоноид сои генистеин [15, 16], деметилирующий агент гидралазин [17].

Цель исследования – оценить влияние метилирующих (S-аденозилметионина, генистеина) и гипометилирующих (гидралазина) агентов на продукцию остеопротегерина фибробластоподобными синовиальными клетками больных РА *in vitro*, их миграцию и инвазию.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ревматоидные ФСК выделялись из синовиальной ткани, полученной во время операции эндопротезирования коленного сустава от девяти больных активным РА, материалы были предоставлены сотрудниками ФГБУ «ННИИТО им. Я.А. Цивьяна» Минздрава России.

Поскольку для исследования использовались анонимные ткани, предназначенные для утилизации, одобрения этического комитета и предоставление информированного согласия не требовалось.

Последовательные этапы культивирования описаны нами ранее [4], здесь мы ограничимся

лишь основными сведениями. Ткань, полученную из синовиальной оболочки коленного сустава больных РА во время операции, помещали в контейнер при температуре 4 °С. Затем ткань промывали холодным фосфатным буфером и помещали в 150-миллиметровую чашку Петри для удаления нежелательных тканей (жир и др.). Перемещали ткань в чистую 150-миллиметровую чашку Петри и нарезали кусочками, образцы ткани переносили в колбу, содержащей 1%-й раствор трипсина и фосфатного буфера. Инкубировали при 37 °С в течение 30 мин, после инкубации удаляли супернатант. К оставшейся в колбе ткани добавляли раствор коллагеназы Р (Sigma-Aldrich, США) со средой DMEM (Биолот), содержащей фетальную бычью сыворотку FBS (Hyclone), и продолжали инкубацию в течении 2 ч при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. Пипетировали смесь через клеточный фильтр в пробирку объемом 50 мл, клеточную взвесь центрифугировали при 250 g 10 мин. Затем удаляли супернатант, взвесь клеток размешивали, промывали добавлением 15 мл DMEM и вновь центрифугировали. Количество жизнеспособных клеток подсчитывали с помощью трипанового синего. Взвесь ресуспендировали в среднем 1 × 10<sup>6</sup> клеток в 15 мл DMEM, клетки вносили в Т-75 флакон, содержащий 5 мл DMEM, 10% FBS (Hyclone), 100 ед/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 50 мг/мл гентамицина, 2 ммоль L-глутамин и 2,5 мкг/мл амфотерицина В, инкубировали флакон при температуре 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>.

Для исследования применялись ФСК, культивированные между 3–7 пассажами. Клетки в концентрации 5 × 10<sup>5</sup> кл/мл культивировали 48 ч в 24-луночных планшетах. ФСК стимулировали IL-1β 10 нг/мл (R&D Systems) в течение 1 ч при температуре 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>, затем к культурам добавляли один из модуляторов метилирования ДНК: SAME (Abbot, США) в концентрации 25, 50, 100 мкг/мл, генистеин (LC Laboratories, США) в концентрации 5, 10, 20 мкг/мл или гидралазин (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 5, 10, 20 мкмоль/мл. После 48 ч инкубации определяли уровень остеопротегерина в супернатантах клеточных культур с помощью набора Osteoprotegerin Human ELISA Kit (Abcam), согласно инструкции фирмы производителя.

Для исследования клеточной миграции и инвазии ФСК использовали модифицированные камеры Бойдена, состоящие из двух отсеков, разделенных 8-микрометровой пористой мембраной (Transwell 96, фирма Trevigen, Gaithersburg, США). Основные этапы оценки миграции ФСК

следующие. За 24 ч до начала эксперимента ФСК 3–7 пассажей 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 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 °С и 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 ч, затем ФСК верхней и нижней камеры аспирировали и промывали промыточным фосфатным буфером. К нижней камере добавляли Cell Dissociation/ Calcein-AM (способствует флуоресценции клеток за счет образования свободного кальцеина) и инкубировали при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub> в течение 1 ч. 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 ч при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. Дальнейшие манипуляции проводили аналогично этапам при оценке миграции ФСК. Количество инвазивных клеток также выражалось в процентах от общего числа клеток, вносимых в верхний отсек камеры Бойдена.

Статистический анализ. Большинство изучаемых параметров имело ненормальное распределение. Тем не менее мы использовали среднее и ошибку среднего для описательной статистики и парный t-тест для оценки различий между группами, так как эти методы являются робастными к отклонениям от нормальности, и их применение предпочтительно даже в случае ненормального распределения [18].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рисунке представлены данные о влиянии модуляторов метилирования ДНК в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию остеопротегерина фибробластоподобными синовиальными клетками. Видно, что внесение в культуры ФСК IL-1 $\beta$  увеличивает продукцию ОПГ более чем в 1,5 раза. Добавление в культуры донатора метильных групп SAMe в дозах

25 и 100 мкг/мл статистически значимо снижало стимулированный синтез ОПГ. Сходным эффектом обладал другой донатор метильных групп генистеин в дозах 5 и 20 мкг/мл. Добавление к клеткам различных доз деметилирующего агента гидралазина не изменяло уровень ОПГ в супернатантах культур ФСК.

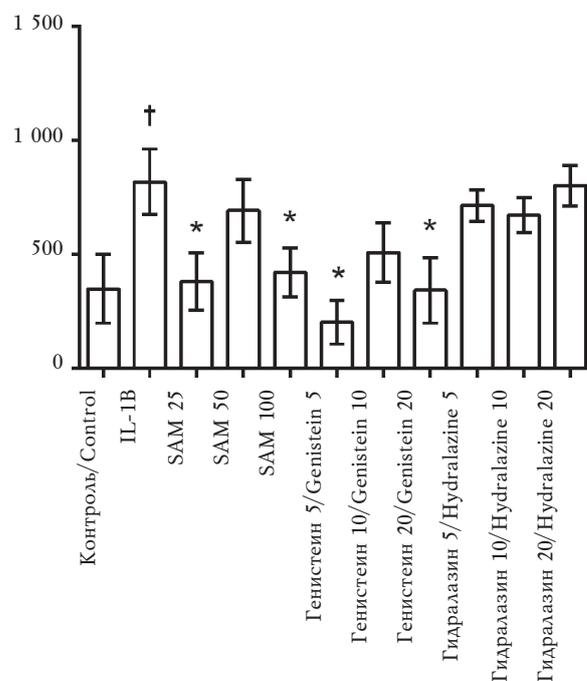


Рисунок. Влияние модуляторов метилирования ДНК в разных концентрациях на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию остеопротегерина фибробластоподобными синовиальными клетками больных ревматоидным артритом, пг/мл

\*  $p < 0,05$  между спонтанной и IL-1 $\beta$  стимулированной продукцией ОПГ; \*  $p < 0,05$  между IL-1 $\beta$  стимулированной продукцией и продукцией после добавления модуляторов

Figure. The effect of DNA methylation modulators in different concentrations on IL-1 $\beta$  stimulated production of osteoprotegerin by fibroblast-like synovial cells of patients with rheumatoid arthritis, pg/ml

\*†  $p < 0.05$  between spontaneous and IL-1 $\beta$  stimulated production of OPG; \*  $p < 0.05$  between IL-1 $\beta$  stimulated production and production after the addition of modulators

В таблице представлены данные о влиянии модуляторов метилирования ДНК на способность ФСК к миграции и инвазии в камере Бойдена.

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

Таблица  
Table

Влияние модуляторов метилирования ДНК на миграцию и инвазию фибробластоподобных синовиальных клеток больных РА *in vitro*,  $M \pm m$   
Effect of DNA methylation modulators on the migration and invasion of fibroblast-like synovial cells of RA patients *in vitro*,  $M \pm m$

Модуляторы Modulators		Миграция, $n = 9$ Migration, $n = 9$	$p$	Инвазия, $n = 9$ Invasion, $n = 9$	$p$
Контроль Control		45,21 ± 4,63	–	38,34 ± 7,37	–
SАМе, мкг/мл µg/ml	25	39,15 ± 1,84	<0,001	21,03 ± 4,2	<0,001
	100	38,79 ± 3,02	<0,001	23,72 ± 4,51	<0,001
Гидралазин, мкмоль/мл Hydralazine, µmol/ml	5	38,88 ± 1,78	<0,001	21,7 ± 3,67	<0,001
	20	38,8 ± 1,72	<0,001	22,34 ± 4,39	<0,001
Генистеин, мкг/мл Genistein µg/ml	5	37,58 ± 1,6	<0,001	16,88 ± 8,01	<0,001
	20	38,36 ± 1,7	<0,001	21,94 ± 6,42	<0,001

Примечание. Представлен средний процент (ошибка средней) клеток, осуществивших миграцию/инвазию. Абсолютное значение величины, принятой за 100% –  $5 \times 10^4$  (количество клеток, внесенных в лунку).

Note. The average percentage (average error) of the cells that carried out the migration/invasion are presented. The absolute value of the value taken as 100% is  $5 \times 10^4$  (the number of cells introduced into the well).

Видно, что SАМе, гидралазин, генистеин статистически значимо уменьшали показатель инвазии, в среднем на 55%, а показатель миграции – на 15%. Дозозависимого эффекта не отмечено.

Таким образом, культуры ФСК больных РА 3–7 пассажей при стимуляции IL-1 $\beta$  увеличивают продукцию ОПГ. Внесение в культуры метилирующих соединений – SАМе и генистеина – приводило к статистически значимому снижению продукции ОПГ, а добавление деметилирующего агента гидралазина не меняло синтез цитокина. Все три используемых модулятора метилирования ДНК в разных концентрациях статистически значимо снижали процент спонтанно мигрировавших и инвазивных ФСК в камере Бойдена.

## ОБСУЖДЕНИЕ

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,

агреканызы, стромелизин; сериновые протеазы (трипсин, химотрипсин), катепсины, металлопротеиназы (ММР) [19].

Помимо деструкции хряща происходит разрушение костной ткани с участием остеокластов, которые накапливаются в субхондральном костном мозге и в зоне контакта паннуса и кости [20–22]. Резорбция кости осуществляется путем взаимодействия рецептора активатора NF $\kappa$ B (RANK) на мембране остеокластов [5], с лигандом RANKL [6], который относится к семейству факторов некроза опухоли и представлен на поверхности остеобластов, стромальных клеток костного мозга, ФСК. Он также секретируется активированными Т-клетками при стимуляции провоспалительными цитокинами (TNF, IL-1, IL-17) [1, 3]. Антагонистом подсистемы RANK – RANKL является растворимый рецептор – остеопротегерин [23] – гликопротеин, относящийся к семейству фактора некроза опухоли [7]. Он ингибирует связывание RANK и RANKL, тем самым угнетая мобилизацию, пролиферацию и активацию остеокластов. У взрослых людей остеопротегерин выделяется остеобластами после их активации [24], также обнаруживается в эндотелиальных клетках и макрофагах синовиальной ткани и субсиновиальном слое [8, 25].

Показано, что провоспалительные цитокины IL-1 $\beta$ , IL-6 совместно с растворимыми рецепто-

рами sIL-6R, IL-17 и TNF $\alpha$  стимулируют продукцию остеопротегерина ФСК больных РА до уровня 520 нг/мл, достаточного для ингибирования остеокластогенеза *in vitro* [26]. Эти провоспалительные цитокины повышают продукцию ОПГ прямо или косвенно путем стимуляции синтеза простагландина E2 (PGE2) [26]. В противоположность действию указанных цитокинов основной фактор роста фибробластов bFGF ингибирует продукцию ОПГ ФСК за счет подавления прямого стимулирующего действия провоспалительных цитокинов [26]. Результаты наших исследований подтверждают данные литературы о том, что провоспалительный цитокин IL-1 $\beta$  усиливает синтез ОПГ ФСК. Помимо этого, нами показано, что в сложной цепи регуляции продукции ОПГ ФСК важная роль принадлежит процессам метилирования и деметилирования ДНК, в частности, донаторы метильных групп способствуют снижению синтеза ОПГ ФСК *in vitro*.

Уместно заметить, что, по данным M. Skoumal и соавт., содержание ОПГ значительно снижено в синовиальной жидкости больных РА, в результате чего увеличивается содержание RANKL [11]. По мнению авторов исследования, уменьшение концентрации ОПГ в синовиальной жидкости отражает низкий защитный эффект ОПГ на кость, что способствует более раннему и более выраженному разрушению кости у больных РА. Таким образом, регуляция продукции ОПГ 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 [3]. Кроме этого, синовиальные фибробласты больных РА характеризуются инвазивным ростом, сохраняющимся после ряда пассажей в культуре [2]. Предполагается, что в основе формирования стабильно активированного деструктивного, апоптоз-устойчивого фенотипа ФСК при РА, способного к миграции и инвазии, лежат эпигенетические изменения, включая изменения в метилировании ДНК [27]. Эпигенетические нарушения ФСК больных РА влекут за собой внутриклеточные метаболические изменения, касающиеся содержания глюкозы, липидов, кислорода, ферментов, цитокинов и др. [28], обеспечивая высокий провоспалительный потенциал клеток [13].

Анализ миграции и инвазии различных типов клеток *in vitro* первоначально осуществлялся в предложенных Бойденом камерах, состоящих из двух отсеков [29]. В последующем были разработаны улучшенные и упрощенные одноразовые варианты оригинальных камер, однако основной принцип метода сохранен во всех модификациях, описанных в подробном обзоре N. Kramer и соавт. [29].

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 [29]. 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 миграцию [12, 29]. 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 неинвазивных 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 [12]. 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 [12].

В исследовании М.А. Shelef и соавт. установлено, что ингибиторы фокальной адгезионной киназы (ФАК) уменьшают миграцию и инвазию ФСК *in vitro*, но не снижают тяжесть экспериментального артрита у мышей [30]. 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 в случае применения донаторов метильных групп и деметилаторов. Это 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 [27]. Пока неясно, как координируются процессы нарушения метилирования ДНК, ацетилирования гистонов, активности малых РНК, обеспечивая стабильность фенотипа ФСК, их провоспалительный потенциал, хотя эпигенетические изменения уже могут объяснить некоторые ключевые особенности измененного фенотипа ФСК при РА. Важно то, 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 лекарственных соединений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования показано, что культуры ФСК больных РА при стимуляции IL-1 $\beta$  увеличивают продукцию остеопротегерина. Вне-

сение в культуры метилирующих соединений – SAME и генистеина – приводило к статистически значимому снижению продукции ОПП, а добавление деметилирующего агента гидралазина не меняло синтез цитокина. Все три используемых модулятора метилирования ДНК в разных концентрациях статистически значимо снижали количество спонтанно мигрировавших и инвазивных ФСК в камере Бойдена. Таким образом, ферменты и молекулярные комплексы, участвующие в процессах метилирования ДНК, являются потенциальными терапевтическими мишенями, а культура ФСК больных РА *in vitro* может быть моделью для доклинического скрининга новых лекарственных соединений.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Huber L.C., Distler O., Tarner I., Gay R.E., Gay S., Pap T. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006; 45 (6): 669–675. DOI: 10.1093/rheumatology/ke065.
2. 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; 149 (5): 1607–1615.
3. 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; 15 (12): 1414–1420. DOI: 10.1038/nm.2050.
4. Шнайдер М.А., Ширинский В.С., Ширинский И.В. Культура фибробластоподобных синовиальных клеток больных ревматоидным артритом: свойства и возможности. *Медицинская иммунология*. 2016; 18 (2): 107–118. [Schneider M.A., Shirinsky V.S., Shirinsky I.V. Cultures of fibroblast-like synovial cells from patients with rheumatoid arthritis: properties and opportunities. *Medical Immunology*. 2016; 18 (2): 107–118 (in Russ.)]. DOI: 10.15789/1563-0625-2016-2-107-118.
5. Boyle W.J., Simonet W.S., Lacey D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003; 423: 337–342. DOI: 10.1038/nature01658.
6. 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; 240 (2): 279–286. DOI: 10.1006/bbrc.1997.7404.
7. 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; 93: 165–176. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81569-X.
8. 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. 42 (1): 123–134.
  9. 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; 30 (11): 2319–2324.
  10. Fonseca J.E., Cortez-Dias N., Francisco A., Sobral M., Canhão H., Resende C., Castelo 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; 23 (2): 185–192.
  11. 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; 26 (1): 63–69. DOI: 10.1007/s00296-004-0579-1.
  12. Moutasim K.A., Nystrom M.L., Thomas G.J. Cell migration and invasion assays. *Methods in Molecular Biology*. 2011; 731: 333–343. DOI: 10.1007/978-1-61779-080-5\_27.
  13. Bartok B., Firestein G.S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* 2010; 233 (1): 233–255. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2009.00859.x.
  14. Portela A., Esteller M. Epigenetic modifications and human diseases. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28 (10): 1057–1068. DOI: 10.1038/nbt.1685.
  15. Dolinoy D.C., Weidman J.R., Waterland R.A., Jirtle R.L. Maternal genistein alters coat color and protects a<sup>vy</sup> mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ. Health Perspect.* 2006; 114 (4): 567–572. DOI: 10.1289/ehp.8700.
  16. 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; 32 (5): 535–540. DOI: 10.1007/s10067-012-2148-4.
  17. 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; 4: 10–22. DOI: 10.1186/1479-5876-4-10.
  18. Lydersen S. Statistical review: frequently given comments. *Ann. Rheum. Dis.* 2015; 74 (2): 323–325. DOI: 10.1136/annrheumdis-2014-206186.
  19. 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*. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2009: 1035–1086. DOI: 10.1016/B978-0-323-31696-5.00069-3.
  20. 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-a-mediated joint destruction. *J. Clin. Invest.* 2002; 110 (10): 1419–1427. DOI: 10.1172/JCI15582.
  21. Bromley M., Woolley D.E. Chondrocytes and osteoclasts at subchondral sites of erosions in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum.* 1984; 27 (9): 968–975.
  22. Gravalles 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; 43: 250–258. DOI: 10.1002/1529-0131(200002)43:2<250::aid-anr3>3.0.co;2-p
  23. Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinoshita 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. Nat. Acad. Sci. USA.* 1998; 95 (7): 3597–3602.
  24. 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; 89: 309–319. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80209-3.
  25. 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; 15: 2–12. DOI: 10.1359/jbmr.2000.15.1.2.
  26. 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; 19 (6): 365–372. DOI: 10.1007/s007740170006.
  27. Klein K., Ospelt C., Gay S. Epigenetic contributions in the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2012; 14 (6): 227. DOI: 10.1186/ar4074.
  28. 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; 19 (1): 110. DOI: 10.1186/s13075-017-1303-3.
  29. Kramer N., Walzl A., Unger C., Rosner M., Krupitza G., Hengstschläger M., Dolznig H. In vitro cell migration and

invasion assays. *Mutat. Res.* 2013; 752 (1): 10–24. DOI: 10.1016/j.mrrev.2012.08.001.

30. 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; 16 (5): 464. DOI: 10.1186/s13075-014-0464-6.

## Сведения об авторах

**Шнайдер Мария Александровна**, аспирант, лаборатория клинической иммунофармакологии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

**Ширинский Валерий Степанович**, д-р мед. наук, профессор, гл. науч. сотрудник, лаборатория клинической иммунофармакологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-4922-9303.

**Калиновская Наталья Юрьевна**, канд. мед. наук, лаборант, лаборатория клинической иммунофармакологии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

**Ширинский Иван Валерьевич**, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клинической иммунофармакологии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-8603-3406.

(✉) **Шнайдер Мария Александровна**, e-mail: minerva1986@mail.ru.

Поступила в редакцию 11.12.2018  
Подписана в печать 11.06.2019

## Authors information

**Shnayder Maria A.**, PhD Student, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

**Shirinsky Valery S.**, DM, Professor, Main Researcher, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-4922-9303.

**Kalinovskaya Natalia Y.**, PhD, Researcher, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation.

**Shirinsky Ivan V.**, DM, Leading Researcher, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-8603-3406.

(✉) **Shnayder Maria A.**, e-mail: minerva1986@mail.ru.

Received 11.06.2019  
Accepted 11.06.2019