ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

ПЛЕЙОТРОПНОЕ ДЕЙСТВИЕ МОДУЛЯТОРОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК НА СИНОВИАЛЬНЫЕ ФИБРОБЛАСТЫ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ *IN VITRO*

© 2019 г. М. А. Шнайдер*, Н. Ю. Калиновская

**E-mail: minerva1986@mail.ru*

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Поступила: 13.03.2019. **Принята:** 25.03.2019

Для изучения плейотропного влияния модуляторов метилирования ДНК использовались культуры фибробластоподобных синовиальных клеток (ФСК), полученных из синовиальной ткани 9 больных активным ревматоидным артритом (РА) при эндопротезировании. Показано, что внесение в культуры ФСК гидралазина статистически значимо уменьшало показатели метилирования в среднем в 2 раза, тогда как добавление донаторов метильной группы – S-аденозилметионина (SAMe) и генистеина, статистически значимо увеличивали уровень 5-метилцитозина в ФСК на 35%. Выявлена спонтанная продукция IL-6, IL-17, IL-18, IL-10, остеопротегерина (ОПГ) в культурах ФСК, добавление ИЛ-1β значительно усиливало синтез цитокинов. Уровень всех изученных провоспалительных цитокинов снижался только при добавлении в культуры донатора метильных групп SAMe в определенных дозах. Деметилятор гидралазин не менял синтез цитокинов, а генистеин в некоторых дозах снижал продукцию IL-6 и IL-17. Продукция IL-10 не меняется под действием модуляторов метилирования ДНК. Внесение в культуры SAMe и генистеина приводило к статистически значимому снижению продукции ОПГ, а добавление гидралазина не меняло синтез цитокина. Все три используемых модулятора метилирования ДНК статистически значимо снижали процент мигрировавших и инвазивных ФСК в камере Бойдена. Заключается, что синтез провоспалительных и противовоспалительных цитокинов ФСК, их миграция и инвазия обусловлена не только процессами метилирования ДНК, но и опосредована другими эпигенетическими механизмами. Модель культуры ФСК может быть использована для доклинической оценки новых модуляторов метилирования ДНК.

Ключевые слова: синовиальные фибробласты, ревматоидный артрит, метилирование ДНК, генистеин, гидралазин, S-аденозилметионин

DOI: 10.31857/S102872210007007-2

Адрес: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», лаборатория клинической иммунофармакологии. Шнайдер Мария Александровна. Тел.: 89231075100 (моб.).

E-mail: minerva1986@mail.ru

Авторы:

Шнайдер М. А., аспирант лаборатории клинической иммунофармакологии НИИФКИ, Новосибирск, Россия.

Калиновская Н. Ю., к.м.н., лаборант лаборатории клинической иммунофармакологии НИИФКИ, Новосибирск, Россия.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Фибробастоподобные синовиальные клетки (ФСК) являются доминирующей популяцией клеток в гиперплазированном ревматоидном синовии и в месте инвазии синовиальной оболочки (СО) в хрящевую и костную ткань. ФСК представляют собой уникальный тип клеток, который отличает ревматоидный артрит (РА) от других воспалительных заболеваний суставов и здоровых людей [1]: автономностью функционирования, способностью к инвазивному росту, сохраняющейся после ряда пассажей в культуре, способностью к миграции в другие суставы, лежащей в основе полиартикулярного поражения при РА. Предполагается, что деструктивный фенотип ФСК при РА обусловлен эпигенетическими изменениями, в частности, тотальным гипометилированием ДНК [2]. К числу веществ,

усиливающих метилирование ДНК, относится S-аденозилметионин (SAMe). Фитоэстроген сои – генистеин, оказывает аналогичное действие на некоторых клеточных линиях, а к числу деметилирующих препаратов относят гидралазин.

Цель работы. Изучить влияние веществ, модулирующих метилирование ДНК, на функцию фибробастоподобных синовиальных клеток больных РА в культуре *in vitro*.

МЕТОДЫ

ФСК были выделены из синовиальной оболочки, полученной в ходе операций эндопротезирования коленного, тазобедренного суставов от 9 больных активным РА и культивированы *in vitro*. Уровень метилирования ДНК в ФСК измеряли методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител к 5-метилцитозину. Для стимуляции синтеза цитокинов ФСК стимулировали IL-1β 10 нг/мл, а затем к культурам добавляли один из модуляторов метилирования ДНК: SAMe (25, 50, 100 мкг/мл), генистеин (5, 10, 20 мкг/мл) или гидралазин (5, 10, 20 мкмоль/мл). Уровень IL-6, IL-18, IL-17 и IL-10 в супернатантах ФСК оценивали с помощью наборов Вектор-Бест. Содержание остеопротегерина (ОПГ) в супернатантах клеточных культур определяли с помощью набора Osteoprotegerin Human ELISA Kit. Исследования по инвазии и миграции ФСК проводились при помощи модифицированных камер Бойдена. Описательная статистика представлена средней и стандартной ошибкой средней. Для выявления различий между сравниваемыми подгруппами использовали критерий Стъюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Внесение в культуры ФСК деметилирующего соединения гидралазина статистически значимо уменьшало показатели метилирования в среднем в 2 раза, тогда как добавление донаторов метильной группы – SAMe и генистеина, напротив, увеличивало содержание 5-метилцитозина в ФСК на 35%. Добавление в культуры ФСК – IL-1β приводило к значительному увеличению продукции клетками IL-6. Установлено, что внесение в культуры ФСК гидралазина в разных концентрациях не изменяло уровень продукции IL-6. Добавление SAMe и генистеина в определенных концентрация статистически значимо снижало синтез цитокина. Генистеин и гидралазин не изменял уровень IL-18 в супернатантах культур ФСК. Отмечена тенденция снижения продукции цитокина при добавлении в культуры донатора метильных групп SAMe в максимальной концентрации. Продукция IL-17 снижалась при внесении в культуры ФСК используемых модуляторов преимущественно в малых дозах. Внесение в культуры модуляторов метилирования ДНК не меняло уровень продукции IL-10, за исключением статистически значимого снижения синтеза цитокина в ответ на средние дозы генистеина. Внесение в культуры ФСК IL-1β увеличивает продукцию ОПГ более чем в 1,5 раза. Добавление в культуры SAMe в дозах 25 и 100 мкг/мл статистически значимо снижало синтез ОПГ. Сходным эффектом обладал генистеин в дозах 5 и 20 мкг/мл. Добавление к клеткам различных доз деметилирующего агента гидралазина не изменяло уровень ОПГ в супернатантах культур ФСК. Показано, что SAMe, гидралазин, генистеин статистически значимо уменьшали показатель инвазии, в среднем на 55%, а показатель миграции на 15%. Дозозависимого эффекта не установлено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты свидетельствуют о том, что используемая модель культуры ФСК от больных РА является чувствительным методом оценки действия метилирующих и деметилирующих соединений поскольку модуляторов метилирования ДНК: SAMe, гидралазин, генистеин, с известными свойствами, прогнозируемо изменяют уровень метилирования ДНК. 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 метилирующих соединений – SAMe и генистеина приводило к статистически значимому снижению продукции ОПГ, а добавление гидралазина не меняло синтез цитокина. SAMe, гидралазин и генистеин уменьшали миграционную и инвазивную способность ФСК больных РА. Можно предположить, что уровень синтеза про- и противовоспалительных цитокинов, а также миграционная и инвазивная способность ФСК больных РА *in vitro* определяется

не только процессами метилирования и деметилирования ДНК, но и опосредована другими эпигенетическими механизмами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *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. [*Schneider M. A., Shirinsky V. S., Shirinsky I. V.* Cultures of fibroblast-like synovial cells from patients with rheumatoid arthritis: properties and opportunities. Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology, 2016, Vol. 18, no. 2, pp. 107–118. (In Russ.)]
2. *Karouzakis E., Gay R. E., Michel B. A., Gay S., Neidhart M.* DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Arthritis Rheum. 2009; 60(12): 3613–22.

PLEIOTROPIC EFFECTS OF DNA METHYLATION MODULATORS ON RHEUMATOID ARTHRITIS SYNOVIAL FIBROBLASTS *IN VITRO*

© 2019 M. A. Snyder*, N. Y. Kalinovskaya

**E-mail: minerva1986@mail.ru*
Federal State Budgetary Scientific Institution Research «Institute of Fundamental and Clinical Immunology», Novosibirsk, Russia

Received: 13.03.2019. **Accepted:** 25.03.2019

To evaluate pleiotropic effects of DNA methylation modulators, we used cultures of fibroblast-like synoviocytes (FLS) obtained during total arthroplasty from nine rheumatoid arthritis (RA) patients. It was shown that addition of hydralazine to cultures lead to significant two-fold decrease in of global DNA methylation, whereas addition of donors of methyl group S-adenosyl L-methyonine (SAMe) and genistein resulted in reduction of 5-methylcytosine in FLS by 35%. There was a spontaneous production of IL-6, IL-17, IL-18, IL-10, and osteoprotegerin (OPG) by FLS, the stimulation with IL1β lead to significant increase of these cytokines synthesis. The production of pro-inflammatory cytokines was reduced only after addition of SAMe to cultures in some doses. Demethylating agent hydralazine had no effect on cytokine synthesis, while genistein decreased production of IL-6 and IL-17 in some concentrations. The production of IL-10 was not changed by the modulators of DNA methylation. Addition of SAMe and genistein to cultures lead to significant reduction of OPG production while hydralazine did not have any effect on OPG synthesis. All three DNA methylation modulators significantly reduced migration and invasion of FLS in Boyden chambers. In conclusion, cytokine synthesis, migration and invasion of FLS are modulated not only by DNA methylation, but probably via other epigenetic mechanisms. The model of FLS cultures can be used for preclinical assessment of DNA methylation inhibitors.

Key words: synovial fibroblasts, rheumatoid arthritis, DNA methylation, genistein, hydralazine, S-adenosyl L-methyonine

Authors:

Snyder M. A., ✉ PhD student, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia. **E-mail:** minerva1986@mail.ru;

Kalinovskaya N. Y., researcher, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia.