

## ПРОДУКЦИЯ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ СИНОВИАЛЬНЫМИ ФИБРОБЛАСТАМИ БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ *IN VITRO* ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ МОДУЛЯТОРОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК: ПОИСКОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

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

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» СО РАН,  
г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** С целью изучения влияния модуляторов метилирования ДНК на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов фибробластоподобными синовиальными клетками (ФСК) использовали клетки, полученные из синовиальной ткани 8 больных активным РА после 3-7 пассажей культивирования *in vitro*. Показано, что фенофибрат не изменял показатели 5-метилцитозина в ФСК, генистеин и адеметионин их увеличивали на 35%, а гидралазин в два раза уменьшал. Выявлена спонтанная продукция IL-6, IL-17, IL-18 и IL-10 в культурах ФСК, добавление IL-1β значительно усиливало синтез цитокинов. Донаторы метилирования ДНК снижали содержание IL-6 в культурах ФСК. Адеметионин в максимальной концентрации, в отличие от гидралазина и генистеина, снижал продукцию IL-18. Уровень IL-17 уменьшался при действии модуляторов в малых дозах, а продукция IL-10 практически не менялась. Заключается, что действие модуляторов метилирования на синтез провоспалительных и противовоспалительных цитокинов ФСК связано не только с их влиянием на метилирование ДНК, но и опосредовано другими эпигенетическими механизмами. Культуры ФСК могут быть использованы как инструмент для доклинической оценки новых модуляторов метилирования ДНК.

**Ключевые слова:** фибробластоподобные синовиальные клетки, ревматоидный артрит, метилирование ДНК, цитокины, генистеин, гидралазин, адеметионин

### Адрес для переписки:

Шнайдер Мария Александровна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии» СО РАН  
630047, Россия, г. Новосибирск, ул. Залесского, 6.  
Тел.: 8 (923) 107-51-00.  
Факс: 8 (383) 228-25-47.  
E-mail: minerva1986@mail.ru

### Address for correspondence:

Shnayder Maria A.  
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology,  
Siberian Branch, Russian Academy of Sciences  
630047, Russian Federation, Novosibirsk, Zalesky str., 6.  
Phone: 7 (923) 107-51-00.  
Fax: 7 (383) 228-25-47.  
E-mail: minerva1986@mail.ru

### Образец цитирования:

М.А. Шнайдер, В.С. Ширинский, Н.Ю. Калиновская,  
И.В. Ширинский «Продукция про-  
и противовоспалительных цитокинов синовиальными  
фибробластами больных ревматоидным артритом  
*in vitro* при использовании модуляторов метилирования  
ДНК: поисковое исследование» // Медицинская  
иммунология, 2019. Т. 21, № 2. С. 231-238.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-231-238  
© Шнайдер М.А. и соавт., 2019

### For citation:

M.A. Shnayder, V.S. Shirinsky, N.Yu. Kalinovskaya,  
I.V. Shirinsky "In vitro production of pro- and anti-  
inflammatory cytokines by synovial fibroblasts of the patients  
with rheumatoid arthritis when using DNA methylation  
modulators: a pilot study", Medical Immunology (Russia)/  
Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 2,  
pp. 231-238.  
doi: 10.15789/1563-0625-2019-2-231-238  
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-2-231-238

## IN VITRO PRODUCTION OF PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES BY SYNOVIAL FIBROBLASTS OF THE PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS WHEN USING DNA METHYLATION MODULATORS: A PILOT STUDY

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

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract.** The effects of DNA methylation modulators upon pro- and anti-inflammatory cytokine production by fibroblast-like synoviocytes (FLS) were evaluated using FLS obtained from synovial tissues of eight patients suffering with active RA and cultivated for 3–7 passages *in vitro*. It was shown that fenofibrate did not change levels of 5-methylcytosine (5-MeC) in FLS, whereas genistein and ademetionine increased 5-MeC concentrations by 35%, and hydralazine resulted in two-fold decrease of 5-MeC levels.

There was a spontaneous production of IL-6, IL-17, IL-18, and IL-10 by FLS cultures. Addition of IL-1 $\beta$  to the cell cultures resulted into significantly up-regulated synthesis of these cytokines. Donators DNA methylation caused a decrease of IL-6 production in FLS. In contrast to hydralazine and genistein, ademetionine decreased IL-6 production by FLS. Synthesis of IL-17 was down-regulated with addition of DNA-methylation modulators at low doses, whereas no effect upon IL-10 production was revealed. In conclusion, the effects of DNA-methylation modulators upon production of pro- and anti-inflammatory cytokines by FLS are caused not only by their impact upon DNA methylation, but may be linked to other epigenetic mechanisms. FSC cultures may be used as a model for preclinical assessment of new DNA methylation modulators.

**Keywords:** fibroblast-like synovial cells, rheumatoid arthritis, DNA methylation, cytokines, genistein, hydralazine, ademetionine

### Введение

Хроническое воспаление при ревматоидном артрите (РА) в первую очередь затрагивает синовиальную оболочку сустава, претерпевающую в процессе развития болезни смену клеточного ансамбля и внеклеточных элементов. Сложная патоморфологическая структура синовиальной оболочки (СО) — результат динамического изменения содержания и функции существующих в норме клеток (синовиоциты типа А и В) и клеток, мигрирующих в подпокровный слой СО (субпопуляции Т- и В-лимфоцитов, дендритные клетки, НК-клетки) [1]. Их появление и изменение активности скоординировано влиянием хемокинов, факторов роста, молекул адгезии, цитокинов. В содружестве с синовиоцитами клетки-мигранты реализуют воспаление в синовиальной, хрящевой и костной ткани самостоятельно на стадии «раннего РА», а также с помощью особой пролиферирующей ткани паннуса, который они формируют в стадии «позднего

РА». Поэтому изучение морфологии клеток СО, их функциональных свойств, морфофункциональных характеристик внеклеточных элементов, помогает расшифровать ключевые звенья патогенеза РА, выявить потенциальные терапевтические мишени для новых методов лечения. С этой целью уже достаточно давно используют несколько основных подходов, в том числе изучение функциональных свойств фибробластоподобных синовиальных клеток (ФСК) от больных РА в долгосрочных монослойных культурах *in vitro* [13, 18].

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 [6]. Показано, что ряд промоторов специфических генов, играющих существенную роль в патогенезе РА, находится в состоянии

гипометилирования [11]. Продемонстрирована конститутивно повышенная экспрессия такого хемокина, как CXCL12, в ФСК за счет гипометилирования его промоторной области [7], высокие уровни CXCL12, в свою очередь, стимулируют выработку матриксных металлопротеиназ (ММП), которые отвечают за деструктивное действие ФСК [5, 15]. Показано, что деметилирование даже одного CpG-мотива в промоторах генов IL-6 [4, 10] и IL-10 [3] положительно коррелирует с их уровнем экспрессии и способствует увеличению уровня цитокинов во время болезни.

В то же 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 больных РА к апоптозу [14].

Описан ряд веществ, изменяющих метилирование ДНК, — индукторы метилирования, ингибиторы и соединения со смешанным действием. К числу веществ, усиливающих метилирование ДНК, относится донатор метиловой группы адеметионин-S-аденозил-L-метионин (SAdMe) [12]. Одним из деметилирующих ДНК препаратов, воздействующих на ДНК-метилтрансферазы, является антигипертензивный препарат гидралазин, оказывающий противоопухолевое действие в некоторых экспериментальных моделях [2]. К модуляторам метилирования ДНК растительного происхождения относится изофлавоноид сои генистеин, в зависимости от экспериментальной модели повышающий или понижающий метилирование ДНК [9]. Есть основания предполагать, что процессы метилирования ДНК тесно связаны с активностью некоторых гормональных ядерных рецепторов, в частности рецепторов, активируемых пероксисомным пролифератором (PPAR). Это послужило основанием для изучения показателей метилирования ДНК и продукции про- и противовоспалительных медиаторов ФСК больных РА *in vitro* при использовании агониста PPAR $\alpha$  фенофибрат и модуляторов метилирования ДНК.

## Материалы и методы

Для получения культур ФСК использовали синовиальную оболочку, полученную в ходе операций эндопротезирования коленного, тазо-

бедренного суставов от 8 больных активным РА. Метод культивирования ФСК отработан достаточно давно, со временем претерпел ряд модификаций и на сегодняшний день является стандартным [13, 18].

Последовательные этапы культивирования описаны нами ранее [1], здесь мы ограничимся лишь основными сведениями:

- ткань, полученную из синовиальной оболочки коленного или тазобедренного сустава больных РА во время операции, помещали в контейнер при  $t + 4^{\circ}\text{C}$ ;

- ткань промывали холодным PBS и помещали в 150-мм чашку Петри для удаления нежелательных тканей — жир и т.д.;

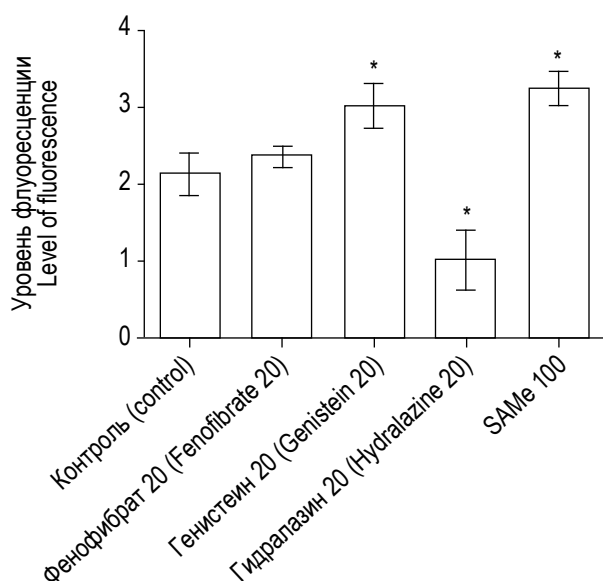
- перемещали ткань в чистую 150-мм чашку Петри и нарезали кусочками, образцы ткани переносили в колбу, содержащую раствор трипсина и PBS; инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин, после инкубации удаляли супернатант;

- к оставшейся в колбе ткани добавляли раствор коллагеназы Р со средой DMEM, содержащей FBS, и продолжали инкубацию в течение двух часов при  $37^{\circ}\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ ;

- 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  $1 \times 10^6$  клеток в 15 мл DMEM, добавляли взвесь в T-75 флакон, содержащий 5 мл DMEM, инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ , 90% конфлюэнтность появлялась через 10-14 дней.

Для исследования применялись ФСК, культивированные между 3-7 пассажами. Уровень метилирования ДНК в синовиоцитах оценивали при помощи мышиных моноклональных антител к 5-метилцитозину и вторичных козых антител к тяжелым цепям IgG1, конъюгированных с FITC (Abcam). Содержание 5-метилцитозина оценивалось с помощью проточного цитометра и представлено как медиана интенсивности флуоресценции в окрашенных ФСК минус контроль. Для стимуляции синтеза цитокинов ФСК использовали IL-1 $\beta$  (R&D Systems), который вносили в лунки в дозе 10 нг/мл на 48 часов. В опытные лунки добавляли генистеин (LC Laboratories) в дозах 5, 10, 20 мкг/мл, гидралазин (Sigma-



**Рисунок 1. Действие фенофибрата и модуляторов метилирования ДНК на содержание 5-метилцитозина в культурах ФСК**

Примечание. На оси ординат – интенсивность флуоресценции.

Figure 1. Effect of fenofibrate and modulators of DNA methylation on the content of 5-methylcytosine in cultures of FLC

Note. The fluorescence intensity is shown on the coordinate axis.

Aldrich) 5, 10, 20 мкмоль/мл и SAMe (Abbot) 25, 50, 100 мкг/мл.

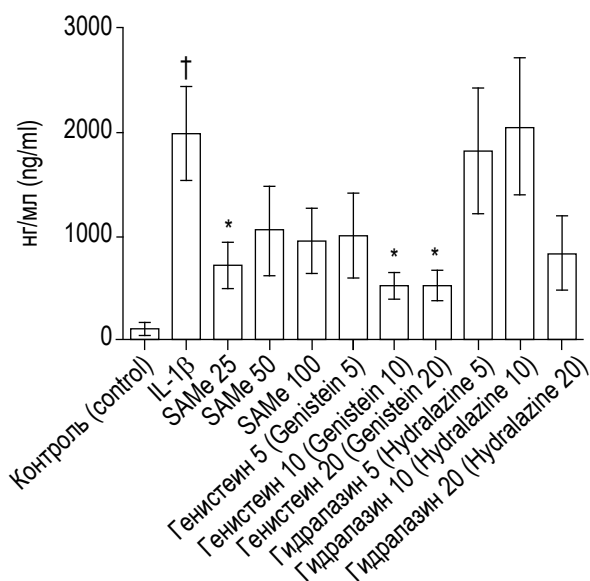
Уровень IL-6, IL-18, IL-17, IL-10 в супернатантах IL-1 $\beta$  стимулированных культур ФСК, помещенных в 96-луночные планшеты, оценивали с помощью стандартных наборов «Вектор-Бест» (Россия), согласно инструкции фирмы-производителя.

Описательная статистика представлена средней и стандартной ошибкой средней. Для выявления различий между сравниваемыми подгруппами использовали критерий Стьюдента.

## Результаты

На рисунке 1 представлены данные о влиянии модуляторов метилирования ДНК и фенофибрата на уровень метилирования ДНК в культурах ФСК (рис. 1).

Установлено, что агонист PPAR $\alpha$  фенофибрат не изменял уровень иммунофлуоресценции ФСК при окрашивании на 5-метилцитозин. Внесение в культуры ФСК деметилирующего соединения гидралазина статистически значимо уменьшало



**Рисунок 2. Влияние генистеина, гидралазина и SAMe в разных концентрациях на IL-1 $\beta$ -стимулированную продукцию ФСК IL-6**

Примечание. На этом и последующих аналогичных рисунках † –  $p < 0,05$  между спонтанной и IL-1 $\beta$ -стимулированной продукцией IL-6; \* –  $p < 0,05$  между стимулированной продукцией и добавлением модуляторов.

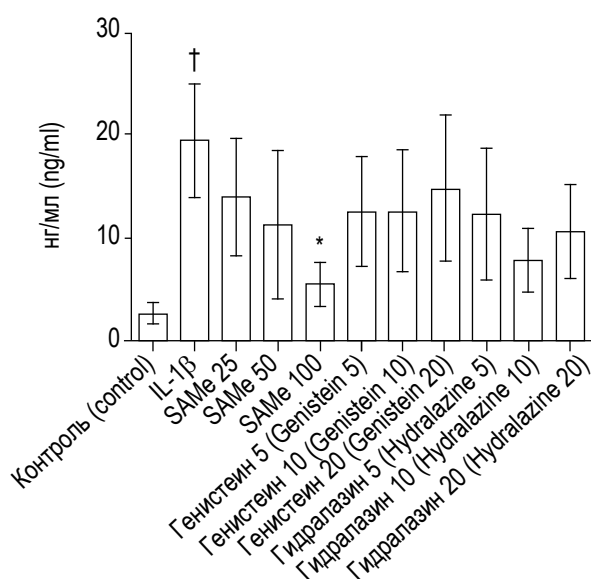
Figure 2. Effect of genistein, hydralazine and SAMe in different concentrations on IL-1 $\beta$  induced production of FLC IL-6

Note. In this and subsequent similar Figures †,  $p < 0,05$  between spontaneous and IL-1 $\beta$  stimulated production of IL-6; \*,  $p < 0,05$  between stimulated products and the addition of modulators.

показатели флуоресценции в среднем в 2 раза, тогда как добавление донаторов метильной группы SAMe и генистеина, напротив, статистически значимо увеличивало флуоресценцию на 35%. Эти данные свидетельствуют о том, что используемые модель ФСК и модуляторы метилирования ДНК адекватны решению поставленных задач, поскольку применение известных модуляторов метилирования ДНК разнонаправленного действия (SAMe, гидралазин, генистеин, но не фенофибрат) прогнозируемо изменяют уровень метилирования. После этого этапа исследований в последующих экспериментах фенофибрат не использовался.

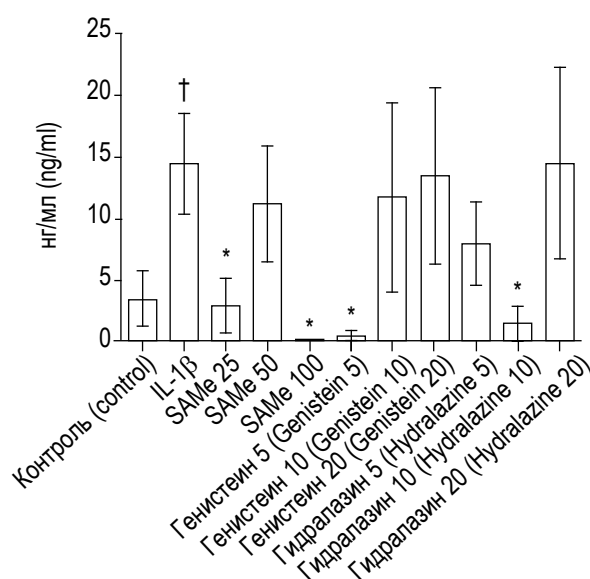
На рисунке 2 представлены данные о влиянии модуляторов метилирования ДНК на IL-1 $\beta$  стимулированную продукцию ФСК IL-6 (рис. 2).

Следует обратить внимание на то, что добавление в культуры ФСК IL-1 $\beta$  приводило к зна-



**Рисунок 3. Влияние генистеина, гидралазина и SAMe в разных концентрациях на IL-1β-стимулированную продукцию ФСК IL-18**

Figure 3. Effect of genistein, hydralazine and SAMe in different concentrations on IL-1β induced production of FLC IL-18



**Рисунок 4. Влияние генистеина, гидралазина и SAMe в разных концентрациях на IL-1β-стимулированную продукцию ФСК IL-17**

Figure 4. Effect of genistein, hydralazine and SAMe in different concentrations on IL-1β induced production of FLC IL-17

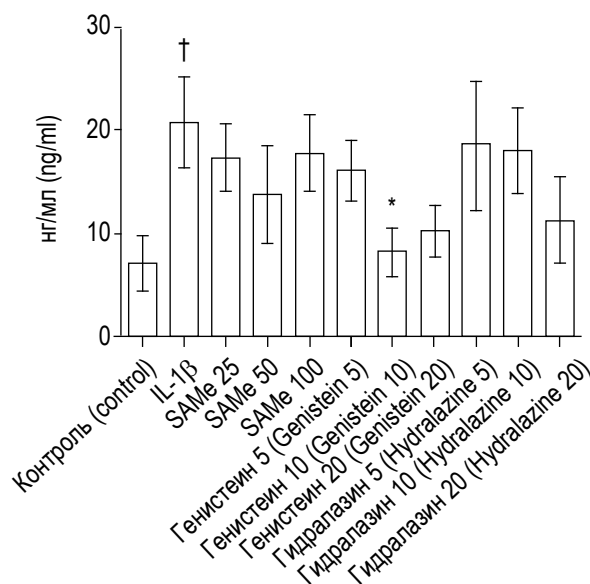
чительному (в 3,5 раза) увеличению продукции клетками IL-6. Установлено, что внесение в культуры ФСК демитилирующего ДНК соединения гидралазина в разных концентрациях не изменяло уровень продукции IL-6. Добавление SAMe и генистеина в определенных концентрациях существенно и статистически значимо снижало синтез цитокина.

Генистеин и гидралазин не изменял уровень другого провоспалительного цитокина IL-18 в супернатантах культур ФСК. Отмечена тенденция снижения продукции цитокина при добавлении в культуры донатора метильных групп SAMe, достигающая статистически значимых значений при использовании SAMe в максимальной концентрации (рис. 3).

Продукция IL-17 снижалась при внесении в культуры ФСК используемых модуляторов преимущественно в малых дозах (рис. 4).

На рисунке 5 представлены данные о влиянии модуляторов метилирования ДНК на продукцию клетками культур ФСК противовоспалительного цитокина IL-10 (рис. 5).

Видно, что стимуляция клеток IL-1β приводила к двукратному увеличению синтеза IL-10, внесение в культуры модуляторов метилирова-



**Рисунок 5. Влияние генистеина, гидралазина и SAMe в разных концентрациях на IL-1β-стимулированную продукцию ФСК IL-10**

Figure 5. Effect of genistein, hydralazine and SAMe in different concentrations on IL-1β induced production of FLC IL-10

ния ДНК в разных концентрациях практически не меняло уровень продукции, за исключением статистически значимого снижения синтеза цитокина в ответ на средние дозы генистеина.

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

## Обсуждение

Использование ФСК от больных активным РА вне организма является логическим продолжением метода биопсии, при котором изъятый фрагмент ткани подвергается исследованию для изучения патогенеза болезни и поиска новых терапевтических мишеней. Благодаря длительному культивированию возможности изучения 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. ФСК сохраняют важнейшие черты, свойственные этим клеткам в организме; более того, они сохраняют онтогенетические индивидуально-генотипические свойства организма-донора. Изменения, которые претерпевают ФСК культуре *ex vivo*, легко контролируются путем создания соответствующих условий. Результаты исследований подтверждают сказанное и свидетельствуют о том, что ФСК больных РА обладают тремя важными особенностями:

- они, вероятно, тотально гипометилированы, поскольку контрольные образцы клеток слабо окрашены на 5-метилцитозин, а известный донатор метильных групп SAmе, а также генистеин значительно увеличивают содержание 5-метилцитозина, в противоположность деметилирующему агенту гидралазину, который двукратно уменьшает содержание 5-метилцитозина в ФСК;

- во-вторых, ФСК способны спонтанно продуцировать провоспалительные цитокины, преимущественно IL-6, содержание которого в супернатантах клеток оценивается в нанограммах, а также IL-18, IL-17 и противовоспалительный цитокин IL-10;

- продукция этих цитокинов существенно увеличивается при стимуляции культур IL-1 $\beta$  — одним из активаторов фибробластов синовиальной ткани *in vivo*.

В использованной модели уровень всех изученных провоспалительных цитокинов снижался только при добавлении в культуры классического донатора метильных групп SAmе в определенных дозах. Демитилятор гидралазин практически не менял синтез цитокинов, а генистеин в некоторых дозах снижал продукцию IL-6 и IL-17. Наши данные согласуются с результатами зарубежных исследований, свидетельствующими о противовоспалительных, антиангиогенных, антипролиферативных, антиоксидантных, иммуномодулирующих, обезболивающих свойствах генистеина в исследованиях *in vitro* и *in vivo*, обусловленных его влиянием на процесс метилирования ДНК и позволяющими отнести препарат к числу перспективных агентов в лечении РА [8, 16]. Что касается действия модуляторов метилирования ДНК на продукцию клетками ФСК противовоспалительного цитокина IL-10, то оно не корректируется модуляторами, за исключением генистеина, внесение которого в средней дозировке снижало продукцию цитокина. Возможно, этим можно объяснить неудавшиеся попытки достичь клинического эффекта у больных РА путем изменения баланса активности провоспалительных и противовоспалительных цитокинов?

Следует подчеркнуть, что уровень синтеза провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в культурах ФСК от больных РА определяется не только влиянием различных агентов на метилирование ДНК, но и другими механизмами. К их числу следует отнести процессы ацетилирования гистонов, активность малых РНК, которые, действуя совместно с механизмами метилирования, также контролируют включение и выключение генов цитокинов и других белков [1].

Пока не ясно, как координируются процессы метилирования ДНК, ацетилирования гистонов, активности малых РНК, обеспечивая стабильность фенотипа ФСК, их провоспалительный потенциал, противовоспалительную активность. 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 [17]. Надо помнить, что большинство приобретенных эпигенетических нарушений — обратимые процессы, регулируемые специфическими ферментами и кофакторами, которые позволяют клеткам из-

менять экспрессию генов в ответ на различные раздражители, в том числе фармакологические агенты, о чем свидетельствуют результаты наших исследований.

В заключение следует еще раз подчеркнуть, что синовиальные фибробласты являются ключевыми клетками, участвующими в патогенезе

«поздней», развернутой стадии ревматоидного артрита. Исследования, посвященные изучению нарушений их эпигенетической регуляции, находятся в начале своего пути, а ферменты и молекулярные комплексы, участвующие в регуляции, могут быть потенциальными терапевтическими мишенями.

## 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 (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 2, pp. 107-118. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-107-118.
2. 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, Vol. 4, pp. 10-22.
3. 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, Vol. 32, pp. 1373-1380.
4. 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, Vol. 83, pp. 917-925.
5. 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, Vol. 86, pp. 296-300.
6. Karouzakis E., Gay R.E., Michel B.A., Gay S., Neidhart M. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.*, 2009, Vol. 60, pp. 3613-3622.
7. 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, Vol. 12, pp. 643-652.
8. 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, Vol. 32, pp. 535-540.
9. 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, Vol. 412, pp. 366-372.
10. 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, Vol. 58, pp. 2686-2693.
11. 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, Vol. 10, no. 9, pp. 519-524.
12. Portela A., Esteller M. Epigenetic modifications and human diseases. *Nat. Biotechnol.*, 2010, Vol. 28, pp. 1057-1068.
13. Rosengren S., Boyle D.L., Firestein G.S. Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts. *Methods Mol. Med.*, 2007, Vol. 135, pp. 365-375.
14. 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, Vol. 54, pp. 779-787.
15. 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, Vol. 64, pp. 537-543.
16. Wang J., Zhang Q., Jin S., He D., Zhao S., Liu S. Genistein modulate immune responses in collagen-induced rheumatoid arthritis model. *Maturitas*, 2008, Vol. 59, pp. 405-412.

17. 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, Vol. 5, no. 4, p. 40.
18. 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, Vol. 3, pp. 72-76.

---

**Авторы:**

**Шнайдер М.А.** — аспирант лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» СО РАН, г. Новосибирск, Россия

**Ширинский В.С.** — д.м.н., профессор, врач-ревматолог, заведующий лабораторией клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» СО РАН, г. Новосибирск, Россия

**Калиновская Н.Ю.** — к.м.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» СО РАН, г. Новосибирск, Россия

**Ширинский И.В.** — д.м.н., врач-ревматолог, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» СО РАН, г. Новосибирск, Россия

---

**Authors:**

**Shnayder M.A.**, Postgraduate Student, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

**Shirinsky V.S.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Clinical Rheumatologist, Head, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

**Kalinovskaya N.Yu.**, PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

**Shirinsky I.V.**, PhD, MD (Medicine), Clinical Rheumatologist, Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

---

Поступила 07.05.2018  
Отправлена на доработку 14.05.2018  
Принята к печати 21.05.2018

---

Received 07.05.2018  
Revision received 14.05.2018  
Accepted 21.05.2018