

## КУЛЬТУРА ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ СИНОВИАЛЬНЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ: СВОЙСТВА И ВОЗМОЖНОСТИ

Шнайдер М.А., Ширинский В.С., Ширинский И.В.

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

**Резюме.** В обзоре представлены данные литературы о структуре синовиальной оболочки у здоровых людей и больных ревматоидным артритом *in vivo*, рассмотрены особенности фибробластоподобных синовиальных клеток больных ревматоидным артритом (РА) в культуре *in vitro*, включая морфологию, фенотип, функциональные свойства клеток культуры. Описан стандартный протокол культивирования ФСК *in vitro*. Подчеркивается, что ФСК характеризуются автономностью функционирования, способностью к инвазивному росту, способностью к миграции в различные, в том числе интактные, суставы, лежащей в основе полиартикулярного поражения при ревматоидном артрите (РА). Особое внимание посвящено характеристике стабильного фенотипа фибробластоподобных синовиальных клеток как результату эпигенетических нарушений: изменениям метилирования ДНК, ацетилирования гистонов, функции микроРНК. ФСК больных РА характеризуются стабильным, возникающим *in vivo* и сохраняющимся после неоднократных пассажей *in vitro* тотальным гипометилированием ДНК. При РА ряд промоторов специфических генов (в частности CXCL12, IL-6), играющих существенную роль в патогенезе РА, находится в состоянии гипометилирования. В то же время в ФСК выявляются и гиперметилированные промоторы некоторых генов (гена рецептора смерти 3). Важным механизмом персистенции воспаления при РА является повышение ацетилирования гистонов в промоторах генов, ответственных за продукцию провоспалительных белков, в частности MMP1. Изменения в ацетилировании гистонов в ФСК связаны с высоким уровнем убиквитин-подобного белка SUMO-1 и параллельным снижением уровня специфической протеазы SENP1. Роль ацетилирования гистонов в патогенезе РА подтверждается эффективностью ингибитора деацетилазы гистонов трихостатина А при коллаген-индуцированном артрите у мышей. Содержание микроРНК-155 и микроРНК-146а стабильно повышено в культуре ФСК, так же как и в синовиальной ткани, синовиальной жидкости и МНК ПК пациентов с РА. Экспрессия микроРНК-124а снижена в ФСК от больных РА по сравнению с ОФСК. Экспрессия микроРНК-203 в ФСК также постоянно повышена. Уровень микроРНК-203 повышен в ФСК не только пациентов с многолетним РА по сравнению с остеоартритом и нормальными ФСК, а также у пациентов с ранним РА.

### Адрес для переписки:

Шнайдер Мария Александровна  
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт  
фундаментальной и клинической иммунологии»  
630047, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.  
Тел.: 8 (923) 107-51-00.  
Факс: 8 (383) 228-25-47.  
E-mail: minerva1986@mail.ru

### Address for correspondence:

Schneider Maria A.  
Institute of Fundamental and Clinical Immunology  
630047, Russian Federation, Novosibirsk,  
Yadrintsevskaia str., 14.  
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, И.В. Ширинский,  
«Культура фибробластоподобных синовиальных  
клеток больных ревматоидным артритом: свойства  
и возможности» // Медицинская иммунология, 2016.  
Т. 18, № 2. С. 107-118.  
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-107-118

© Шнайдер М.А. и соавт., 2016

### For citation:

M.A. Schneider, V.S. Shirinsky, I.V. Shirinsky, "Cultures of  
fibroblast-like synovial cells from patients with rheumatoid  
arthritis: properties and opportunities", Medical Immunology  
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 2,  
pp. 107-118.  
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-107-118

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-2-107-118>

Заключается, что фибробластоподобные синовиальные клетки являются ключевыми клеточными элементами, участвующими в патогенезе ревматоидного артрита, и исследования, посвященные нарушениям их эпигенетической регуляции, находятся в самом начале своего пути. Ферменты и молекулярные комплексы, участвующие в этих процессах, являются потенциальными терапевтическими мишенями.

**Ключевые слова:** ревматоидный артрит, фибробластоподобные синовиальные клетки, фенотип, метилирование ДНК, ацетилирование гистонов, микроРНК

## CULTURES OF FIBROBLAST-LIKE SYNOVIAL CELLS FROM PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS: PROPERTIES AND OPPORTUNITIES

Schneider M.A., Shirinsky V.S., Shirinsky I.V.

*Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation*

**Abstract.** The present review contains data from literature concerning the *in vivo* structure of synovial membranes in healthy people and patients with rheumatoid arthritis (RA). The properties of *in vitro* cultured fibroblast-like synovial cells (FLS) from RA patients are considered, including FLS morphology, phenotype and function. A standard protocol of *in vitro* FLS culturing is described. Notably, the FLS are characterized by autonomic functioning, ability for invasive growth/migration, e.g., into non-affected joints. These FLS properties may be a reason of multiple joint involvement typical to RA. Special attention is drawn to characterization of stable phenotypic profile of FLS which results from certain epigenetic disturbances, i.e., changes of the DNA methylation, histone acetylation, and micro-RNA effects.

The FLS from RA patients are characterized with stable and extensive hypomethylation of genes which occurs *in vivo* and persists after repeated culture passages. Some promoters of genes involved into RA pathogenesis (for example, CXCL12, IL-6) are hypomethylated. By contrary, some other gene promoters (e.g., the death receptor 3 gene) are shown to be hypermethylated. An increased histone acetylation of genes encoding proinflammatory mediators (such as MMP1) may be an important mechanism of persistent inflammation in RA. Changes in histone acetylation in FLS are related to high levels of ubiquitin-like SUMO-1 protein and concurrent decrease in specific protease SENP1 activity. A role of histone acetylation in RA pathogenesis is supported by efficacy of a histone deacetylase inhibitor (Trichostatin A) in collagen-induced murine arthritis. Local concentrations of micro RNA-155, micro-RNA-146a, and micro-RNA-203 are permanently increased in FLS cultures, synovial tissues, and PBMC of the RA patients. Expression of micro RNA-124a is decreased in FLS from RA, as compared with OA FLS.

One may conclude that the fibroblast-like synovial cells are key cellular elements involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, and the studies of their impaired epigenetic regulation are at their initial stage. Enzymes and molecular complexes involved in these processes may represent potential therapeutic targets for the treatment of RA.

**Keywords:** rheumatoid arthritis, fibroblast-like synovial cells, phenotype, DNA methylation, histone acetylation, microRNA

## 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) [2]. 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, морфофункциональ-

ных характеристик внеклеточных элементов помогает расшифровать ключевые звенья патогенеза РА, выявить потенциальные терапевтические мишени для новых методов лечения. С этой целью уже в течение длительного времени используют три основных подхода [2]:

- изучение морфофункциональных свойств СО, полученной путем биопсии или при операции эндопротезирования;

- изучение функции клеток в краткосрочных культурах ткани биоптатов СО *in vitro*;

- изучение функциональных свойств синовиальных фибробластов в долгосрочных монослойных культурах *in vitro*.

Настоящее сообщение посвящено анализу данных литературы о морфологии, функциональных свойствах синовиальных фибробластов больных РА *in vitro*, возможности их использования в качестве клеток-мишеней для поиска новых лекарственных средств.

#### **Структура синовиальной оболочки в норме**

Под термином СО следует понимать весь лежащий внутри от фиброзной капсулы и ограничивающий полость сустава пласт соединительной ткани, состоящей из клеток и основного вещества, и содержащий кровеносные и лимфатические сосуды, нервные волокна и окончания [1]. Этот соединительнотканый пласт не покрыт эпителием и не имеет ограничительной базальной мембраны. Он выстилает все внутрисуставные структуры, кроме контактирующих между собой суставных хрящей. Покровный слой содержит примерно равные пропорции клеток двух различных типов: клетки типа А, или макрофагоподобные синовиальные клетки, и клетки типа В, или фибробластоподобные синовиальные клетки (ФСК) [35].

Последние ответственны за синтез внеклеточных матриксных белков, включая коллагены, фибронектин, гиалуроновую кислоту и другие молекулы, которые облегчают смазывание и скольжение поверхностей хряща [1]. Клетки типа А являются фагоцитирующими клетками и экспрессируют маркеры, характерные для клеток системы мононуклеарных фагоцитов (CD11b, CD68, CD14, CD163, MСН II) [7, 16]. При электронной микроскопии регистрируются пищеварительные вакуоли, указывающие на их фагоцитарную активность [52].

#### **Синовиальная оболочка при ревматоидном артрите**

Результатам изучения патоморфологии СО у больных РА посвящено большое количество оригинальных статей и обзоров [30], мы здесь ограничимся изложением лишь основополагающих данных.

В синовиальной оболочке при РА многократно повышается содержание резидентных клеток и клеток-мигрантов. Повышение количества синовиоцитов типа А и В увеличивает толщину покровного слоя, а иммунокомпетентные клетки (Т- и В-лимфоциты, дендритные клетки, плазмоциты, NK-клетки) распределяются в субсиновиальном слое диффузно или организуются в лимфоидные агрегаты [41, 91]. В инфильтратах преобладают CD4<sup>+</sup>Т-клетки, в основном представленные клетками памяти CD45RO<sup>+</sup> и обладающие хемокиновыми рецепторами CXCR3 и CCR5, характерными для Th1-клеток. У 15–20% пациентов выявляются структуры, типичные для вторичных лимфоидных фолликулов [19, 84]. Следует отметить, что Т- и В-клеточные инфильтраты не специфичны для РА и встречаются при других хронических воспалительных заболеваниях суставов.

ФСК являются доминирующей популяцией клеток в гиперплазированной ревматоидной синовиоцитной и в месте инвазии синовиальной оболочки в хрящевую и костную ткань. ФСК представляют собой уникальный тип клеток, который отличает ревматоидный артрит от других воспалительных заболеваний суставов и СО здоровых людей [32]:

- Автономностью функционирования (для активации ФСК не обязательны экстраклеточные сигналы).

- Способностью к инвазивному росту, сохраняющемуся после ряда пассажей в культуре. Показано, что имплантация культивированных человеческих ФСК, совместно с клетками хрящевой ткани человека под почечную капсулу мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом SCID (severe combined immunodeficiency), приводила к внедрению ФСК в имплантированный хрящ в течение двух месяцев. Внедрившиеся клетки экспрессировали молекулы адгезии, такие как VCAM-1, ICAM-1, интегрины, которые облегчали фиксацию к клеткам хряща, синтезировали металлопротеиназы, принимающие участие в разрушении внеклеточного матрикса хряща [57].

- Способностью к миграции в различные, в том числе интактные суставы, лежащей в основе полиартикулярного поражения при РА. Так, в одном исследовании хрящ здорового человека совместно с ФСК вводили подкожно SCID мышам [46]. На противоположной стороне имплантировали хрящ здорового человека без ФСК. Было установлено, что ФСК активно перемещаются к интактному хрящу через сосудистое русло, что сопровождается заметным разрушением хряща.

Активированные цитокинами ФСК являются главным источником провоспалительных медиаторов и металлопротеиназ при РА, при-

нимая участие в деструкции хрящевой и костной ткани, миграции и пролиферации в СО антигенпрезентирующих клеток, субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, нейтрофилов, НК-клеток, ангиогенезе. Кратко рассмотрим эти процессы.

В разрушении внеклеточного матрикса хряща участвуют различные ферменты, секретируемые в первую очередь ФСК: коллагеназы, желатиназы, агреканы, стромелизин; сериновые протеазы (трипсин, химотрипсин), катепсины, металлопротеиназы (ММР) [19]. В пораженном суставе присутствуют также ингибиторы протеаз, однако их активность подавляется массивным синтезом деградирующих ферментов [9, 28]. Таким образом, относительный баланс между уровнем протеаз и антипротеаз в СО больных РА нарушается и может быть стабилизирован приемом болезнь-модифицирующих препаратов [12, 88]. Если главными клетками-эффекторами деструкции матрикса хряща являются ФСК, хондроциты, нейтрофилы, то разрушение костной ткани происходит с участием в первую очередь остеокластов, которые накапливаются в субхондральном костном мозге и в зоне контакта паннуса и кости [10, 26, 71]. Резорбция кости осуществляется в субсистеме клеточных лиганд-рецепторных взаимодействий, в которых роль рецептора выполняет рецептор активатор NF-κB (RANK), экспрессирующийся остеокластами, а роль лиганда — RANKL [8, 83]. RANKL относится к семейству факторов некроза опухоли, экспрессируется на поверхности остеобластов, стромальных клеток костного мозга, ФСК, а также секретируется активированными Т-клетками при стимуляции провоспалительными цитокинами (TNF, IL-1, IL-17) [13, 73]. Антагонистом субсистемы RANK — RANKL является растворимый рецептор-«ловушка» остеопротегерин (OPG), который связывает RANKL [44, 90].

Провоспалительный потенциал СО больных РА обусловлен активностью макрофагов и ФСК, в меньшей степени субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, являющихся источником синтеза разнообразных цитокинов [6, 21]. При этом следует отметить, что содержание «классических» цитокинов профиля Th1 и Th2 (IFN, IL-2 и IL-4, IL-10) в синовиальной оболочке больных РА невысокое [18, 34, 87]. В СО пораженных суставов определяют Т-клеточные цитокины, усиливающие дифференцировку Th1-лимфоцитов и поддерживающие воспаление (IL-12 и IL-17) [15, 74]. В синовиальной жидкости и ткани больных РА обнаруживают многочисленные провоспалительные цитокины (IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-32), GM-CSF и множество хемокинов, синтезируемых преимущественно активированными А-клетками и ФСК [75]. Цитокины уча-

ствуют в аутокринной и паракринной регуляции активности различных клеток, усиливая персистенцию воспаления в синовиальной оболочке, способствуя разрушению хряща и кости. Потенциально воспаление СО может быть лимитировано активностью противовоспалительных цитокинов (IL-10, TGF-β), действием растворимых рецепторов цитокинов, антител к цитокинам, однако их локальные концентрации ниже необходимых для подавления воспаления [75].

Важная роль в формировании паннуса у больных РА принадлежит нарушениям механизмов апоптоза. Физиологической гиперплазии ткани и пролиферации клеток в процессе иммунного ответа обычно противодействует запрограммированная смерть клеток, или апоптоз, предотвращающий избыточное накопление клеточных популяций. Однако в гиперплазированной СО больных РА присутствует относительно немного клеток в состоянии апоптоза, несмотря на наличие таких мощных стимулов смерти клетки, как гипоксия и TNFα. Происходит активное подавление апоптоза, обусловленное избытком антиапоптотических молекул, которые вырабатываются ФСК [7, 42, 66]. Напомним, что существуют два основных пути апоптоза в клетке: митохондриальный и путь через рецепторы апоптоза [27, 50].

Bcl-2 регулирует клеточную смерть, контролируя проницаемость митохондриальной мембраны. Bcl-2 в значительном количестве экспрессируется в синовиальной оболочке больных РА [54, 69]. IL-15 — цитокин с плейотропным действием на клетки врожденного и адаптивного иммунитета, увеличивает уровни экспрессии mРНК Bcl-2 и Bcl-XL. Блокада IL-15 увеличивает апоптоз в ФСК и одновременно подавляет экспрессию Bcl-2 [42, 43]. Bcl-2 оказывает антиапоптотический эффект на уровне митохондрий, тем самым способствуя пролиферативным процессам в синовиальной оболочке у больных РА.

Обсуждается нарушение апоптоза синовиоцитов у больных РА, связанное с геном супрессором опухолей p53 [3, 80, 89]. Продукт p53 гена ответственен за целостность генома, участвуя в репарации ДНК, делении клеток, и клеточную смерть. В клетках ревматоидной синовиальной оболочки экспрессия p53 повышена, вероятно, вследствие разрушительного влияния генотоксических факторов микросреды воспаленного сустава на ДНК [22].

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

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

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

Преимущества изучения фибробластоподобных синовиоцитов *in vitro*:

1. Они сохраняют важнейшие черты, свойственные этим клеткам в организме; более того, они сохраняют онтогенетические индивидуально-генотипические свойства организма-донора.

2. Изучение культивированных *in vitro* ФСК дает возможность понять механизмы сигнальной трансдукции, выделения медиаторов, пролиферации и апоптоза [72].

3. Изменения, которые претерпевают ФСК в культуре *ex vivo*, легко контролируются путем создания соответствующих условий.

Для получения культур ФСК используют СО, полученную в ходе операций по замене суставов (коленного или тазобедренного), синовэктомии или синовиальной биопсии. Метод культивирования ФСК отработан достаточно давно, со временем претерпел ряд модификаций и на сегодняшний день является стандартным [74, 92].

Представим кратко этапы культивирования:

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

- заранее готовят раствор трипсина с PBS и раствор коллагеназы Р в среде DMEM, содержащей FCS;

- ткань промывают холодным PBS и помещают в 150-мм чашку Петри, чтобы удалить нежелательные ткани — жировую и т. д.;

- перемещают ткань в чистую 150-мм чашку Петри и нарезают кусочками;

- образцы ткани переносят в колбу, содержащую раствор трипсина и PBS. Инкубируют при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин, после инкубации удаляют супернатант;

- к оставшейся в колбе ткани добавляют раствор коллагеназы Р с DMEM, содержащей FCS, и продолжают инкубацию в течение 2 ч при  $37^{\circ}\text{C}$  и  $5\% \text{CO}_2$ ;

- пипетируют смесь через клеточный фильтр в пробирку объемом 50 мл, клеточную взвесь центрифугируют при  $250 \text{ g}$  10 мин. Затем удаляют супернатант, взвесь клеток размешивают, промывают добавлением 15 мл DMEM и вновь центрифугируют. Количество жизнеспособных клеток подсчитывают с помощью трипанового синего;

- ресуспензируют взвесь в среднем  $1 \times 10^6$  клеток в 15 мл DMEM, добавляют взвесь в Т-75 флакон, содержащий 5 мл DMEM, инкубируют при  $37^{\circ}\text{C}$  и  $5\% \text{CO}_2$  до образования монослоя.

### Морфология, фенотип, функциональные свойства культуры ФСК

При световой микроскопии ФСК в культуре представляют собой удлинённые, иногда овальные или полигональные клетки, с небольшим количеством цитоплазматических отростков, хорошо выраженным ядром (см. рис. 1 и 2, см. 3-ю стр. обложки).

Редко клетки имеют древовидную или звездчатую форму. При электронной микроскопии ФСК содержат большое количество эндоплазматического ретикула, отсутствуют пищеварительные вакуоли [72].

Гетерогенная природа ФСК в культуре усложняет определение точного фенотипа. Его идентифицируют по наличию типичной морфологии и ультраструктуры, отсутствия большого количества гранулярного эндоплазматического ретикула, макрофагальных маркёров, таких как CD14 и CD68, а также неспособностью поглощать частички латекса [11]. ФСК являются мезенхимальными клетками, которые обладают признаками фибробластов, включая экспрессию виментина и CD90 (Thy-1), а также продукцию IV и V типов коллагена [19, 20]. Но помимо этого ФСК обладают рядом уникальных свойств *in situ*, которые отличают их от многих других клеточных линий фибробластов. Относительно специфическими маркерами ФСК являются васкулярно клеточные адгезивные молекулы (VCAM-1) [56], CD55 (белковый регулятор C3/C5-конвертазы) [29], а также уридин дифосфоглюкозо-дегидрогеназа (UDPGD) [70]. Специфической адгезивной молекулой, экспрессируемой ФСК, является кадгерин-11, отвечающий за формирование синовиальной выстилки и способствующий разрушению хряща, хотя точный механизм до конца остается неясным [45, 85].

ФСК пролиферируют в культуре прилипших клеток, и скорость пролиферации увеличивается под действием фактора роста тромбоцитов (PDGF), трансформирующего ростового фактора (TGF- $\beta$ ). Умеренный пролиферативный эффект наблюдается также после воздействия TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  [5]. Эти цитокины усиливают синтез ФСК простагландина E2 [14, 53], продукцию

IL-6, IL-8, GM-CSF, матричных металлопротеиназ MMP-1, MMP-3 [4], экспрессию молекул адгезии, а именно VCAM-1, ICAM-1, интегринов [19, 20].

#### **Стабильный фенотип ФСК как результат эпигенетических нарушений**

В последние годы все большее внимание исследователей привлекают эпигенетические механизмы регуляции активности генов, в том числе при мультифакториальных заболеваниях, к числу которых относится и РА. Этот интерес обусловлен, прежде всего, перспективой открытия новых терапевтических мишеней.

Предполагается, что в основе стабильно измененного фенотипа ФСК лежат эпигенетические изменения [67], в частности нарушения метилирования ДНК, ацетилирования гистонов, активности малых РНК [81].

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

Метилирование ДНК — эпигенетический механизм экспрессии генов, не затрагивающий последовательность ДНК [81].

ДНК-метилтрансферазы (DNA methyltransferases, DNMTs) являются «эффекторами» метилирования ДНК и катализируют либо метилирование *de novo* (т.е. в новых сайтах), либо поддерживают метилирование полуметилированной ДНК после репликации ДНК. Утрата способности поддерживать метилирование ДНК или дерегуляция в уровнях метилирования ДНК может приводить к различным заболеваниям [81].

Так, показано, что ФСК больных РА характеризуются стабильным, возникающим *in vivo* и сохраняющимся после неоднократных пассажей *in vitro* тотальным гипометилированием ДНК, сопоставимым по выраженности с гипометилированием ДНК в опухолевых клетках [38].

В исследовании Neidhart и его коллег была продемонстрирована повышенная экспрессия ретротранспозонов LINE-1 (длинных диспергированных нуклеотидных элементов — 1) в клетках синовиальной оболочки больных РА, особенно в местах инвазии [63]. Ретротранспозоны — это мобильные последовательности ДНК, которые могут перемещаться внутри генома и при этом подавлять метилирование ДНК. Экспрессия LINE-1 элементов в ФСК индуцирует транскрипцию р38, галектин-3-связывающего белка и met протоонкогена, демонстрируя, что наличие функциональной LINE-1 может вызывать изменения в экспрессии генов [63]. Гипотеза, что экспрессия LINE-1 в ФСК связана с потерей метилированных меток, была подтверждена исследованиями, показавшими, что геномная ДНК ФСК от больных РА была глобально гипо-

метилирована по сравнению с ФСК при остеоартрите (ОФСК) или ФСК здоровых пациентов [38]. При этом в ОФСК уровень DNMT1 увеличивался в процессе пролиферации, обеспечивая тем самым полноценное восстановление метилирования в недавно синтезированной цепи ДНК, тогда как пролиферирующие ФСК больных РА характеризуются относительным недостатком DNMT1. Этот недостаток DNMT1 может привести к утрате метилирования в дочерних клетках, что с течением времени способствует прогрессивному преобразованию фенотипа ФСК в клетку с высоким провоспалительным потенциалом.

В настоящее время показано, что ряд промоторов специфических генов, играющих существенную роль в патогенезе РА, находится в состоянии гипометилирования. Продемонстрирована конститутивно повышенная экспрессия CXCL12 в РФСК за счет гипометилирования его промоторной области [39]. Высокие уровни CXCL12, в свою очередь, стимулируют выработку металлопротеиназ, ферментов, которые частично могут отвечать за деструктивное действие ФСК. Было показано, что у пациентов с РА, получавших блокаторы TNF $\alpha$ , уровень CXCL12 оставался высоким и активность болезни сохранялась, в то время как после синовэктомии уровень CXCL12 значительно снижался [37, 86]. Последние публикации показали, что деметилирование даже одного CpG-мотива в промоторах генов IL-6 [33, 64] и IL-10 [23, 49] коррелирует с их уровнем экспрессии и, следовательно, 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 к апоптозу при РА [82].

#### **Роль модификаций гистонов в стабильно измененном фенотипе ФСК**

Ацетилирование и метилирование коровых гистонов, особенно H3 и H4, были одними из первых описанных ковалентных модификаций этих белков. Со временем были идентифицированы и охарактеризованы другие типы ковалентных модификаций гистонов, в их числе: фосфорилирование, убиквитинирование, сумоилирование, АДФ-рибозилирование, биотинилирование, изомеризация пролина. Все эти модификации происходят в различных сайтах и остатках гистонов и вместе составляют сложный гистоновый код, который способствует подавлению или активации транскрипции соответствующих белков [79]. Степень ацетилирования гистонов определяется активностью двух типов ферментов —

гистонацетилтрансфераз (НАТ) и гистондеацетилаз (HDAC) [78].

Изменение секреции и активности гистондеацетилаз может негативно регулировать доступность промотора гена. В одном исследовании было продемонстрировано уменьшение активности HDAC в синовиальной ткани больных РА по сравнению с синовиальной тканью больных ОА и снижением уровня HDAC1 и HDAC2 [31]. В другой работе [40] показано, что активность HDAC выше в синовиальной ткани больных РА, чем у пациентов с ОА, причем содержание HDAC1 было увеличено [40]. Не ясно, преобладают ли процессы глобального гипер- или гипoaцетилирования в ФСК больных РА, но иммуногистохимический анализ с использованием меченых антител против ацетил-лизина показал значительное ацетилирование в макрофагах и ФСК синовиальной ткани больных РА [25].

Важным механизмом персистенции воспаления при РА является повышение ацетилирования гистонов в промоторах генов, ответственных за продукцию провоспалительных белков. Так, показано, что участок промотора MMP1 ФСК больных РА находится в гиперацетилированном состоянии [51]. Продemonстрировано, что стимуляция ФСК TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  индуцирует ацетилирование промотора регулятора клеточного цикла — p21, что, в свою очередь, коррелирует с пролиферацией ФСК [65]. Обнаружено, что изменения в ацетилировании гистонов в ФСК связаны с высоким уровнем убиквитин-подобного белка SUMO-1 и параллельным снижением уровня специфической протеазы SENP1. При гиперсекреции SENP1 в ФСК ацетилирование гистона H4 в промоторе MMP1 было снижено, что приводило к уменьшению инвазивности ФСК [51]. Поскольку этот эффект зависит от экспрессии HDAC4, авторы предположили, что увеличение сумоилирования HDAC4 в ФСК предотвращает его ядерную транслокацию и последующее деацетилирование гистонов в промоторе MMP-1.

Складывается впечатление, что вмешательства, направленные на снижение функции HDAC ФСК, обладают терапевтическим потенциалом при РА. Показано, что введение различных ингибиторов HDAC приводит к профилактическому и лечебному эффекту на моделях артрита у животных [48, 60, 65]. Jungel и его коллеги [36] добавляли в культуры ФСК ингибитор гистондеацетилазы — трихостатин А (TSA), что способствовало подавлению их пролиферации и сенсibilизации к TRAIL — цитокину семейства фактора некроза опухоли, выполняющего роль лиганда, вызывающего апоптоз. Впоследствии Nasu и его коллеги

[62] провели исследование *in vivo*, где были проанализированы эффекты TSA при лечении артрита, индуцированного антителом против коллагена (CAIA) у мышей. Мыши получали подкожные инъекции TSA, и гистологический анализ показал дозозависимое улучшение морфологических проявлений артрита. Кроме того, введение ингибиторов HDAC в культуры *in vitro* макрофагов и синовиальных эксплантатов от больных РА выявило их мощное противовоспалительное действие [24]. Механизмы, посредством которых HDAC оказывают противовоспалительное действие, полностью не понятны. Предполагается, что противовоспалительный эффект возникает вследствие увеличения ацетилирования гистонов в промоторах транскрипционных репрессоров, повышения транскрипции продуктов генов, обладающих противовоспалительными свойствами или модификации негистоновых белков [55]. Эти, пока немногочисленные, исследования свидетельствуют о том, что методы лечения, основанные на модуляции HDAC, могут стать реальностью для лечения ревматоидного артрита.

#### **Роль микроРНК в стабильном фенотипе ФСК**

Подавление экспрессии гена может быть вызвано не только репрессорами белковой природы, и не всегда на уровне транскрипции. Супрессирующим экспрессию белков на посттранскрипционной стадии обладают микроРНК — небольшие (от 19 до 22 нуклеотидов), эндогенные, одноцепочечные, не кодирующие РНК [47]. Показано, что экспрессия нескольких микроРНК в ФСК была изменена, и это способствовало изменению уровня пролиферации, продукции провоспалительных цитокинов и MMP [59, 76]. Содержание микроРНК-155 и микроРНК-146а стабильно повышено в культуре ФСК, так же как и в синовиальной ткани, синовиальной жидкости и МНК ПК пациентов с РА [58, 61, 68, 77], в то время как экспрессия микроРНК-124а снижена в ФСК от больных РА по сравнению с ОФСК [59]. Экспрессия микроРНК-203 в ФСК также постоянно повышена, и ее высокий уровень способствует продукции IL-6 и MMP в этих клетках [76]. Необходимо отметить, что уровень микроРНК-203 повышен в ФСК не только пациентов с многолетним РА по сравнению с остеоартритом и нормальными ФСК, а также у пациентов с ранним РА. Предполагается, что на ранних этапах болезни эпигенетическая регуляция сбалансирована, что позволяет ФСК оставаться пластичными [76].

Механизмы эпигенетической регуляции ФСК тесно взаимосвязаны. Так, показано, что деметилирование нормальных синовиальных фибробластов с помощью 5-азациитидина приводит

к повышенной экспрессии микроРНК-203 [17]. Пока не ясно, как координируются процессы нарушения метилирования ДНК, ацетилирования гистонов, активности малых РНК, обеспечивая стабильность фенотипа ФСК, их провоспалительный потенциал.

## Заключение

ФСК являются ключевыми клеточными элементами, участвующими в патогенезе ревматоидного артрита. Эпигенетические изменения потенциально уже могут объяснить некоторые ключевые особенности стабильно измененного

фенотипа ФСК при РА. Большинство приобретенных эпигенетических нарушений — обратимые процессы, регулируемые специфическими ферментами и кофакторами, которые позволяют клеткам изменять экспрессию генов в ответ на различные раздражители. Ферменты и молекулярные комплексы, участвующие в этих процессах, являются потенциальными терапевтическими мишенями.

Исследования, посвященные нарушениям их эпигенетической регуляции ФСК при РА, находятся в самом начале своего пути. Есть основания полагать, что на этом трудном пути нас ждет больше радости, чем разочарования.

## Список литературы / References

1. Павлова В.Н. Синовиальная среда суставов. М.: Медицина, 1980. 294 с. [Pavlova V. N. Synovial fluid of joints]. Moscow: Meditsina, 1980. 294 p.
2. Раденска-Лоповок С.Г. Биопсия синовиальной оболочки как метод оценки эффективности терапии ревматоидного артрита: подход к стандартизации клинических испытаний // Современная ревматология, 2011. №4. С. 31-34. [Radenska-Lopovok S.G. Synovial membrane biopsy as a method for evaluating the efficiency of therapy for rheumatoid arthritis: approach to standardizing clinical trials. *Sovremennaya revmatologiya = Modern Rheumatology*, 2011, no. 4, pp. 31-34. (In Russ.)]
3. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме // Успехи биологической химии, 2007. Т. 47. С. 3-52. [Chumakov P. M. Versatile Functions of p53 protein in multicellular Organisms. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances Biological Chemistry*, 2007, Vol. 47, pp. 3-52. (In Russ.)]
4. Alvaro-Gracia J.M., Zvaifler N.J., Brown C.B., Kaushansky K., Firestein G.S. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. VI. Analysis of the synovial cells involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and gene expression in rheumatoid arthritis and its regulation by IL-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Immunol.*, 1991, Vol. 146, no. 10, pp. 3365-3371.
5. Alvaro-Gracia J.M., Zvaifler N.J., Firestein G.S. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *J. Clin. Invest.*, 1990, Vol. 86, no. 6, pp. 1790-1798.
6. Arend W.P., Dayer J.M. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1990, Vol. 33, pp. 305-315.
7. Bartok B., Firestein G.S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.*, 2010, Vol. 233, no. 1, pp. 233-255.
8. Boyle W.J., Simonet W.S., Lacey D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 2003, Vol. 423, pp. 337-342.
9. Brackertz D., Hagmann J., Kueppers F. Proteinase inhibitors in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 1975, Vol. 34, pp. 225-230.
10. Bromley M., Woolley D.E. Chondrocytes and osteoclasts at subchondral sites of erosions in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum.*, 1984, Vol. 27, pp. 968-975.
11. Burmester G.R., Jahn B., Rohwer P., Zacher J., Winchester R.J., Kalden J.R. Differential expression of Ia antigens by rheumatoid synovial lining cells. *J. Clin. Invest.*, 1987, Vol. 80, pp. 595-604.
12. Close D.R. Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.*, 2001, Vol. 60, pp. iii62-iii67.
13. Collin-Osdoby P., Rothe L., Anderson F., Nelson M., Maloney W., Osdoby P. Receptor activator of NF- $\kappa$ B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, pp. 20659-20672.
14. Dayer J.M., Beutler B., Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J. Exp. Med.*, 1985, Vol. 162, pp. 2163-2168.
15. Dolhain R.J., van der Heiden A.N., ter Haar N.T., Breedveld F.C., Miltenburg A.M. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1996, Vol. 39, no. 12, pp. 1961-1969.
16. Edwards J.C., Willoughby D.A. Demonstration of bone marrow derived cells in synovial lining by means of giant intracellular granules as genetic markers. *Ann. Rheum. Dis.*, 1982, Vol. 41, pp. 177-182.



17. Feldges Stanczyk J., Karouzakis E., Jungel A., Ospelt C., Kolling C., Michel Beat A., Gay R.E. Mir-203 Regulates the Expression of IL-6 and Matrix Metalloproteinase(MMP)-1 in RA Synovial Fibroblasts [abstract]. *Arthritis Rheum.*, 2009, Vol. 60, 1893 p.
18. Feldmann M., Brennan F.M., Maini R.N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.*, 1996, Vol. 14, pp. 397-440.
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. 8. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier*, 2009, pp. 1035-1086.
20. Firestein G.S., Gary S. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum.*, 1996, Vol. 39, pp. 1781-1790.
21. Firestein G.S., Alvaro-Garcia J.S., Maki R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.*, 1990, Vol. 144, pp. 3347-3353.
22. Firestein G.S., Nguyen K., Aupperle K.R., Yeo M., Boyle D.L., Zvaifler N.J. Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. *Am. J. Pathol.*, 1996, Vol. 149, pp. 2143-2151.
23. 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.
24. Grabiec A.M., Krausz S., de Jager W., Burakowski T., Groot D., Sanders M.E., Prakken B.J., Maslinski W., Eldering E., Tak P.P., Reedquist K.A. Histone deacetylase inhibitors suppress inflammatory activation of rheumatoid arthritis patient synovial macrophages and tissue. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, pp. 2718-2728.
25. Grabiec A.M., Tak P.P., Reedquist K.A. Targeting histone deacetylase activity in rheumatoid arthritis and asthma as prototypes of inflammatory disease: should we keep our HATs on? *Arthritis Res. Ther.*, 2008, Vol. 10, p. 226.
26. Gravallesse E.M., Manning C., Tsay A., Naito A., Pan C., Amento E., Goldring S.R. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum.*, 2000, Vol. 43, pp. 250-258.
27. Green D.R., Knight R.A., Melino G., Finazzi-Agro A., Orrenius S. Ten years of publication in cell death. *Cell Death Differ.*, 2004, Vol. 11, pp. 2-3.
28. Hadler N.M., Johnson A.M., Spitznagel J.K., Quinet R.J. Protease inhibitors in inflammatory synovial effusions. *Ann. Rheum. Dis.*, 1981, Vol. 40, pp. 55-59.
29. Hamann J., Wishaupt J.O., van Lier R.A., Smeets T.J., Breedveld F.C., Tak P.P. Expression of the activation antigen CD97 and its ligand CD55 in rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum.*, 1999, Vol. 42, pp. 650-658.
30. Hitchon C.A., El-Gabalawy H.S. The synovium in rheumatoid arthritis. *Open Rheumatol. J.*, 2011, Vol. 5, pp. 107-114.
31. Huber L.C., Brock M., Hemmatazad H., Giger O.T., Moritz F., Trenkmann M., Distler J.H. W., Gay R.E., Kolling C., Moch H., Michel B.A., Gay S., Distler O., Jungel A. Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum.*, 2007, Vol. 56, pp. 1087-1093.
32. Huber L.C., Distler O., Tarner I., Gay R.E., Gay S., Pap T. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology. Oxford*, 2006, Vol. 45, pp. 669-675.
33. 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.
34. Isomaki P., Punnonen J. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann. Med.*, 1997, Vol. 29, pp. 499-507.
35. Iwanaga T., Shikichi M., Kitamura H., Yanase H., Nozawa-Inoue K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch. Histol. Cytol.*, 2000, Vol. 63, no. 1, pp. 17-31.
36. Jungel A., Baresova V., Ospelt C., Simmen B.R., Michel B.A., Gay R.E., Gay S., Seemayer C.A., Neidhart M. Trichostatin A sensitises rheumatoid arthritis synovial fibroblasts for TRAIL-induced apoptosis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2006, Vol. 65, pp. 910-912.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. Kawabata T., Nishida K., Takasugi K., Ogawa H., Sada K., Kadota Y., Inagaki J., Hirohata S., Ninomiya Y., Makino H. Increased activity and expression of histone deacetylase 1 in relation to tumor necrosis factor-alpha in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2010, Vol. 12, R133.
41. Kobayashi I., Ziff M. Electron microscopic studies of lymphoid cells in the rheumatoid synovial membrane. *Arthritis Rheum.*, 1973, Vol. 16, pp. 471-486.
42. Korb A., Pavenstädt H., Pap T. Cell death in rheumatoid arthritis. *Apoptosis*, 2009, Vol. 14, no. 4, pp. 447-454.

43. Kurowska M., Rudnicka W., Kontny E., Janicka I., Chorzasty M., Kowalczywski J., Ziolkowska M., Ferrarilacraz S., Strom T.B., Maslinski W. Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex: endogenous IL-15 in autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-x(L) and Bcl-2. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, pp. 1760-1767.
44. 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, Vol. 93, pp. 165-176.
45. Lee D.M., Kiener H.P., Agarwal S.K., Noss E.H., Watts G.F., Chisaka O., Takeichi M., Brenner M.B. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science*, 2007, Vol. 315, pp. 1006-1010.
46. 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, Vol. 15, no. 12, pp. 1414-1420.
47. Lewis B.P., Shih I.H., Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P., Burge C.B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 2003, Vol. 115, pp. 787-798.
48. Lin H.S., Hu C.Y., Chan H.Y., Liew Y.Y., Huang H.P., Lepescheux L., Bastianelli E., Baron R., Rawadi G., Clément-Lacroix P. Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors *in vivo* in collagen-induced arthritis in rodents. *Br. J. Pharmacol.*, 2007, Vol. 150, pp. 862-872.
49. Lin S.Y., Hsieh S.C., Lin Y.C., Lee C.N., Tsai M.H., Lai L.C., Chuang E.Y., Chen P.C., Hung C.C., Chen L.Y., Hsieh W.S., Niu D.M., Su Y.N., Ho H.N. A whole genome methylation analysis of systemic lupus erythematosus: hypomethylation of the IL10 and IL1R2 promoters is associated with disease activity. *Genes Immun.*, 2012, Vol. 13, pp. 214-220.
50. Liu H., Pope R.M. Apoptosis in rheumatoid arthritis: friend or foe. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 2004, Vol. 30, pp. 603-625.
51. Maciejewska-Rodrigues H., Karouzakis E., Strietholt S., Hemmatzad H., Neidhart M., Ospelt C., Gay R.E., Michel B.A., Pap T., Gay S., Jüngel A. Epigenetics and rheumatoid arthritis: the role of SENP1 in the regulation of MMP-1 expression. *J. Autoimmun.*, 2010, Vol. 35, pp. 15-22.
52. Mapp P.I., Revell P.A. Ultrastructural characterisation of macrophages (type A cells) in the synovial lining. *Rheumatol. Int.*, 1988, Vol. 8, no. 4, pp. 171-176.
53. Martel-Pelletier J., Pelletier J.P., Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2003, Vol. 33, no. 3, pp. 155-167.
54. Matsumoto S., Müller-Ladner U., Gay R.E., Nishioka K., Gay S. Ultrastructural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J. Rheumatol.*, 1996, Vol. 23, pp. 1345-1352.
55. Mitsiades C.S., Mitsiades N.S., McMullan C.J., Poulaki V., Shringarpure R., Hideshima T., Akiyama M., Chauhan D., Munshi N., Gu X., Bailey C., Joseph M., Libermann T.A., Richon V.M., Marks P.A., Anderson K.C. Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2004, Vol. 101, pp. 540-545.
56. Morales-Ducet J., Wayner E., Elices M.J., Alvaro-Gracia J.M., Zvaifler N.J., Firestein G.S. Alpha 4/beta 1 integrin (VLA-4) ligands in arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes. *J. Immunol.*, 1992, Vol. 149, no. 4, pp. 1424-1431.
57. 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, Vol. 149, pp. 1607-1615.
58. Murata K., Yoshitomi H., Tanida S., Ishikawa M., Nishitani K., Ito H., Nakamura T. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2010, Vol. 12, R86.
59. Nakamachi Y., Kawano S., Takenokuchi M., Nishimura K., Sakai Y., Chin T., Saura R., Kurosaka M., Kumagai S. MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2009, Vol. 60, pp. 1294-1304.
60. Nakamura T., Kukita T., Shobuike T., Nagata K., Wu Z., Ogawa K., Hotokebuchi T., Kohashi O., Kukita A. Inhibition of histone deacetylase suppresses osteoclastogenesis and bone destruction by inducing IFN-beta production. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, pp. 5809-5816.
61. Nakasa T., Miyaki S., Okubo A., Hashimoto M., Nishida K., Ochi M., Asahara H. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.*, 2008, Vol. 58, pp. 1284-1292.
62. Nasu Y., Nishida K., Miyazawa S., Komiyama T., Kadota Y., Abe N., Yoshida A., Hirohata S., Ohtsuka A., Ozaki T. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses synovial inflammation and subsequent cartilage destruction in a collagen antibody-induced arthritis mouse model. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2008, Vol. 16, pp. 723-732.
63. Neidhart M., Rethage J., Kuchen S., Künzler P., Crowl R.M., Billingham M.E. Retrotransposable L1 elements expressed in rheumatoid arthritis synovial tissue: association with genomic DNA hypomethylation and influence on gene expression. *Arthritis Rheum.*, 2000, Vol. 43, pp. 2634-2647.

64. 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.
65. Nishida K., Komiyama T., Miyazawa S., Shen Z.N., Furumatsu T., Doi H., Yoshida A., Yamana J., Yamamura M., Ninomiya Y., Inoue H., Asahara H. Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and p21(WAF1/Cip1) expression. *Arthritis Rheum.*, 2004, Vol. 50, no. 10, pp. 3365-3376.
66. Nishioka K., Hasunuma T., Kato T., Sumida T., Kobata T. Apoptosis in rheumatoid arthritis: A novel pathway in the regulation of synovial tissue. *Arthritis Rheum.*, 1998, Vol. 41, pp. 1-9.
67. 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.
68. Pauley K.M., Satoh M., Chan A.L., Bubbs M.R., Reeves W.H., Chan E.K. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res. Ther.*, 2008, Vol. 10, R101.
69. Perlman H., Georganas C., Pagliari L.J., Koch A.E., Haines K., Pope R.M. Bcl-2 expression in synovial fibroblasts is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 164, pp. 5227-5235.
70. Pitsillides A.A., Wilkinson L.S., Mehdizadeh S., Bayliss M.T., Edwards J.C. Uridine diphosphoglucose dehydrogenase activity in normal and rheumatoid synovium: the description of a specialized synovial lining cell. *Int. J. Exp. Pathol.*, 1993, Vol. 74, no. 1, pp. 27-34.
71. Redlich K., Hayer S., Ricci R., David J.P., Tohidast-Akrad M., Kollias G., Steiner G., Smolen J.S., Wagner E.F., Schett G. Osteoclasts are essential for TNF- $\alpha$ -mediated joint destruction. *J. Clin. Invest.*, 2002, Vol. 110, pp. 1419-1427.
72. Rosengren S., Boyle D.L., Firestein G.S. Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts. *Methods Mol. Med.*, 2007, Vol. 135, pp. 365-375.
73. Schett G., Hayer S., Zwerina J., Redlich K., Smolen J.S. Mechanisms of disease: the link between RANKL and arthritic bone disease. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 2005, Vol. 1, pp. 47-54.
74. Schulze-Koops H., Kalden J.R. The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2001, Vol. 15, pp. 677-691.
75. Shirinsky I.V., Shirinsky V. S. Cytokines in Rheumatoid Arthritis. In: Preedy V.R., Hunter R.J., editors. *Science publishers Jersey, British Isles, Enfield, New Hampshire: Cytokines*, 2011, pp. 403-417.
76. Stanczyk J., Ospelt C., Karouzakis E., Filer A., Raza K., Kolling C., Gay R., Buckley C.D., Tak P.P., Gay S., Kyburz D. Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis Rheum.*, 2011, Vol. 63, pp. 373-381.
77. Stanczyk J., Pedrioli D.M., Brentano F., Sanchez-Pernaute O., Kolling C., Gay R.E., Detmar M., Gay S., Kyburz D. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2008, Vol. 58, pp. 1001-1009.
78. Sterner D.E., Berger S.L. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000, Vol. 64, no. 2, pp. 435-459.
79. Strahl B.D., Allis C.D. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000, Vol. 403, pp. 41-45.
80. Sun Y., Cheung H.S. p53, proto-oncogene and rheumatoid arthritis. *Semin. Arthr. Rheum.*, 2002, Vol. 31, no. 5, pp. 299-310.
81. Szyf M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2009, Vol. 49, pp. 243-263.
82. 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.
83. Takayanagi H., Iizuka H., Juji T., Nakagawa T., Yamamoto A., Miyazaki T., Koshihara Y., Oda H., Nakamura K., Tanaka S. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2000, Vol. 43, pp. 259-269.
84. Takemura S., Braun A., Crowson C., Kurtin P.J., Cofield R.H., O'Fallon W.M., Goronzy J.J., Weyand C.M. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, pp. 1072-1080.
85. Valencia X., Higgins J.M., Kiener H.P., Lee D.M., Podrebarac T.A., Dascher C.C., Watts G.F., Mizoguchi E., Simmons B., Patel D.D., Bhan A.K., Brenner M.B. Cadherin-11 provides specific cellular adhesion between fibroblast-like synoviocytes. *J. Exp. Med.*, 2004, Vol. 200, pp. 1673-1679.
86. 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.
87. Vervoordeldonk M.J., Tak P.P. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2002, Vol. 4, pp. 208-217.
88. Weidauer E., Yasuda Y., Biswal B.K., Cherny M., James M.N., Brömme D. Effects of disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) on the activities of rheumatoid arthritis-associated cathepsins K and S. *Biol. Chem.*, 2007, Vol. 388, no. 3, pp. 331-336.

89. Yamanishi Y., Boyle D.L., Rosengren S., Green D.R., Zvaifler N.J., Firestein G.S. Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2002, Vol. 99, no. 15, pp. 10025-10030.
90. Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., Mochizuki S-I., Tomoyasu A., Yano K., Goto M., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K., Udagawa N., Takahashi N., Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/ osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1998, Vol. 95, pp. 3597-3602.
91. Young C.L., Adamson T.C., Vaughan J.H., Fox R.I. Immunologic characterization of synovial membrane lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1984, Vol. 27, pp. 32-39.
92. 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», г. Новосибирск, Россия

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

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

---

**Authors:**

**Schneider M.A.**, Research Fellow, PhD student, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

---

Поступила 08.02.2016  
Принята к печати 18.02.2016

---

Received 08.02.2016  
Accepted 18.02.2016