Інститут біології клітини
Національної академії наук України
Інститут біології тварин
Національної академії аграрних наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

МАЛИШЕВА ХРИСТИНА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 616.72-002.77:616-002:611.018.4:577.2

ДИСЕРТАЦІЯ

БЛОКУВАННЯ СИГНАЛЬНОГО ШЛЯХУ WNT ІНТЕРЛЕЙКІНОМ 6: РОЛЬ У РОЗВИТКУ ТА ПРОГРЕСУВАННІ РЕВМАТОЇДНОГО АРТРИТУ

03.00.04 – біохімія
09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Х. В. Малишева

Науковий керівник: Стойка Ростислав Стефанович, доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України

Львів – 2017

АНОТАЦІЯ

Малишева Х. В. Блокування сигнального шляху Wnt інтерлейкіном 6: роль у розвитку та прогресуванні ревматоїдного артриту. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04 «Біохімія». – Інститут біології клітини НАН України; Інститут біології тварин НААН, Львів, 2017.

Незважаючи на те, що ревматоїдний артрит був і є предметом численних досліджень, причина розвитку даного захворювання, його етіологія та патофізіологія і досі залишаються не до кінця зрозумілими. До головних ознак ревматоїдного артриту належать синовіт, руйнування суглобових тканин, зокрема хрящової тканини та прилягаючої кістки (утворення ерозій кістки), що є найбільш болісним з ускладнень захворювання, а також високий рівень прозапальних цитокінів, серед яких ключову роль відіграють фактор некрозу пухлин α, інтерлейкін 1β та інтерлейкін 6. Морфогенетичні протеїни кістки, а також сигнальний шлях Wnt належать до основних механізмів, які забезпечують індукцію і підтримку формування скелетних тканин. Активація сигнального шляху Wnt необхідна для підтримки правильного балансу між процесами формування і ремоделювання кісткової та хрящової тканин. Однак, при ревматоїдному артриті такий баланс порушується. Дисертаційна робота присвячена вивченню негативного регуляторного впливу генів інтерлейкіну 6, секурину (*pttg1*, ген пухлинної трансформації клітин гіпофізу 1) та PTTG-зв'язувального протеїну 1 (*pttg-bp1*) на остеобластну диференціацію мезенхімних стовбурових клітин миші, індуковану морфогенетичними протеїнами кістки 2 і 7.

Показано, що у первинних синовіальних фібробластах людини, фактор некрозу пухлин α так само як і продукт його гена-мішені, інтерлейкін 6, інгібують активацію сигнального шляху Wnt (відповідно у 2,67 і 4,39 разу порівняно з контролем). Окрім того, інтерлейкін 6 у поєднанні з фактором некрозу пухлин α

виявляли кооперативний інгібувальний ефект. Зокрема, поєднання дії інтерлейкіну 6 і фактора некрозу пухлин α призводило до інгібування сигнального шляху Wnt у 13,5 разу порівняно з необробленими клітинами. Встановлено, що обробка фібробластів миші лінії NIH-3T3 інтерлейкіном 6 та його рецептором разом з надекспресією гена протеїну DKK-1, який є ключовим інгібітором сигнального шляху Wnt, призводила до інгібування даного сигнального шляху в 1,42 разу порівняно з контролем, тоді як поєднання усіх трьох агентів (інтерлейкін 6 і його рецептор, фактор некрозу пухлин α і DKK-1) було менш ефективним. Показано, що фактор некрозу пухлин α не виявив ефекту в поєднанні з надекспресією гена протеїну DKK-1.

Враховуючи те, що прогресування ревматоїдного артриту призводить до ураження прилягаючої кісткової тканини в суглобах, було проведено оцінку *in vitro* функціонального вкладу взаємодії інтерлейкіну 6 і фактора некрозу пухлин α в інгібування процесу кісткоутворення. Для цього використовували обробку рекомбінантними цитокінами у поєднанні з блокуванням експресії мРНК гена інтерлейкіну 6 з допомогою малих шпилькових (мш) РНК в мезенхімних стовбурових клітинах миші ліній C2C12 і KS483 під час їх остеобластної диференціації. Показано, що стабільний нокдаун експресії мРНК гена інтерлейкіну 6 підсилював ранні стадії остеобластної диференціації (в окремих експериментах від 2,7 до 6 раз порівняно з контролем) клітин ліній C2C12 і KS483, а також усував негативний вплив фактора некрозу пухлин α на остеобластну диференціацію клітин лінії C2C12 і перетворював його з інгібітора у потенціатор остеогенезу. Водночас, подібно до активації сигнального шляху Wnt в клітинах лінії NIH-3T3, обробка Hyper-ІЛ-6 (гібридний протеїн, що складається з інтерлейкіну 6 і розчинної форми його рецептора) не впливала на ранні стадії остеобластної диференціації клітин лінії KS483. До того ж, нокдаун експресії мРНК гена інтерлейкіну 6 підсилював пізні стадії остеобластної диференціації цих клітин, що відображалося у вищій порівняно з контролем активності процесів мінералізації позаклітинного матриксу і утворенні специфічних вузликів. Отже, інтерлейкін 6 є важливим медіатором в інгібуванні остеобластної диференціації,

опосередкованим фактором некрозу пухлин α. Найімовірніше, що антиостеогенні ефекти інтерлейкіну 6 обумовлені його негативною взаємодією з сигнальним шляхом Wnt.

З'ясовано, що тимчасова надекспресія гена *pttg-bp1* призводила до інгібування ранніх стадій остеобластної диференціації клітин лінії C2C12 (в 6,93 разу порівняно з контролем). Під час тимчасової надекпресії гена *pttg1* і за наявності фактора некрозу пухлин α в середовищі, остеогенні процеси інтенсифікувались в 2,41 разу. До того ж показано, що тимчасовий нокдаун генів *pttg1* та *pttg-bp1* з допомогою мшРНК, призводив до зростання інтенсивності остеобластної диференціації клітин лінії C2C12 порівняно з контролем (у 2,52 і 1,89 разу, відповідно). Було досліджено ефекти надекспресії і нокдауну генів *pttg1* і *pttg-bp1* на активацію сигнального шляху Wnt. Встановлено, що надекспресія генів *pttg1* і *pttg-bp1* інгібує активацію цього сигнального шляху у клітинах лінії KS483, що відображалося в пригніченні мінералізації кісткового матриксу у 2,5 разу порівняно з контролем. Водночас, нокдаун експресії мРНК генів *pttg1, pttg-bp1*, опосередкований мшРНК, або ж їх поєднання, додатково (відповідно у 3,0, 1,5 і 2,5 разу) підсилював остеобластну диференціацію цих клітин. Отже, система PTTG1/PTTG-BP1 є важливим транскрипційним репресором остеогенезу і, можливо, задіяна у руйнуванні кісткової тканини, спричиненому запальним процесом.

Незважаючи на значну частоту захворюваності ревматоїдним артритом у світі, ефективних методів лікування цього захворювання і досі не створено. Сучасні способи терапії включають застосування препаратів, які можуть значно сповільнити розвиток ревматоїдного артриту чи звести до мінімуму деградацію суглобів. На жаль, жоден із існуючих засобів не здатний повністю зупинити руйнування уражених тканин суглобів і забезпечити їх ефективне відновлення. Тому, важливими є пошук і створення високодієвих терапевтичних препаратів, які змогли б усунути негативний вплив запального процесу на деградацію кісткової та хрящової тканин суглобів, а також сприяти їх регенерації. Було вивчено похідні 4-тіазолідинону, які володіють здатністю модулювати остеобластну

диференціацію мезенхімних стовбурових клітин, а також демонструють мінімальний цитотоксичний ефект щодо цих клітин. Зокрема показано, що сполуки Les-4368, Les-4370, Les-3882 і Les-3288 (у концентраціях 0,02; 0,1; 0.5 і 1,0 мкМ) виявляють мінімальну цитотоксичність, що, у свою чергу, є важливим і необхідним для уникнення шкідливих побічних ефектів у тканинах-мішенях.

Досліджено ефекти похідних 4-тіазолідинону Les-4368, Les-4370, Les-3882, і Les-3288 щодо опосередкованої фактором некрозу пухлин α прозапальної дії під час остеобластної диференціації клітин лінії C2C12. Показано, що сполуки Les-4368 і Les-3882 у концентрації 1 мкМ, усували негативний вплив фактора некрозу пухлин α на остеобластну диференціацію цих клітин. Більше того, ці речовини конвертували дію останнього з інгібітора остеогенезу в його стимулятор. Встановлено, що сполуки Les-4368 і Les-3882 володіють протизапальними властивостями у широкому діапазоні концентрацій (0,02; 0,1 і 0,3 мкМ). Зокрема, сполука Les-4368 у концентрації 0,02 мкМ та сполука Les-3882 у всіх трьох варіантах додатково стимулювали остеобластну диференціацію модельної культури клітин. Найкращий ефект виявила сполука Les-3882, яка у концентрації 0,1 мкМ підсилювала остеобластну диференціацію клітин C2C12 в 1,56 разу порівняно з контролем. Проведено дослідження для з'ясування молекулярного механізму протизапальної активності сполук Les-4368 і Les-3882. Модуляція активації сигнального шляху NF-κB сполуками Les-4368 і Les-3882, потенційно, може бути ключовим механізмом, який опосередковує їхні протизапальні ефекти. Протеїн I-κBα є критично важливим компонентом, який контролює активацію даного сигнального шляху. З'ясовано, що обробка клітин лінії C2C12 сполуками Les-3882 і Les-4368 з наступною стимуляцією фактором некрозу пухлин α протягом 1 год по-різному модулюють активацію сигнального шляху NF-κB. Зокрема, дія Les-3882 у концентрації 0,3 мкМ призводила до нижчого рівня експресії гена протеїну I-κBα після обробки фактором некрозу пухлин α, тоді як Les-4368 у тій же концентрації, навпаки, призводить до зростання рівня експресії гена даного протеїну порівняно з необробленими клітинами.

Отримано і здійснено оптимізацію *in vitro* остеоіндуктивних властивостей препаратів рекомбінантних морфогенетичних протеїнів кістки. Зокрема показано, що найефективнішим індуктором остеобластної диференціації на моделі клітин лінії C2C12 є препарат рекомбінантних морфогенетичних протеїнів кістки, що містить 85 % морфогенетичного протеїну кістки 2 і 15 % морфогенетичного протеїну кістки 7. Глибоке заморожування та зберігання при температурі – 70ºС препаратів рекомбінантних морфогенетичних протеїнів кістки з оптимізованими остеоіндуктивними властивостями суттєво не впливали на їх остеоіндуктивні властивості порівняно з свіжими препаратами морфогенетичних протеїнів кістки. Такі препарати успішно використовували в дисертаційній роботі для індукції остеобластної диференціації *in vitro*. Вони також можуть бути застосовані в інших біологічних цілях.

Показано, що екстракти поліуретанових кістково-пластичних матеріалів, PURs і PURs-M (з включенням гліцерофосфату кальцію для стимуляції остеогенних процесів), є нетоксичними і не інгібують ранньої остеобластної диференціації мезенхімних стовбурових клітин лінії C2C12, що робить їх перспективними для клінічного застосування в інженерії кісткової тканини.

Ключові слова: сигнальний шлях Wnt, інтерлейкін 6, ген пухлинної трансформації клітин гіпофізу 1, PTTG-зв’язувальний протеїн 1, фактор некрозу пухлин α, малі шпилькові РНК, морфогенетичні протеїни кістки, остеобластна диференціація, мезенхімні стовбурові клітини миші.

SUMMARY

Malysheva Kh. V. Wnt signaling pathway inhibition by interleukin 6 and its role in the development and progression of rheumatoid arthritis. – Qualified scientific work as a manuscript.

Thesis for a Philosophy Doctor (PhD) degree in biology, speciality 03.00.04 «Biochemistry». – Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine; Institute of Animal Biology, NAAS, Lviv, 2017.

Although rheumatoid arthritis has been the subject of numerous investigations, the cause of the disease is still unknown and its etiology and pathogenesis remain poorly understood. Rheumatoid arthritis may affect many tissues and organs, but primarily attacks the synovium of joints. This leads to a destruction of articular cartilage and multiple erosions into adjacent bones. An imbalance between the pro- and anti-inflammatory cytokine activities favors the induction of autoimmunity, chronic inflammation, and thereby joint damage. Tumor necrosis factor α, interleukin 1β and interleukin 6 play the primary roles in the rheumatoid arthritis pathogenesis. Several signaling pathways are strongly misregulated in the joints of rheumatoid arthritis patients'. It is known, that bone morphogenetic proteins and Wnt pathway are key signaling pathways that induce and support cartilage and bone formation and maintenance. In a healthy skeleton, formation and resorption of adjacent to joints cortical bones are well balanced but inflammatory arthritis leads to an imbalance between these processes. The thesis is devoted to the study of the negative regulatory influence of interleukin 6 and PTTG1/PTTG-BP1 axis on activation of Wnt signaling pathway and consequently osteoblastic differentiation of mouse mesenchymal stem cells induced by bone morphogenetic proteins 2 and 7, its role in the development and progression of rheumatoid arthritis.

We showed that, both tumor necrosis factor α and interleukin 6 inhibited the activation of Wnt signaling induced with the overexpression of Wnt3a adenovirus in primary human synoviocytes. The tumor necrosis factor α inhibition was respectively

2.1 and 2.67 times when Wnt3a adenovirus was used at multiplicity of infection 300 and 600. The interleukin 6 inhibition was respectively 3.2 and 4.39 times more pronounced when Wnt3a was used at multiplicity of infection 300 and 600. Strikingly, these two proinflammatory cytokines together inhibited the activation of Wnt3a response (respectively 12.83 and 13.5 times when Wnt3a was used at multiplicity of infection 300 and 600). Thus, we showed that interleukin 6 cooperates with tumor necrosis factor α in the inhibition of osteogenic Wnt signaling.

Mouse fibroblasts of NIH-3T3 line were much less responsive to the inhibitory effects of tumor necrosis factor α than human synoviocytes and without stimulation with Wnt3a did not respond to interleukin 6. Nevertheless, in NIH-3T3 cells the combination of interleukin 6 and its receptor with tumor necrosis factor α showed a cooperative inhibitory effect. We also combined the inhibitory effects of interleukin 6 and its receptor, tumor necrosis factor α or their combination with the overexpression of DKK-1, a master Wnt signaling inhibitor. Interleukin 6 together with DKK-1 inhibited Wnt response in 1.42 times, while a combination of all three agents (interleukin 6 and its receptor, tumor necrosis factor α, and DKK-1) was less efficient than the combination of interleukin 6 and DKK-1. Moreover, tumor necrosis factor α did not show any effect in combination with DKK-1 or in combination with interleukin 6 and its receptor and DKK-1 together.

While taking into account that rheumatoid arthritis progression in joints affects also adjacent bones, we further performed an *in vitro* evaluation of functional contribution of interleukin 6 and tumor necrosis factor α on the inhibition of bone formation using treatment with recombinant cytokines combined with a blocking of interleukin 6 gene expression by small hairpin (sh) RNA in mouse mesenchymal precursor cells of C2C12 and KS483. We found that shRNA-mediated knockdown of interleukin 6 gene expression increased early stages of osteoblast differentiation (in individual experiments from 2.7 to 6 times compared with the control) of C2C12 and KS483 cells. At the same time, similarly to activation of Wnt pathway in NIH-3T3 cells, Hyper-IL-6 (a fusion protein of interleukin 6 and its soluble receptor) treatment alone did not influence early osteoblast differentiation of KS483 cells. We also showed

that interleukin 6 is an important inhibitor of late osteogenesis. The treatment of KS483 cells with bone morphogenetic proteins 2 and 7 strongly intensified their late osteoblast differentiation and overexpression of shRNA constructs targeting the mRNA of interleukin 6 gene further potentiated osteogenesis. More efficient differentiation was observed through both nodules formation and matrix mineralization when compared with a control. Therefore interleukin 6 is an important mediator in the inhibition of osteoblast differentiation by the tumor necrosis factor α. The anti-osteoblastic effects of interleukin 6 in rheumatoid arthritis are most likely mediated by its negative interaction with Wnt signaling pathway.

We found that the ectopic expression of *pttg-bp1* gene inhibits (in 6.93 times) osteogenic differentiation in C2C12 cell line. The osteogenic processes were intensified 2.41 times during ectopic expression of *pttg1* gene and in the presence of tumor necrosis factor α in the medium. At the same time, shRNA-mediated knockdown of *pttg1* and *pttg-bp1* mRNAs led to a substantial increase (respectively in 2.52 and 1.89 times) of bone formation in these cells. We have also investigated the effect of *pttg1* and *pttg-bp1* genes overexpression and knockdown on activation of Wnt signaling pathway. It was shown that the ectopic co-expression of *pttg1* and *pttg-bp1* genes inhibit (in 2.5 times) activation of the Wnt signaling pathway in KS483 cells, which results in inhibition of bone matrix mineralization induced by bone morphogenetic proteins 2 and 7. The treatment of KS483 cells, with these proteins strongly intensified their late osteoblast differentiation and overexpression of shRNA constructs targeting mRNAs of *pttg1* and *pttg-bp1* genes or their combination further potentiated (respectively in 3, 1.5 and 2.5 times) osteoblast differentiation observed through nodules formation and matrix mineralization when compared with a control. Thus, PTTG1/PTTG-BP1 axis is an important repressor of osteogenesis, and it may be involved in skeletal tissue destruction caused by inflammatory processes.

Although there is no effective cure for the rheumatoid arthritis yet, a variety of treatments are available that can slow down the condition and keep joint damage to a minimum. Despite the numerous medications are available to control the signs and progression of rheumatoid arthritis, many patients' symptoms are not adequately

controlled with available therapies. We studied the anti-inflammatory activity of novel 4-thiazolidinone-based derivatives (Les-4368, Les-4370, Les-3882 and Les-3288) towards inflammatory processes induced by tumor necrosis factor α during osteoblast differentiation in mouse mesenchymal stem cells. On that way, we optionally focused at the 4-thiazolidinone compounds that possess a minimal cytotoxicity to prevent of any destructive side effects in the inflamed joint. We have tested which of our 4-thiazolidinone derivatives of interest will show the anti-inflammatory effects in 1 μM dose. In case of using Les-4368 and Les-3882 for treatment of C2C12 cells, they rescued the osteoblast differentiation due to negative control of tumor necrosis factor α. Moreover, these compounds converted their action from inhibition of osteoblast differentiation to its stimulation when compared with a control. Next, we have tested Les-4368 and Les-3882 that showed the anti-inflammatory properties in a wider range of concentrations (0.3 μM, 0.1 μM and 0.02 μM). We found that Les-4368 used on 0.02 μM concentration and Les-3882 at all three applied concentrations stimulate osteoblast differentiation comparing with a control. The best effect was found for Les-3882 that stimulated (in 1.56 times) osteoblast differentiation in 0.1 μM dose.

Possible modulation of the NF-κB activation by Les-3882 and Les-4368 might be a key mechanism mediating its anti-inflammatory effects. It is known that the I-κBα is a key component in the control of the NF-κB pathway activation. Therefore, we used the immunoblot assays with anti-IκBα antibodies for validation of our hypothesis based on the determination of the level of NF-κB signaling activation. We found that the pretreatment of C2C12 cells with Les-3882 and Les-4368 compounds with a subsequent stimulation with tumor necrosis factor α differently modulates the activation of the NF-κB signaling pathway. Les-3882 led to a lower level of the I-κBα protein after tumor necrosis factor α treatment, while Les-4368 increased the level of the I-κBα protein comparing with a control.

We conducted *in vitro* optimization of osteoinductive properties of recombinant bone morphogenetic proteins preparations to be used for inducing osteoblastic differentiation *in vitro*, as well as for bone tissue regeneration and creation of highly efficient regenerative bone matrices. We found that the most effective inducer of

osteoblast differentiation was recombinant bone morphogenetic proteins preparation produced upon co-transfection of 85 and 15 % of plasmids expressing bone morphogenetic protein 2 and bone morphogenetic protein 7, respectively. It is most likely due to generation of conditions most favorable for formation of bone morphogenetic proteins 2 and 7 heterodimers. Frozen bone morphogenetic proteins 2 and 7 preparations stored for 3 h in experimental setup and for several weeks in routine work do not lose their osteoinductive properties compared with freshly prepared preparations of bone morphogenetic proteins 2 and 7.

It was also established that extracts of biodegradable polyurethane matrices, unmodified (PUR) and modified with calcium glycerophosphate (PURs-M), were non-toxic and did not inhibit the early stages of osteoblastic differentiation of mouse mesenchymal stem cells. It makes them promising for clinical application in bone tissue regeneration.

Key words: Wnt signaling pathway, interleukin 6, pituitary tumor transforming gene 1, PTTG-binding protein 1, tumor necrosis factor α, small hairpin RNA, bone morphogenetic proteins, osteoblast differentiation, mouse mesenchymal stem cells.

Список публікацій здобувача:

За результатами дисертації опубліковано 14 наукових праць, у тому числі 5 статей у наукових фахових виданнях, які включені до міжнародних наукометричних баз, 2 статті у зарубіжних наукових виданнях, 7 тез доповідей на конференціях.

1. **Malysheva K.** ShRNA-mediated knockdown of interleukin 6 expression rescues tumor necrosis factor α - inhibited osteogenesis in mouse mesenchymal precursor cells / **K. Malysheva**, K. de Rooij, C. Löwik, D. Baeten, R. Stoika, O. Korchynskyi // Studia Biologica. – 2015. –V. 9. – P. 5-14.

2. Krupak V. The PTTG1 is a novel inhibitor of osteogenic differentiation of mouse mesenchymal stem cells / V. Krupak, **K. Malysheva**, O. Pavlenko, G. Shafranska, K. de Rooij, C. Löwik, R. Stoika, O. G. Korchynskyi // Animal Biology. – 2016. – V. 18, № 1. – P. 61-68.

3. **Malysheva K.** Interleukin 6/Wnt signaling interaction in rheumatoid arthritis: interleukin 6 inhibits Wnt signaling in synovial fibroblasts and osteoblasts / **K. Malysheva**, M. de Rooij, C. Lowik, D. Baeten, S. Rose-John, R. Stoika, O. Korchynskyi // Croatian Medical Journal. – 2016. – V. 57, № 2. – P. 89-98.

4. **Malysheva K.** Generation of optimized preparations of bone morphogenetic proteins for bone regeneration / **K. Malysheva**, I. Spasyuk, O. Pavlenko, R. Stoika, O. Korchynskyi // Ukrainian Biochemical Journal. – 2016. – V. 88, № 6. – P. 87-97.

5. **Malysheva K.** ShRNA-mediated knockdown of pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG1): optimization of the effect and targeting of early osteoblast differentiation in murine mesenchymal stem cells / **K. Malysheva**, O. Pavlenko, R. Stoika, O. Korchynskyi // Animal Biology. – 2017. – V. 19, № 2. – P. 70-78.

6. **Malysheva K.** 4-thiazolidinone–based derivatives rescue TNFα-inhibited osteoblast differentiation in mouse mesenchymal precursor cells / **K. Malysheva**, N. Finiuk, O. Pavlenko, D. Havrylyuk, R. Lesyk, R. Stoika, O. Korchynskyi // Ukrainian Biochemical Journal. – 2017. – V. 89 (Special Issue). – P. 112-123.

7. Kucinska-Lipka J. The influence of calcium glycerophosphate (GPCa) modifier on physicochemical, mechanical, and biological performance of polyurethanes applicable as biomaterials for bone tissue scaffolds fabrication / J. Kucinska-Lipka, I. Gubanska, O. Korchynskyi, **K. Malysheva**, M. Kostrzewa, D. Włodarczyk, J. Jakub Karczewski, H. Janik // Polymers. – 2017. – V. 9, № 8. – P. 329. Режим доступу до журн.: http://www.mdpi.com/2073-4360/9/8/329.

8. **Malysheva Kh.** Knockdown of IL-6 expression rescues TNFα-inhibited osteogenesis / **Kh. Malysheva**, K. de Rooij, C. W. G. M. Löwik, R. Stoika, O. Korchynskyi // Сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции «Наука и образование в XXI веке» (31 октября 2014 г., Тамбов). – Тамбов, 2014. – С. 9–11.

9. **Malysheva Kh.** Knockdown of IL-6 expresion rescues osteogenesis from inhibition by TNFα / **Kh. Malysheva**, R. Stoika, O. Korchynskyi // Матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених «Молоді вчені у

вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (5-6 грудня 2014 р., Львів). – Львів, 2014. – С. 198.

10. **Malysheva Kh.** ShRNA-mediated knockdown of IL-6 expression rescues TNFα-inhibited osteogenesis in mouse mesenchymal precursor cells / **Kh. Malysheva**, K. de Rooij, C. Löwik, D. Baeten, R. Stoika, O. Korchynskyi // International Conference on Advances in Cell Biology and Biotechnology (October 11-13, 2015, Lviv). – Lviv, 2015. – P. 84.

11. **Malysheva K.** Interleukin 6/Wnt signaling interaction in rheumatoid arthritis: interleukin 6 inhibits Wnt signaling in synovial fibroblasts and osteoblasts / **K. Malysheva**, K. de Rooij, C. W. Lowik, D. L. Baeten, S. Rose-John, R. Stoika, O. Korchynskyi // Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference in Prague. (April 7-10, 2016, Prague). – Prague, 2016. – P. 65.

12. **Malysheva K.** Dickkopf-1 and Interleukin 6 interaction as a potential mechanism of Wnt pathway inhibition in rheumatoid arthritis / **K. Malysheva**, K. de Rooij, C. W. Lowik, D. L. Baeten, S. Rose-John, R. Stoika, O. Korchynskyi // The 41st FEBS Congres «Molecular and systems biology for a better life» (September 3-8, 2016, Kusadasi). – Kusadasi, 2016. – V. 283, № 1. – P. 25-26.

13. **Malysheva K.** 4-thiazolidinone–based derivatives rescue TNFα-inhibited osteogenesis in mouse mesenchymal precursor cells / **K. Malysheva**, N. Finiuk, O. Pavlenko, D. Havrylyuk, R. Lesyk, R. Stoika, O. Korchynskyi // 7th TriNet Meeting - RECOOP Annual Project Review Meeting Hotel Gellert (October 6-9, 2016, Budapest). – Budapest, 2016. – P. 85.

14. **Malysheva K.** 4-thiazolidinone–based derivatives rescue TNFα-inhibited osteoblast differentiation in mouse mesenchymal precursor cells / **K. Malysheva**, N. Finiuk, O. Pavlenko, D. Havrylyuk, R. Lesyk, R. Stoika, O. Korchynskyi // RECOOP 12th Bridges in Life Sciences Annual Conference (April 7-8, 2017, Budapest). – Budapest, 2017. – P. 21.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ **2**

SUMMARY **7**

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА **11**

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ **17**

ВСТУП **19**

РОЗДІЛ 1 **25**

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ **25**

1.1 Ревматоїдний артрит: загальна характеристика 25

1.2 Роль цитокінів у патогенезі ревматоїдного артриту 26

1.2.1 Фактор некрозу пухлин α та інтерлейкін 1β 27

1.2.2 Інтерлейкін 6 28

1.2.3 Сигнальні каскади інтерлейкіну 6 29

1.3 Ерозія кісткової тканини при ревматоїдному артриті 32

1.4 Скелетогенні сигнальні шляхи 36

1.4.1 Морфогенетичні протеїни кістки: загальна характеристика і функції 36

1.4.1.1 Сигнальні каскади морфогенетичних протеїнів кістки та їх регуляція 38

1.4.2 Протеїни Wnt: загальна характеристика і функції 41

1.4.2.1 Wnt/β-катенін-залежний сигнальний шлях та його регуляція 42

1.4.2.2 Роль канонічного сигнального шляху Wnt у регуляції метаболізму кісткової тканини 45

1.5 Сигнальний шлях NF-κB та його роль у розвитку ревматоїдного артриту 47

1.6 Ген пухлинної трансформації клітин гіпофізу 1 та його роль у розвитку ревматоїдного артриту 49

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ **53**

2.1 Загальна схема досліджень 53

2.2 Матеріали 56

2.3 Біохімічні методи 60

2.3.1 Аналіз репортерного гена люциферази 60

15
2.3.2 Визначення активності β-галактозидази 62
2.3.3 Визначення активності лужної фосфатази 62
2.3.4 Вестерн-блот аналіз протеїнів клітин 63
2.3.5 Аналіз цитотоксичності нових похідних 4-тіазолідинону і поліуретанових матеріалів 64
2.4 Молекулярно-біологічні методи 64
2.4.1 Тимчасова трансфекція клітин ліній C2C12 і KS483 64
2.4.2 Стабільна трансфекція клітин ліній C2C12 і KS483 65
2.4.3 Трансфекція клітин лінії HEK293 65
2.4.4 Створення рекомбінантних аденовірусних векторів 66
2.4.5 Створення оптимізованих варіантів векторів для експресії генів протеїнів МПК2 і МПК7 66
2.5 Індукція остеобластної диференціації клітин ліній C2C12 і KS483 66
2.6 Приготування екстрактів поліуретанових кістковопластичних матеріалів 67
2.8 Умови культивування клітин 68
2.9 Гістохімічне забарвлення ділянок мінералізації алізариновим червоним S 69
2.10 Статистичні методи 69
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ 71
3.1 Створення оптимізованих препаратів рекомбінантних МПК 71
3.1.1 Дослідження біосумісності та остеоіндуктивних властивостей біодеградабельних кістково-пластичних матеріалів на поліуретановій основі 78
3.2 Дослідження функціонального вкладу взаємодії ІЛ-6 і ФНП-α в інгібування остеобластної диференціації МСК миші 83
3.3 Дослідження ролі генів *pttg1* і *pttg-bp1* в регуляції остеобластної диференціації МСК миші 92
3.4 Дослідження ефектів похідних 4-тіазолідинону щодо опосередкованого ФНП-α інгібування МПК-індукованої остеобластної диференціації МСК миші 101

РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ **109**

ВИСНОВКИ **126**

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ **129**

ДОДАТОК А **149**

ДОДАТОК Б **153**

ДОДАТОК В **154**

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ІЛ-6 – інтерлейкін 6

ІЛ-6Р – рецептор інтерлейкіну 6

ІЛ-1β – інтерлейкін 1β

кДНК – комплементарна ДНК

КС – кондиціоноване середовище

ЛФ – лужна фосфатаза

МПК – морфогенетичні протеїни кістки

мРНК – матрична РНК

МСК – мезенхімні стовбурові клітини

мшРНК – мала шпилькова РНК

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

РА – ревматоїдний артрит

РНК – рибонуклеїнова кислота

ТФР-β – трансформуючий фактор росту β

ФНП-α – фактор некрозу пухлин α

DMEM – середовище Ігла в модифікації Дульбекко

DKK-1 – Dickkopf-споріднений протеїн 1

FBS (FCS) – фетальна бичача (теляча) сироватка

FLS – фібробластоподібні синовіоцити

Hyper-IL-6 – гібридний протеїн, що складається з інтерлейкіну 6 і розчинної форми його рецептора

I-κBα – протеїн-інгібітор κBα

MOI – показник множинності інфекції

MTT – 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід

NF-κB – ядерний фактор κB

π-NPP – π-нітрофенілфосфат

OD – оптична густина

OPG – остеопротогерин

PBS – натрій-фосфатний буфер

PTTG-BP1 – PTTG-зв’язувальний фактор 1

PTTG1 – секурин, продукт гена пухлинної трансформації клітин гіпофізу 1

PEI – поліетиленімін

PURs – кістково-пластичний матеріал на поліуретановій основі

PURs-M – модифікований варіант поліуретанового кістково-пластичного матеріалу з включеннями β-гліцерофосфату кальцію

RANK – рецептор активатора ядерного фактора κB

RANKL – ліганд рецептора активатора ядерного фактора κB

ВСТУП

Актуальність теми. Ревматоїдний артрит – це автоімунне системне захворювання сполучної тканини з переважаючим ураженням суглобів за типом хронічного прогресуючого ерозивно-деструктивного поліартриту. Зважаючи на значне поширення захворювання, яке в різних країнах світу становить від 0,4 до 1,8 %, ревматоїдний артрит має непересічне медико-соціальне значення, оскільки за відсутності ефективного лікування призводить до швидкого розвитку інвалідності та скорочення тривалості життя пацієнтів [1, 6, 37, 66, 79, 143]. В Україні, за останніми даними відділу медичної статистики МОЗ, поширеність ревматоїдного артриту становить 115 тис. хворих (серед яких понад 49 тис. – це особи працездатного віку), а рівень смертності від цього захворювання зріс на 14,3 %, починаючи з 1990 року.

У патофізіології захворювання тісно переплітаються імунологічні та біохімічні порушення, які найбільш чітко виражені в синовіальній оболонці, синовіальній рідині та хрящі суглобів. При ревматоїдному артриті у суглобах відбувається неконтрольоване розростання шару фібробластоподібних клітин (синовіоцитів), що утворюють так званий паннус [6, 143]. Хронічний запальний процес у суглобі призводить до його набряку та накопичення в ньому запальних клітин, зокрема В- та Т-лімфоцитів, макрофагів і дендритних клітин. Активовані синовіоцити продукують великий надлишок синовіальної рідини з високим вмістом різних прозапальних цитокінів, серед яких ключову роль відіграють інтерлейкін 1β, фактор некрозу пухлин α та інтерлейкін 6 [37, 94, 144]. У свою чергу високий вміст прозапальних цитокінів призводить до потужної активації їх сигнальних шляхів. У результаті відбувається незворотне руйнування хрящової тканини та прилягаючої до неї кістки (утворення ерозій кістки), що є найбільш болісним із ускладнень захворювання [143, 179].

Етіологія ревматоїдного артриту, а також молекулярні механізми, які запускають автоімунні процеси і опосередковують його перебіг, залишаються маловідомими [37, 162, 186, 187].

Відомо, що активація сигнальних шляхів морфогенетичних протеїнів кістки і Wnt-протеїнів є ключовими механізмами, що індукують і підтримують формування скелетних тканин [15, 32, 123]. Молекулярно-біологічні та генетичні дослідження показали важливість сигнального шляху Wnt у регуляції метаболізму кісткової тканини. Даний сигнальний шлях стимулює процеси кісткоутворення шляхом регуляції остеобластної і остеокластної проліферації та диференціації [67, 93, 96, 149]. У здоровому організмі процеси резорбції та утворення кісткової тканини є тонко збалансовані. Однак, під час запального артриту баланс цих процесів порушується, зокрема як за рахунок опосередкованого фактором некрозу пухлин α утворення блокаторів сигнального шляху Wnt і остеобластогенезу, так і завдяки зростанню експресії гена протеїну RANKL (receptor activator of NF-κB ligand) – ключового фактора активації та диференціації остеокластів [44].

Згідно даних літератури, рівень експресії гена *pttg-bp1* (*pbf1*: PTTG binding factor 1), який кодує структуру протеїну, необхідний для зв'язування і транслокації в ядро секурину – протеїнового продукту гена пухлинної трансформації клітин гіпофізу 1 (*pttg1*), зменшується з часом перебігу ревматоїдного артриту порівняно з початковими стадіями захворювання [125]. Водночас, *pttg-bp1* є геном-мішенню протеїну RUNX2 – ключового транскрипційного фактора, який опосередковує остеобластну диференціацію [190].

Дисертаційна робота націлена на дослідження процесів, які можуть бути задіяними в деградації скелетних тканин при ревматоїдному артриті. Розуміння механізмів цих процесів відкривають перспективи для розвитку нових парадигм і терапевтичних стратегій щодо лікування цього та інших споріднених захворювань.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження, що увійшли в дисертаційну роботу, є частиною науково-дослідної роботи відділу регуляції проліферації клітин і апоптозу Інституту біології клітини НАН України за темою «Механізми дії *in vitro* та *in vivo* нових сполук із проапоптичною активністю, шляхи підвищення ефективності їх

антинеопластичної дії та обґрунтування нових підходів у діагностиці та оцінці розвитку автоімунних і гематоонкологічних захворювань» (№ держреєстрації: 0112U002174, 2012-2016 рр.) і науково-дослідної роботи лабораторії імунології Інституту біології тварин НААН за темою «Вивчити біохімічні механізми формування та регуляції клітинного компартменту і гуморального імунітету у тварин за норми і патології» (№ держреєстрації: 0116U001415, 2016-2020 рр.). Частину досліджень проводили в рамках індивідуального гранту від Західно-Українського Біомедичного Центру (2014-2015 рр.) і проекту «Створення новітніх біоактивних кістковопластичних матеріалів, що містять морфогенетичні протеїни кістки для індукції остеогенезу» (№ держреєстрації: 0115U001972, 2015-2019 рр.), який фінансується цільовою комплексною міждисциплінарною програмою наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства».

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було з'ясувати негативний регуляторний вплив генів інтерлейкіну 6 (ІЛ-6), секурину (*pttg1*) та секурин-зв'язувального протеїну (*pttg-bp1*) на диференціацію мезенхімних стовбурових клітин, а також його вклад у розвиток і прогресування ревматоїдного артриту.

Для досягнення та реалізації мети були поставлені наступні завдання:

1. Оптимізувати *in vitro* остеоіндуктивні властивості препаратів рекомбінантних морфогенетичних протеїнів кістки.
2. За допомогою блокування експресії мРНК гена ІЛ-6, використовуючи малі шпилькові РНК, оцінити функціональний вклад взаємодії інтерлейкіну 6 і фактора некрозу пухлин α в інгібування активації сигнального шляху Wnt.
3. Дослідити роль інтерлейкіну 6 і продукту гена *pttg1* в регуляції остеобластної диференціації, індукованої морфогенетичними протеїнами кістки, шляхом тимчасового пригнічення експресії мРНК генів ІЛ-6, *pttg1* та *pttg-bp1* з допомогою малих шпилькових РНК.
4. Дослідити роль гена *pttg1* в регуляції остеобластної диференціації мезенхімних стовбурових клітин шляхом тимчасової надекспресії генів *pttg1* та *pttg-bp1*.

5. Проаналізувати ефекти *in vitro* похідних 4-тіазолідинону щодо опосередкованого фактором некрозу пухлин α інгібування остеобластної диференціації мезенхімних стовбурових клітин, індукованої морфогенетичними протеїнами кістки.

Об'єктом дослідження є остеобластна диференціація мезенхімних стовбурових клітин миші ліній C2C12 і KS483.

Предметом дослідження є регуляція остеобластної диференціації мезенхімних стовбурових клітин миші ліній C2C12 та KS483 генами ІЛ-6, *pttg1* та *pttg-bp1* за умови впливу прозапального цитокіну – фактора некрозу пухлин α.

Методи дослідження. У роботі використовували біохімічні (вимірювання активності лужної фосфатази, люциферази і β-галактозидази, Вестерн-блот аналіз клітинних протеїнів з використанням антитіл до відповідних регуляторних протеїнів), молекулярно-біологічні (використання люциферазних репортерів, технології малих шпилькових РНК, молекулярного клонування, тимчасової трансфекції клітин плазмідними конструкціями та стабільно вбудованих в клітинний геном лентивірусів із заданими генами) методи, а також методи культивування клітин *in vitro*, цитохімічного забарвлення клітин, що диференціюються і статистичного опрацювання результатів досліджень.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше показано, що інтерлейкін 6 разом з фактором некрозу пухлин α і протеїном DKK-1 виявляє кооперативний інгібувальний ефект щодо остеогенного сигнального шляху Wnt. З'ясовано, що пригнічення експресії гена ІЛ-6 з допомогою малих шпилькових РНК підсилює ранні і пізні стадії остеобластної диференціації мезенхімних стовбурових клітин. Виявлено, що ектопічна експресія гена *pttg-bp1* інгібує ранні і пізні стадії остеобластної диференціації мезенхімних стовбурових клітин, тоді як нокдаун експресії мРНК генів *pttg1* і *pttg-bp1*, опосередкований мшРНК, чи їх поєднання підсилює остеогенну диференціацію цих клітин. Показано здатність нових похідних 4-тіазолідинону усувати негативний вплив фактора некрозу пухлин α на остеобластну диференціацію мезенхімних стовбурових клітин, а також підсилювати її.

Практичне значення отриманих результатів. Результати досліджень щодо отримання препаратів рекомбінантних кісткових морфогенетичних протеїнів 2 і 7 та оптимізації їх остеоіндуктивних властивостей можна успішно використовувати для стимуляції індукції остеобластної диференціації *in vitro,* регенерації кісткової тканини, а також для створення високоефективних регенеративних кісткових матриксів. Одержані результати й теоретичні узагальнення, зокрема щодо ролі прозапальних цитокінів (інтерлейкіну 6, фактора некрозу пухлин α, а також секурину) у підтриманні гомеостазу кісткової тканини та їх вплив на диференціацію мезенхімних стовбурових клітин, використовуються у спеціалізованих курсах для студентів Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, а також кафедри біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

Особистий внесок здобувача. Дисертанткою спільно із науковим керівником, член-кореспондентом НАН України Стойкою Р. С. і канд.біол.наук Корчинським О. Г. розроблено план проведення досліджень, підібрано оптимальні методичні підходи для реалізації поставлених завдань, проведено обговорення одержаних результатів, складено план статей за темою роботи, підібрано літературу й обговорено кінцевий текст наукових публікацій. Експериментальну частину дисертаційної роботи здобувачем виконано самостійно, сформульовано основні висновки, проведено статистичний аналіз результатів досліджень. Аналіз активності люциферази здійснювали на базі лабораторії Центру інноваційних досліджень в галузі медицини та природничих наук і Медичного факультету (Жешувський університет, Польща) у співпраці з канд.біол.наук Корчинським О. Г., якому автор висловлює щиру подяку за допомогу у цій роботі. Мультиклональні культури клітин ліній C2C12 і KS483 зі стабільною експресію генів малих шпилькових РНК, які специфічно інактивують гени ІЛ-6 і *pttg1* отримані канд.біол.наук Корчинським О. Г. в Лайденському університеті (Нідерланди) на умовах співпраці. Похідні 4-тіазолідинону були синтезовані під керівництвом д-ра.фарм.наук, професора Лесика Р. Б. на кафедрі фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного

медичного університету імені Данила Галицького, та надані для роботи в рамках науково-технічної співпраці. Біодеградуючі кістковопластичні матеріали на поліуретановій основі було надано для роботи в рамках науково-технічної співпраці з Державним університетом «Гданська Політехніка» (Польща). Автор також щиро вдячний усім співавторам публікацій за темою дисертації.

Апробація матеріалів дисертації. Результати досліджень, отримані в рамках виконання дисертаційної роботи, представлені у вигляді тез, усних і стендових доповідей на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях: на XIII Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (Львів, 2014 р.), на Міжнародній конференції «Advances in cell biology and biotechnology» (Львів, 2015 р.), на 41-му міжнародному конгресі FEBS «Molecular and systems biology for a better life» (Кушадаси, Туреччина, 2016 р.), на 7-ій щорічній науковій зустрічі TriNet «RECOOP Annual Project Review Meeting» (Будапешт, Угорщина, 2016 р.), 11-ій та 12-ій Міжнародних наукових зустрічах «The Bridges in Life Sciences» (Прага, Чеська республіка, 2016 р.; Будапешт, Угорщина, 2017 р.).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 14 наукових праць, у тому числі 5 статей у наукових фахових виданнях, які включені до міжнародних наукометричних баз, 2 статті у зарубіжних наукових виданнях, 7 тез доповідей на конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 152 сторінках комп'ютерного тексту, з яких 110 займає основна частина, і сформована зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу і узагальнення одержаних результатів, висновків, списку використаних джерел, який налічує 221 найменування, із них 215 латиницею, та додатків. Робота містить 2 таблиці і 32 рисунки, які займають 23 сторінки.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Ревматоїдний артрит: загальна характеристика

Ревматоїдний артрит (РА) – це автоімунне системне захворювання сполучної тканини із переважаючим ураженням суглобів за типом хронічного прогресуючого ерозивно-деструктивного поліартриту. Зважаючи на значне поширення РА, яке у різних країнах світу становить від 0,4 до 1,8 %, це захворювання має непересічне медико-соціальне значення, оскільки за відсутності ефективного лікування РА призводить до швидкого розвитку інвалідності та скорочення тривалості життя пацієнтів. [1, 6, 37, 66, 79, 143]. В Україні, за останніми даними відділу медичної статистики МОЗ, поширеність РА становить 115 тис. хворих, серед яких близько 54 тис. є особами працездатного віку і перебувають під диспансерним наглядом. Щорічний рівень смертності на 100 тис. людей від РА зріс на 14,3 %, починаючи з 1990 року.

Етіологія РА, а також молекулярні механізми, які лежать в основі виникнення автоімунних процесів залишаються невідомими. У патофізіології цього захворювання тісно переплітаються імунологічні та біохімічні порушення, які найбільш чітко виражені у синовіальній оболонці, синовіальній рідині та суглобному хрящі. В основі патогенезу РА лежить хронічний запальний процес у синовіальній оболонці суглобів (синовіт), що характеризується аномальним неконтрольованим розростанням шару фібробластоподібних клітин (синовіоцитів) з утворенням грануляційної тканини (ревматоїдного пануса) [6, 143, 187].

Заміщення нормальних структур суглоба новоутвореною сполучнотканинною структурою призводить до незворотного руйнування хрящової і кісткової тканин, і, відповідно, деформації суглобів та порушення їх функцій [69, 98, 179].

Хронічний запальний процес у суглобі призводить до його набряку та накопичення запальних клітин, зокрема В- та Т-лімфоцитів, макрофагів і дендритних клітин. Гіперактивовані синовіоцити продукують значний надлишок синовіальної рідини з високим вмістом різних прозапальних цитокінів, зокрема інтерлейкіну 1β (ІЛ-1β), фактора некрозу пухлин α (ФНП-α), інтерлейкіну 6 (ІЛ-6) і різних хемокінів. У свою чергу високий вміст прозапальних цитокінів призводить до потужної активації їх сигнальних шляхів [37, 94, 144].

1.2 Роль цитокінів у патогенезі ревматоїдного артриту

Цитокіни – це різнорідна група протеїнів, яка включає монокіни, лімфокіни, інтерлейкіни, інтерферони, колоніестимулюючі фактори і хемокіни. Це низькомолекулярні регуляторні розчинні молекули, які синтезуються різними типами клітин організму (переважно клітинами імунної системи) і забезпечують передачу сигналів між ними. Утворення і секреція цитокінів відбувається короткочасно і чітко регулюється. Один і той самий цитокін може виявляти свою дію на різні клітини-мішені. Деякі з них можуть підсилювати дію інших цитокінів, або ж, навпаки, послаблювати її. Біологічний ефект цитокінів на клітини реалізується через взаємодію із специфічними рецепторами, що локалізовані на поверхні клітини-мішені і, як правило, утворюють рецепторні комплекси [26, 47, 219]. Залежно від природи та рівня експресії генів рецепторів, цитокіни можуть виявляти плейотропну дію [26, 159, 219].

При РА виникає дисбаланс у продукції цитокінів та функціонуванні їх системи, що призводить до виникнення запалення і, як результат, до пошкодження суглобових тканин. Водночас, неконтрольоване утворення прозапальних цитокінів вносить свій вклад у розвиток автоімунних процесів та ще більш загострює їх. Під час прогресування захворювання, цитокіновий профіль в синовіальній рідині зазнає змін, механізм яких залишається нез’ясованим. Одночасно, очевидним є взаємозв’язок між прогресуванням РА і

надлишковою продукцією хемокінів та інших цитокінів, які виявляють у крові та тканинах пацієнтів [24, 39, 145, 189]. Множинними клінічними та дослідженнями *in vivo* показано, що ключову роль у патогенезі РА відіграють такі прозапальні цитокіни як ФНП-α, ІЛ-1β і ІЛ-6 [30, 97, 167, 208].

1.2.1 Фактор некрозу пухлин α та інтерлейкін 1β

ФНП-α є одним із найважливіших цитокінів у каскаді, що регулює продукцію інших прозапальних цитокінів синовіальною тканиною при РА [24, 140, 144]. Здебільшого, цей цитокін синтезується активованими макрофагами, але ген, який кодує ФНП-α, також експресується і нейтрофілами, природніми кілерами, ендотеліальними клітинами та активованими лімфоцитами. ФНП-α реалізує свої біологічні ефекти через зв'язування з двома специфічними рецепторами: TNFR1 (p55), виявленим у всіх типів клітин, і TNFR2 (p75) – менш поширеним і знайденим у найбільшій кількості на поверхні Treg-лімфоцитів [24, 161, 203]. Розчинна форма рецептора sTNFR (soluble TNF receptor), так само як і ФНП-α, у найбільшій кількості виявлена у синовіальній рідині хворих на РА [148]. ФНП-α індукує активацію синовіальних фібробластів і, як наслідок, продукцію фактора росту сполучної тканини (connective tissue growth factor, CTGF), що стимулює аберантну активацію остеокластів і порушує гомеостаз хрящової тканини, що в кінцевому результаті призводить до руйнування суглоба [24, 200]. Експерименти з використанням культури синовіоцитів *in vitro* показали, що нейтралізація ФНП-α призводить до зниження вироблення таких прозапальних цитокінів, як ІЛ-1β, ІЛ-6, а також гранулоцито-макрофаго-колонієстимулюючого фактору (granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) [24, 153].

ФНП-α опосередковує такі прояви РА, як: ураження суглобів і резорбцію кісткової тканини через активацію остеокластів і хондроцитів; утворення пануса через активацію ендотеліальних клітин і вироблення ними хемокінів; біль і лихоманку через індукцію синтезу простагландину Е2 і сенсибілізації больових рецепторів. ФНП-α індукує утворення інших прозапальних цитокінів, таких як ІЛ-

1β, ІЛ-6 та ІЛ-8 [22, 24]. Сьогодні, у терапії РА використовують п’ять препаратів з анти-ФНП-α активністю: інфліксімаб (Бельгія), адалімумаб (США), голімумаб (США), етанерцепт (США) і сертолізумаб (США) [24].

Деякі прозапальні ефекти є спільними для ФНП-α та ІЛ-1β. Обидва цитокіни активують Т-клітини та індукують синтез інших прозапальних цитокінів [22, 24, 187]. ІЛ-1β синтезується різними типами клітин імунної системи, а при синовіті основним джерелом даного інтерлейкіну є моноцити і макрофаги [200]. ІЛ-1β, у порівнянні з ФНП-α, значно більшою мірою стимулює руйнування хрящової тканини [36]. Відомі два рецептори до ІЛ-1β: IL-1RI – через який відбувається передача сигналу і IL-1RII, що не задіяний у трансдукції сигналу, а функціонує як рецептор-«пастка». Дія ІЛ-1β регулюється антагоністом рецептора IL-1RI (IL-1Rα) [31]. При РА в синовіальній оболонці виявлений дисбаланс між IL-1β та IL-1Rα [24, 36, 200].

Сьогодні існує один дозволений препарат, який блокує дію ІЛ-1β – анакінра (Швеція). Однак, згідно з кількома спостереженнями даний засіб демонструє дуже незначний успіх при лікуванні РА у порівнянні з препаратами, які блокують дію ФНП-α [24, 185].

1.2.2 Інтерлейкін 6

ІЛ-6 – це цитокін з плейотропною дією, який відіграє важливу роль у патофізіології РА. Він виявлений у великій кількості у синовіальній рідині та сироватці хворих на РА, і його рівень корелює з активністю перебігу захворювання та інтенсивністю руйнування суглобів. У суглобі основним джерелом ІЛ-6 є синовіальні фібробласти, а додаткові кількості цитокіну вивільняються активованими макрофагами і лімфоцитами. ІЛ-6 сприяє розвитку синовіту і руйнуванню суглобів через стимуляцію міграції нейтрофілів, дозрівання остеокластів і проліферацію пануса. ІЛ-6 опосередковує багато системних проявів РА, включно з ерозією суглобів, яка є наслідком впливу ІЛ-6 на диференціацію остеокластів і остеобластів. Цей цитокін відіграє роль

позитивного регулятора диференціації остеокластів через індукцію експресії остеобластами гену, який кодує ліганд рецептора-активатора ядерного фактору κB (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL) [90, 188, 215].

Показано, що ІЛ-6 сприяє індукції і підтриманню автоімунних процесів. У мишей з нокаутом гену ІЛ-6 виявлено порушення реакції на різні віруси, а у ході запальних реакцій – і на пошкодження тканин, чи інші інфекції, що демонструє критично важливу роль ІЛ-6 *in vivo* [113, 188].

Даний цитокін виявляє неоднозначні біологічні ефекти, оскільки ІЛ-6, відомий як прозапальна молекула, за деяких обставин може виявляти протизапальні ефекти. ІЛ-6 індукує експресію ендотеліальними клітинами генів різних хемокінів, активує Т- і В-лімфоцити. Водночас, ІЛ-6 стимулює вироблення протизапального IL-1Rα і пригнічує дію прозапальних цитокінів таких як ФНП-α, ІЛ-1β та ІЛ-12 [24, 177, 200]. Таким чином, блокування ІЛ-6 є бажаним терапевтичним методом при лікуванні РА [90].

Сьогодні, у терапії цього захворювання використовують один препарат, тоцілізумаб (США), який блокує дію ІЛ-6 через специфічне зв'язування із його рецепторами (розчинною і мембранозв'язаною формами). На даний час, проходять клінічні випробування ще два препарати – сірукумаб (США) і сарілумаб (США, Франція) [24, 201].

1.2.3 Сигнальні каскади інтерлейкіну 6

ІЛ-6 передає свої сигнали через унікальну систему рецепторів, взаємодіючи з розташованим на поверхні клітини рецепторним комплексом типу I, який складається з ліганд-зв'язуючого глікопротеїну – IL-6Rα та сигнал-трансдукуючого компонента – глікопротеїну (gp) 130 [11].

Відомо два типи рецепторів для ІЛ-6 –мембранний рецептор (IL-6R), який характеризується низькою афінністю і утворює комплекс з gp130 при зв'язуванні з лігандом, та розчинний рецептор (sIL-6R), який спершу зв'язується з ІЛ-6, а потім з β-ланцюгом мембранного рецептора – gp130, що призводить до активації

внутрішньоклітинного сигналу. За нормальних умов ген, який кодує IL-6R, експресується лише деякими типами клітин, тоді як gp130 зустрічається у багатьох типах тканин [11].

Трансдукція сигналу ІЛ-6 включає активацію тирозинових кіназ, представників родини Янус-кіназ (Janus kinase, JAK), що у свою чергу призводить до фосфорилювання залишків тирозину і активації протеїну STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3). Після фосфорилювання, STAT3 утворює димер, який транслокується до ядра [83, 99].

Сигнальний шлях ІЛ-6-JAK-STAT3 регулює експресію кількох генів, продукти яких задіяні в індукції росту клітин, їх диференціації і виживанні. Інгібування і модуляція цього сигнального шляху опосередковується протеїнами SOCS (suppressor of cytokine signaling) і PIAS (protein inhibitor of activated STAT), які, за фізіологічних умов, активуються в клітинах протеїнами STAT3 [11, 83, 99,150].

У відповідь на дію ІЛ-6 також активується протеїн Ras, що призводить до гіперфосфорилювання протеїнів MAPK (mitogen activated protein kinases) і до зростання їх серин-треонінової кіназної активності. MAPK активує транскрипційні фактори (transcription factors, TF), які опосередковують різноманітні ефекти залежно від типу клітини, включаючи стимуляцію клітинного росту, синтез протеїнів гострої фази та імуноглобулінів [150].

Оскільки JAK-кіназа також фосфорилює і активує фософінозитол-3-кіназу (phosphoinositol-3 kinase, PI3K), то третім сигнальним шляхом, що активується ІЛ-6 є сигнальний каскад PI3K/Akt, центральними компонентами якого є PI3K і серин/треонінова кіназа B/Akt (serine/threonine kinase PKB). Як показано на рис. 1.1, PI3K послідовно фосфорилює фофсфотадилінозитол-4,5-біфосфат (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP2) з утворенням фофсфатидилінозитол-3,4,5-трифосфату (phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, PIP3). PIP3 у свою чергу активує PKB/Akt [89].

Активована PKB/Akt фосфорилює ряд субстратів необхідних для індукції деяких життєвоважливих сигнальних шляхів. Показано, що PKB/Akt регулює

активність транскрипційних факторів родини ядерного фактора κB (nuclear factor κB, NF-κB) через індукцію фосфорилювання і подальшої деградації інгібіторів κB (I-κBs) (рис. 1.1) [11, 14].

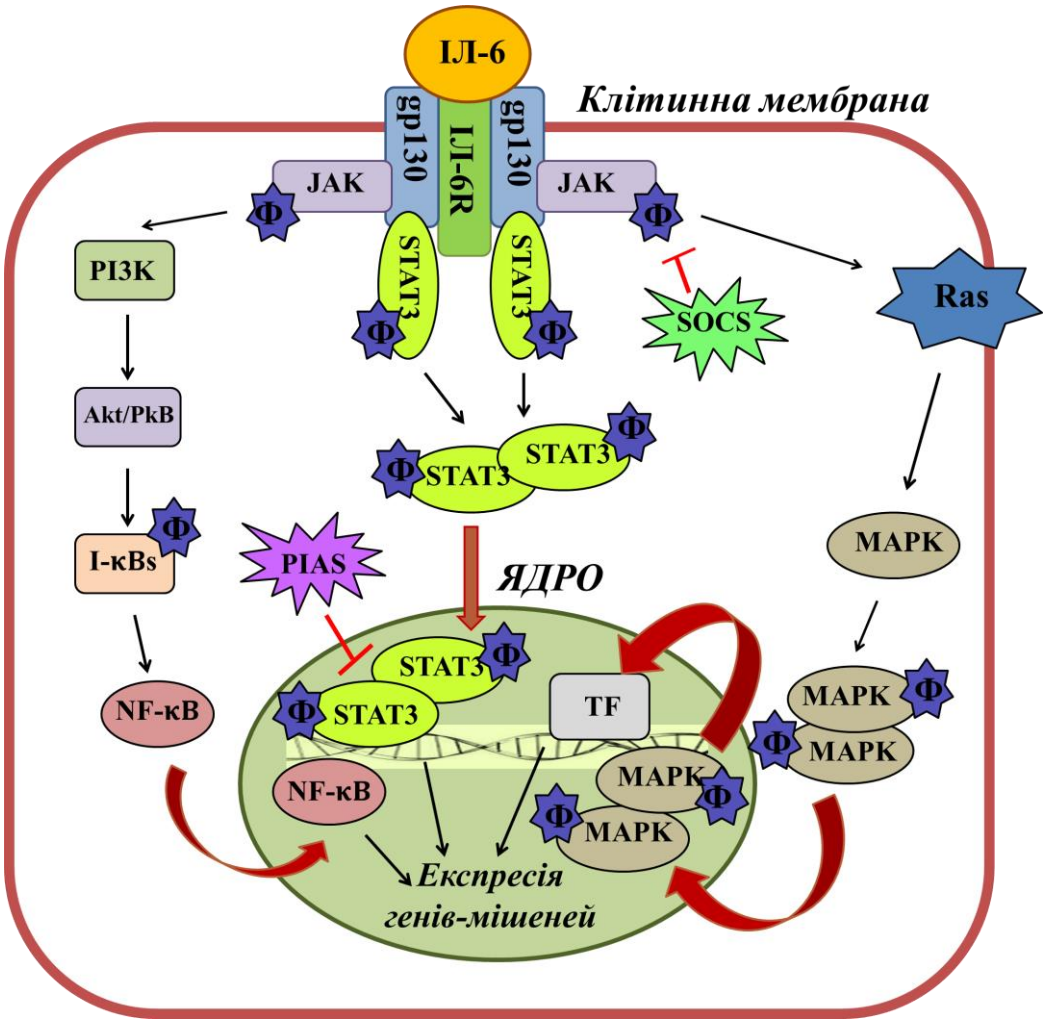


Рис. 1.1. Загальна схема сигнальних каскадів, індукованих ІЛ-6 [11, 83, 89, 150].

Примітка. Ініціація сигнальних каскадів ІЛ-6 відбувається через взаємодію останнього з рецепторним комплексом, який складається з ліганд-зв'язуючого (IL-6Rα) та сигнал-трансдукуючого компонентів (gp130). Передача сигналу здійснюється через активацію протеїнів JAK-STAT3, або PI3K/Akt чи MAPK, які регулюють експресію генів, продукти яких задіяні в індукції різноманітних клітинних процесів. Сигнальні шляхи ІЛ-6 модулюються низкою регуляторних молекул, серед яких протеїни PIAS і SOCS.

У 1997 році доктор M. Fisher з колегами розробили стабільну і високобіоактивну конструкцію цитокіну, що являє собою гібридний протеїн, який складається з ІЛ-6 та розчинної форми його рецептора (sIL-6R). Такий гібрид, який отримав назву Hyper-IL-6 або H-IL-6, використовували для експансії людських гемопоетичних клітин-попередників. Hyper-IL-6 ефективний у тих випадках, коли клітини не відповідають на дію лише ІЛ-6, а потребують наявності його комплексу з рецептором sIL-6R. Hyper-IL-6 повністю активний в клітинах, які експресують ген, що кодує сигнал-трансдукуючий компонент рецепторного комплексу – gp130, але не його ліганд-зв'язуючу частину. Концентрація Hyper-IL-6, при якій у клітин виявляється біологічна відповідь на його дію, в 100-1000 разів нижча у порівнянні з незв'язаною формою ІЛ-6 і його рецептора [63].

1.3 Ерозія кісткової тканини при ревматоїдному артриті

Кістковий гомеостаз є необхідним для підтримки відповідної кісткової маси організму і здійснюється за рахунок балансу формування та резорбції кісткової тканини. За фізіологічних умов, ремоделювання кісткової тканини – це безперервні, спряжені у часі процеси локальної резорбції (як правило, в місцях мікротріщин) і формування кістки. Ремоделювання кісткової тканини полягає у підтримці балансу між процесами кісткоутворення, які опосередковуються остеобластами та резорбцією кісткової тканини, що регулюється остеокластами і забезпечує таким чином гомеостаз [31, 77, 179].

Характерною ознакою РА є прогресуюче руйнування суглобів та втрата кісткової тканини. При патологічних станах, таких як РА, гомеостаз кісткової тканини порушується через пошкодження координації роботи остеокластів і остеобластів – ключових клітин, які задіяні в резорбції та утворенні кісткової тканини, відповідно [95, 97, 175, 179].

Остеокласти – це спеціалізовані багатоядерні клітини, які походять з клітин-попередників, що належать до моноцитарно-макрофагальної лінії. Після

приєднання до протеїнів кісткового матриксу, остеокласти секретують протеїнази, а також локально закислюють середовище, що необхідно для резорбції кісткової тканини. За фізіологічних умов, втрата кісткової маси, опосередкована остеокластами, є чітко скоординованою та збалансованою із формуванням кісткової тканини, опосередкованим остеобластами [23, 73, 97, 98].

Взаємодія між рецептором активатора ядерного фактору κB (receptor activator of the nuclear factor κB, RANK) та його лігандом (RANKL) є критично важливою для остеокластогенезу. Ініціація остеокластної диференціації відбувається при зв'язуванні RANK з RANKL на поверхні клітин-попередників. При зв'язуванні RANKL з остеопротогерином (osteoprotegerin, OPG), який являє собою розчинний рецептор-«приманку» для RANKL, відбувається інгібування про-остеокластогенної активності останнього. За фізіологічних умов, остеобласти є основним джерелом RANKL. Однак, за патологічних станів, таких як РА, ген, який кодує RANKL також експресується клітинами імунної системи і фібробластоподібними синовіоцитами (fibroblast-like synoviocytes, FLS) уражених суглобів [81, 97, 98].

Окрім RANKL, важливу роль в остеокластогенезі відіграє колонієстимулюючий фактор макрофагів (macrophage-colony stimulating factor, M-CSF), який необхідний для підтримки пулу клітин-попередників остеокластів [98, 197].

Система RANKL/RANK/OPG відіграє центральну роль у регуляції остеокластогенезу при РА. Різні прозапальні цитокіни задіяні в регуляції цієї системи, яка також може впливати на здатність остеобластів відновлювати кісткову тканину у місцях суглобових ерозій [98].

При РА, руйнування кісткової і хрящової тканин уражених суглобів відбувається шляхом розростання синовіальної мембрани з утворенням так званого пануса. У панусній структурі накопичується велика кількість різних типів клітин, в першу чергу імунних, зокрема В-, Т-клітин, макрофагів, моноцитів, а також FLS. Акумульовані в панусі клітини надмірно експресують ген, який кодує RANKL, що значно підсилює остеокластогенез і призводить до появи ерозій [97].

На процес остеокластогенезу впливає низка системних і місцевих факторів. Надмірна активація імунної системи, яка відбувається при РА, призводить до порушення процесів формування і функціонування остеокластів. Остеокластогенні ефекти виявляють такі прозапальні цитокіни як ІЛ-1β, ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-11, ІЛ-17, а також ФНП-α [97, 151].

Прозапальні цитокіни стимулюють остеокластогенез через індукцію експресії гена, який кодує RANKL. Однак, деякі дослідження показали, що такі прозапальні цитокіни як ІЛ-1β, ІЛ-6 і ФНП-α можуть індукувати диференціацію остеокластів і без участі RANKL [97, 105, 109, 122].

Під час терапії РА інгібіторами ФНП-α відбувається зменшення інтенсивності запального процесу і, як результат, зменшення кількості суглобових ерозій [97, 181]. В експериментах *in vivo* показано, що блокування ФНП-α призводить до зменшення резорбції кісткової тканини при остеопорозі спричиненому менопаузою. Таким чином, ФНП-α розглядають як ключовий цитокін, задіяний в остеокластогенезі і руйнуванні кісткової тканини [30, 97].

ФНП-α опосередковує руйнування кісткової тканини шляхом активації експресії остеобластами і стромальними клітинами генів, які кодують RANKL та M-CSF, а також шляхом RANK-RANKL-незалежної диференціації остеокластів. Відомо, що ФНП-α і RANKL посилюють експресію гена, що кодує RANK [97, 102, 110]. Незважаючи на те, що в уражених суглобах остеокластогенез є переважаючим процесом, ФНП-α також впливає на остеобластогенез шляхом інгібування остеобластної диференціації [7, 68, 97].

Показано, що ІЛ-6 може відігравати двояку роль в ремоделюванні кісткової тканини. Після додавання ІЛ-6 і розчинної форми його рецептора до культури клітин кісткової тканини відбувається її резорбція шляхом активації сигнального шляху, опосередкованого STAT3, за рахунок посилення експресії остеобластами гена, який кодує RANKL [97, 157, 160].

Разом з тим, ІЛ-6 в попередниках остеокластів за відсутності інших підтримуючих клітин, демонстрував пряму інгібувальну дію на сигнальний шлях, опосередкований RANK [97, 215].

Дослідженнями *in vivo* показано, що у трансгенних мишей з підвищеним рівнем експресії гена ІЛ-6 спостерігався інтенсивний остеокластогенез, що призводило до порушень у формуванні скелету в період до статевого зрілості, і зниженою інтенсивністю утворення остеокластів у дорослому віці. За фізіологічних умов, дефіцит ІЛ-6 суттєво не змінює кількості остеокластів [40, 97, 106, 166]. Однак, у мишей із нокаутом гена ІЛ-6 та з експериментальним артритом відзначали значне зменшення остеокластогенної активності і порушення процесу накопичення остеокластів у місцях запалення [97, 208].

ІЛ-1β опосередковано індукує експресію гена, який кодує RANKL, через утворення простагландину Е в пародонтальній тканині [64, 97, 154]. Показано, що ІЛ-1β впливає на резорбцію кісткової тканини альтернативним способом, незалежним від RANK/RANKL системи. ІЛ-1β є важливим для остеокластогенезу, опосередкованого ФНП-α. У трансгенних мишей, позбавлених ІЛ-1β, не спостерігалось системної втрати кісткової тканини через хронічне запалення, опосередковане ФНП-α [18, 97, 104, 167]. Показано, що під час остеокластогенезу, опосередкованого ФНП-α та ІЛ-1β, відбувається активація кінази p38 MAP (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) через підвищення експресії в стромальних клітинах гена, що кодує RANKL, і стимуляцію диференціації попередників остеокластів [97, 206].

Ролі остеобластів у втраті кісткової маси при РА надається менше уваги, ніж остеокластами. Остеобласти, подібно до остеокластів, є важливими як учасниками, так і регуляторами ремоделювання кісткової тканини. Ці клітини продукують і мінералізують кістковий матрикс, а також за допомогою продукції RANKL і OPG модулюють функціонування та диференціацію остеокластів з клітин-попередників [13, 98, 132].

Остеобласти походять з мезенхімних стовбурових клітин (МСК). У міру дозрівання остеобластів, відбувається поступове зменшення експресії ними гена, що кодує RANKL і збільшення експресії гена, який кодує OPG. Таким чином, створюється мікросередовище, що сприяє формуванню кісткової тканини [12, 13, 98, 132].

1.4 Скелетогенні сигнальні шляхи

У хворих на РА спостерігається порушення регуляції деяких сигнальних шляхів у різних типах клітин суглобів, зокрема в FLS, моноцитах, нейтрофілах, ендотеліальних клітинах та ін [37]. Відомо, що морфогенетичні протеїни кістки (МПК) і сигнальний ланцюг Wnt задіяні у ключових сигнальних шляхах, які важливі для індукції та підтримки формування скелетних тканин [32, 130, 134, 164]. Активація сигнального шляху Wnt необхідна для підтримки правильного балансу між процесами формування та ремоделювання кісткової і хрящової тканин. Однак, при РА та інших споріднених захворюваннях, цей баланс порушується [37, 92, 130, 168].

1.4.1 Морфогенетичні протеїни кістки: загальна характеристика і функції

Процес формування кісткової тканини (остеогенез) включає хемотаксис, міграцію, мітоз МСК, а також їх диференціацію та дозрівання остеоцитів. Фактори росту, які задіяні у процесах формування, репарації кісткової та інших сполучних тканин можуть бути згруповані відповідно до їх біологічної активності: інсуліноподібні фактори росту, тромбоцитарний фактор росту, фактори росту фібробластів, епідермальний фактор росту, а також протеїни надродини трансформуючого фактору росту β (ТФР-β) [127, 131].

Окрім трьох форм ТФР-β, до надродини ТФР-β належать активіни, протеїни nodal, інгібувальний фактор мюллерівської протоки, та інші фактори росту і диференціації, а також МПК, які складають найбільшу родину її представників [29, 108].

У 1965 році доктор M. R. Urist продемонстрував здатність екстрактів демінералізованих фрагментів кістки індукувати утворення нової кісткової

тканини при їх імплантації в ектопічні ділянки піддослідних тварин [198]. Для факторів, які опосередковували процес осифікації була запропонована назва – «морфогенетичні протеїни кістки». МПК – це група багатофункціональних сигнальних молекул, які виробляються клітинами-попередниками, що походять від МСК кісткового мозку, остеобластами, хондроцитами, тромбоцитами, однак їх синтез не обмежений кістковою тканиною, оскільки ці протеїни також задіяні в регуляції інших функцій клітин [128, 163].

МПК впливають на клітинну проліферацію та диференціацію, морфогенез тканин зуба, органогенез, ембріональний розвиток, апоптоз, хемотаксис і репарацію широкого спектру тканин, модулюють гомеостаз глюкози і Феруму, а також відіграють важливу роль у формування кісткової тканини під час розвитку ссавців, виявляючи різносторонні функції. Регуляторні ефекти МПК залежать від типу клітини-мішені, стадії диференціації, локальної концентрації МПК, а також від взаємодії останніх з іншими секреторними протеїнами [29, 46]. МПК індукують енхондральний остеогенез, окостеніння в сполучнотканинній мембрані і хондрогенез, шляхом індукції диференціації МСК в остеобластну лінію, що є критично важливим для підтримки цілісності скелету і загоюванні переломів кісток [29, 124].

Ефективність МПК щодо прискорення регенерації кісткової тканини і загоювання переломів була продемонстрована на тваринних моделях і доклінічними випробуваннями [29, 46].

У людини описано близько 20 різних МПК, які згруповані в підродини на основі подібності їх амінокислотних послідовностей та відомих функцій, хоча не всі їх представники володіють істинно остеогенними властивостями [29, 103].

МПК – це димерні молекули, що складаються з близько 120-ти амінокислотних залишків, включаючи сім консервативних цистеїнових залишків, шість з яких є висококонсервативними, і які формують цистеїновий мотив, стабілізований трьома внутрішньомолекулярними дисульфідними містками. Сьомий залишок цистеїну задіяний у стабілізації димеру через утворення міжмолекулярного цистеїнового містка [25, 29].

МПК синтезуються клітиною у вигляді великих і неактивних попередників, які мають N–кінцевий гідрофобний сигнальний пептид (50-100 амінокислотних залишків), необхідний для секреції; продомен, потрібний для правильного укладання протеїну, а також С-кінцевий зрілий пептид, що здатний зв'язуватись з рецептором [29, 78, 204]. МПК мають сайти N- і О-глікозилювання, які підвищують їх стабільність та період півжиття в організмі, а також визначають специфічність при зв'язуванні із рецептором. Після димеризації, яка є необхідною умовою індукції кісткоутворення, продомен протеолітично відщеплюється у ділянці Arg-X-X-Arg з утворенням зрілих і активних гомо- чи гетеродимерів [29, 82, 133].

Як гомо- так і гетеродимери МПК виявляють біологічну активність, однак дослідження *in vitro* та *in vivo* продемонстрували підвищену активність деяких гетеродимерів, зокрема МПК2/6, МПК2/7, МПК4/7, у порівнянні з відповідними гомодимерами [29].

Встановлено, що гетеродимери МПК, що складаються з субодиниць представників різних груп (наприклад, МПК2/7 чи МПК4/6) ефективніше активують сигнальний шлях МПК і, як результат, виявляють кращі остеоіндуктивні властивості [9].

1.4.1.1 Сигнальні каскади морфогенетичних протеїнів кістки та їх регуляція.

МПК можуть запускати як канонічний (Smad-залежний) так і неканонічний (Smad-незалежний) сигнальні шляхи [85, 204].

Ініціація канонічного сигнального каскаду відбувається шляхом зв'язування МПК з відповідними рецепторами на поверхні клітини-мішені і подальшим утворенням гетеротетрамерного комплексу, який складається з двох димерів рецепторів типу I і II [85]. Обидва типи рецепторів мають короткі позаклітинні домени, один трансмембранний домен і внутрішньоклітинний домен, який володіє серин/треонінкіназною активністю. Для лігандів надродини ТФР-β описано сім видів рецепторів типу I (ALK1-7), чотири з яких зв'язують МПК: рецептор МПК типу 1А (BMPR-1A або ALK3), рецептор МПК типу 1В (BMPR-1B

або ALK6), активіновий рецептор типу 1A (ActR-IA або ALK2) і рецептор ALK1, який зв'язує МПК9. Відомо чотири різновиди рецепторів типу II для представників надродини ТФР-β, три з яких можуть взаємодіяти з МПК: рецептор МПК типу II (BMPR-II), активіновий рецептор типу IIA (ActR-IIA), і активіновий рецептор типу IIB (ActR-IIB). Тоді як BMPR-1A, BMPR-1B, і BMPR-II специфічні саме до МПК, ActR-1A, ActR-IIA, і ActR-IIB можуть функціонувати як рецептори для активінів, які також належать до надродини ТФР-β. У різних представників надродини ТФР-β, детальні механізми утворення гетеротетрамерного сигнального комплексу можуть бути відмінними [36, 152, 204].

При формуванні гетеротетрамерного комплексу, кіназа конститутивно активного рецептора типу II трансфосфорилює рецептор типу I в мотиві багатому на залишки гліцину та серину, відомому як GS домен. Фосфорилювання активує рецептор типу I, що в свою чергу призводить до фосфорилювання в COOH-кінцевому мотиві SSXS субстратних протеїнів відомих як рецептор-регульовані Smad-протеїни (R-Smads). До протеїнів R-Smad, які задіяні у сигнальному шляху МПК, належать Smad1, Smad5, і Smad8 (Smad1/5/8). Після фосфорилювання протеїни R-Smad асоціюються із спільним партнерним протеїном (Co-Smad) – Smad4 [84, 204] (рис. 1.2).

Такий комплекс транслокується в ядро, де функціонує як транскрипційний фактор, дія якого модулюється відповідними ко-активаторами чи ко-репресорами, необхідними для регуляції експресії генів-мішеней. Інгібіторні протеїни Smad (I-Smads), Smad6 і Smad7 (Smad6/7), відіграють роль антагоністів цього сигнального шляху [84, 91, 204].

Зв'язування R-Smad із Smad6/7 веде до інгібування їх взаємодії із активованими BMPRI, що у свою чергу перешкоджає активації R-Smad через фосфорилювання, і знижує їх активність, зокрема через зменшення кількості R-Smad в ядрі [84] (рис. 1.2).

Описано кілька неканонічних, Smad-незалежних сигнальних шляхів, які активуються МПК. Наприклад, виявлено, що МПК4 активує TAK1 (transforming growth factor β-activated kinase 1), серин-треонінову кіназу, яка належить до

родини MAPKKK (MAP kinase kinase kinase) [43, 204, 212]. Окрім сигнального шляху MAPK, передача сигналів МПК може здійснюватися через PI3K/Akt, P/kc, Rho-ГТФази та ін [204, 218].

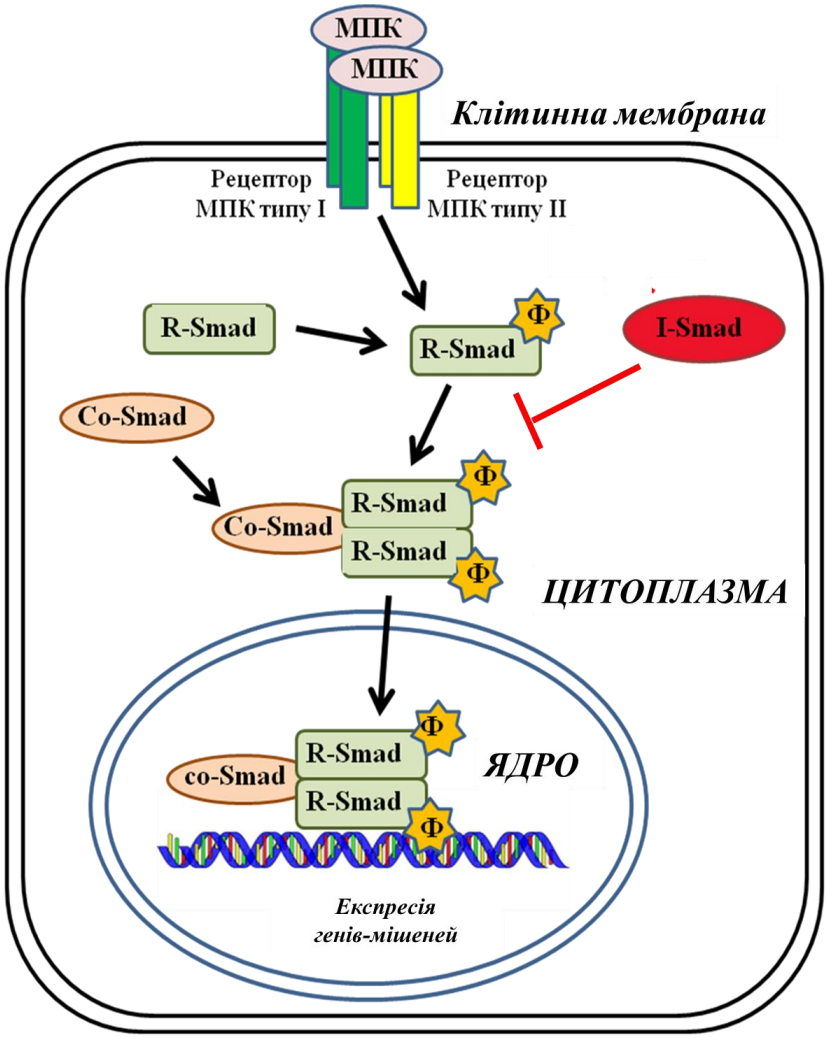


Рис. 1.2. Загальна схема Smad-залежного сигнального шляху МПК [84, 85, 204].

Примітка. Активація канонічного сигнального шляху МПК відбувається через взаємодію останніх з рецепторним комплексом, який складається з МПК рецепторів типу I і типу II. Утворення гетеротетрамерного комплексу призводить до активації протеїнів R-Smad і їх наступної асоціації з протеїнами Co-Smad. Такий комплекс транслокується в ядро, де функціонує як транскрипційний фактор. До антагоністів Smad-залежного сигнального шляху МПК належать протеїни I-Smad.

Активація конкретного сигнального шляху, очевидно, залежить від позаклітинного середовища, клітинної активності чи взаємодії з іншими сигнальними ланцюгами, наприклад, шляхом Wnt [204].

Усі перелічені вище сигнальні шляхи, тим чи іншим способом, задіяні в регуляції процесів проліферації і диференціації мезенхімних стовбурових клітин-попередників, клітин кісткової та хрящової тканин [170]. Через ініціацію цих сигнальних каскадів, МПК здатні реалізовувати свої біологічні ефекти щодо апоптозу, виживання, міграції і диференціації клітин [21].

Регуляція сигнальних шляхів МПК здійснюється як внутрішньо- так і зовнішньоклітинними регуляторними факторами, які зв'язуються з МПК або ж з компонентами їх сигнального каскаду. Внутрішньо- або зовнішньоклітинні модулятори, що діють як антагоністи сигнального шляху МПК, взаємодіють з рецепторами МПК або самими лігандами, блокуючи трансдукцію сигналу, що призводить до інактивації процесів кісткоутворення. Відомо понад 15 антагоністів МПК, серед яких склеростин, продукт гена *SOST* і протеїн Noggin та ін [21].

1.4.2 Протеїни Wnt: загальна характеристика і функції

У 80-х рр. XX ст. був відкритий сигнальний шлях Wnt (поєднання термінів *wingless* та *Int*) – один з внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, що регулює процеси ембріогенезу, диференціації клітин і розвитку злоякісних пухлин [126, 213]. Ген *wingless* був ідентифікований за рецесивною мутацією, внаслідок якої у дрозофіли повністю порушувався розвиток крил [156, 183, 211]. Гомологічний ген хребетних *Int* спочатку вивчали у зв'язку з наявністю в його локусі декількох місць інтеграції геному вірусу раку молочної залози миші (mouse mammary tumor virus, MMTV) [155]. Дослідження функцій цих двох генів привело до відкриття цілого класу протеїнів, які регулюють ембріональний розвиток організмів від нематод до ссавців і підтримують гомеостаз їх органів шляхом регуляції клітинної проліферації, диференціації, апоптозу, рухливості та процесів морфогенезу.

Ліганди Wnt належать до великої родини сигнальних протеїнів, яка нараховує щонайменше 19 різних представників – висококонсервативних багатих на залишки цистеїну секреторних ліпопротеїнів, експресія генів яких чітко регулюється під час розвитку. Показано, що ці протеїни відіграють важливу роль у багатьох патологічних процесах. Аномальне функціонування їх сигнального шляху, пов'язане з різними захворюваннями, зокрема розвитком злоякісних пухлин і патологіями кісткової тканини [169, 202].

1.4.2.1 Wnt/β-катенін-залежний сигнальний шлях та його регуляція. Wnt-протеїни активують декілька внутрішньоклітинних сигнальних каскадів, зокрема канонічний або Wnt/β-катенін-залежний сигнальний шлях і неканонічні, або β-катенін-незалежні сигнальні шляхи, які можна розділити на такі, що регулюють полярність клітини шляхом стимуляції реорганізації цитоскелету і метаболізму Кальцію [86, 111].

Як показано на рис. 1.3, в основі канонічного шляху передачі сигналу лежить стабілізація цитоплазматичного протеїну β-катеніну, який належить до родини протеїнів катенінів, що здатні утворювати комплекси з кадгеринами – молекулами клітинної адгезії. β-катенін – це багатофункціональний протеїн, який задіяний в регуляції координації міжклітинної адгезії і транскрипції генів [17, 134].

Якщо зв'язування Wnt-протеїнів з рецепторами інгібується, або гени, які їх кодують не експресуються, то цитоплазматична форма β-катеніну підлягає деградації «деструктивним комплексом», який складається з «підтримуючого» протеїну Axin, протеїну супресора пухлин adenomatous polyposis coli (APC), казеїн кінази 1 (casein kinase 1, CK1) і кінази глікогенсинтази 3β (glycogen synthase kinase 3β, GSK3β). CK1 і GSK3β послідовно фосфорилюють амінокінцеву ділянку β-катеніну, що призводить до його розпізнавання субодиницею убіквітинлігази E3, β-Trcp, із наступними убіквітинуванням та протеосомальною деградацією β-катеніну (рис. 1.3, A) [96, 134].

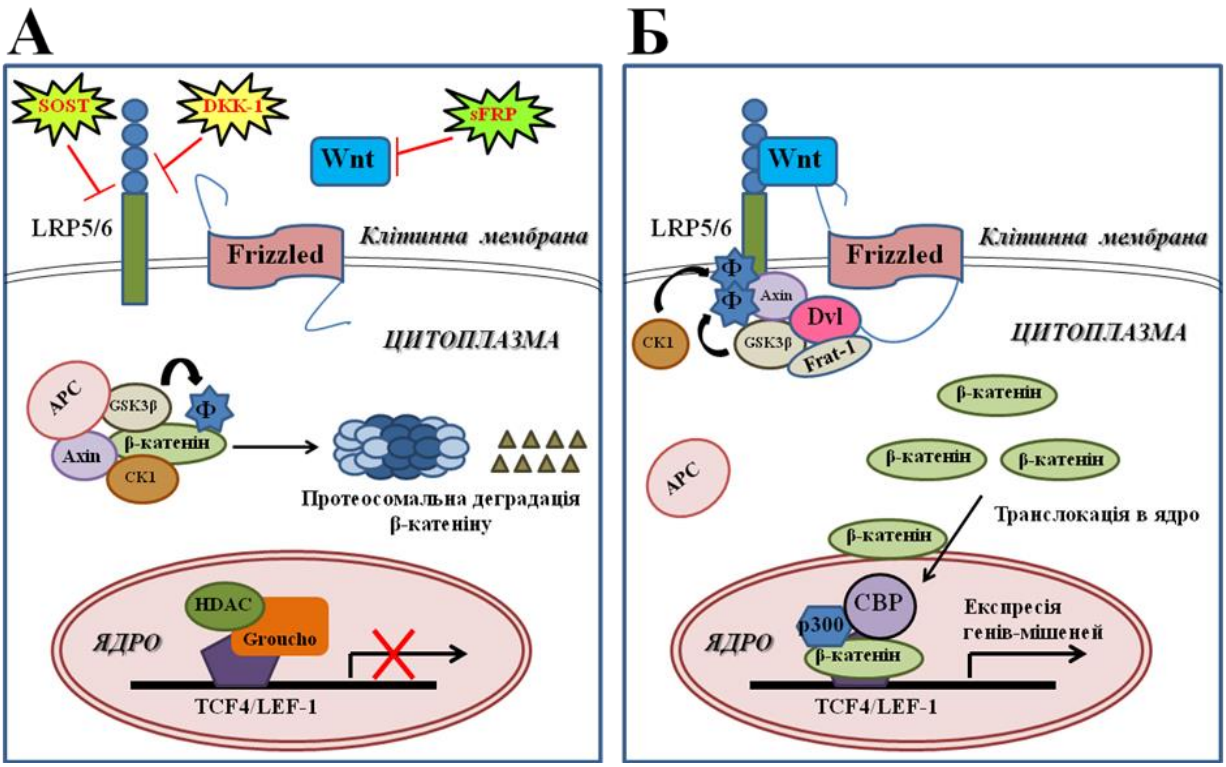


Рис. 1.3. Загальна схема Wnt/β-катенін-залежного сигнального шляху [17, 96, 134, 207].

Примітка. (А) При відсутності лігандів Wnt, β-катенін підлягає фосфорилюванню «деструктивним комплексом», який складається з APC, GSK3β, CK1 і Axin із наступною його протеосомальною деградацією. Конститутивна елімінація β-катеніну перешкоджає його надходженню в ядро, і гени-мішені сигнального шляху Wnt репресуються. (Б) Активація сигнального каскаду відбувається при зв'язуванні лігандів Wnt з рецепторним комплексом, який складається з трансмембранного рецептора Frizzled і ко-рецептора LRP5/6. Трансдукція сигналу відбувається через протеїни Dvl, Axin, і Frat-1, які опосередковують руйнування «деструктивного комплексу», що призводить до стабілізації і транслокації β-катеніну в ядро, та активації генів-мішеней.

Склеростин, DKK-1, sFRP – інгібітори Wnt/β-катенін-залежного сигнального шляху.

Конститутивна елімінація β-катеніну перешкоджає його надходженню в ядро і, в результаті, гени-мішені сигнального шляху Wnt репресуються ДНК-

зв’язуючими транскрипційними факторами родини Т-клітинних факторів (T-cell factor, TCF/lymphoid enhancer factor, LEF) – TCF4 і LEF-1 [96, 134].

Активація Wnt/β-катенін-залежного сигнального шляху відбувається при зв’язуванні лігандів Wnt з рецепторним комплексом, який складається з трансмембранного рецептора Frizzled і LRP-подібного ко-рецептора (low-density lipoprotein receptor-related protein, LRP). Протеїни LRP містять єдиний трансмембранний домен, який і забезпечує передачу сигналу в середину клітини. У хребетних виділені три члени родини LRP (LRP4, LRP5 і LRP6), які здатні зв’язувати протеїни Wnt [193].

Внутрішньоклітинна передача сигналу відбувається через протеїни Disheveled (Dvl), Axin, і Frat-1, які опосередковують руйнування мультипротеїнового «деструктивного комплексу», що призводить до інгібування активності GSK3β і, як наслідок, зниження швидкості деградації β-катеніну. Це веде до стабілізації β-катеніну і його Rac1-залежної транслокації в ядро, де він виконує функцію транскрипційного ко-регулятора. У ядрі β-катенін взаємодіє з амінокінцевими ділянками ДНК-зв’язуючих протеїнів TCF4/LEF-1, які за відсутності сигналу Wnt, пригнічують експресію генів-мішеней через пряму взаємодію з транскрипційними інгібіторними протеїнами родини Groucho і гістоновими деацетилазами (histone deacetylases, HDACs). Взаємодія між β-катеніном і TCF4/LEF-1 залучає HDACs, Bcl9 – представника докінг-протеїнів родини Legless та CBP/p300, перетворюючи таким чином TCF4/LEF-1 в транскрипційні активатори їх генів-мішеней (рис. 1.3, Б). До генів-мішеней сигнального шляху Wnt належать гени, продукти яких задіяні у широкому спектрі ключових функцій клітини [17, 96, 118, 207].

Wnt/β-катенін-залежний сигнальний шлях чітко регулюється різними модулюючими протеїнами. Порушення такої регуляції призводить до численних розладів, зокрема, до ураження кісткової тканини і виникнення онкологічних захворювань [96].

До внутрішньоклітинних антагоністів сигнального шляху Wnt належать GSK3β і APC, які відіграють більш універсальну роль у функціонуванні клітини в

порівнянні з специфічними позаклітинними антагоністами даного сигнального каскаду [93, 96].

Існує ряд позаклітинних протеїнів, які модулюють активність сигнального шляху Wnt. Такі протеїни взаємодіють або з рецептором Frizzled чи ко-рецепторами LRP4/5/6, або ж з самими Wnt-протеїнами. До позаклітинних антагоністів належать протеїни sFRP (secreted frizzled-related proteins), які мають лігандзв'язуючий домен подібний до рецептора Frizzled, однак позбавлені трансмембранного домену, і тому можуть зв'язувати ліганди Wnt, але не можуть опосередковувати трансдукцію сигналу, що ефективно блокує сигнальний шлях Wnt. Протеїни Dickkopf (DKK-1, 2, 3 і 4) – секреторні фактори, які перешкоджають передачі сигналів Wnt, шляхом зв'язування із ко-рецепторами LRP5 і LRP6 [93]. Протеїни sFRP і DKK, є специфічними інгібіторами канонічного сигнального каскаду Wnt [93, 96].

До антагоністів сигнального шляху Wnt також належать протеїни WIF (Wnt inhibitory protein), які зв'язуються з лігандами Wnt, перешкоджаючи у такий спосіб утворенню комплексу Wnt-рецептор на поверхні клітини. Протеїни Wise і склеростин – продукт гена *SOST*, представляють інший клас інгібіторів LRP5/6. Подібно до DKK-1, склеростин перешкоджає утворенню комплексу Frizzled-Wnt-LRP6. Обидва інгібітори, DKK-1 і склеростин, значною мірою задіяні у розвитку ряду захворювань людини.

Протеїни Shisa зв'язують Frizzled в ендоплазматичному ретикулумі, перешкоджаючи його виходу на клітинну поверхню, що пригнічує сигнальний шлях. Крім того, існує низка полівалентних інгібіторів сигнального каскаду Wnt [20].

До агоністів сигнального шляху Wnt належать представники двох родин – протеїни родини R-spondin (Rspo) і родини Norrin [134].

1.4.2.2 Роль канонічного сигнального шляху Wnt у регуляції метаболізму кісткової тканини. Дослідження ревматичних і ортопедичних

захворювань людини показали ключове значення канонічного сигнального шляху Wnt у регуляції остеогенезу, остеобластної та остеокластної проліферації і диференціації [67, 93, 96].

Остеобластна диференціація, головним чином, регулюється МПК, та протеїнами Wnt. Хоча комітування мезенхімних попередників в остео- або хондрогенну лінії вимагає в першу чергу МПК за їх взаємодії із Wnt-лігандами, на пізніх стадіях остеогенезу канонічний сигнальний каскад Wnt функціонує як його головний регулятор [123].

Сигнальний шлях Wnt стимулює процеси кісткоутворення шляхом регуляції остеобластної і остеокластної проліферації та диференціації. Регуляція остеогенезу опосередковується декількома механізмами: через блокування альтернативних шляхів диференціації МСК; за рахунок індукції остеобластогенезу та блокування апоптозу остеобластів і остеоцитів. Wnt-протеїни індукують утворення OPG остеобластами, який блокує диференціацію остеокластів. При зростанні співвідношення OPG/RANKL β-катенін пригнічує остеокластогенез [118].

У здоровому організмі процеси резорбції та утворення кісткової тканини збалансовані. Однак, при РА цей баланс порушується, зокрема за рахунок опосередкованого ФНП-α утворення блокаторів сигнального каскаду Wnt і остеобластогенезу, та внаслідок експресії гена, що кодує RANKL – ключовий фактор активації та диференціації остеокластів [44].

Таким чином, Wnt/β-катенін-залежний сигнальний шлях індукує опосередковані остеобластами процеси кісткоутворення та інгібує резорбцію скелетних тканин остеокластами [93].

Показана взаємодія між сигнальними каскадами Wnt і МПК. Протеїни Wnt прямо регулюють експресію ряду генів, які відіграють ключову роль в біології остеобластів [169].

Під час регуляції остеогенних процесів, сигнальний шлях Wnt також взаємодіє з такими сигнальними каскадами як Hedgehog (Hh) і Notch, які є важливими для формування скелету під час ембріогенезу. До інших механізмів,

які задіяні в регуляції остеогенезу через сигнальний шлях Wnt належать активація протеїнкінази C-δ і сигнальних каскадів Src/ERK та PI3K/Akt [96].

1.5 Сигнальний шлях NF-κB та його роль у розвитку ревматоїдного артриту

До протеїнів, які найінтенсивніше вивчаються в біології хребетних, належать транскрипційні фактори родини ядерного фактора κB (nuclear factor κB, NF-κB). З часу їх відкриття у 80-х роках XX ст., було показано, що ці протеїни задіяні у різноманітних процесах, зокрема запаленні, проліферації та диференціації [216].

Як правило, активація транскрипційних факторів NF-κB має прозапальний характер. Важливість протеїнів NF-κB у фізіології людини підкреслюється різними захворюваннями, які виникають при порушенні регуляції активності цих транскрипційних факторів [120, 184, 216].

До родини NF-κB належать п’ять протеїнів: NF-kB1 (або p50), NF-kB2 (або p52), RelA (або p65), RelB і c-Rel. Ці протеїни утворюють гомо- або гетеродимери транскрипційних факторів NF-κB, які активують або ж інгібують транскрипцію генів-мішеней. Найрозповсюдженішою формою є гетеродимер, що складається з NF-κB1/p50 і RelA/p65. В нестимульованих клітинах транскрипційні фактори NF-κB виявлені у неактивній формі в цитозолі [33, 142, 184].

ФНП-α відіграє роль ключового медіатора запалення, а також є найпотужнішим активатором сигнального шляху NF-κB (рис. 1.4). Важливо зазначити, що гени, які кодують ФНП-α та інші важливі фактори самі перебувають під контролем транскрипційних факторів NF-κB. Тому, NF-κB може бути одним з ключових регуляторів утворення прозапальних цитокінів при РА. Зокрема, наявність активних транскрипційних факторів NF-κB була продемонстрована при культивуванні синовіальних фібробластів, в суглобах тварин з експериментально індукованим РА, а також в суглобах пацієнтів хворих

артритом. В ядрі макрофагів і клітин, що вистилають синовіальну мембрану були виявлені p65 і p50 [184], а ген, який кодує c-Rel був охарактеризований як ген, асоційований із розвитком РА [27, 62, 74].

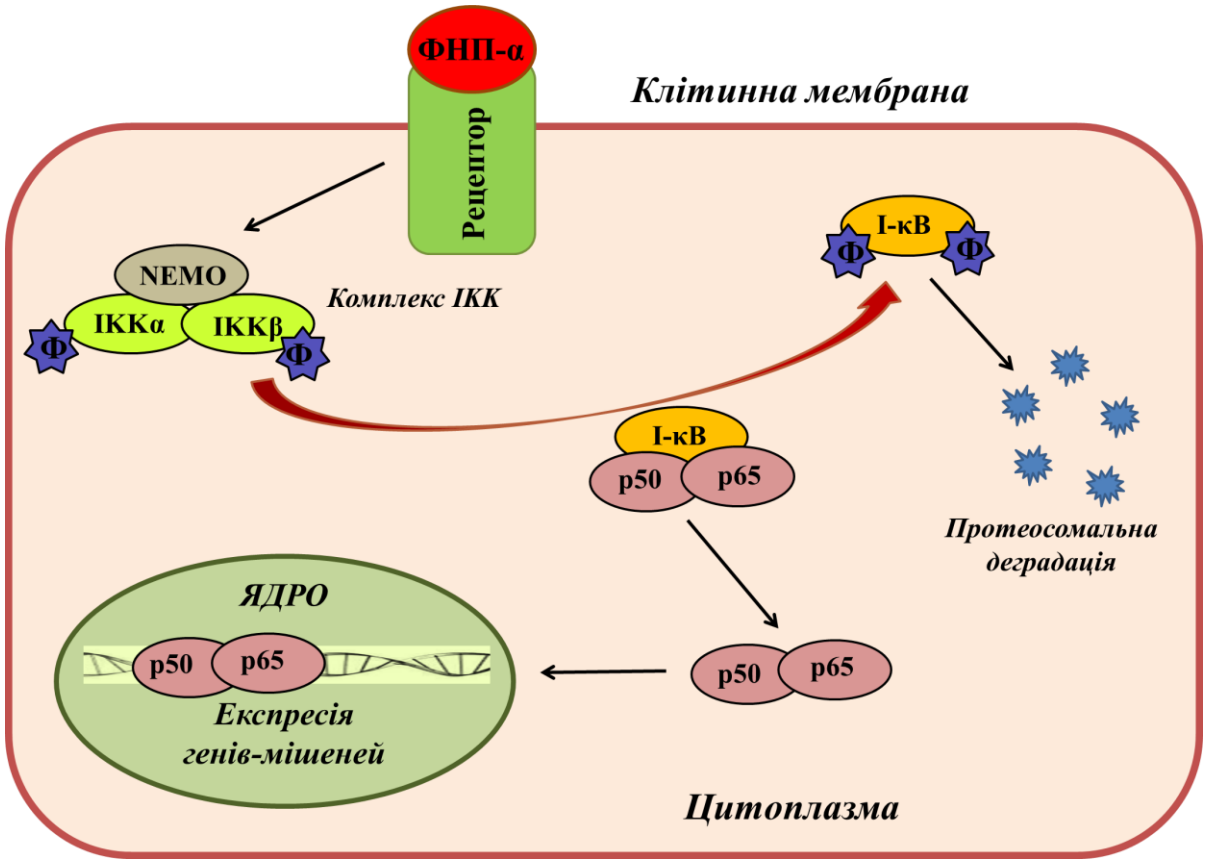


Рис. 1.4. Загальна схема канонічного сигнального шляху NF-κB [45, 88].

Примітка. Ініціація канонічного сигнального шляху NF-κB відбувається після зв'язування ліганда (ФНП-α) з специфічним рецепторним комплексом, що призводить до активації комплексу IKK, який складається з протеїнів IKKβ, IKKα і IKKγ/NEMO. Активований комплекс IKK опосередковує фосфорилювання інгібіторних протеїнів I-κB, що необхідно для їх убіквітинування і подальшої протеосомальної деградації. Після протеолізу I-κB, димери p65/p50 вивільняються і транслокуються в ядро, де самостійно або у комплексі з іншими транскрипційними факторами індукують експресію генів-мішеней.

Молекулярні події, які призводять до активації транскрипційних факторів NF-κB в синовіальній мембрані при РА становлять значний інтерес і включають

канонічний (класичний) сигнальний шлях, основними компонентами якого є комплекс IKK (inhibitory κB kinase), протеїни I-κB (inhibitory κB) і транскрипційні фактори NF-κB [45, 88] (рис. 1.4).

У нестимульованих зовнішніми факторами клітинах, димери NF-κB інактивуються шляхом утворення комплексу з протеїнами I-κB, серед яких найпоширенішим є I-κBα. При канонічній активації сигнального шляху NF-κB, зв'язування ліганду з специфічним рецептором на поверхні клітини призводить до активації комплексу IKK, який складається з протеїнів IKKβ, IKKα і IKKγ/NEMO (NF-κB essential modulator), що, у свою чергу, стимулює фосфорилювання протеїнів I-κB, що необхідно для їх убіквітинування і подальшої протеосомальної деградації. Після чого димери NF-κB (p65/p50) вивільняються і транслокуються в ядро, де самостійно або у комплексі з іншими транскрипційними факторами індукують експресію генів-мішеней [45, 88, 146, 171] (рис. 1.4).

Ген, що кодує I-κBα є прямим геном-мішенню для NF-κB. Експресія цього гена негайно індукується після активації NF-κB, що представляє дуже ефективний негативний зворотній зв'язок, необхідний для регуляції сигнального шляху NF-κB [34, 35, 172, 191].

1.6 Ген пухлинної трансформації клітин гіпофізу 1 та його роль у розвитку ревматоїдного артриту

Ген *pttg* – це протоонкоген, який вперше був ідентифікований у 1997 році в клітинах лінії GH4 гіпофізу щурів [165]. Подальші дослідження продемонстрували, що цей ген кодує протеїн секурин, який є критично важливим у регуляції розходження сестринських хроматид під час анафази мітозу [221]. Секурин інгібує сепаразу, яка забезпечує деградацію зв'язуючих протеїнів (когезинів) між сестринськими хроматидами при переході із метафази в анафазу мітозу. В анафазі секурин убіквітинується і зазнає деградації під дією анафазного комплексу. Це призводить до звільнення сепарази, яка руйнуючи когезин, ініціює

розходження хромосом. Таким чином, секурин запобігає завчасному розходженню хромосом під час мітозу [147, 217]. Як інактивація гена *pttg*, так і надлишкова його експресія призводять до появи анеуплоїдних клітин [147].

До родини протеїнів PTTG належать PTTG1, PTTG2 і PTTG3. У людини ген *pttg1* локалізований у п'ятій хромосомі і кодує протеїн PTTG1 довжиною 202 амінокислотних залишки і молекулярною масою 22 кДа [174, 195]. Протеїн PTTG1 – найрозповсюдженіший і найкраще вивчений у порівнянні з двома іншими формами, а також на 91% і 89% гомологічний PTTG2 і PTTG3, відповідно [174].

Ген *pttg1* активно експресується клітинами багатьох злоякісних пухлин (пухлини гіпофізу, карциноми легень, молочної залози, стравоходу, товстої і прямої кишок, яєчників), деякими нормальними тканинами, а також здатний трансформувати клітини *in vitro* та *in vivo* [174, 195].

Показано, що PTTG1 відіграє важливу роль в ангіогенезі, а також у таких звичайних клітинних процесах, як репарація ДНК і апоптоз. Цей протеїн взаємодіє з цілою низкою різних факторів *in vitro* та *in vivo* [147, 174]. Крім того, PTTG1 виконує функцію трансактиватора і впливає на регуляцію деяких генів [174]. Зокрема, надекспресія гена *pttg1* в клітинах лінії NIH-3T3 призводить до зростання рівня мРНК основного фактора росту фібробластів (basic fibroblast growth factor, bFGF) і стимуляції його секреції [205].

Мишачий PTTG1 на 66% гомологічний людській формі цього протеїну. Миші з нокаутом гена *pttg1* ($PTTG1^{-/-}$) життєздатні, але їм властиві різні аномалії розвитку, зокрема гіпоплазія селезінки та сім'яників, гіперплазія загрудинної залози, тромбоцитопенія та цукровий діабет. Клітини таких мишей характеризуються передчасним розходження центромер і аберантним клітинним циклом [205, 217].

Секурин/PTTG1 локалізований як у цитоплазмі, так і в ядрі. Очевидно, що на додаток до основної функції, запобігання передчасному розходженню сестринських хроматид, ядерна форма PTTG1 також відіграє роль транскрипційного активатора, тоді як функція цитоплазматичної форми PTTG1

залишається нез'ясованою. Локалізація цього протеїну у клітині, можливо, залежить від типу клітини, а також від фази клітинного циклу. Транслокація PTTG1 в ядро опосередковується PTTG-зв'язуючим фактором (PTTG-binding factor, PBF або PTTG-binding protein 1, PTTG-BP1), який містить сигнал ядерної локалізації, або здійснюється за механізмом, який потребує активації сигнального шляху MAPK. Експресія конститутивно активної MAPKK значно полегшує транслокацію PTTG1 в ядро [174].

Показано, що експресія гена *pttg-bp1* знижується на пізніх стадіях РА у порівнянні з ранніми етапами захворювання [125]. Водночас, *pttg-bp1* є геном-мішенню транскрипційного фактора RUNX2 (Runt-related transcription factor 2), специфічного для остеобластів [190].

Встановлено, що стовбурові клітини кісткового мозку з нокаутом гена *pttg1*, які експресують такі ж фенотипові маркери як і МСК, проліферують повільніше та старіють швидше, ніж відповідні клітини дикого типу. Продемонстровано, що диференціація цих клітин порушена *in vivo* [173].

Узагальнюючи дані, наведені в розділі «Огляд літератури», необхідно зазначити, що незважаючи на те, що РА був і є предметом численних досліджень, причина розвитку даного захворювання, його етіологія та патофізіологія і досі залишаються не до кінця зрозумілими. РА належить до центральних проблем сучасної ревматології, що пояснюється важкістю захворювання, його поширеністю, ураженням людей б удь-якого віку. Актуальність та соціальна значимість цієї проблеми визначаються не тільки частотою захворювання, важкістю перебігу, недостатньою ефективністю лікувальних заходів, але й наслідками перебігу хвороби — високим відсотком інвалідності й, як наслідок підвищення недієздатної популяції в Україні та світі, а також скороченням тривалості життя [2, 129].

Оскільки ерозія кісткової тканини належить до найбільш болючих ускладнень РА й асоціюється із важкістю захворювання і несприятливим

функціональним результатом, дослідження механізмів процесів, які потенційно можуть бути задіяними в деградації скелетних тканин відкривають великі перспективи для розвитку нових парадигм і терапевтичних стратегій щодо лікування РА та інших споріднених захворювань.

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Загальна схема досліджень

У ході виконання дисертаційної роботи було проведено 4 етапи досліджень (рис. 2.1).

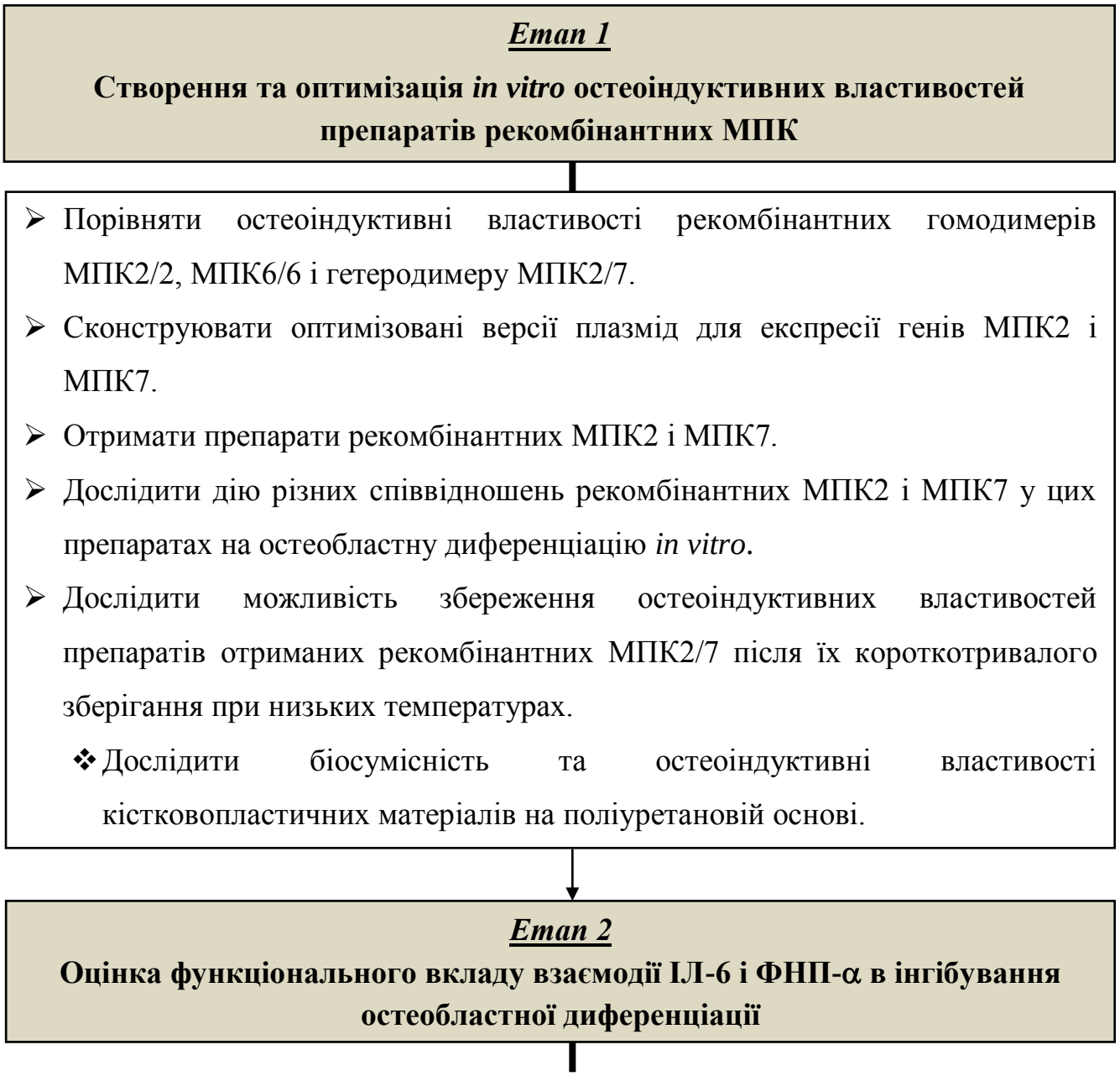


Рис. 2.1. Схема досліджень (продовження на наступній сторінці).

- Дослідити ефекти ІЛ-6 на активацію сигнального шляху Wnt за умови впливу ФНП-α в синовіальних фібробластах людини і фібробластах миші.
- Дослідити роль ІЛ-6 в регуляції ранніх і пізніх стадій остеобластної диференціації МСК миші, індукованої МПК2/7, шляхом блокування експресії мРНК гена ІЛ-6 з допомогою малих шпилькових (мш) РНК.

↓

Етап 3

Дослідження ролі генів *pttg1* і *pttg-bp1* в регуляції остеобластної диференціації

- Дослідити ефекти надекспресії генів *pttg1* і *pttg-bp1* на ранні і пізні стадії остеобластної диференціації МСК миші, індукованої МПК2/7.
- Дослідити роль генів *pttg1* і *pttg-bp1* в регуляції ранніх і пізніх стадії остеобластної диференціації МСК миші, індукованої МПК2/7, шляхом блокування експресії мРНК цих генів з допомогою мшРНК.

↓

Етап 4

Аналіз ефектів *in vitro* похідних 4-тіазолідинону щодо опосередкованого ФНП-α інгібування остеобластної диференціації

- Дослідити цитотоксичну дію сполук похідних 4-тіазолідинону щодо МСК миші.
- Оцінити протизапальну активність похідних 4-тіазолідинону щодо опосередкованих ФНП-α прозапальних ефектів під час остеобластної диференціації клітин у різному діапазоні концентрацій (0,02; 0,1; 0,3 і 1 мкМ).
- З’ясувати молекулярний механізм протизапальної активності досліджуваних сполук.

Рис. 2.1. Схема досліджень (продовження).

На першому етапі отримано і проведено оптимізацію остеоіндуктивних властивостей препаратів рекомбінантних МПК, необхідних для індукції остеобластної диференціації *in vitro*. Для цього спочатку порівнювали остеоіндуктивні властивості рекомбінантних гомодимерів МПК2/2, МПК6/6 і гетеродимеру МПК2/7, а також було сконструйовано оптимізовані версії плазмід з генами, що кодують МПК2 і МПК7. Для отримання препаратів рекомбінантних МПК використовували загальноприйняту модель – клітини лінії НЕК293. Дію різних співвідношень рекомбінантних МПК2 і МПК7 в отриманих препаратах на остеобластну диференціацію *in vitro* досліджували на моделі МСК лінії С2С12. Також вивчали можливість збереження остеоіндуктивних властивостей препаратів отриманих рекомбінантних МПК2/7 після їх короткотривалого зберігання при низьких температурах.

Окрім того, на МСК миші лінії С2С12 досліджували біосумісність та остеоіндуктивні властивості кістковопластичних матеріалів на поліуретановій основі.

На другому етапі проводили експерименти щодо оцінки функціонального вкладу взаємодії ІЛ-6 і ФНП-α в інгібування остеобластної диференціації. Зокрема, на синовіальних фібробластах людини і фібробластах миші досліджували ефекти ІЛ-6 на активацію сигнального шляху Wnt за умови впливу ФНП-α. Також вивчали роль ІЛ-6 в регуляції ранніх і пізніх стадій МПК2/7-індукованої остеобластної диференціації МСК миші ліній С2С12 і KS483, шляхом блокування експресії мРНК гена *ІЛ-6* з допомогою мшРНК.

На третьому етапі досліджували роль генів *pttg1* і *pttg-bp1* в активації сигнальних шляхів МПК і Wnt. Зокрема, досліджували ефекти надекспресії генів *pttg1* і *pttg-bp1* та блокування експресії їх мРНК з допомогою відповідних мшРНК на ранні і пізні стадії остеобластної диференціації МСК миші, індукованої МПК2/7.

На четвертому етапі проводили аналіз ефектів *in vitro* похідних 4-тіазолідинону щодо опосередкованого ФНП-α інгібування остеобластної диференціації МСК миші лінії С2С12. Попередньо досліджували цитотоксичну

дію даних сполук на модельну культуру клітин. Протизапальну активність похідних 4-тіазолідинону під час остеобластної диференціації вивчали у вузькому і широкому діапазоні концентрацій (0,02; 0,1; 0,3 і 1 мкМ). Для з'ясування імовірного молекулярного механізму, що опосередковує протизапальні ефекти досліджуваних похідних 4-тіазолідинону, визначали рівень активації сигнального шляху NF-κB, через детекцію рівня експресії гена протеїну I-κBα.

2.2 Матеріали

Клітинні лінії. Для досліджень використовували такі клітинні лінії, як: іммортолізовані МСК миші ліній C2C12, придбані в Банку клітинних ліній American Type Culture Collection (ATCC), і KS483, надані професором C. Lowik (Нідерланди), а також фібробласти миші лінії NIH-3T3, надані професором P. ten Dijke's (Нідерланди), і клітини лінії HEK293, придбані в Банку клітинних ліній ATCC.

Окремі експерименти проводили на людських первинних синовіоцитах (fibroblast-like synoviocytes, FLS), виділених з синовіальних біопсій пацієнтів хворих на РА відповідно до критеріїв Американської колегії ревматології [10, 71], а також на МСК людини, виділених з аспірату кісткового мозку хірургічного матеріалу після операції ендопротезування кульшового суглоба з інформованої згоди пацієнтів. Плюрипотентність людських МСК оцінювали за їх здатністю диференціювати в остеобласти, адипоцити і хондроцити під впливом необхідних для цього стимулів та умов.

Весь людський матеріал зібрано після узгодження з Експертною радою організації Академічного медичного центру/Амстердамського університету в Нідерландах (Протокол MEC 07/079 #10.17.0708, 12/05/2010) та надання інформативної згоди пацієнтами.

У роботі також використовували мультиклональні культури клітин ліній C2C12 і KS483 зі стабільною експресію генів мшРНК, які специфічно блокують

експресію мРНК генів ІЛ-6, *pttg1* і scr мшРНК. Зазначені культури клітин отримані к.б.н. Корчинським О. Г. в Лайденському університеті (Нідерланди) на умовах співпраці.

Ліганди. Залежно від типу експерименту, клітини у відповідних варіантах і різних поєднаннях обробляли 10 нг/мл рекомбінантного ФНП-α, 100 нг/мл рекомбінантного ІЛ-6 і 500 нг/мл рекомбінантної розчинної форми рецептора до ІЛ-6 (ІЛ-6Р). Усі ліганди придбані у фірми «R&D Systems» (США). Альтернативно, у деяких експериментах поєднання ІЛ-6 з ІЛ-6Р було замінено на наданий професором S. Rose-John (Німеччина) гібридний протеїн Hyper-ІЛ-6, який використовували у концентрації 10 нг/мл [63, 180]. Рекомбінантний МПК6 отриманий від доктора K. Sampath («Curis, Inc.», США). Людські варіанти рекомбінантних МПК2 і МПК7, а також гетеродимерна форма МПК2/7 придбані у фірм «PeproTech» (США) і «R&D Systems» (США), відповідно. Рекомбінантні МПК2 і МПК6 використовували у концентрації 50 нг/мл, а МПК2/7 – у концентрації 10 нг/мл.

Плазмідні конструкції. Плазміди, які містять гени протеїнів МПК2 і МПК7 придбані у фірми «Open Biosystems/GE Healthcare» (США). Плазміди pShuttle, pShuttle-CMV і Easy1 (компоненти системи AdEasy, що розроблена для отримання рекомбінантних аденовірусів) надані доктором B. Vogelstein (США). Плазміда pPGK-mWnt3a-neo надана докторами R. і S. Takada (Японія). Репортерна система Bat-Luc, специфічна для сигнального шляху Wnt і плазміда pCMV-DKK-1 надані доктором S. Piccolo (Італія). Плазміда pCMV-β-Gal придбана у фірми «Clontech-Takara» (США). Плазміду pcDNA3 придбано у фірми «Invitrogen» (Нідерланди).

Малі шпилькові РНК (мшРНК). Набір перевірених лентивірусних конструкцій, які містять гени мшРНК, що специфічно пригнічують експресію мишачих варіантів мРНК генів *ІЛ-6*, *pttg1* і *pttg-bp1* придбані як частина MISSION shRNA library у фірми «Sigma-Aldrich/Merck» (США).

Похідні 4-тіазолідинону. Сполуки, які використовували у дослідженнях, Les-3882, Les-3288, Les-4368 і Les-4370, були синтезовані під керівництвом д.фарм.н., професора Лесика Р. Б. на кафедрі фармацевтичної, органічної і

біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Їх синтез і фізико-хімічні властивості описані в [80, 182]. Нові похідні 4-тіазолідинону відрізняються між собою наявністю і розміщенням у молекулі специфічних функціональних груп (рис. 2.2).

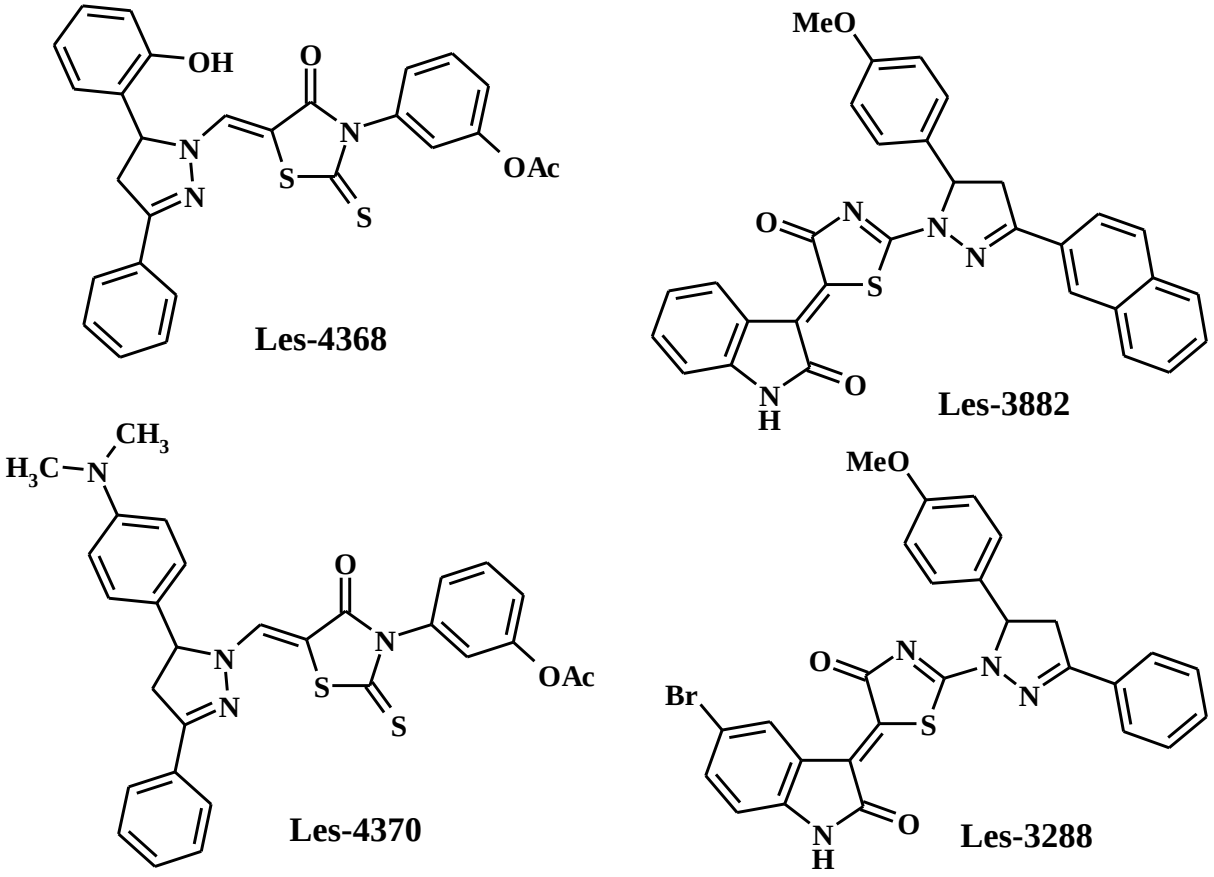
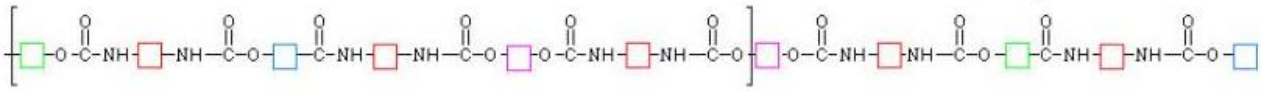


Рис. 2.2. Хімічна структура досліджуваних нових похідних 4-тіазолідинону [136].

Безпосередньо перед використанням досліджувані сполуки розчиняли в чистому диметилсульфоксиді (ДМСО) фірми «Сфера Сім» (Україна) у концентрації 1мМ. Наступні розведення сполук проводили в середовищі Ігла в модифікації Дульбекко (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) фірми «Biowest» (Франція) з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (Fetal Bovine Serum, FBS) фірми «Biowest» (Франція). Кінцева концентрація ДМСО у культуральному середовищі не перевищувала 0,1 %.

Кістково-пластичні поліуретанові матеріали. У дослідженнях використовували кістково-пластичний матеріал на поліуретановій основі (PURs) і його модифікований варіант (PURs-M) з включеннями гліцерофосфату кальцію (рис. 2.3, А і Б), які були надані Державним університетом «Гданська Політехніка» (Польща). Їх синтез і фізико-хімічні властивості описані в **[**121].

А



Б

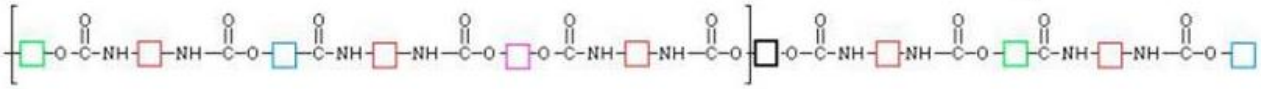
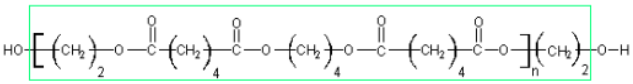
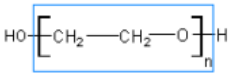


Рис. 2.3. Схема хімічної структури досліджуваних матеріалів на поліуретановій основі: А – PURs; Б – PURs-M [121].

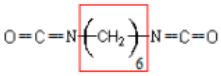
Примітка. На рисунку схематично зображені такі компоненти, як:



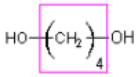
поліестер α,ω-дигідрокси (етилен-бутилен адипат)



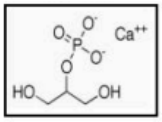
поліетиленгліколь



1,6-гексаметилендиізоціанат



1,4-бутандіол



β-гліцерофосфат кальцію

2.3 Біохімічні методи

2.3.1 Аналіз репортерного гена люциферази

Культуру людських МСК висівали у 12-лункові пластикові культуральні планшети. Концентрація клітин при висіванні становила $1x10^4$ на $см^2$. Через 24 год проводили тимчасову трансдукцію плазмідною конструкцією на основі аденовірусу з МПК-специфічним люциферазним репортером BRE-Luc (рис. 2.4, А) за множинності інфекції (MOI) 190 у поєднанні з аденовірусною конструкцією, яка містить ген β-галактозидази (при MOI=10).

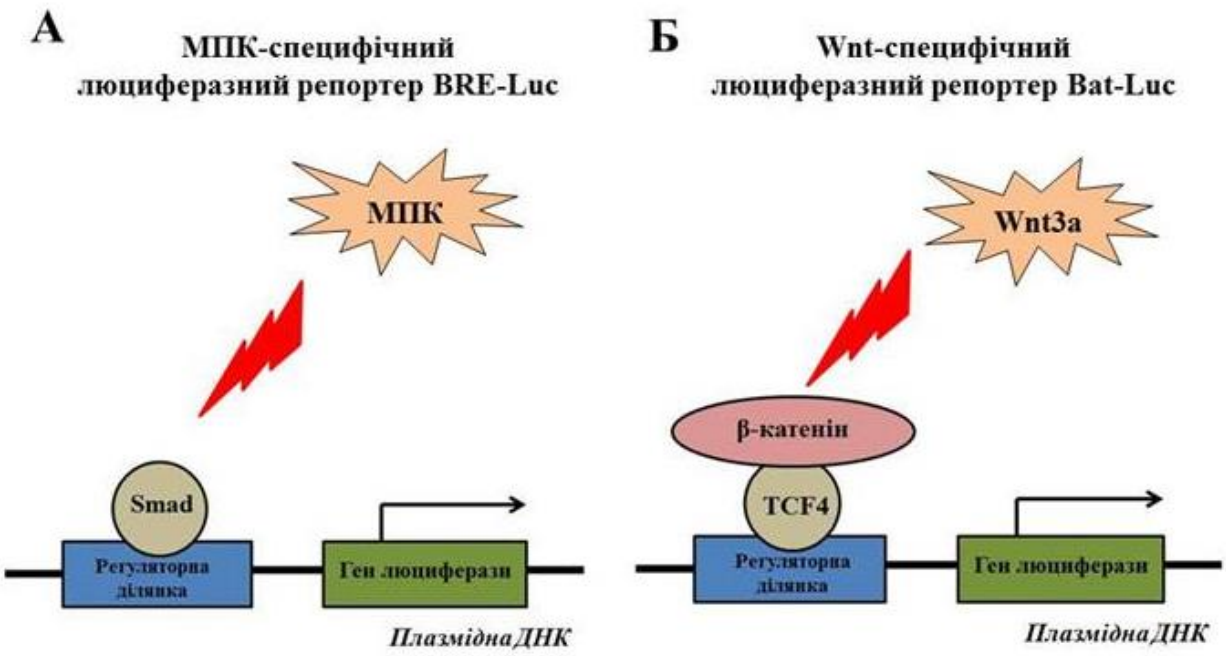


Рис. 2.4. Схематичне зображення люциферазних репортерних систем.

Примітка. Активація МПК-специфічного люциферазного репортеру BRE-Luc здійснювалась після стимуляції клітин-мішеней МПК (А), тоді як Wnt-специфічний люциферезний репортер Bat-Luc у клітинах-мішенях активували надекспресією гена ліганда Wnt3a за допомогою відповідної аденовірусної конструкції (Б).

Після 6 год інкубації культуральне середовище змінювали на свіже. Чере 36 год після трансфекції, клітини витримували протягом 12 год у середовищі DMEM з додаванням 0,1% FBS, після чого знову змінювали середовище на теж саме, але вже з відповідними лігандами та інкубували протягом наступних 12-15 год.

Культуру FLS висівали у 12-лункові пластикові культуральні планшети. Концентрація клітин при висіванні становила $1x10^4$ на $см^2$. Через 24 год проводили тимчасову трансдукцію плазмідною конструкцією на основі аденовірусу з Wnt-специфічним люциферезним репортером Bat-Luc (рис. 2.4, Б) за MOI=200 у поєднанні з аденовірусною конструкцією, яка містить ген β-галактозидази (MOI=20). Після 12 год інкубації, клітинні моношари промивали безсироватковим середовищем і, у відповідних варіантах, проводили трансдукцію аденовірусними конструкціями з генами, які кодують Wnt3a чи зелений флуоресцентний протеїн (Green Fluorescent Protein, GFP), який використовували для вирівнювання загального титру вірусу, за сумарної MOI=600 або 300. Через 12 год клітинні моношари промивали безсироватковим середовищем, додавали свіже повноцінне культуральне середовище з відповідними лігандами та інкубували протягом наступних 48 год.

Клітини лінії NIH-3T3 висівали у 12-лункові пластикові культуральні планшети. Концентрація клітин при висіванні становила $1,5x10^4$ на $см^2$. Через 24 год проводили тимчасову трансфекцію плазмідною конструкцією з Wnt-специфічним люциферезним репортером Bat-Luc (рис. 2.4, Б) у поєднанні з плазмідною конструкцією, яка містить ген β-галактозидази та у відповідних варіантах – плазмідою, що кодує ген *DKK1*. Трансфекцію здійснювали з використанням трансфекційного реагенту – поліетиленіміну (polyethylenimine, PEI) фірми «Polysciences» (США). Плазміду pcDNA3 використовували як контроль.

Одночасна трансфекція чи трансдукція плазмідою, що містить ген β-галактозидази проводилась як внутрішній контроль для нормалізації ефективності трансфекції чи трансдукції. Аналіз активності люциферази (КФ 1.13.12.7) здійснювали за допомогою тест-набору фірми «Promega» (США). Вимірювання

біолюмінісцентної активності люциферази в клітинних лізатах проводили за допомогою люмінометра Victor2 «Perkin Elmer» (США).

2.3.2 Визначення активності β-галактозидази

Визначення активності β-галактозидази (КФ 3.2.1.23) в клітинних лізатах проводили фотометричним методом з використанням *о*–нітрофеніл-β-D-галактопіранозиду як субстрату згідно загальноприйнятої методики [116]. Зокрема, клітини лізували і визначали загальну концентрацію протеїну в екстрактах. Після цього відбирали аліквоту і змішували з буфером, що містив 100 мМ гідрофосату натрію/дигідрофосату натрію, 1 мМ хлорид магнію, 100 мМ 2-меркаптоетанол і *о*–нітрофеніл-β-D-галактопіранозиду у концентрації 0,67 мг/мл. Після чого інкубували при 37°С до появи жовтого забарвлення. Оптичну густину вимірювали при λ=420 нм (optical density, OD_{420}).

2.3.3 Визначення активності лужної фосфатази

Аналіз активності лужної фосфатази (ЛФ, КФ 3.1.3.1) у клітинних лізатах проводили спектрофотометрично з використанням π-нітрофенілфосфату (π-nitrophenylphosphate, π-NPP) як субстрату [199]. Через 4 доби після індукції остеобластної диференціації клітинні моношари спочатку двічі промивали однократним фосфатно-сольовим буферним розчином (phosphate-buffered saline, PBS), а потім у кожну лунку культурального пластикового планшету додавали по 0,2 мл лізисного буферу (10 мМ гліцин, 100 мкМ хлорид магнію, 10 мкМ хлорид цинку, 0,1% Triton X-100) і акуратно помішували протягом 5 хв. Після цього 10 мкл клітинного лізату вносили в 96-лунковий пластиковий планшет і додавали 90 мкл аналітичного буферу (100 мМ гліцин, 1 мМ хлорид магнію, 100 мкМ хлорид цинку) з 6 мМ π-NPP («Pierce-Thermo Fisher Scientific», США) [199], акуратно перемішували та інкубували при кімнатній температурі до появи жовтого забарвлення. Оптичну густину вимірювали при λ=405 нм (optical density, OD_{405}) в

скануючому планшет-рідері Absorbance Reader BioTek EL*800 («BioTek Instruments, Inc.», США). Рівень активності ЛФ прямо пропорційний інтенсивності остеобластної диференціації МСК.

2.3.4 Вестерн-блот аналіз протеїнів клітин

Культуру клітин лінії C2C12 висівали у чашки Петрі «Anumbra» діаметром 6 см. Після обробки клітин досліджуваними сполуками і відповідними лігандами, проводили їх лізис у буфері, що містив 20 мМ TRIS-HCl (pH 7,4), 150 мМ хлорид натрію, 0,5% Triton X-100, 50 мМ флуорид натрію і 1 мМ фенілметилсульфонілу флуорид (ФМСФ). Після чого при 4ºС клітинні лізати відцентрифуговували на центрифузі фірми «Jouan» (Франція) при 12-14 000 об/хв та відбирали супернатант, що містив протеїни. Далі проводили вимірювання загальної концентрації протеїну за допомогою спектрофотометра ND-1000 фірми «Thermo Fisher Scientific» (США). Вирівнювання концентрації протеїну в різних зразках здійснювали шляхом його розведення. Кінцева загальна концентрація протеїну при нанесенні становила 20 мкг на лунку. Фракціонування протеїнів здійснювали за допомогою електрофорезу у 12% поліакриламідному гелі при наявності додецилсульфату натрію фірми «Сфера Сім» (Україна). Далі протеїни з електрофорезного гелю переносили на мембрану з полівінілденфториду («Merck Millipore», США). Для проведення трансферу використовували трансблотер фірми «Thermo Fisher Scientific» (США). Подальший імуноблот-аналіз проводили як зазначено у [87].

Для детекції протеїну I-κBα використовували специфічні антитіла («Santa Cruz Biotechnology», США) у розведенні 1:10000. Для оцінки рівномірності нанесення протеїну проводили імуноблот-аналіз тієї ж мембрани з використанням мишачих моноклональних антитіл AC-15 («Sigma Aldrich/Merck», США) до β-актину у розведенні 1:5000. Відповідні вторинні антитіла («Cell Signaling Technology», США), зв’язані з пероксидазою, використовували у розведенні 1:10000.

2.3.5 Аналіз цитотоксичності нових похідних 4-тіазолідинону і поліуретанових матеріалів

МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід («Sigma Aldrich», США) – це тетразолієва сіль, яку використовують для проведення колориметричного тесту (МТТ-тест), що дозволяє оцінити метаболічну активність, а отже і життєздатність клітин. Для цього культуру клітин лінії С2С12 висівали в 24-лункові пластикові культуральні планшети. Концетрація клітин при висіванні становила 30 000 в одну лунку. Через 24 год додавали досліджувані похідні 4-тіазолідинону (кінцеві концентрації становили 0,02; 0,01; 0,5; 1,0 мкМ від загального об'єму) або ж екстракти досліджуваних поліуретанових матриксів (кінцеві концентрації становили 25%, 50%, 75% і 100% від загального об'єму) та інкубували протягом 72 год. Далі проводили МТТ аналіз життєздатності клітин згідно з рекомендаціями виробника.

Оптичну густину кінцевого забарвленого продукту вимірювали при λ=570 нм (OD_{570}) на сканувальному планшет-рідері Absorbance Reader BioTek EL*800 («BioTek Instruments, Inc.», США). Кількість життєздатних необроблених клітин приймали за 100%.

2.4 Молекулярно-біологічні методи

2.4.1 Тимчасова трансфекція клітин ліній С2С12 і KS483

Культури клітин висівали в 12- або 24-лункові пластикові культуральні планшети. Концентрація клітин при висіванні становила $1,5x10^4$ на $см^2$. Через 24 год проводили трансфекцію плазмідними конструкціями (з розрахунку 0,5 мкг сумарної ДНК на лунку), які містять гени мшРНК, що специфічно блокують експресію мРНК генів ІЛ-6, *pttg1*, *pttg-bp1* або scr мшРНК, що не має гена-мішені і використовувалась як контроль. Трансфекцію проводили з використанням

трансфекційного реагенту GeneJuice («Merck Millipore», США) згідно рекомендацій виробника.

2.4.2 Стабільна трансфекція клітин ліній C2C12 і KS483

Клітини культивували в повноцінному середовищі протягом ночі. Лентивірусні частинки додавали за MOI=5 і =10 за наявності диметилетаноламіну (ДМЕА)-декстрину та інкубували протягом 24 год. Після зміни культурального середовища, клітини інкубували протягом додаткових 24 год. Через дві доби проводили селекцію трансдукованих клітин за стійкістю до пуроміцину (3-4 мкг/мл) фірми «PanreacAppliChem» (Іспанія).

В експериментах використовували резистентні до пуроміцину мультиклональні культури клітин C2C12 і KS483, які були перевірені на біобезпеку (присутність у культуральному середовищі протеїну p24) за допомогою ELISA і привезені в Україну для намноження потрібної біомаси. Попередньо, була перевірена ефективність мшРНК-опосередкованого нокдауну генів *ІЛ-6* і *pttg1* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (Real-time PCR).

2.4.3 Трансфекція клітин лінії HEK293

Клітини лінії HEK293 висівали у чашки Петрі «Anumbra» діаметром 6 або 9 см, залежно віж типу експерименту. Концетрація клітин на час трансфекції становила 60-70% від стану конфлюенту. Через 24 год проводили трансфекцію плазмідами з генами МПК2, МПК7 і контрольною плазмідою – pcDNA3 (з розрахунку 5 чи 20 мкг/мл сумарної ДНК на чашку залежно від її діаметру). Трансфекцію проводили з використанням трансфекціного реагента – PEI фірми «Polysciences Inc.» (США) згідно рекомендацій виробника.

Через 6-7 год після трансфекції проводили заміну культурального середовища на свіже.

2.4.4 Створення рекомбінантних аденовірусних векторів

Аденовіруси, що кодують МПК2, МПК7, Wnt3a і Bat-Luc були сконструйовані канд.біол.наук Корчинським О. Г. і нарощені як описано в [71]. Для створення аденовірусів, які експресують гени протеїнів МПК2, МПК7 і Wnt3a, повнорозмірна комплементарна ДНК (кДНК) була клонована у плазміду pShuttle-CMV. Вектор pShuttle використовували для створення аденовірусів, що експресують репортерний ген люциферази Bat-Luc. Отримані конструкції pShuttle-CMV чи pShuttle лінеаризували за допомогою ендонуклуеази рестрикції PmeI і з'єднували у векторі Easy-1. Отримані косміди лінеаризували за допомогою ендонуклуеази рестрикції PacI і піднарощували у вигляді аденовірусів за допомогою клітин лінії HEK293 [71].

2.4.5 Створення оптимізованих варіантів векторів для експресії генів протеїнів МПК2 і МПК7

Повнорозмірні кДНК МПК2 і МПК7 людини були виділені за допомогою рестрикційних ферментів EcoRI і NotI для того, щоб перенести їх із не-експресійного вектора pINCY («Mammalian Gene Collection», MGC) у вектор pDEF, який забезпечує високий рівень експресії в клітинах ссавців [115]. Конструкції МПК2-DEF і МПК7-pSport6.1 обробляли за допомогою рестрикційних ферментів KpnI і NotI для того, щоб перенести ці повнорозмірні кДНК до експресійного вектора pShuttle-CMV, який несе в собі ген стійкості до канаміцину.

2.5 Індукція остеобластної диференціації клітин ліній C2C12 і KS483

Клітини висівали у 12- або 24-лункові пластикові культуральні планшети. Концентрація клітин при посіві становила $1{,}5x10^4$ на $см^2$. Через 24 год після посіву або ж тимчасової трансфекції для індукції утворення гетеродимерів

МПК2/7 разом з відповідними гомодимерами проводили ко-трансдукцію аденовірусними конструкціями з генами МПК2 і МПК7. Ко-трансдукцію здійснювали за MOI до 500 для кожної із зазначених конструкцій [114]. Під час короткотривалих досліджень остеобластної диференціації, клітини ліній C2C12 і KS483 культивували протягом 4 діб у диференційному середовищі з додаванням 50 мкг/мл аскорбінової кислоти («Sigma Aldrich/Merck», США). Під час довготривалих досліджень клітини лінії KS483 культитвували протягом 18-21 дня у диференційному середовищі з додаванням 50 мкг/мл аскорбінової кислоти від початку індукції та 5 мМ β-гліцерофосфату («Sigma Aldrich/Merck», США) з 10 доби досліду.

2.6 Приготування екстрактів поліуретанових кістковопластичних матеріалів

Для отримання екстрактів досліджуваних поліуретанових кістковопластичних матеріалів (PURs і PURs-M), готували наважки цих матриксів масою 10 мг кожний і стерилізували під ультрафіолетовим випромінюванням протягом 30 хв з кожної сторони. Потім наважки матриксів додавали у співвідношенні 1:100 (*w*/*v*) до попередньо підготовленого культурального середовища DMEM з додаванням 10% FBS. Після цього препарати кістковопластичних матеріалів інкубували протягом ночі при 37°C при постійному перемішуванні. Наступного дня препарати витримували протягом одного тижня при 4°C. Для покращення процесу екстракції, процедуру повторювали.

2.7 Збір і зберігання кондиціонованого середовища, що містило МПК

Кондиціоноване середовище (КС), яке містило гомо- чи гетеродимери МПК2 і МПК7 або ж їх поєднання збирали через 48 год після трансфекції клітини лінії HEK293. Залежно від типу експерименту, КС зберігали у пробірках при 4°C в

холодильній камері або при –70°С в морозильній камері з низькотемпературним режимом («NuAire», США). Кріопротектори чи спеціальні методики кріоконсервації не використовували у зв'язку з відсутністю живих клітин у препаратах.

2.8 Умови культивування клітин

МСК миші ліній C2C12 і KS483, а також фібробласти миші лінії NIH-3T3 і клітини лінії HEK293 культивували в середовищі DMEM за присутності 10% FBS, 2 мМ глутаміну і 25 мкг/мл гентаміцину. Клітини пасажували через кожні дві-три доби з метою уникнення досягнення ними стану конфлюенту. Перед кожним субкультивуванням клітини промивали однократним розчином PBS, що містив 137 мМ хлориду натрію, 2,7 мМ хлориду калію, 4,3 мМ гідрофосфату натрію і 1,4 мМ дигідрофосфату калію з pH 7.4. Під час проведення тимчасової трансфекції клітини культивували в середовищі DMEM з додаванням 4% FBS і через 16 год середовище DMEM замінювали на свіже з додаванням 10% FBS.

Людські МСК культивували в середовищі DMEM з низьким вмістом глюкози (1 мг/мл) за присутності 10% FBS, 2 мМ глутаміну, 25 мкг/мл гентаміцину та 10 нг/мл рекомбінантного фактора росту фібробластів 2 (fibroblast growth factor, FGF2) фірми «Peprotech» (США). Клітини пасажували у пропорції 1:3 в міру досягнення ними конфлюенту. В експериментах людські МСК використовували з четвертого до восьмого пасажу.

Первинні FLS культивували як описано в [71] і використовували для досліджень між четвертим і дев'ятим пасажами. Перед проведенням експериментів клітини протягом ночі вирощували у середовищі DMEM за присутності 1% FBS фірми «Invitrogen» (Нідерланди), 2 мМ глутаміну і 25 мкг/мл гентаміцину.

Усі клітинні лінії інкубували в CO_2-інкубаторі фірми «Sanyo» (Японія) при 37°С в атмосфері з 5%-вмістом CO_2 та вологістю 100%. Перед проведенням експериментів життєздатність клітин перевіряли фарбуванням 0,1% розчином

трипанового синього. Кількість клітин підраховували в гемоцитометричній камері за допомогою світлового мікроскопу «МИКМЕД 5» фірми «ЛОМО» (Росія). Допустима кількість мертвих клітин не перевищувала 5%.

2.9 Гістохімічне забарвлення ділянок мінералізації алізариновим червоним S

Виявлення ділянок мінералізації під час остеобластної диференціації клітин лінії KS483 проводили шляхом специфічного гістохімічного фарбування солей кальцію алізариновим червоним S («ICN», США) [199]. Для цього клітинні моношари промивали однократним розчином PBS і фіксували 10% (v/v) розчином формальдегіду протягом 5 хв при кімнатній температурі. Перед додаванням 2% розчину алізаринового червоного S (pH 5,5), клітинні моношари промивали деіонізованою водою (de-ionized water, DIW). Культуральний пластиковий планшет з клітинами інкубували протягом 2-5 хв при кімнатній температурі, акуратно помішуючи. Після аспірації неінкорпорованого барвника, клітинні моношари у кожній лунці двічі промивали 0,4 мл DIW і раз 3 мл DIW, при цьому помішуючи протягом 5 і 20 хв, відповідно. Після цього клітинні моношари витримували в однократному розчині PBS і сканували на сканері фірми «Xerox» (США).

2.10 Статистичні методи

Всі досліди повторювали не менше 2-3 разів. При цьому кількість паралельних експериментів у кожному варіанті становила як мінімум 2-3. Кожна ордината гістограм, подана на рисунках, відповідає середньому значенню, розрахованому з результатів 2-3 вимірювань в одному з декількох однотипних експериментів. Аналіз результатів експериментів проводили за допомогою програмного забезпечення «GraphPad Prism 6». Статистичне опрацювання результатів досліджень проводили з використанням t-критерію Стьюдента.

Порівняння двох мінливих величин здійснювали на підставі показника статистичної значущості відмінностей «*p*». Відмінність між двома величинами вважали достовірною, коли величина «*p*» була меншою за 0,05.

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Створення оптимізованих препаратів рекомбінантних МПК

Метою даного етапу дослідження була оптимізація остеоіндуктивних властивостей препаратів рекомбінантних МПК, необхідних для індукції остеобластної диференціації *in vitro*, зокрема у наступних етапах досліджень, або ж для створення високоефективних кістково-пластичних матеріалів для регенерації кісткової тканини.

Для цього спочатку було проведено порівняльне дослідження остеоіндуктивних властивостей рекомбінантних гомодимерів МПК2/2, МПК6/6 і гетеродимеру МПК2/7. Оскільки, остеоіндуктивні властивості різних МПК прямо залежать від інтенсивності активації їх сигнального шляху, у даному експерименті було використано МПК-специфічний люциферазний репортер BRE-Luc, який дозволяє у широкому лінійному діапазоні кількісно оцінити рівень активації Smad-залежного сигнального шляху МПК.

Як показано на рис. 3.1, активація сигнального шляху МПК в МСК людини спостерігалась при використанні 50 нг/мл рекомбінантних гомодимерів МПК6/6. З іншого боку, активація МПК-чутливої репортерної системи у клітинах, оброблених гомодимерами МПК6/6, була вдвічі вищою ніж активація у клітинах, оброблених гомодимерами МПК2/2 тієї ж концентрації. У додатковому експерименті для такої ж активації сигнального шляху МПК, використовували гомодимери МПК7/7 у три рази вищій концентрації.

Водночас, гетеродимери МПК2/7 у концентрації 10 нг/мл були в 1,76 разу ($p \leq 0,01$) потужнішими активаторами Smad-опосередкованого сигнального шляху МПК, ніж гомодимери МПК2/2, а також виявили порівнюваний ефект з гомодимерами МПК6/6, які використовували у п’ять разів вищій концентрації (рис. 3.1).

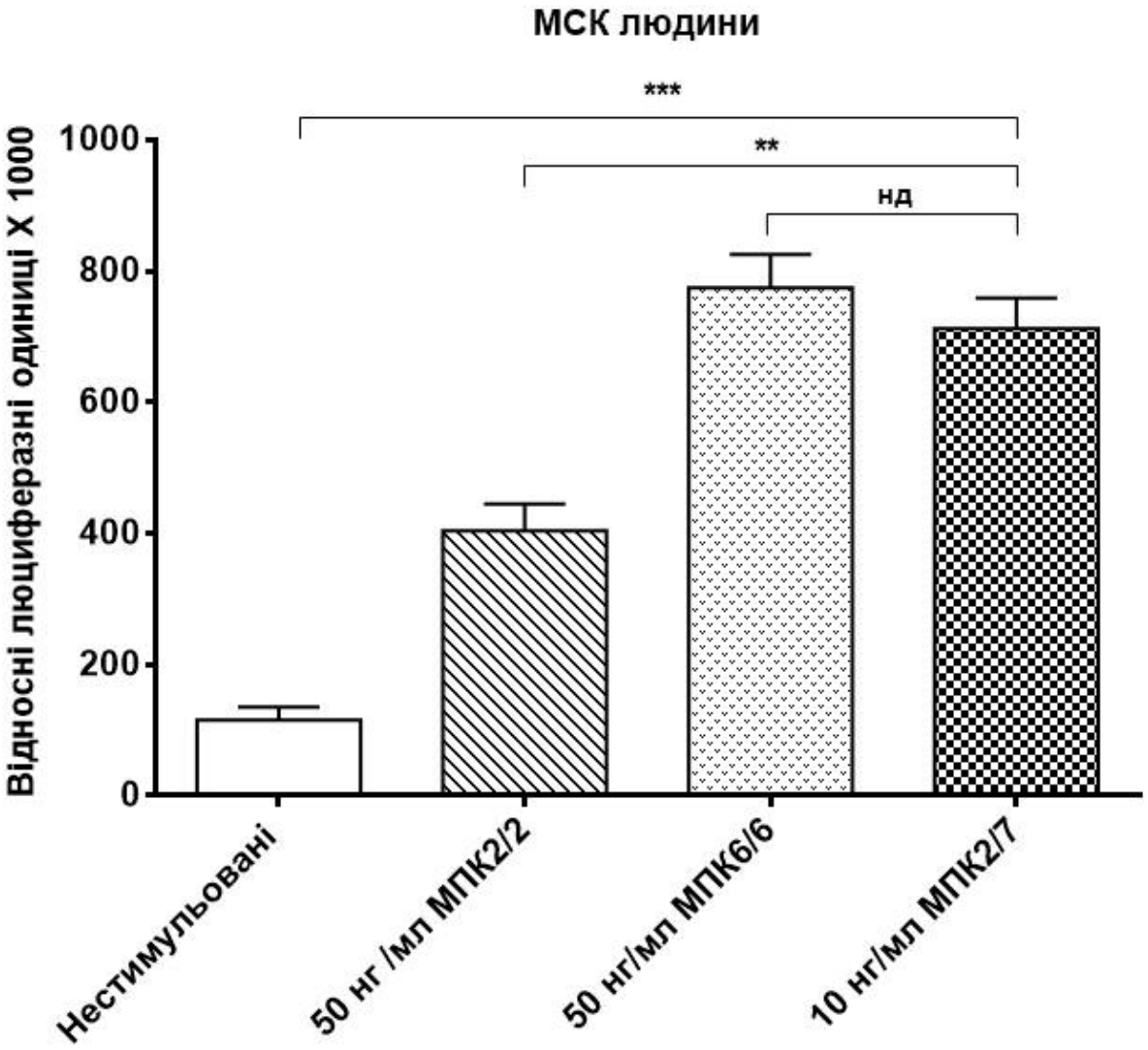


Рис. 3.1. Активність люциферази у лізатах МСК людини після обробки рекомбінантними гомодимерами МПК2/2, МПК6/6 і гетеродимерами МПК2/7 у зазначених концентраціях.

*Примітка. Статистична достовірність даних зазначена: ** – $p \leq 0{,}01$; *** – $p \leq 0{,}001$; нд – недостовірно.*

Для підбору оптимальних комбінації МПК у препаратах, що демонструють найкращий остеоіндуктивний ефект, було вивчено дію різних співвідношень рекомбінантних МПК2 і МПК7 у цих препаратах на остеобластну диференціацію *in vitro*. Остеоіндуктивні властивості отриманих препаратів МПК тестували на клітинах лінії С2С12, які під дією різних МПК, зокрема МПК2 і МПК7, здатні

диференціювати у ранні остеобласти [100]. Для отримання препаратів рекомбінантних МПК було використано загальноприйняту модель – клітини лінії HEK293, яка, завдяки своїй високій ефективності, широко застосовується для різних дослідницьких цілей, зокрема для отримання рекомбінантних протеїнів.

Попередньо, для перевірки ефективності комбінованої дії МПК2 і МПК7 порівняно з їх гомодимерами, обидві кДНК зазначених протеїнів було клоновано в ідентичний вектор pShuttle-CMV. Клітини лінії HEK293 трансфікували плазмідними конструкціями з генами, які кодують структуру протеїнів МПК2 і МПК7, та контрольною плазмідою – pcDNA3, що не містить кодуючих послідовностей генів, продукти яких можуть вплинути на результати експерименту. Трансфекцію (або ко-трансфекцію) зазначеними плазмідами проводили у пропорціях, які представлені у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Співвідношення плазмід (%) з генами, які кодують структуру протеїнів МПК2 або МПК7 (попередня оцінка)

МПК2	100	75	50	25	0
МПК7	0	25	50	75	100

Через 48 год після трансфекції, збирали кондиціоноване середовище (КС), що містило секретовані клітинами гомо- або гетеродимери МПК2 і МПК7 у відповідних пропорціях. Далі це КС змішували у співвідношенні 1:1 із свіжим культуральним середовищем і проводили індукцію клітин лінії C2C12. Через дві доби повторно додавали КС, оскільки одноразова стимуляція призводила до низької індукції остеобластної диференціації цих клітин. Інтенсивність остеогенної диференціації визначали шляхом спектрофотометричного вимірювання активності ЛФ, яка широко використовується як маркер ранніх стадій остеогенезу [65, 100]. Як показано на рис. 3.2, гомодимери МПК2/2 так як і гомодимери МПК7/7, виявили відносно низькі остеоіндуктивні властивості –

відповідно у 2,74 ($p \leq 0,01$) і 2,52 ($p \leq 0,01$) разу вищі порівняно з контролем. Суміш цих плазмідних конструкцій в еквімолярних концентраціях була в 5,43 ($p \leq 0,001$) разу ефективнішою порівняно з нестимульованими клітинами.

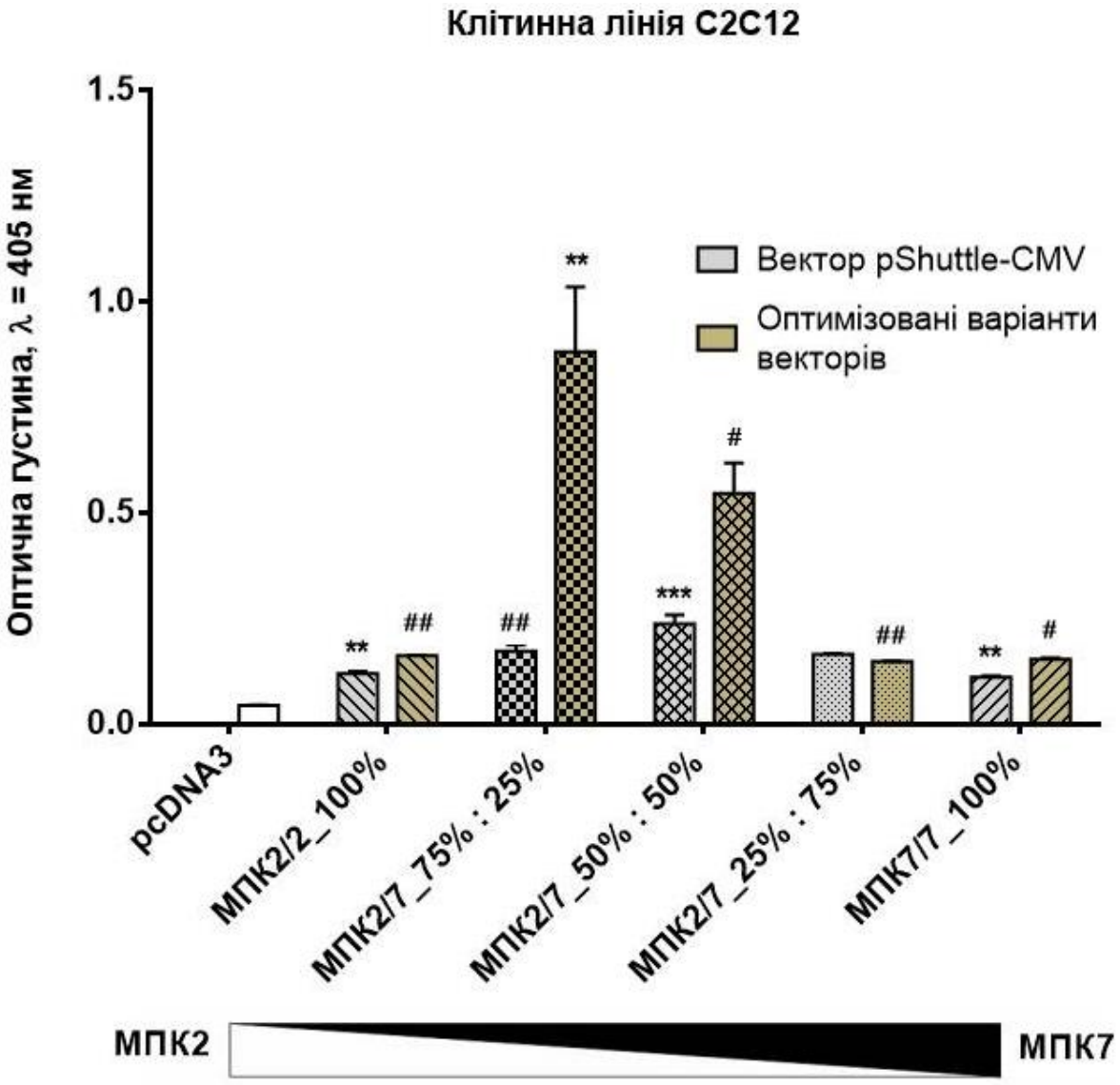


Рис. 3.2. Активність ЛФ у лізатах клітин лінії C2C12 після обробки КС, яке містило гомо- і/або гетеродимери МПК2 чи МПК7 у вказаних пропорціях.

*Примітка. Статистична достовірність даних зазначена: # – $p \leq 0,05$; ** (##) – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$, * – різниця порівняно з контролем, # – різниця порівняно з клітинами, обробленими препаратом МПК, що містив експресовані оптимізованими варіантами векторів МПК2 і МПК7 у пропорції 75 до 25 %.*

Враховуючи низьку остеоіндуктивну активність отриманих препаратів, була сконструйована оптимізована версія плазміди для експресії гена протеїну МПК2 шляхом його повторного клонування у вектор pDEF, що забезпечує високий рівень експресії рекомбінантних протеїнів [116].

Отриману конструкцію використовували паралельно з вектором pSport6.1 із субклонованим геном протеїну МПК7. На рис. 3.2 також відображено порівняння остеоіндуктивних властивостей препаратів рекомбінантних МПК, отриманих шляхом експресії генів протеїнів МПК2 і МПК7, клонованих у різних векторах одночасно в одному експерименті. Оптимізовані варіанти векторів (МПК2-pDEF у поєднанні з МПК7-pSport6.1) у випадку їх оптимального співвідношення, а саме 75 МПК2-pDEF і 25 % МПК7-pSport6.1, виявились у 5,13 ($p \leq 0,01$) разу ефективнішим, ніж початковий варіант (вектор pShuttle-CMV) і в 20,24 ($p \leq 0,01$) разу ефективнішим порівняно з контролем.

Наступний експеримент був проведений для більш точного визначення співвідношень концентрацій векторів, що експресують гени протеїнів МПК2 і МПК7, необхідних для отримання препарату МПК, який виявив найкращий остеоіндуктивний ефект у попередньому дослідженні.

Даний експеримент був проведений аналогічно попередньому. Трансфекцію (або ко-трансфекцію) клітин лінії НЕК293 плазмідними конструкціями з генами, які кодують структуру протеїнів МПК2 або МПК7 проводили у пропорціях, вказаних в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Співвідношення плазмід (%) з генами, які кодують структуру протеїнів МПК2 або МПК7 (точна оцінка)

МПК2	95	85	80	75	70	65	60	55
МПК7	5	15	20	25	30	35	40	45

Показано, що препарат рекомбінантих МПК, який містив 85 МПК2 і 15 % МПК7, виявився у 4,17 ($p \leq 0,001$) разу ефективнішим індуктором остеобластної диференціація клітин лінії С2С12 порівняно з контролем і у 1,19 ($p \leq 0,01$) разу ефективнішим, ніж препарат МПК, що містив МПК2 і МПК7 у пропорції 75 до 25 %, відповідно (рис. 3.3).

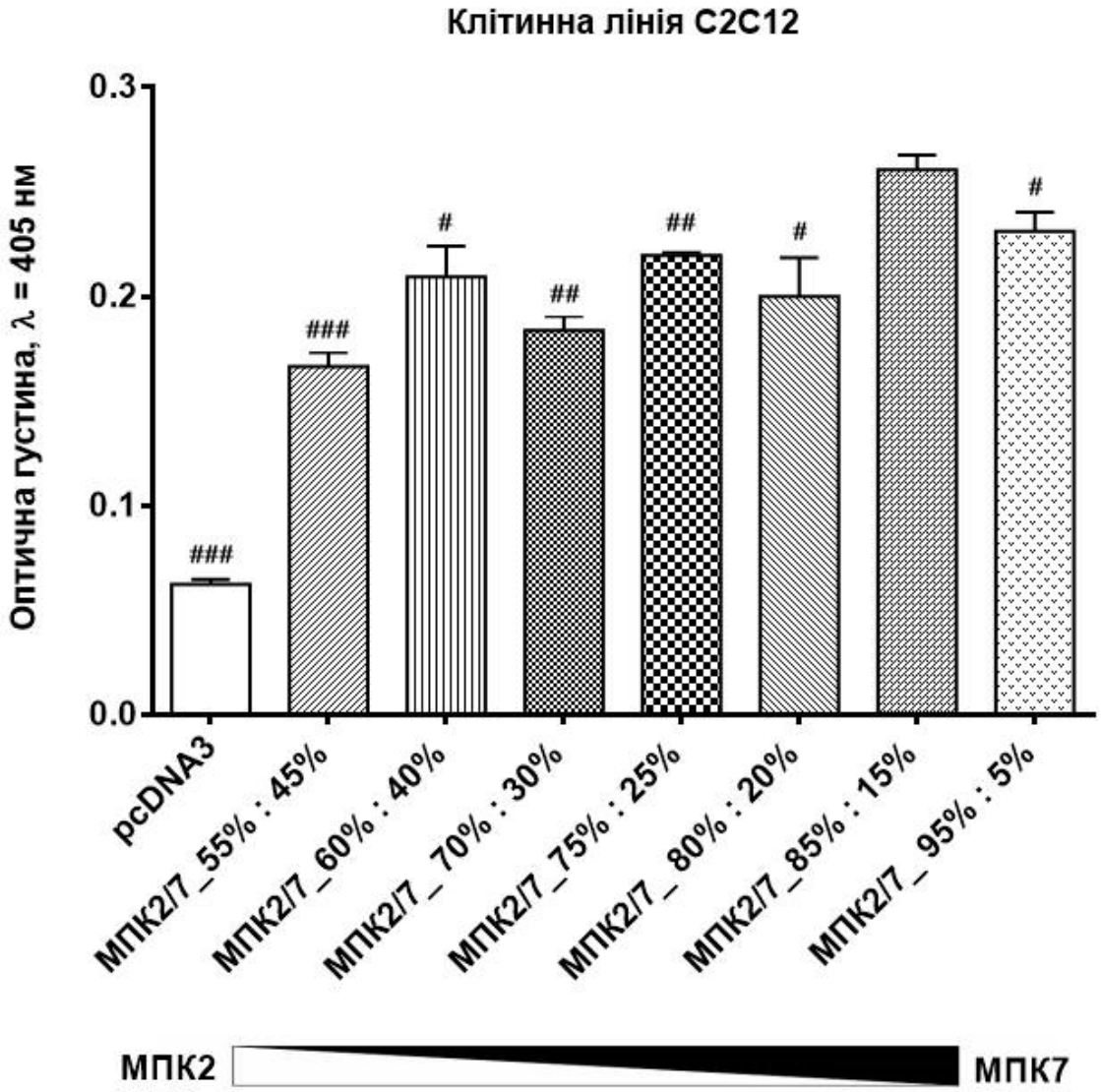


Рис. 3.3. Активність ЛФ у лізатах клітин лінії С2С12 після обробки КС, яке містило гомо- і/або гетеродимери МПК2 чи МПК7 у зазначених пропорціях.

Примітка. Статистична достовірність даних зазначена: # – $p \leq 0,05$; ## – $p \leq 0,01$; ### – $p \leq 0,001$, # – різниця порівняно з клітинами, обробленими препаратом МПК, що містив експресовані оптимізованими варіантами векторів МПК2 і МПК7 у пропорції 85 до 15 %.

Відомо, що процедура заморожування-розморожування препаратів, які містять протеїни, призводить до конформаційних змін останніх. Такі зміни можуть супроводжуватися структурними порушеннями, втратою біологічної активності і деградацією протеїнів, зокрема їх комплексів [4, 28]. Тому, у наступному експерименті було досліджено можливість збереження остеоіндуктивних властивостей препаратів отриманих рекомбінантних МПК після їх короткотривалого зберігання при низьких температурах.

Даний експеримент було проведено аналогічно попереднім дослідженням, але вже з використанням для трансфекції оптимізованих варіантів векторів, які містять гени протеїнів МПК2 і МПК7 у співвідношеннях, що наведені у таблиці 3.1. Одну частину аліквот КС, що містило рекомбінантні МПК2 і/або МПК7, зберігали при 4°С протягом 3 год, а другу частину – при –70°С протягом того ж періоду часу. Цього ж дня змішували свіже культуральне середовище у співвідношенні 1:1 із КС і проводили індукцію клітин лінії С2С12 у двох варіантах: А – КС після короткочасного зберігання при 4°С, і В – КС після короткочасного зберігання при –70°С. Через два дні після індукції остеобластної диференціації, проводили повторне додавання КС. Результати спектрофотометричного вимірювання активності ЛФ наведені на рис. 3.4.

Показано, що зберігання препаратів рекомбінантних МПК при низькій температурі (–70°С) протягом 3 год не призводило до суттєвої ($p>0,05$) втрати їх остеоіндуктивних властивостей порівняно з препаратами рекомбінантних МПК після їх зберігання при 4°С протягом того ж періоду часу (рис. 3.4).

У додатковому експерименті використовували аналогічне КС, яке зберігали при –20°С протягом трьох тижнів. Проте, достовірних втрат остеоіндуктивних властивостей препаратів МПК порівняно з контролем також виявлено не було.

Таким чином, отримані препарати рекомбінантних МПК можна успішно використовувати для стимуляції остеобластної диференціації *in vitro*, а також для створення високоефективних кістково-пластичних матеріалів для регенерації кісткової тканини або ж мати інше біологічне застосування.

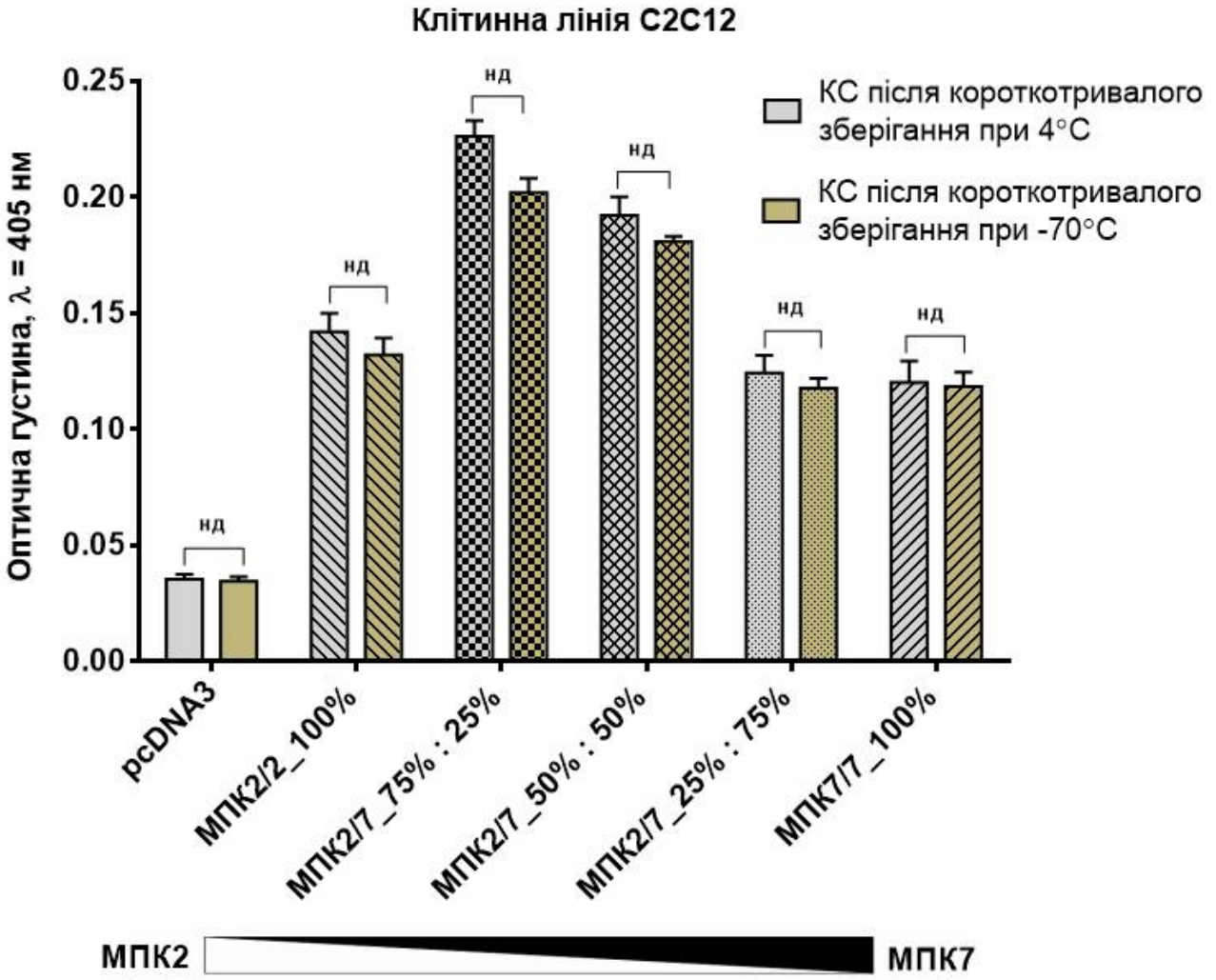


Рис. 3.4. Активність ЛФ у лізатах клітин лінії C2C12 після обробки КС, яке містило гомо- і/або гетеродимери МПК2 чи МПК7 у зазначених пропорціях.

Примітка. Статистична достовірність даних зазначена: нд – недостовірно.

3.1.1 Дослідження біосумісності та остеоіндуктивних властивостей біодеградабельних кістково-пластичних матеріалів на поліуретановій основі

Корекція спадкових аномалій скелету, дегенеративно-дистрофічні захворювання суглобів (серед яких наслідки РА), травми обширних ділянок кістки, переломи, що тривалий час не загоюються, потребують ефективного

відновлення кісткової тканини. З іншого боку, МПК є індукторами утворення кісткової тканини під час ембріогенезу, а також критично важливими для підтримання гомеостазу скелету [38]. Тому, на сьогодні високоперспективними є застосування кістково-пластичних матеріалів з використанням МПК для локальної індукції остеогенезу в зоні кісткового дефекту. На даний час актуальною є проблема вибору кістково-пластичного матеріалу, адже відомо, що саме остеопластика відкриває великі можливості для повної реабілітації пацієнтів [3].

Кістково-пластичні матеріали повинні володіти певними механічними, фізико-хімічними та біологічними властивостями, щоб забезпечити заданий характер взаємодії з внутрішнім середовищем організму. Зокрема, основними вимогами до ефективних кістково-пластичних матеріалів є: біосумісність, біодеградабельність і остеоіндуктивні властивості.

Для дослідження використовували біодеградабельний кістково-пластичний матеріал на поліуретановій основі – PURs. Відомо, що застосування β-гліцерофосфату як компонента, що подовжує ланцюг покращує біологічну активність поліуретану як матеріалу для регенерації кісток [121]. І тому, в експериментах також використовували і модифікований варіант поліуретанового кістково-пластичного матеріалу (PURs-M) з включеннями β-гліцерофосфату кальцію для стимуляції процесів регенерації кісткової тканини.

Досліджено біосумісність зазначених матеріалів шляхом перевірки впливу їх екстрактів на життєздатність МСК миші лінії C2C12. Екстракти PURs і PURs-M додавали до культурального середовища так, щоб їх кінцеві концентрації становили 25 %, 50 %, 75 % і 100 % від загального об’єму, та інкубували протягом 72 год. Необроблені клітини використовували як негативний контроль.

Як показано на рис. 3.5, досліджувані екстракти поліуретанових кістково-пластичних матеріалів, PURs і PURs-M, незалежно від концентрації, показали хорошу біосумісність, не виявивши цитотоксичної дії щодо клітин лінії C2C12. Для екстрактів PURs-M в діапазоні концентрацій від 25 до 75 %, відзначено незначне поліпшення ($p>0,05$) росту клітин порівняно з контролем.

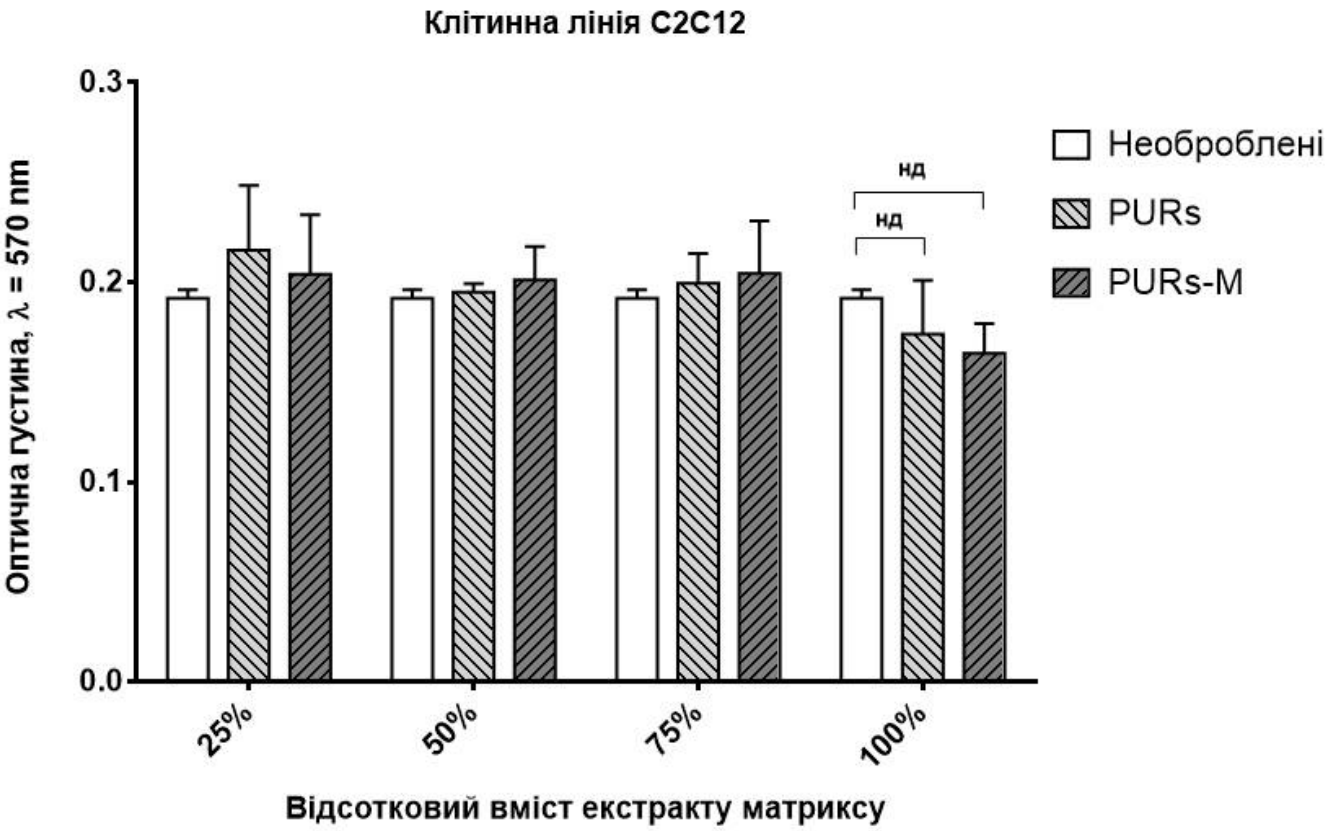


Рис. 3.5. Результати МТТ-аналізу життєздатності клітин лінії C2C12 після їх обробки екстрактами PURs та PURs-M у концентраціях 25 %, 50 %, 75 % і 100 % від загального об'єму культурального середовища.

Примітка. Статистична достовірність даних зазначена: нд – недостовірно.

У випадку нерозведених екстрактів (100%) PURs і PURs-M життєздатність клітин порівняно з контролем зменшувалась несуттєво ($p>0,05$), і залишалась в діапазоні хорошої біосумісності.

В наступному експерименті досліджено остеоіндуктивні властивості екстрактів PURs і PURs-M, зокрема їх вплив на ранні стадії остеобластної диференціації клітини лінії C2C12 (рис. 3.6).

Через 24 год після індукції клітин препаратами рекомбінантних МПК2/7, до культурального середовища додавали екстракти PURs і PURs-M так, щоб їх кінцеві концентрації становили 25 %, 50 % і 100 % від загального об'єму. В

окремих варіантах для покращення остеогенних процесів, додавали аскорбінову кислоту (вітамін С) у концентрації 50 мкг/мл. Як негативний контроль використовували клітини необроблені екстрактами досліджуваних кістково-пластичних матеріалів.

Результати спектрофотометричного вимірювання активності ЛФ наведені на рис. 3.6.

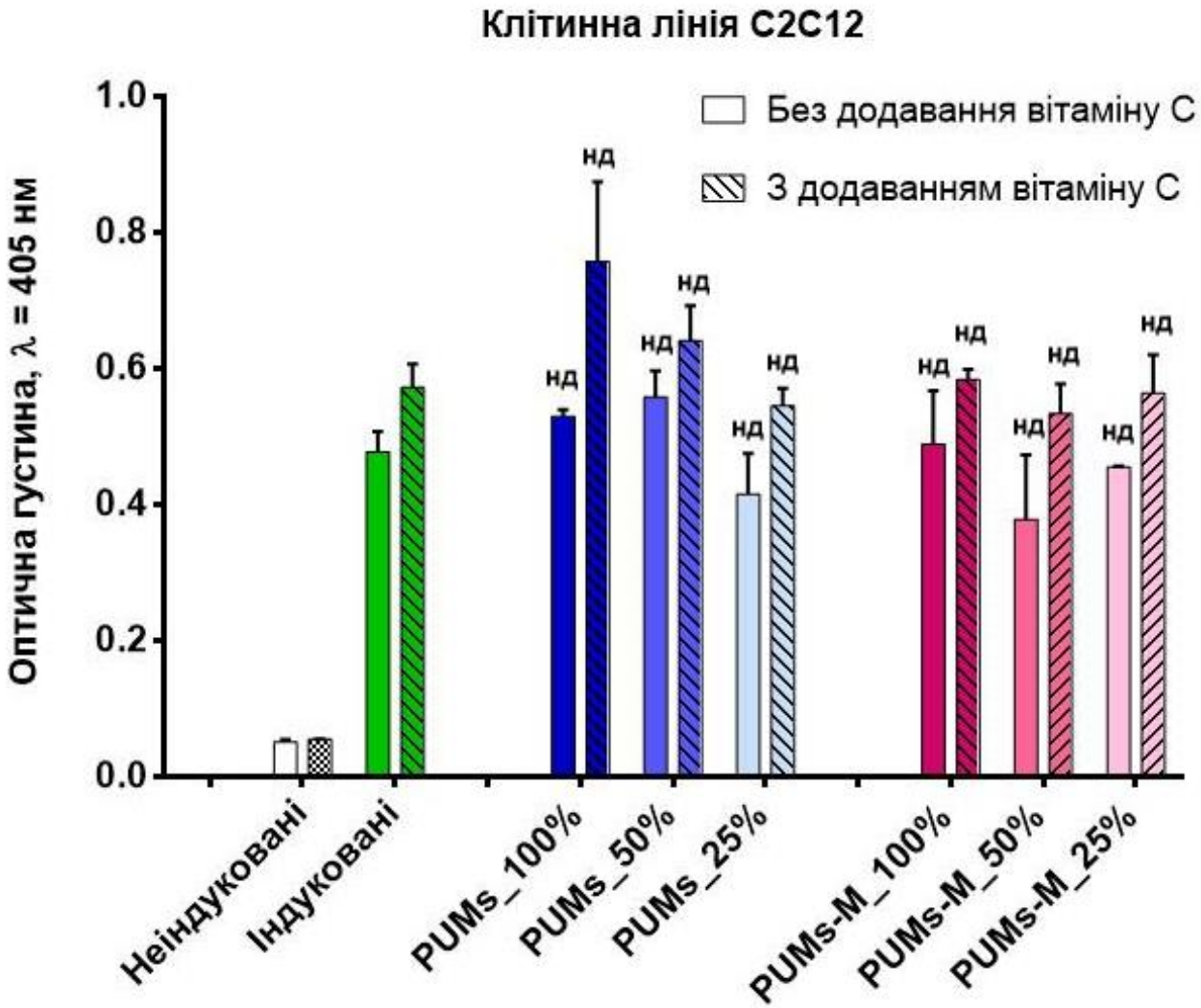


Рис. 3.6. Активність ЛФ у лізатах клітин лінії C2C12 після їх МПК2/7-опосередкованої індукції і обробки екстрактами PURs та PURs-M у концентраціях 25 %, 50 %, 75 % і 100 % від загального об’єму культурального середовища.

Примітка. Статистична достовірність даних відносно контролю зазначена: нд – недостовірно.

Показано, що додавання екстрактів PURs та PURs-M до культурального середовища клітин лінії C2C12 не інгібувало їх ранні стадії остеобластної диференціації (як з додаванням так і без додавання вітаміну С), але і суттєво не підсилювало її порівняно з МПК-індукованими, але необробленими клітинами (рис. 3.6).

Отже, було отримано і здійснено оптимізацію *in vitro* остеоіндуктивних властивостей препаратів рекомбінантних МПК. Показано, що препарат рекомбінантих МПК, отриманий в результаті ко-трансфекції у співвідношенні 85 і 15 % плазмідами з генами, які кодують структуру протеїнів МПК2 і МПК7, виявився найбільш ефективним індуктором остеобластної диференціації модельної культури клітин. Заморожування та збереження одержаних препаратів МПК протягом 3 годин при низькій температурі (–70°С) суттєво не впливали на їхостеоіндуктивні властивості порівняно із свіжими препаратами МПК. Отримані препарати можуть успішно використовуватись для різних біологічних цілей, зокрема для індукції остеобластної диференціації *in vitro*. Показано, що екстракти поліуретанових кістково-пластичних матеріалів, PURs і PURs-M, є нетоксичними і не інгібують ранні стадії остеобластної диференціації МСК лінії C2C12, що робить їх перспективними для клінічного застосування в інженерії кісткової тканини.

За результатами цих досліджень опубліковано 2 статті [121, 137]:

1. **Malysheva K.** Generation of optimized preparations of bone morphogenetic proteins for bone regeneration / **K. Malysheva**, I. Spasyuk, O. Pavlenko, R. Stoika, O. Korchynskyi // Ukrainian Biochemical Journal. – 2016. – V. 88, № 6. – P. 87-97.

2. Kucinska-Lipka J. The influence of calcium glycerophosphate (GPCa) modifier on physicochemical, mechanical, and biological performance of polyurethanes applicable as biomaterials for bone tissue scaffolds fabrication / J. Kucinska-Lipka, I. Gubanska, O. Korchynskyi, **K. Malysheva**, M. Kostrzewa, D. Włodarczyk, J. Jakub Karczewski, H. Janik // Polymers. – 2017. – V. 9, № 8. – P. 329.

3.2 Дослідження функціонального вкладу взаємодії ІЛ-6 і ФНП-α в інгібування остеобластної диференціації МСК миші

Були досліджені ефекти ІЛ-6 на активацію сигнального шляху Wnt за впливу ФНП-α в первинних FLS людини і фібробластах миші. Для цього, первинні FLS тимчасово трансдукували плазмідною конструкцією на основі аденовірусу з Wnt-специфічним люциферезним репортером Bat-Luc у поєднанні з аденовірусною конструкцією, яка містить ген β-галактозидази і яку використовували як внутрішній контроль для нормалізації ефективності трансдукції. Сигнальний шлях Wnt у клітинах-мішенях активували надекспресією гена протеїну Wnt3a за допомогою відповідної аденовірусної конструкції за MOI=300 і =600. Як контроль використовували трансдукцію аденовірусною конструкцією, що кодує GFP, і який використовували для вирівнювання загального титру вірусу. Після чого клітини обробляли рекомбінантними ІЛ-6 (100 нг/мл), ІЛ-6Р (500 нг/мл) і 10 нг/мл ФНП-α або їх поєднанням.

Показано, що у FLS людини, ФНП-α так само як і продукт його гена-мішені ІЛ-6 інгібують активацію сигнального шляху Wnt. Зокрема, при трансдукції аденовірусом за MOI=300 і =600, інгібувальний ефект ФНП-α був вираженішим при вищому рівні активації сигнального шляху Wnt – відповідно у 2,1 ($p \leq 0,05$) і 2,67 ($p \leq 0,05$) разу нижчий порівняно з необробленими клітинами. Інгібувальна дія ІЛ-6 у поєднанні з його розчинним рецептором, ІЛ-6Р, також була вираженішою при вищому рівні активації даного сигнального шляху – відповідно у 3,2 ($p \leq 0,01$) і 4,39 ($p \leq 0,01$) разу нижчою порівняно з контролем (рис. 3.7).

Встановлено, що ІЛ-6 у поєднанні з ФНП-α виявляли кооперативний інгібувальний ефект щодо сигнального шляху Wnt при трансдукції аденовірусом, що кодує Wnt3a, як за MOI=300 так і MOI=600. Зокрема, у кількості MOI=300 поєднання дії ІЛ-6 і ФНП-α призводило до інгібування сигнального шляху Wnt у 12,83 ($p \leq 0,01$) разу, а у кількості MOI=600 у 13,5 ($p \leq 0,01$) разу порівняно з необробленими клітинами (рис. 3.7).

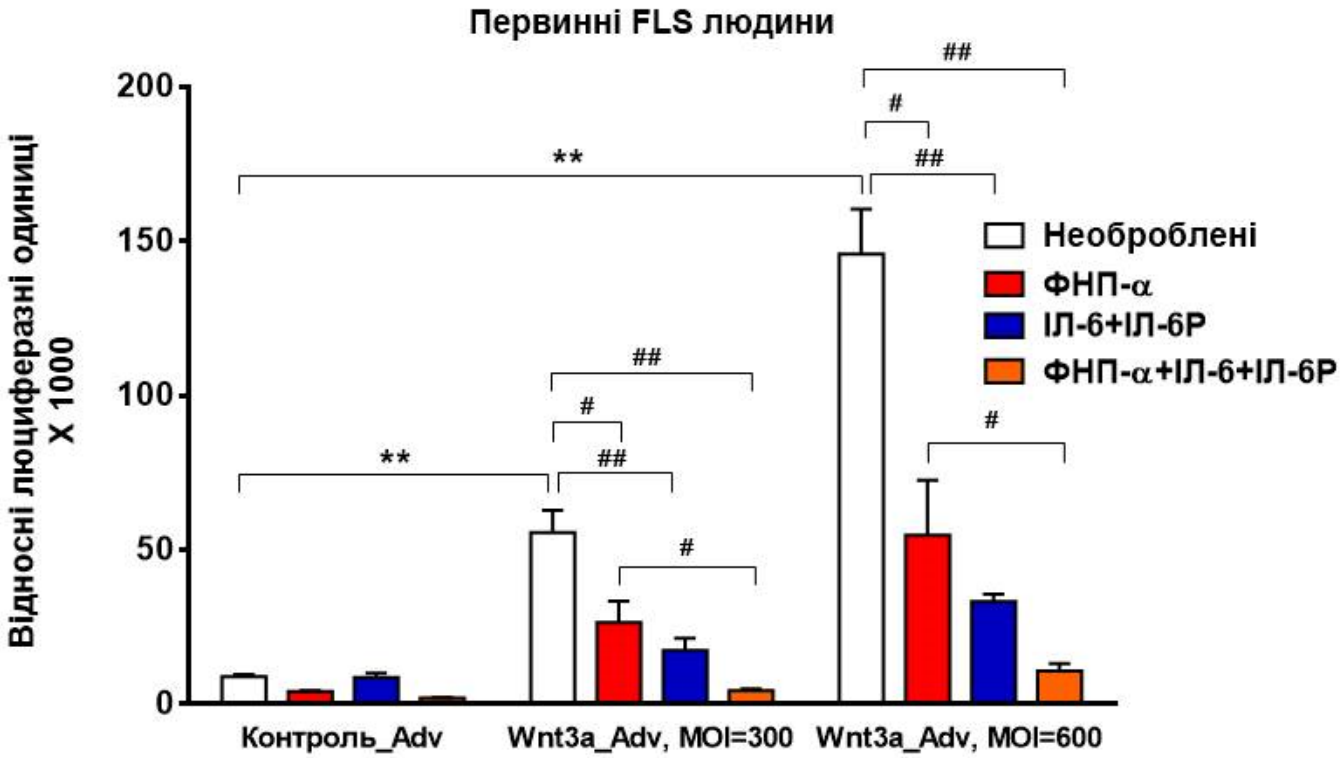


Рис. 3.7. Активність люциферази у лізатах первинних FLS людини після їх трансдукції аденовірусними конструкціями, які експресують Wnt-специфічну репортерну люциферазну касету Bat-Luc і ген Wnt3a, та інкубації з ІЛ-6 (100 нг/мл), ІЛ-6Р (500 нг/мл) і 10 нг/мл ФНП-α або їх поєднанням.

*Примітка. Сигнальний шлях Wnt у клітинах-мішенях активували надекспресією гена протеїну Wnt3a з допомогою відповідної аденовірусної конструкції. Статистична достовірність даних зазначена: # – $p \leq 0,05$; ** (##) – $p \leq 0,01$; нд (недостовірно) – $p > 0,05$, * – різниця порівняно з контролем, # – різниця між дослідними групами.*

Наступний експеримент було проведено аналогічно до попереднього, але з використанням фібробластів миші NIH-3T3, які значно меншою мірою чутливіші до інгібіторної дії ФНП-α, ніж FLS людини і без стимуляції лігандами Wnt3a не відповідають на дію ІЛ-6. Однак, як показано на рис. 3.8, поєднання дії ІЛ-6 і його рецептора з дією ФНП-α призводило до кооперативного інгібувального ефекту

щодо сигнального шляху Wnt у клітинах цієї лінії – у 1,54 (p≤0,01) разу порівняно з необробленими клітинами.

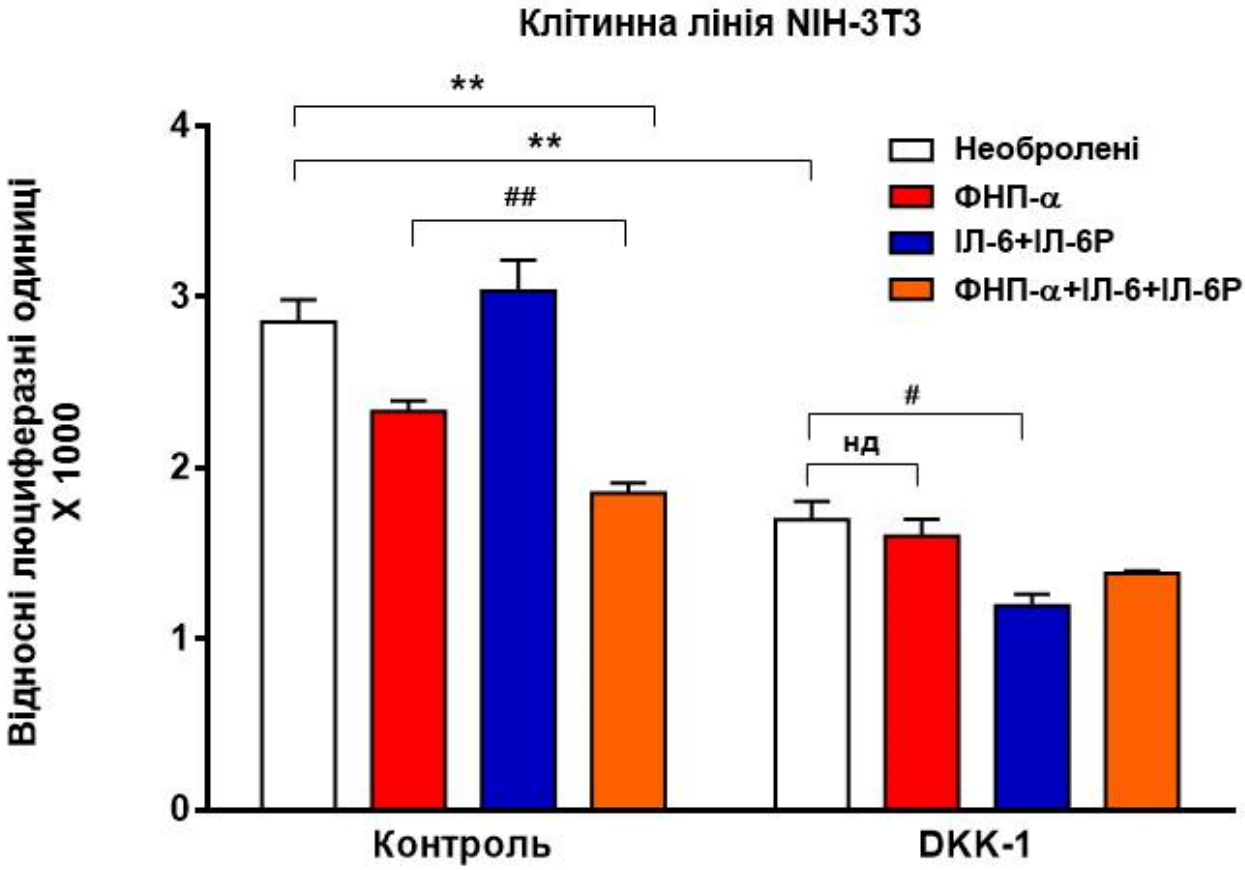


Рис. 3.8. Активність люциферази у лізатах клітин лінії NIH-3T3 після їх трансфекції аденовірусними конструкціями, які експресують Wnt-специфічну репортерну люциферазну касету Bat-Luc, ген Wnt3a і ген DKK-1 та інкубацією з ІЛ-6 (100 нг/мл), ІЛ-6Р (500 нг/мл) і 10 нг/мл ФНП-α або їх поєднанням.

*Примітка. Сигнальний шлях Wnt у клітинах-мішенях активували надекспресією гена протеїну Wnt3a з допомогою відповідної аденовірусної конструкції. Статистична достовірність даних зазначена: # – p ≤ 0,05; ** (##) – p ≤ 0,01; нд (недостовірно) – p > 0,05, * – різниця порівняно з контролем, # – різниця між дослідними групами.*

Було також поєднано дію ІЛ-6 і його рецептора, ФНП-α чи їх комбінацію з надекспресією гена протеїну DKK-1, який є ключовим інгібітором сигнального

шляху Wnt [44]. Показано, що поєднання обробки клітин ІЛ-6 у комбінації з його рецептором разом із надекспресією гена протеїну DKK-1 призводила до інгібування даного сигнального шляху в 1,42 ($p \leq 0,05$) разу порівняно з необробленими клітинами, тоді як поєднання усіх чотирьох агентів (ІЛ-6 і його рецептор, ФНП-α і DKK-1) було менш ефективним. Встановлено, що ФНП-α не виявив ефекту в поєднанні з надекспресією гена протеїну DKK-1 порівняно з необробленими клітинами.

Отже, показано, що ІЛ-6 взаємодіє з DKK-1 і ФНП-α в інгібуванні сигнального шляху Wnt3a у мишачих фібробластах лінії NIH-3T3.

Враховуючи те, що прогресування РА призводить до ураження прилягаючої кісткової тканини в суглобах, у наступних експериментах було проведено оцінку *in vitro* функціонального вкладу взаємодії ІЛ-6 і ФНП-α в інгібування процесу кісткоутворення. Для цього використовували обробку рекомбінантними цитокінами у поєднанні з блокуванням експресії гена ІЛ-6 з допомогою мшРНК в МСК миші ліній C2C12 і KS483 під час їх остеобластної диференціації. Відомо, що ці клітинні лінії експресують ген ІЛ-6 [16, 42].

Попередньо, було протестовано ряд плазмідних конструкцій (6 варіантів), що кодують мшРНК, які специфічно інактивують експресію мРНК гена ІЛ-6, серед яких найефективнішими виявились анти-ІЛ-6 мшРНК-1 і анти-ІЛ-6 мшРНК-2.

Клітини лінії C2C12 тимчасово трансфікували відібраними плазмідними конструкціями (анти-ІЛ-6 мшРНК-1 і анти-ІЛ-6 мшРНК-2), а також scrambled (scr) мшРНК, що не має гена-мішені і яку використали як контроль. Остеобластну диференціацію індукували шляхом ко-трансдукції аденовірусними конструкціями, які містять гени пртотеїнів МПК2 і МПК7. Після чого, клітини обробляли рекомбінантним ФПН-α у концентрації 10 нг/мл.

Результати спектрофотометричного вимірювання активності ЛФ наведені на рис. 3.9.

Обробка клітин лінії C2C12 ФНП-α призводила до повного інгібування їх міобластної диференціації, а також, як показано на рис. 3.9, у 4,42 ($p \leq 0,001$) разу

пригнічувала МПК2/7-індуковану остеобластну диференціацію порівняно з стимульованими, але необробленими клітинами.

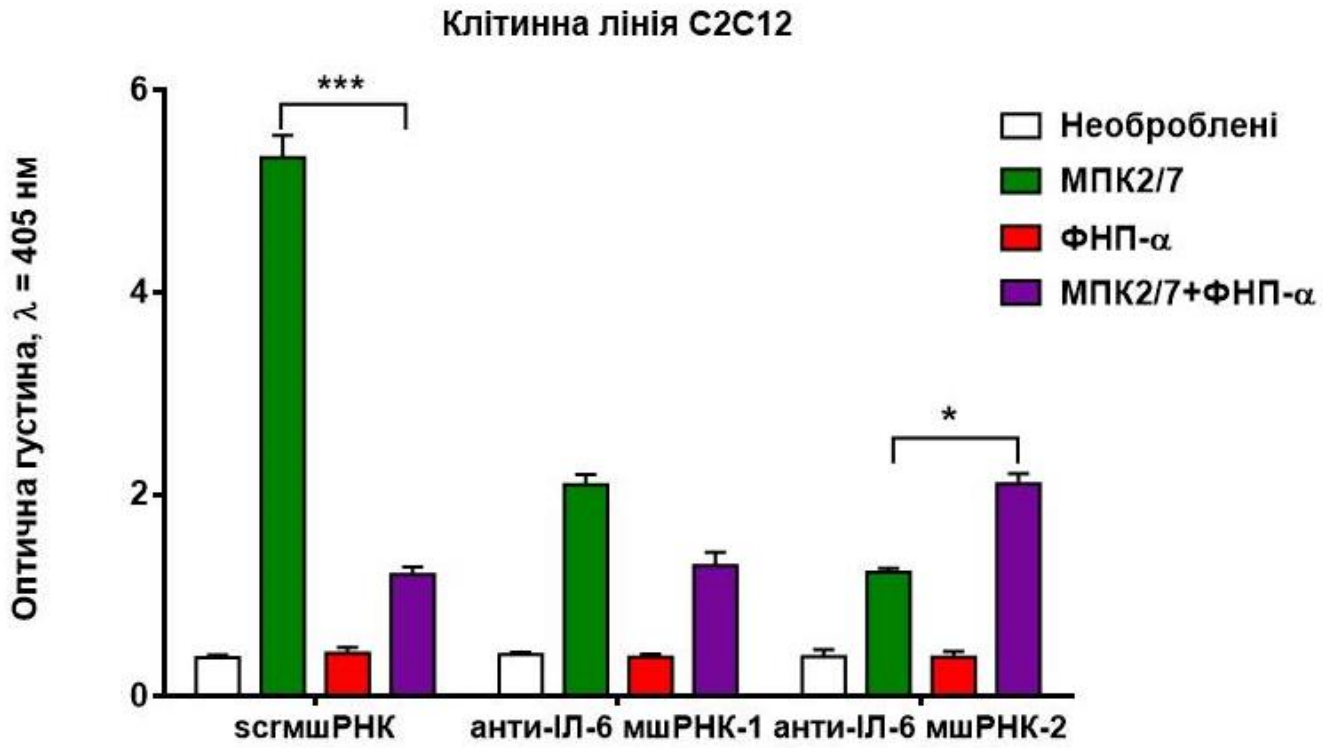


Рис. 3.9. Активність ЛФ у лізатах клітин лінії C2C12 за умов блокування експресії мРНК гена ІЛ-6 з допомогою мшРНК після їх МПК2/7-опосередкованої індукції та обробки рекомбінантним ФНП-α у концентрації 10 нг/мл.

*Примітка. Статистична достовірність даних зазначена: * – $p \leq 0,05$; *** – $p \leq 0,001$.*

Водночас, ефективні конструкції мшРНК (анти-ІЛ-6 мшРНК-1) дозволили частково усунути негативний вплив ФНП-α на остеобластну диференціацію клітин лінії C2C12. У випадку анти-ІЛ-6 мшРНК-2 вдалося конвертувати ФНП-α з інгібітора у потенціатор остеобластної диференціації цих клітин у 1,71 ($p \leq 0,05$) разу порівняно з МПК2/7-стимульованими клітинами (рис. 3.9).

ЛФ не є маркером пізніх стадій остеобластної диференціації, для якої характерні мінералізація кісткового матриксу і утворення специфічних вузликів.

Відовідно до літературних даних, активація сигнального шляху Wnt відбувається на пізніх стадіях остеогенезу [117].

Клітини лінії C2C12 не здатні проходити пізні стадії остеобластної диференціації. Тому, для підтвердження належного функціонального результату інактивації ІЛ-6 в диференціюючих остеобластах, ми використали клітини лінії KS483, які ефективно проходять пізні стадії остеогенної диференціації [199].

Для цього клітини лінії KS483 тимчасово ко-трансфікували 6-ма варіантами плазмідних конструкції, які кодують мшРНК, що специфічно інактивують експресію мРНК гена ІЛ-6, а також scr мшРНК, яку використовували як контроль. Індукцію остеобластної диференціації проводили аналогічно попередньому досліду. Виявлення ділянок мінералізації під час остеогенної диференціації клітин проводили шляхом специфічного гістохімічного фарбування солей кальцію алізариновим червоним S. Відповідні поля (х1) наведені на рис. 3.10.

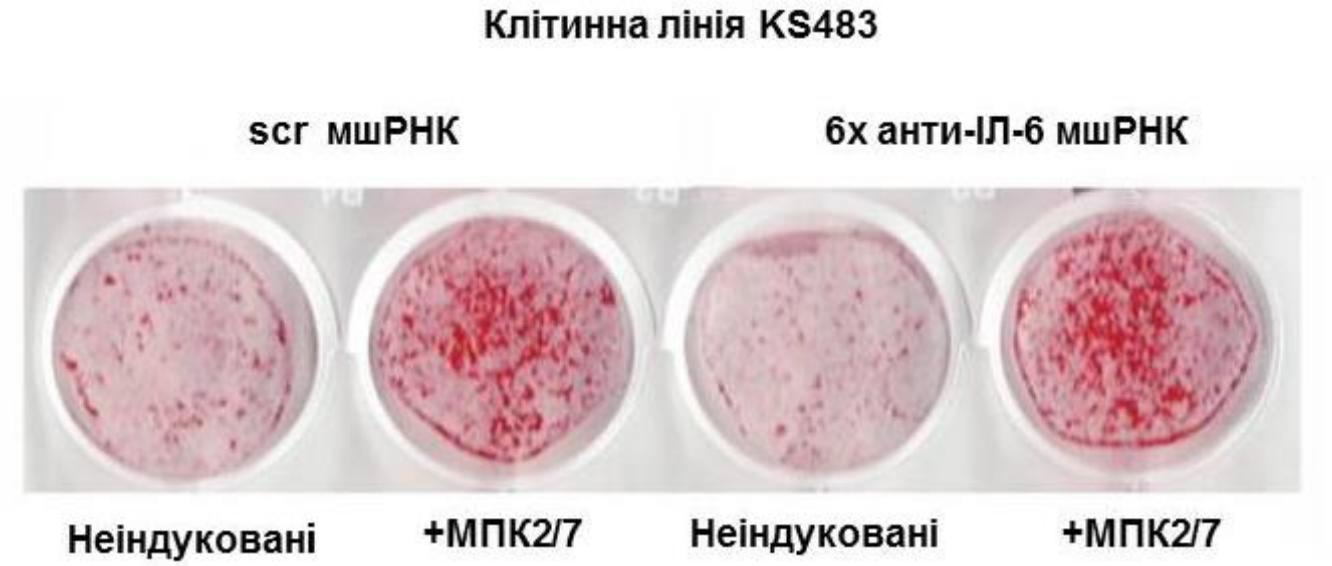


Рис. 3.10. Результати гістохімічного забарвлення ділянок мінералізації під час МПК2/7-індукованої остеогенної диференціації клітин лінії KS483, за умов тимчасового нокдауну експресії мРНК гена ІЛ-6 з допомогою мшРНК.

Показано, що стимуляція гетеродимерами МПК2/7 клітин лінії KS483 у 2-3 рази підсилювала їх пізні стадії остеобластної диференціації порівняно з

нестимульованими клітинами, тоді як одночасна надекспресія 6 варіантів мшРНК, які специфічно блокують експресію гена ІЛ-6, додатково підсилювала остеогенну диференціацію цих клітин. Більш ефективну диференціацію спостерігали через утворення специфічних вузликів і мінералізації позаклітинного матриксу у порівнянні з котрольним варіантом – src мшРНК (рис. 3.10).

Не вдалося поєднати МПК2/7-опосередковану індукцію остеобластної диференціації з обробкою ФНП-α у зв'язку з масовою загибеллю клітин KS483, індукованою даним цитокіном. Аналогічний ефект спостерігали й інші експериментатори, що використовували цю, а також інші (пре)остеобластні культури клітин [48, 107].

Для отримання точніших результатів, були створені трансдуковані лентивірусами мультиклональні культури клітин ліній C2C12 і KS483 зі стабільною експресію генів мшРНК, які специфічно блокують експресію мРНК гена ІЛ-6 і scr мшРНК. Зазначені культури клітин отримані канд.біол.наук Корчинським О. Г. в Лайденському університеті (Нідерланди) на умовах співпраці. Для цього клітини ліній C2C12 і KS483 трансдукували лентивірусними конструкціями, які містять гени, що кодують структуру анти-ІЛ-6 мшРНК-1, анти-ІЛ-6 мшРНК-2 і scr мшРНК. Відбір трансдукованих клітин проводили з додаванням до культурального середовища селективного маркеру – антибіотика пуроміцину. В експериментах використовували резистентні до пуроміцину мультиклональні культури клітин C2C12 і KS483.

Попередньо, була перевірена ефективність мшРНК-опосередкованого нокдауну гена ІЛ-6 за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу.

Остеобластну диференціацію стабільних мультиклональних культур клітин ліній C2C12 і KS483 стимулювали шляхом ко-трансдукції аденовірусними конструкціями з генами протеїнів МПК2 і МПК7. Для модуляції остеобластної диференціації використовували 10 нг/мл рекомбінантного ФНП-α або Hyper-ІЛ-6 у такій же концентрації. Результати спектрофотометричного вимірювання активності ЛФ наведені на рис. 3.11 і 3.12.

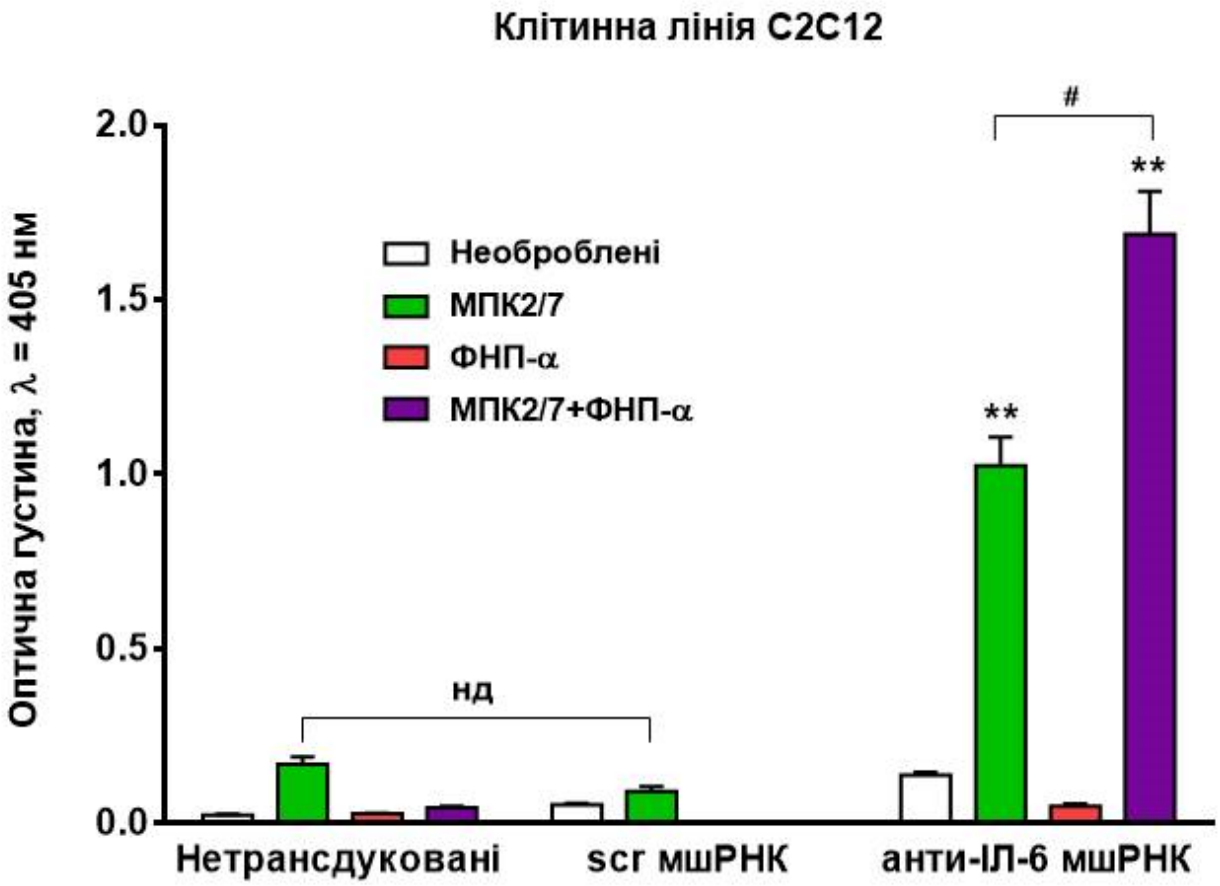


Рис. 3.11. Активність ЛФ у лізатах клітин лінії C2C12 за умов блокування експресії мРНК гена ІЛ-6 з допомогою мшРНК після їх МПК2/7-опосередкованої індукції та обробки рекомбінантним ФНП-α у концентрації 10 нг/мл.

*Примітка. Статистична достовірність даних зазначена: # – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; нд (недостовірно) – $p > 0,05$, * – різниця порівняно з контролем, # – різниця між дослідними групами.*

Виявлено, що опосередкований мшРНК нокдаун експресії мРНК гена ІЛ-6 підсилював МПК2/7-опосередковану остеобластну диференціацію (в окремих експериментах від 2,7 до 6 рази порівняно з контролем) стабільних мультиклональних культур клітин ліній C2C12 і KS483 (рис. 3.11 і 3.12).

Як показано на рис. 3.11, нокдаун експресії мРНК гена ІЛ-6 у клітинах лінії C2C12, усував негативний ефект ФНП-α на остеобластну диференціацію цих клітин і перетворювa його з інгібітора у потенціатор остеогенезу.

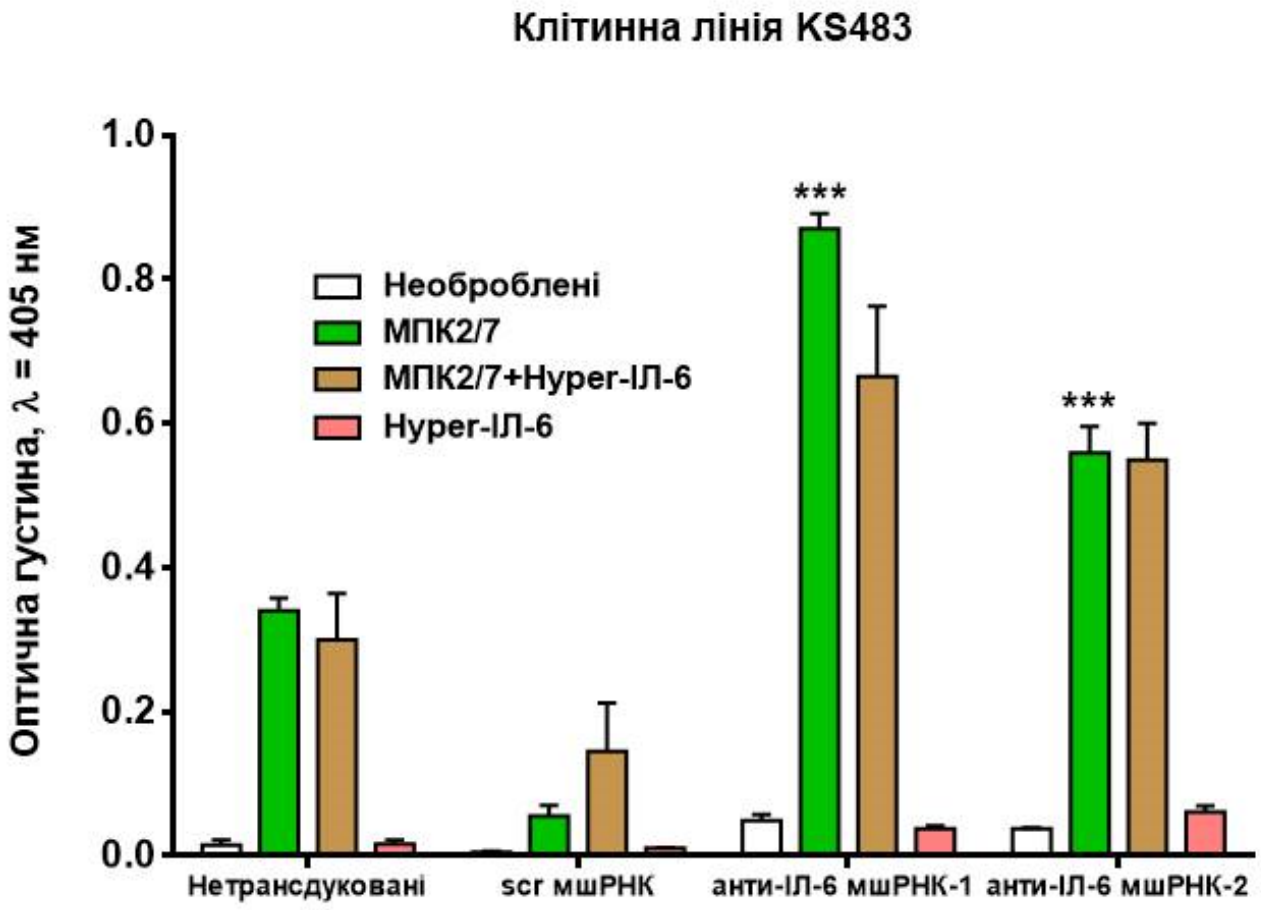


Рис. 3.12. Активінсть ЛФ у лізатах клітин лінії KS483 за умов блокування експресії мРНК гена ІЛ-6, опосередкованого мшРНК після їх МПК2/7-опосередкованої індукції та обробки рекомбінантним Hyper-ІЛ-6 у концентрації 10 нг/мл.

*Примітка. Статистична достовірність даних зазначена: ***$p \leq 0{,}001$, * – різниця порівняно з контролем.*

Зокрема, відзначено підсилення остеобластної диференціації у 1,65 ($p \leq 0{,}05$) разу порівняно з МПК2/7-стимульованими, але необробленими ФНП-α клітинами і в 9,95 ($p \leq 0{,}01$) разу порівняно з контролем – МПК2/7-стимульованими клітинами з стабільною експресією scr мшРНК.

Водночас, подібно до активації сигнального шляху Wnt в клітинах лінії NIH-3T3 (рис. 3.8), обробка Hyper-ІЛ-6 не впливала на ранні стадії остеобластної диференціації клітин лінії KS483 (рис. 3.12). Також, як і у попередніх

дослідженнях з використанням цих клітин, не вдалося поєднати МПК2/7-опосередковану індукцію остеобластної диференціації з обробкою ФНП-α у зв'язку з масовою загибеллю клітин лінії KS483, індукованою даним цитокіном. [48, 107].

Отже, нами вперше показано, що ІЛ-6 разом з DKK-1 і ФНП-α виявляє кооперативний інгібувальний ефект щодо остеогенного сигнального шляху Wnt. Встановлено, що нокдаун експресії мРНК гена ІЛ-6 усуває негативний вплив ФНП-α на остеобластну диференціацію МСК миші лінії C2C12 і підсилює перебіг її ранніх стадій, а також підсилює пізні стадії остеобластної диференціації клітин лінії KS483, що відображається у вищій активності процесів мінералізації кісткового матриксу порівняно з контролем.

За результатами цих досліджень опубліковано 2 статті [138, 139]:

1. **Malysheva K.** ShRNA-mediated knockdown of interleukin 6 expression rescues tumor necrosis factor α - inhibited osteogenesis in mouse mesenchymal precursor cells / **K. Malysheva**, K. de Rooij, C. Löwik, D. Baeten, R. Stoika, O. Korchynskyi // Studia Biologica. – 2015. –V. 9. – P. 5-14.

2. **Malysheva K.** Interleukin 6/Wnt signaling interaction in rheumatoid arthritis: interleukin 6 inhibits Wnt signaling in synovial fibroblasts and osteoblasts / **K. Malysheva**, M. de Rooij, C. Lowik, D. Baeten, S. Rose-John, R. Stoika, O. Korchynskyi // Croatian Medical Journal. – 2016. – V. 57, № 2. – P. 89-98.

3.3 Дослідження ролі генів *pttg1* і *pttg-bp1* в регуляції остеобластної диференціації МСК миші

Метою даного етапу дослідження було вивчення ефектів надекспресії та нокдауну генів *pttg1* і *pttg-bp1* на активацію сигнальних шляхів МПК і Wnt.

Як показано на рис. 3.13, для тимчасової надекспресії генів *pttg1* і *pttg-bp1*, клітини лінії C2C12 трансфікували чи ко-трансфікували плазмідними

конструкціями з генами, які кодують структуру протеїнів PTTG1 і PTTG-BP1, а також плазмідою – pcDNA3, яку використовували як контроль. Остеобластну диференціацію індукували шляхом ко-трансдукції аденовірусними конструкціями, які містять гени протеїнів МПК2 і МПК7.

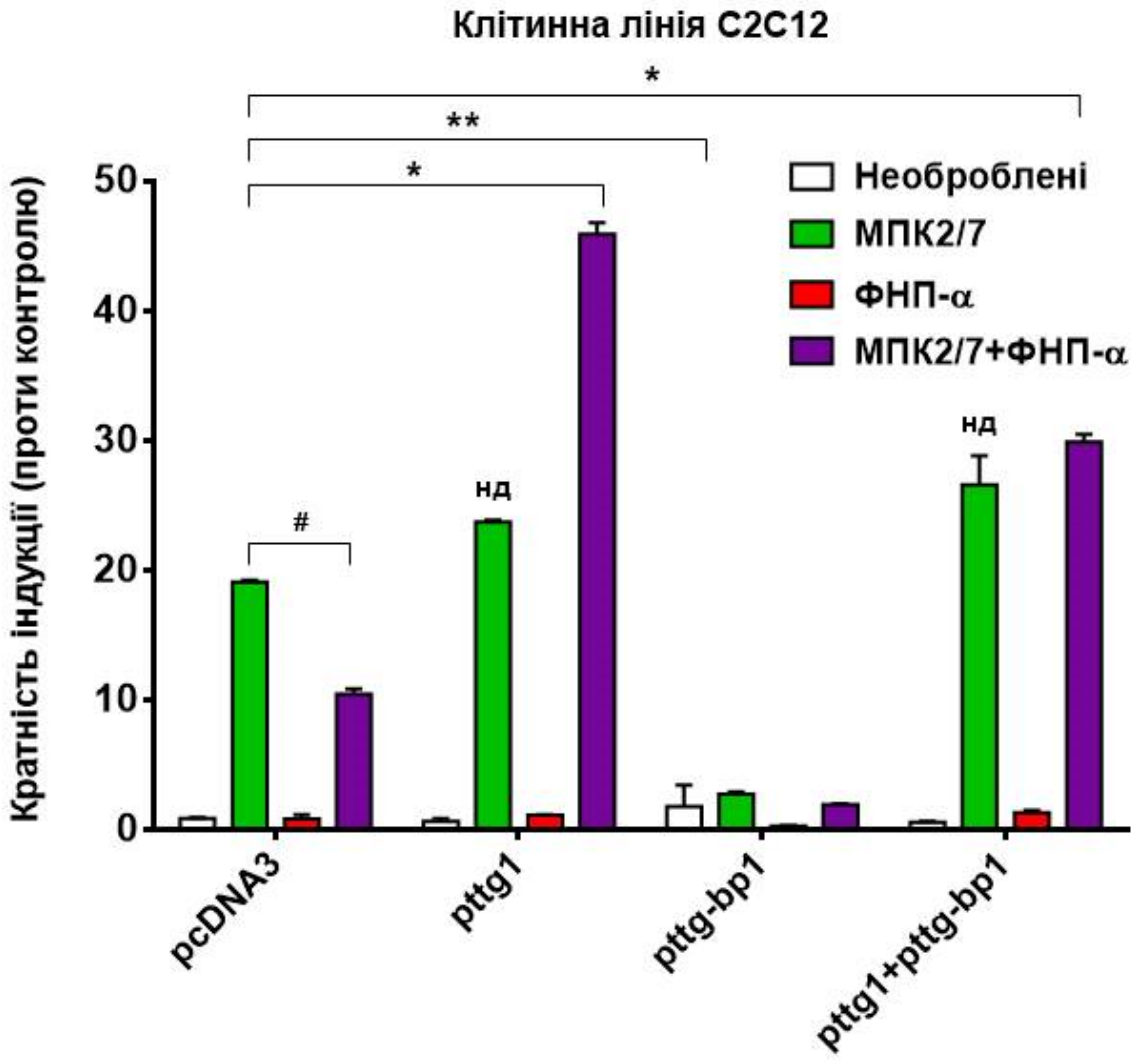


Рис. 3.13. Активність ЛФ у лізатах клітин лінії C2C12 за умов надекспресії генів *pttg1* і *pttg-bp1* після їх МПК2/7-опосередкованої індукції та обробки рекомбінантним ФНП-α у концентрації 10 нг/мл.

*Примітка. Результати відображені у вигляді кратності індукції проти контролю. Статистична достовірність даних зазначена: * (#) – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; нд (недостовірно) – $p > 0,05$, * - різниця порівняно з контролем, # - різниця між контрольними групами.*

У відповідних варіантах, для модуляції остеобластної диференціації, клітини лінії С2С12 обробляли рекомбінантним ФНП-α у концентрації 10 нг/мл. Результати спектрофотометричного вимірювання активності ЛФ наведені (рис. 3.13).

Як і в попередніх дослідженнях, обробка ФНП-α клітин лінії С2С12 призводила до повного інгібування їх міобластної диференціації, а також значного пригнічення МПК-індукованої остеобластної диференціації цих клітин. Зокрема, було встановлено, що модуляція ФНП-α остеобластної диференції клітин лінії С2С12 призводить до інгібування остеогенних процесів у 1,81 ($p \leq 0,05$) разу порівняно МПК2/7-стимульованими, але необробленими ФНП-α клітинами (рис. 3.13, контрольний варіант).

Показано, що надекспресія гена *pttg-bp1* призводила до інгібування МПК2/7-індукованих ранніх стадій остеобластної диференціації клітин лінії С2С12 в 6,93 ($p \leq 0,01$) разу порівняно з контролем. В той самий час при тимчасовій надекпресії гена *pttg1* остеогенні процеси несуттєво ($p > 0,05$) підсилювались, а за наявності ФНП-α в середовищі інтенсифікувались у 2,41 ($p \leq 0,05$) разу порівняно з МПК2/7-стимульованими клітинами у контрольному варіанті (рис. 3.13).

У випадку сумісної надекспресії генів *pttg1* і *pttg-bp1* також спостерігали незначне ($p > 0,05$) підсилення остеобластної диференціації клітин лінії С2С12, тоді як наявність ФНП-α в середовищі призводила до підсилення остеогенних процесів у 1,57 ($p \leq 0,05$) разу порівняно з стимульованими, але необробленими ФНП-α клітинами (рис. 3.13).

У наступному експерименті клітини цієї ж лінії були тимчасово трансфіковані чи ко-трансфіковані плазмідними конструкціями з генами, які кодують структуру мшРНК, що специфічно блокують експресію генів *pttg1* та *pttg-bp1* на рівні їх мРНК, а також контрольною плазмідою – scr мшРНК, яку використовували як контроль.

Аналіз результатів експериментів проводили аналогічно попередньому досліду (рис. 3.14).

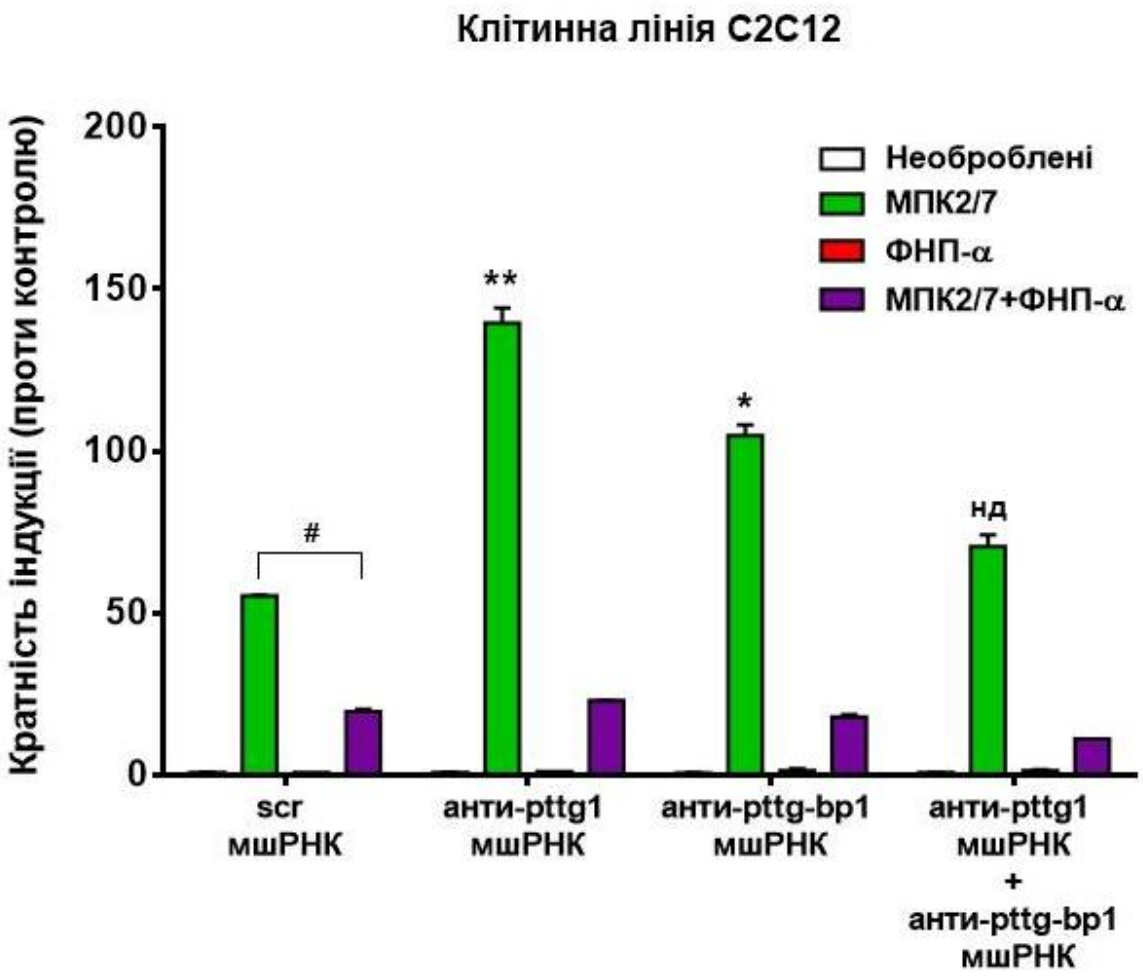


Рис. 3.14. Активність ЛФ у лізатах клітин лінії C2C12 за умов тимчасового нокдауну експресії мРНК генів *pttg1* і *pttg-bp1* з допомогою мшРНК, після їх індукції МПК2/7 та обробки рекомбінантним ФНП-α у концентрації 10 нг/мл.

*Примітка. Результати відображені у вигляді кратності індукції проти контролю. Статистична достовірність даних зазначена: * (#) – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; нд (недостовірно) – $p > 0,05$, * - різниця порівняно з контролем, # - різниця між контрольними групами.*

Встановлено, що опосередкований мшРНК тимчасовий нокдаун експресії досліджуваних генів призводив до зростання інтесивності остеобластної диференціації клітин лінії C2C12 – відповідно у 2,52 ($p \leq 0,01$) і 1,89 ($p \leq 0,05$) разу порівняно з контролем. У випадку одночасного блокування експресії генів *pttg1* та *pttg-bp1* відзначали несуттєве ($p > 0,05$) підсилення остеогенних процесів (рис. 3.14).

Досліджено ефекти надекспресії і нокдауну генів *pttg1* і *pttg-bp1* на активацію сигнального шляху Wnt під час пізніх стадій остеогенезу [94]. Для цього експерименту використано клітини лінії KS483, які активно диференціюють у пізні остеобласти [117].

Остеобластну диференціацію стимулювали з допомогою трансдукції модельної культури клітин сумішшю аденовірусних конструкцій, які містять гени протеїнів МПК2 і МПК7. Виявлення ділянок мінералізації під час остеогенної диференціації клітин лінії KS483 здійснювали шляхом специфічного гістохімічного забарвлення солей кальцію алізариновим червоним S. Відповідні поля (х1) наведені на рис. 3.15.

Для тимчасової надекспресії генів *pttg1* і *pttg-bp1*, клітини лінії KS483 тимчасово ко-трансдукували плазмідними конструкціями з генами, які кодують зазначені протеїни. Як показано на рис. 3.15 А, сумісна надекспресія генів *pttg1* і *pttg-bp1* інгібує активацію сигнального шляху Wnt у цих клітинах, що відображалося в пригніченні МПК2/7-індукованої мінералізації кісткового матриксу у 2,5 разу порівняно з контролем.

Клітини лінії KS483 також тимчасово трансфікували плазмідними конструкціями з генами, які кодують структуру мшРНК, які специфічно інактивують експресію мРНК генів *pttg1* і *pttg-bp1*. Показано, що стимуляція клітин МПК2/7 значно підсилює пізні стадії їх остеобластної диференціації, а надекспресія мшРНК, що блокують експресію *pttg1, pttg-bp1* або ж їх поєднання додатково (відповідно у 3,0, 1,5 і 2,5 разу) підсилює остеобластну диференціацію цих клітин, що відображалося в стимуляції процесів мінералізації кісткового матриксу і утворенні кальцифікованих структур (рис. 3.15, Б).

Як було зазначено раніше, не вдалося поєднати МПК2/7-опосередковану індукцію остеобластної диференціації клітин лінії KS483 з обробкою ФНП-α у зв’язку з їх масовою загибеллю, індукованою даним цитокіном.

Для отримання більш точних результатів було проведено ряд експериментів щодо вивчення ролі гена *pttg1* в регуляції остеобластної диференціації МСК миші з стабільним нокдауном даного гена.

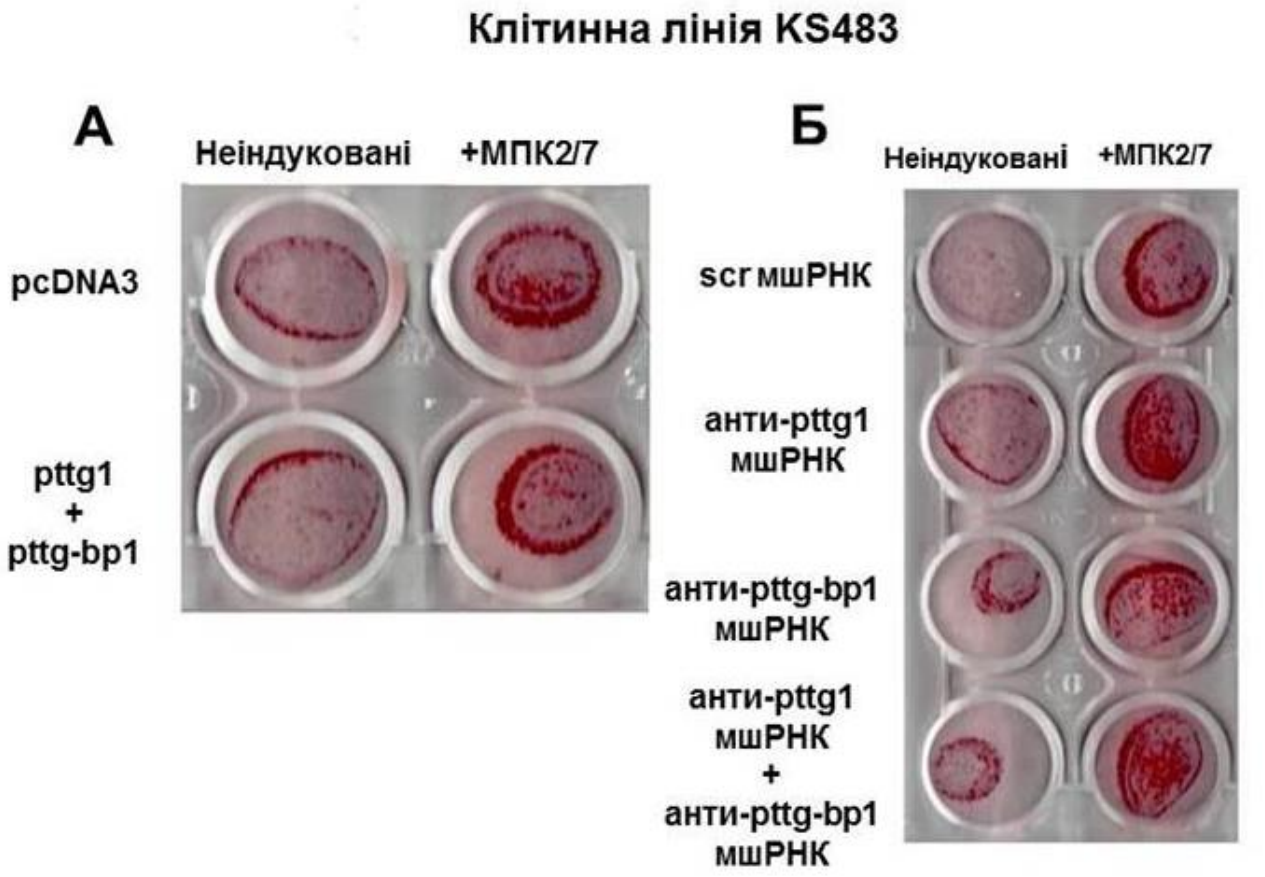


Рис. 3.15. Результати гістохімічного фарбування ділянок мінералізації під час МПК2/7-індукованої остеогенної диференціації клітин лінії KS483 за умов тимчасової надекспресії генів *pttg1* і *pttg-bp1* (А) і тимчасового нокдауну експресії мРНК генів *pttg1* і *pttg-bp1* з допомогою відповідних мшРНК (Б).

У дослідженнях використовували мультиклональні культури клітин ліній C2C12 і KS483 із стабільною експресією генів 3-х варіантів мшРНК, які специфічно інактивують ген *pttg1* на рівні його мРНК і scr мшРНК, яку використовували як контроль (рис.3.16 і 3.17).

Для цього клітини ліній C2C12 і KS483 трансдукували лентивірусними конструкціями з генами, що кодують структуру таких мшРНК як анти-pttg1 мшРНК-1, анти-pttg1-мшРНК-2 і анти-pttg1-мшРНК-3, а також scr мшРНК. Відбір трансдукованих клітин проводили з додаванням до культурального середовища селективного маркеру – антибіотика пуроміцину. У подальших експериментах

використовували резистентні до пуроміцину мультиклональні культури клітин C2C12 і KS483. Попередньо, з допомогою полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу, була перевірена ефективність нокдауну експресії мРНК гена *pttg1* з допомогою відповідних мшРНК. Найефективнішими виявились конструкції анти-pttg1 мшРНК-1 і анти-pttg1 мшРНК-2. Зазначені культури клітин отримані канд.біол.наук Корчинським О. Г. в Лайденському університеті (Нідерланди) на умовах співпраці.

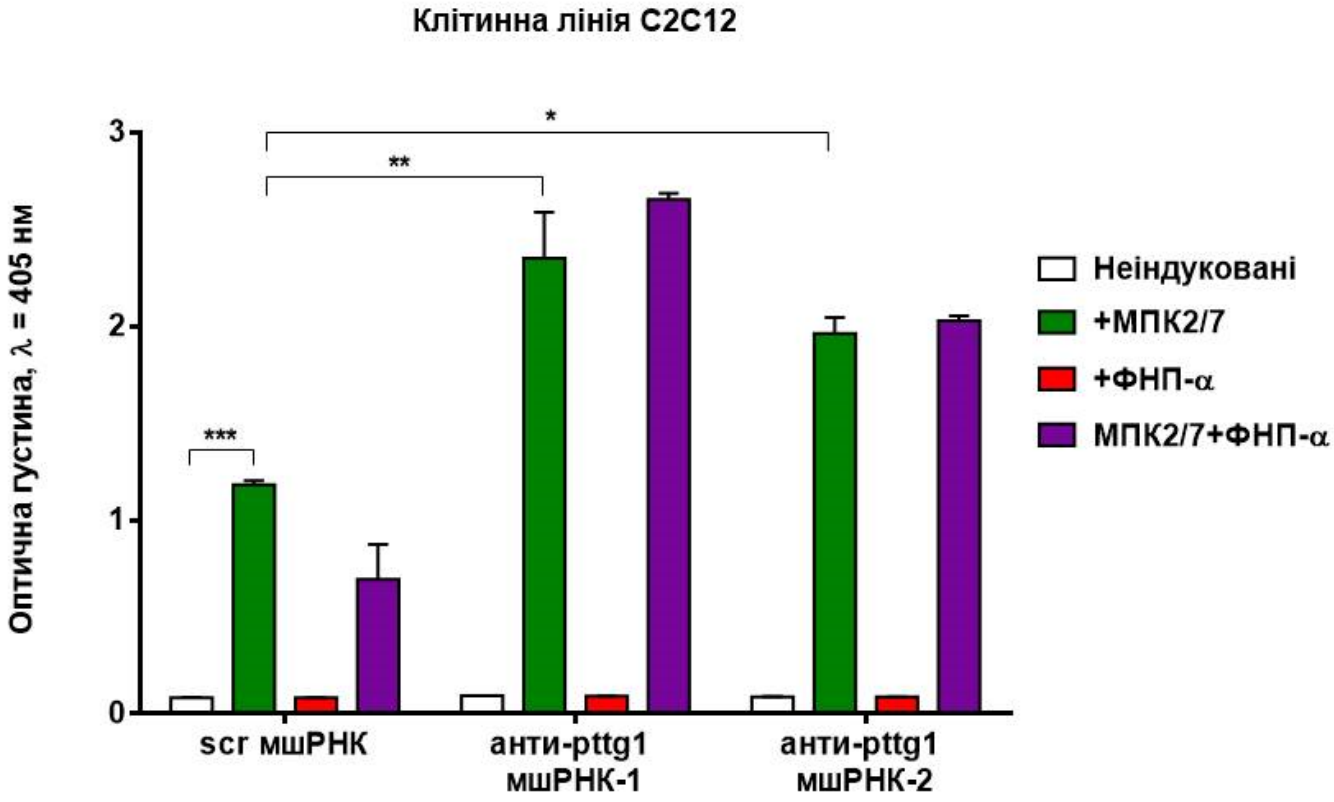


Рис. 3.16. Рівень активності ЛФ у лізатах клітин лінії C2C12 з стабільною експресією мРНК, що специфічно інактивує ген *pttg1*, після їх МПК2/7-опосередкованої індукції та обробки рекомбінантним ФНП-α у концентрації 10 нг/мл.

*Примітка. Статистична достовірність даних зазначена: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$.*

Остеогенну диференціацію мультиклональних культур клітин C2C12 і KS483 стимулювали одночасною трансдукцією аденовірусними конструкціями з

генами, які кодують структуру протеїнів МПК2 і МПК7. Для модуляції остеобластної диференціації у відповідних варіантах клітини лінії С2С12 були оброблені ФНП-α концентрацією 10 нг/мл. Інтенсивність остеогенної диференціації визначали шляхом спектрофотометричного вимірювання активності ЛФ (рис.3.16 і 3.17).

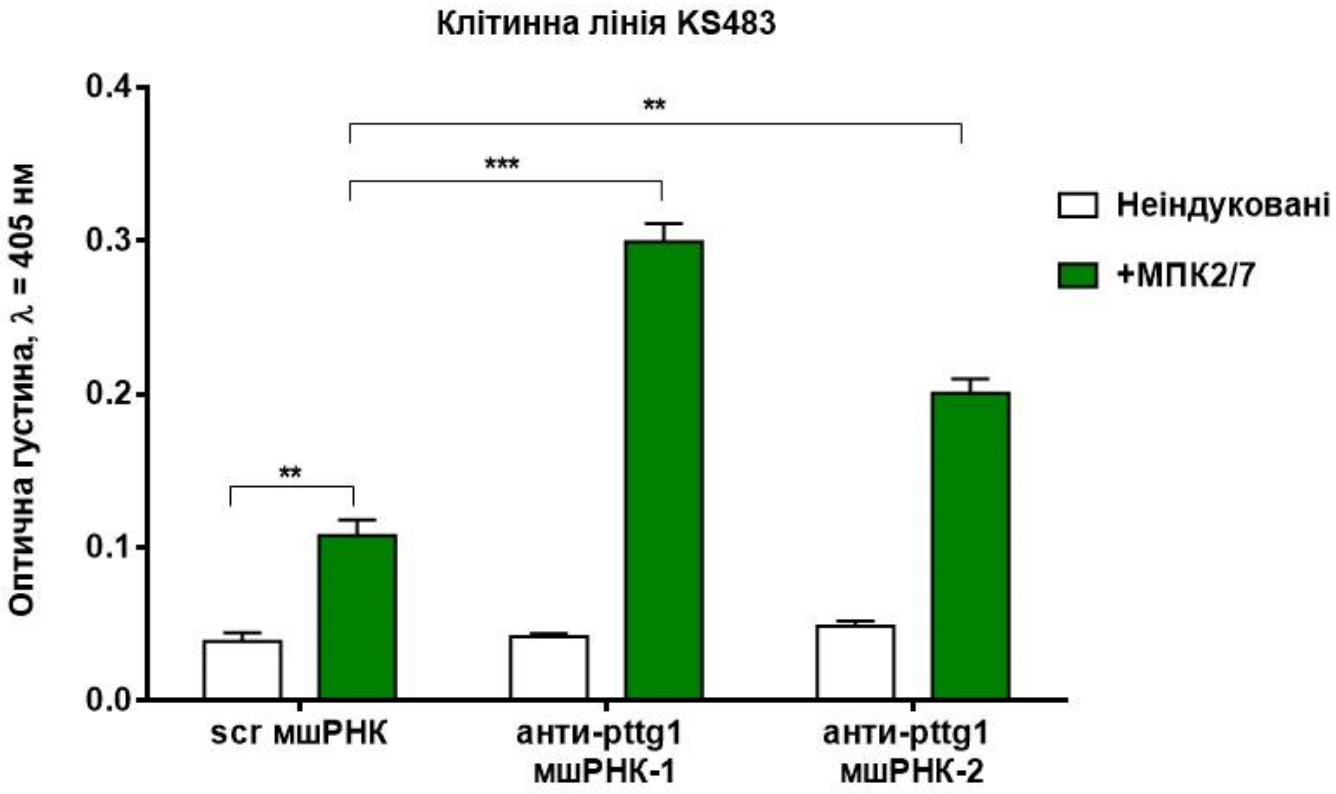


Рис. 3.17. Рівень активності ЛФ у лізатах клітин лінії KS483 з стабільною експресією мРНК, що специфічно інактивує ген *pttg1*, після їх МПК2/7-опосередкованої індукції.

*Примітка. Статистична достовірність даних зазначена: ** – $p \leq 0{,}01$; *** – $p \leq 0{,}001$.*

Як показано на рис. 3.16 і 3.17, ефективні конструкції мшРНК (анти-pttg1 мшРНК-1 і анти-pttg1 мшРНК-2) дозволили підсилити ранні стадії остеобластної диференціації стабільних мультиклональних культур клітин ліній С2С12 і KS483. Зокрема, експресія анти-pttg1 мшРНК-1 і анти-pttg1 мшРНК-2 клітинами лінії

C2C12 призводила до стимуляції остеогенних процесів відповідно у 1,99 ($p \leq 0,01$) і 1,66 ($p \leq 0,05$) разу порівняно з контрольними клітинами, що нормально експресують ген *pttg1*. Водночас, стабільний нокдаун експресії даного гена з допомогою конструкції анти-pttg1 мшРНК-2, дозволив частково усунути негативний ефект ФНП-α на остеобластну диференціацію мультиклональної культури клітин лінії C2C12. У випадку конструкції анти-pttg1 мшРНК-1 вдалося перетворити ФНП-α з інгібітора в стимулятор остеогенної диференціації цих клітин (рис.3.16).

Стабільна експресія анти-pttg1 мшРНК-1 і анти-pttg1 мшРНК-2 зумовлювала підсилення остеобластної диференціації мультиклональної культури клітин лінії KS483 у 2,77 ($p \leq 0,001$) і 1,86 ($p \leq 0,01$) разу, відповідно, порівняно з контролем – scr мшРНК (рис. 3.17).

Отже, встановлено, що ектопічна експресія гена *pttg1* інгібує МПК2/7-індуковані рання стадії остеобластної диференціації клітин лінії C2C12 і, навпаки, нокдаун експресії мРНК гена *pttg1* з допомогою мшРНК значно підсилює остеобластну диференціацію цих клітин. Крім того, ектопічна експресія гена *pttg1* інгібує активацію сигнального шляху Wnt, що відображається у зниженні інтенсивності МПК2/7-індукованої мінералізації кісткового матриксу клітинами лінії KS483. У той же час, опосередкований мшРНК нокдаун експресії мРНК генів *pttg1*, *pttg-bp1* чи їх поєднання підсилює МПК2/7-індуковану мінералізації кісткового матриксу цими клітинами.

За результатами цих досліджень опубліковано 2 статті [119, 135]:

1. Krupak V. The PTTG1 is a novel inhibitor of osteogenic differentiation of mouse mesenchymal stem cells / V. Krupak, **K. Malysheva**, O. Pavlenko, G. Shafranska, K. de Rooij, C. Löwik, R. Stoika, O. G. Korchynskyi // Animal Biology. – 2016. – V. 18, № 1. – P. 61-68.

2. **Malysheva K.** ShRNA-mediated knockdown of pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG1): optimization of the effect and targeting of early osteoblast

differentiation in murine mesenchymal stem cells / **K. Malysheva**, O. Pavlenko, R. Stoika, O. Korchynskyi // Animal Biology. – 2017. – V. 19, № 2. – P. 70-78.

3.4 Дослідження ефектів похідних 4-тіазолідинону щодо опосередкованого ФНП-α інгібування МПК-індукованої остеобластної диференціації МСК миші

Незважаючи на значну частоту захворюваності РА у світі (до 1,8 % дорослого населення), ефективних методів лікування цієї хвороби і досі не створено [186]. Тому, важливими є пошук і створення високоефективних терапевтичних препаратів, які змогли б усунути негативний вплив запального процесу на деградацію кісткової та хрящової тканин суглобів, а також сприяти їх регенерації.

У цьому дослідженні були вивчені сполуки, похідні 4-тіазолідинону, які володіють здатністю модулювати остеобластну диференціацію МСК миші, а також демонструють мінімальний цитотоксичний ефект щодо цих клітин.

Зокрема, досліджено цитотоксичну дію сполук Les-4368, Les-4370, Les-3882 і Les-3288 на МСК миші лінії C2C12, які використовували в експериментах як модельну культуру. Вищезазначені сполуки додавали до культурального середовища у різних концентраціях (0,02; 0,1; 0.5 і 1,0 мкМ) та інкубували протягом 72 год. ДМСО, розчинений у середовищі DMEM, у таких самих концентраціях, що і похідні 4-тіазолідинону, використовували як негативний контроль.

Як показано на рис. 3.18, сполуки Les-3882 і Les-3288 в зазначених концентраціях не виявили значної ($p>0,05$) цитотоксичність щодо клітин лінії C2C12 порівняно з контролем. При дії сполук Les-4368 і Les-4370 у концентрації 1 мкМ, клітинна життєздатність дещо зменшувалась – відповідно у 1,24 і 1,29 разу порівняно з необробленими клітинами, але все ще залишалася в межах допустимих значень.

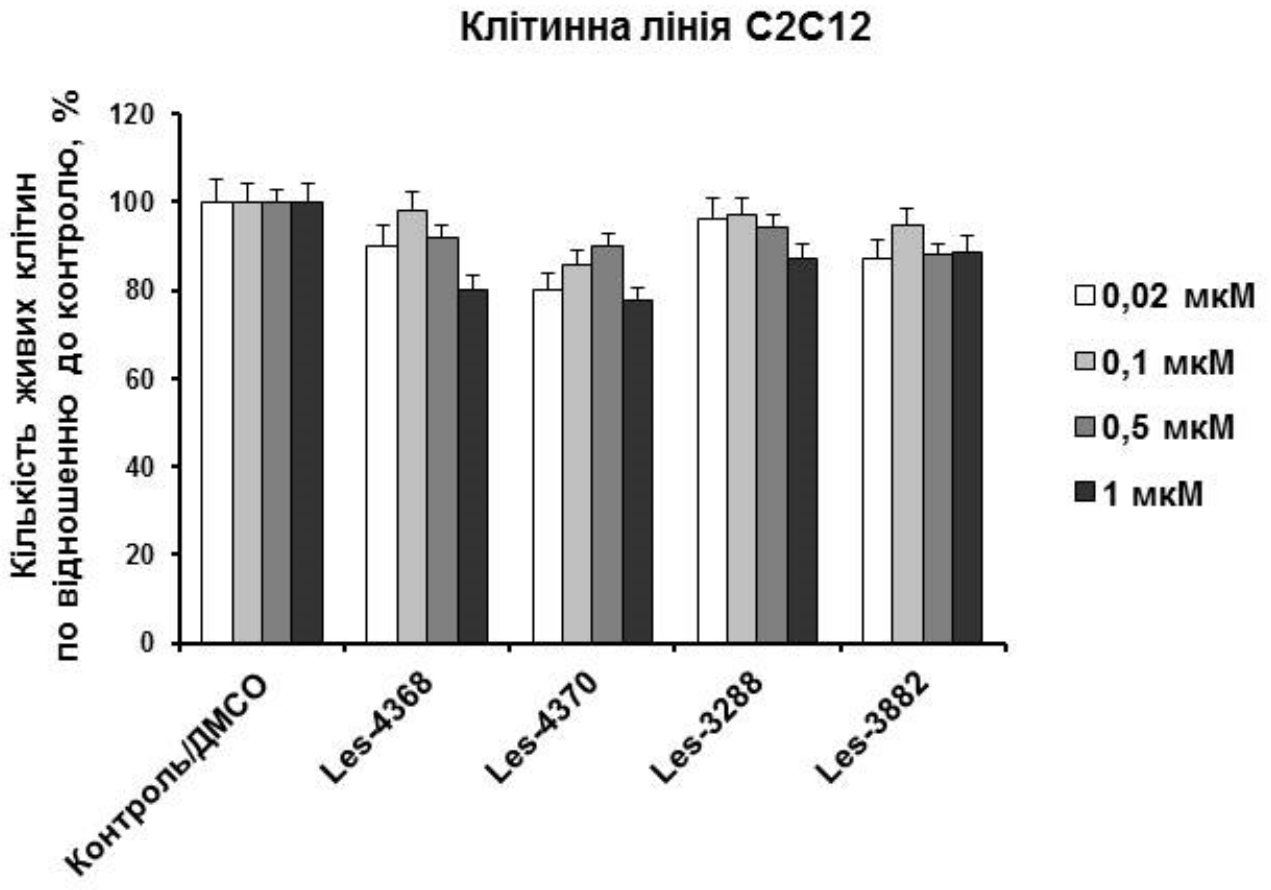


Рис. 3.18. Результати МТТ-аналізу життєздатності клітин лінії C2C12 після їх обробки похідними 4-тіазолідинону (Les-4368, Les-4370, Les-3882 і Les-3288) у концентрації від 0,02 до 1,0 мкМ.

Примітка. Дані представлені як відсоток живих клітин порівняно з контролем (*клітинами, обробленими ДМСО у таких самих концентраціях).*

Метою дослідження було оцінити протизапальну активність похідних 4-тіазолідинону, Les-4368, Les-4370, Les-3882 і Les-3288, щодо опосередкованих ФНП-α прозапальних ефектів під час остеобластної диференціації клітин.

В експериментах використовували іммортализовані МСК миші лінії C2C12. Індукцію остеобластної диференціації цих клітин здійснювали шляхом ко-трансдукції аденовірусними конструкціями з генами, що кодують МПК2 і МПК7. Через 5-6 год після індукції до культурального середовища додавали сполуки Les-4368, Les-4370, Les-3882 чи Les-3288 у концентрації 1 мкМ. Як негативний

котроль використовували ДМСО, розчинений в середовищі DMEM у концентрації 0,1% (v/v).

Для підтвердження остеогенної диференціації клітин лінії C2C12 застосовували спектрофотометричне вимірювання активності ЛФ. З'ясовано, які з досліджуваних сполук виявляють анти-ФНП-α ефекти (рис. 3.19).

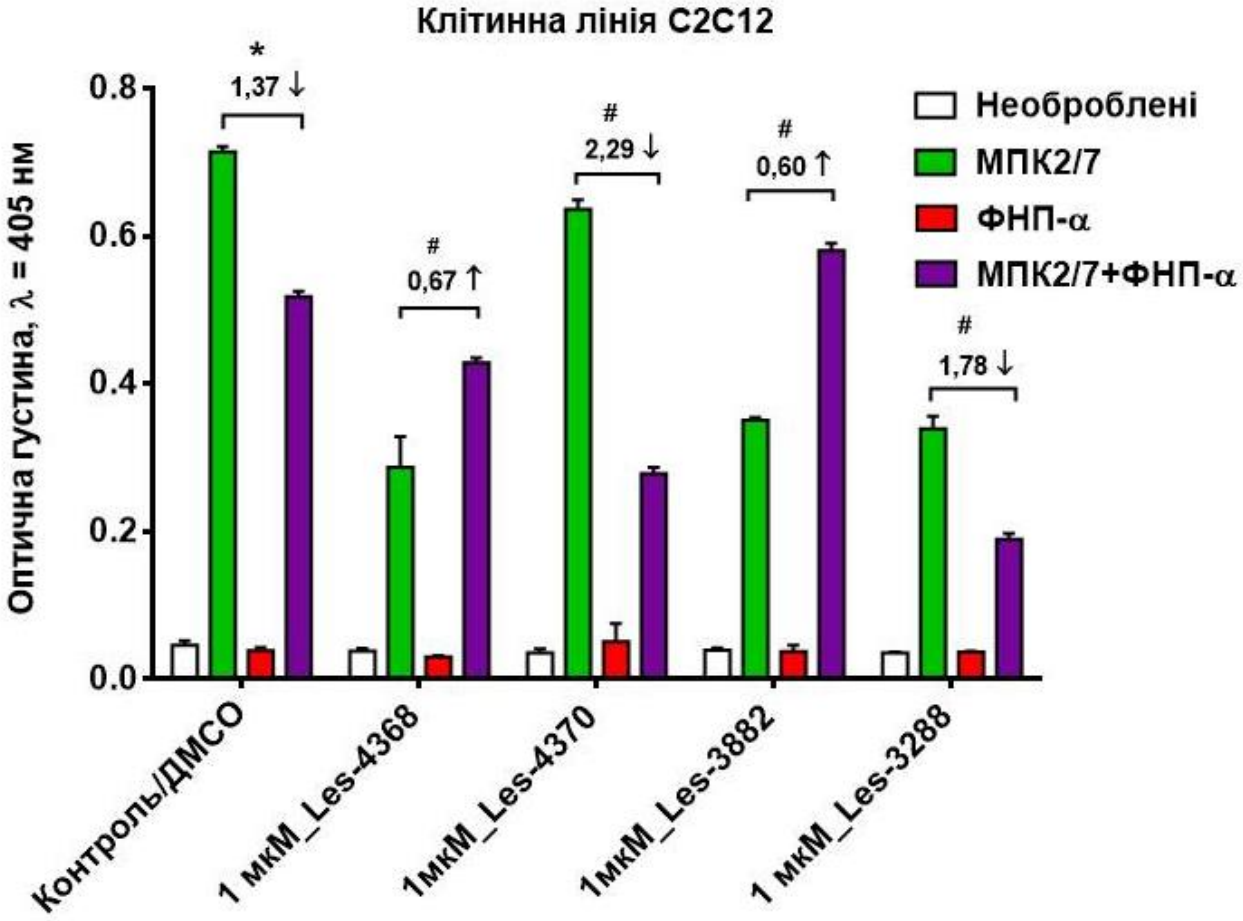


Рис. 3.19. Активність ЛФ у лізатах клітин лінії C2C12 після їх інкубації з Les-4368, Les-4370, Les-3882 чи Les-3288 у концентрації 1 мкМ та обробки ФНП-α (10 нг/мл).

*Примітка. Кратність індукції (МПК2/7-стимульовані клітини проти МПК2/7-стимульованих і оброблених ФНП-α клітин) і статистична достовірність даних зазначена: * (#) – $p \leq 0,05$; нд (недостовірно) – $p > 0,05$, * – різниця між контрольними групами, # – різниця між дослідними групами.*

Показано, що обробка ФНП-α клітин С2С12 у концентрації 10 нг/мл в 1,37 ($p \leq 0,05$) разу пригнічує їх МПК2/7-індуковану остобластну диференціацію у порівнянні з контролем (рис. 3.19, контрольний варіант). При обробці клітин С2С12 досліджуваними похідними 4-тіазолідинону, сполуки Les-4368 і Les-3882, усували негативний ефект ФНП-α на остеобластну диференціацію цих клітин. Більше того, ці речовини конвертували дію останнього з інгібітора остеогенезу в його стимулятор порівняно з МПК2/7-стимульованими, але необробленими ФНП-α клітинами – відповідно у 0,67 ($p \leq 0,05$) і 0,6 ($p \leq 0,05$) разу. Сполуки Les-4370 і Les-3288 виявились неефективними в усуненні негативної дії прозапального цитокіну на остеогенні процеси.

У наступному досліді було показано, що сполуки Les-4368 і Les-3882 володіють протизапальними властивостями у широкому діапазоні конценрацій (0,02; 0,1 і 0,3 мкМ). Схема експерименту була аналогічною попередньому.

Виявлено, що сполука Les-4368 у концентрації 0,02 мкМ та сполука Les-3882 у всіх трьох варіантах додатково підсилюють остеобластну диференціацію порівняно з контролем – у 1,53 ($p \leq 0,05$) і 1,49 ($p \leq 0,05$), 1,56 ($p \leq 0,05$) та 1,47 ($p \leq 0,05$) разу, відповідно. При цьому найкращий ефект виявила сполука Les-3882 у концентрації 0,1 мкМ. (рис. 3.20).

Як показано на рис. 3.20, що сполука Les-3882 у концентрації 0,02 і 0,1 мкМ, а також сполука Les-4368 у концентрації 0,3 мкМ усували негативний ефект ФНП-α на остеобластну диференціацію клітин лінії С2С12, що відображалось у додатковому підсиленні остеогенних процесів.

Проведено дослідження для з’ясування молекулярного механізму протизапальної активності сполук Les-4368 і Les-3882. Модуляція активації сигнального шляху NF-κB сполуками Les-4368 і Les-3882, потенційно, може бути ключовим механізмом, який опосередковує їхні протизапальні ефекти. Протеїн I-κBα є критично важливим компонентом, який контролює активацію даного сигнального шляху. Для підтвердження цієї гіпотези, що грунтується на визначенні рівня активації сигнального шляху NF-κB, у наступному експерименті застосували метод імуноблотингу з використанням антитіл до протеїну I-κBα.

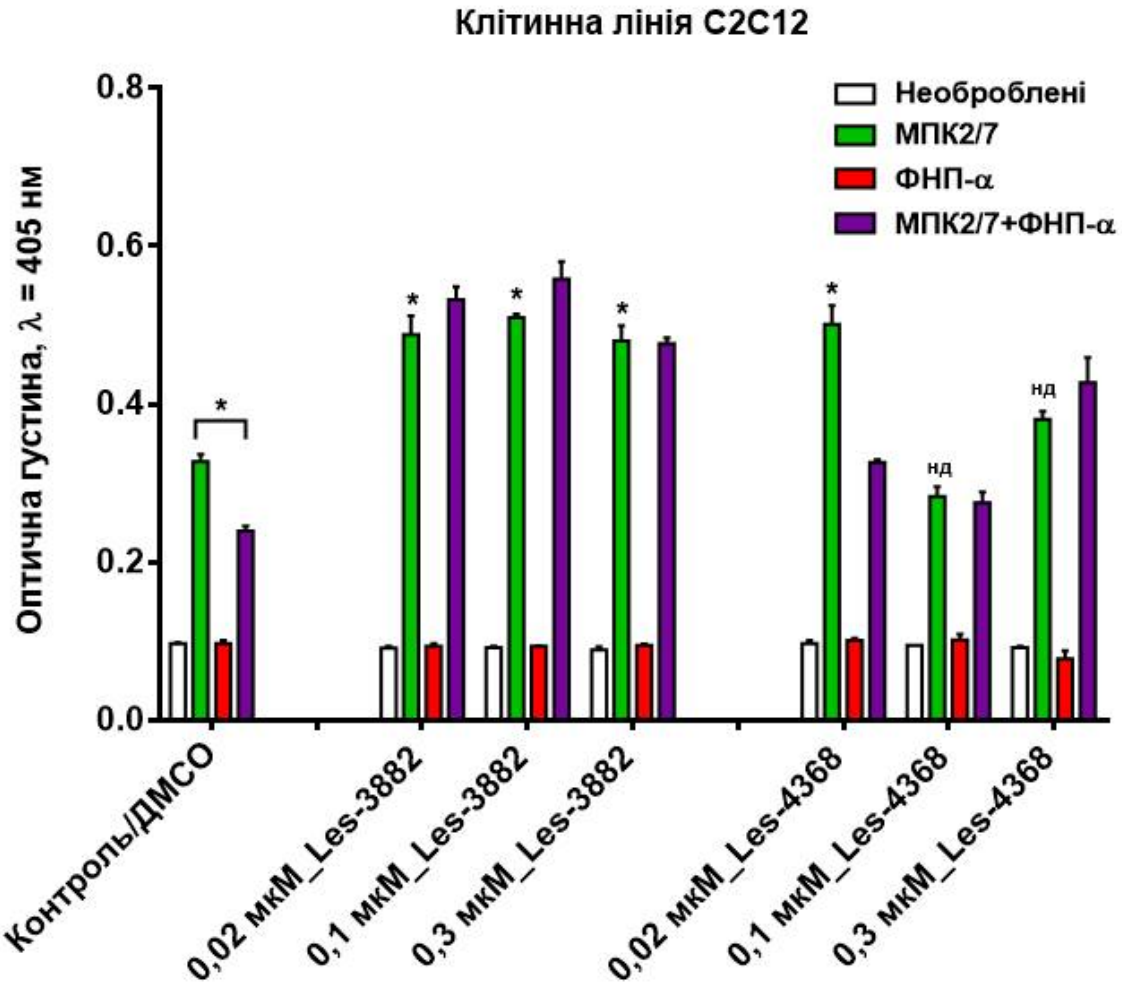


Рис. 3.20. Активність ЛФ у лізатах клітин лінії C2C12 після їх інкубації з Les-4368, Les-4370, Les-3882 чи Les-3288 у концентрації від 0,02 до 0,3 мкМ та обробки ФНП-α (10 нг/мл).

*Примітка. Статистична достовірність даних зазначена: * – $p \leq 0,05$; нд (недостовірно) – $p > 0,05$, * – різниця порівняно з контролем або між контрольними групами.*

Попередньо, проведено експеримент без використання досліджуваних похідних 4-тіазолідинону. Для цього клітини лінії C2C12 обробляли ФНП-α в часовому проміжку від 5 до 120 хв.

Як показано на рис. 3.21, протягом перших 5-20 хв спостергілась деградація I-κBα, тоді як через 30 хв після обробки ФНП-α з'являвся *de novo* синтезований I-κBα.

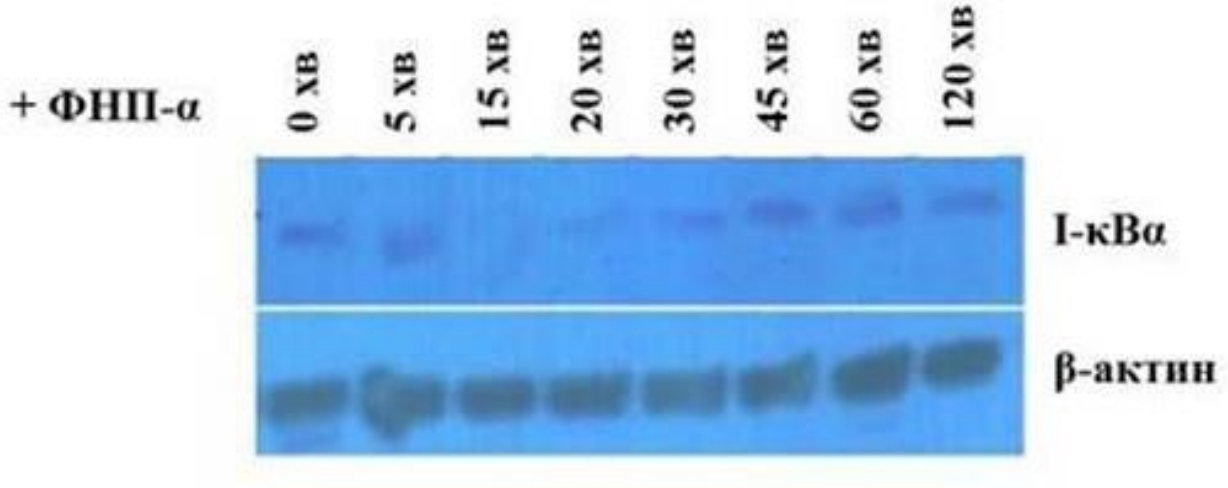


Рис. 3.21. Результати Вестерн-блот аналізу демонструють зміну рівня експресії гена, що кодує структуру протеїну I-κBα в часовому проміжку від 5 до 120 хв після обробки ФНП-α у концетрації 10 нг/мл у клітинах лінії C2C12.

Примітка. Рівень експресії β-актину використовували як внутрішній контроль рівномірносі нанесення протеїнів на електрофоретичні доріжки.

У наступному експерименті клітини C2C12 попередньо обробляли сполуками Les-4368 і Les-3882 у концетраціях 0,1 і 0,3 мкМ (рис. 3.22, А).

Через 1 год після попередньої обробки досліджуваними речовинами додавали ФНП-α у концентрації 10 нг/мл та інкубували протягом 1 год. β-актин використовували як внутрішній контроль рівномірного нанесення протеїнів на електрофоретичні доріжки (рис. 3.22, А).

Встановлено, що обробка клітин лінії C2C12 сполуками Les-3882 і Les-4368 з наступною стимуляціює ФНП-α протягом 1 год по-різному модулюють активацію сигнального шляху NF-κB. Зокрема, дія Les-3882 у концентрації 0,3 мкМ призводить до нижчого рівня експресії гена протеїну I-κBα після обробки ФНП-α (в 1,9 разу), тоді як Les-4368 у тій же концентрації, навпаки, призводить до зростання рівня експресії даного протеїну (в 0,4 разу) порівняно з необробленими клітинами (рис.3.22, Б і В).

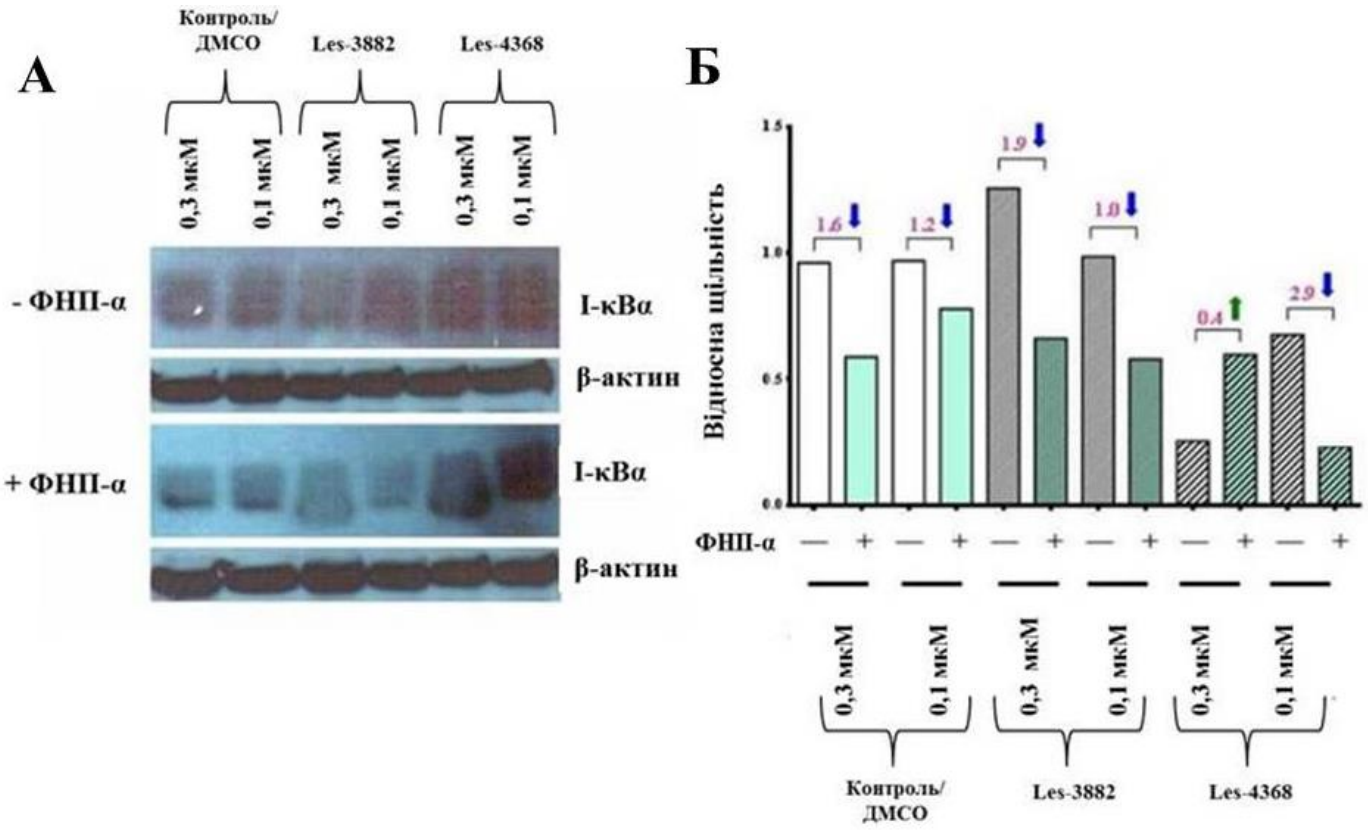


Рис. 3.22. Результати Вестерн-блот аналізу демонструють ефект сполук Les-4368 і Les-3882 в зазначених концентраціях на рівень експресії гена протеїну I-κBα після інкубації з ФНП-α (10 нг/мл) протягом 1 год (А і Б) в клітинах лінії C2C12.

Примітка. Денситометрична оцінка інтенсивності смуг Вестерн-блот аналізу зазначена на панелі Б. Рівень експресії β-актину використовували як внутрішній контроль рівномірності нанесення протеїнів на електрофоретичні доріжки.

Отже, показано, що нові похідні 4-тіазолідинону, а саме сполуки Les-3882 і Les-4368, усувають негативний ефект прозапального цитокіну ФНП-α на ранні стадії остеобластної диференціації МСК миші лінії C2C12. Найвищу активність продемонструвала сполука Les-3882, яка порівняно із контролем в 1,6 рази підсилювала остеобластну диференціацію цих клітин в низькій концентрації (0,1 мкМ), ймовірно, шляхом модуляції сигнального шляху NF-κB.

За результатами цих досліджень опубліковано 1 статтю [136]:

1. **Malysheva K.** 4-thiazolidinone–based derivatives rescue TNFα-inhibited osteoblast differentiation in mouse mesenchymal precursor cells / **K. Malysheva**, N. Finiuk, O. Pavlenko, D. Havrylyuk, R. Lesyk, R. Stoika, O. Korchynskyi // Ukrainian Biochemical Journal. – 2017. – V. 89 (Special Issue). – P. 112-123.

РОЗДІЛ 4
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

4.1 Створення оптимізованих препаратів рекомбінантних МПК для індукції остеобластної диференціації *in vitro*

Відомо, що гетеродимери МПК, які складаються із субодиниць, що належать до різних груп (наприклад МПК2/7 чи МПК4/6) активують сигнальний шлях МПК більш ефективно і, як результат, виявляють кращі остеоіндуктивні властивості завдяки залученню субодиниць рецепторів типу I, які володіють специфічністю до різних підкласів МПК [9]. Остеоіндуктивні властивості різних МПК прямо залежать від інтенсивності активації їх сигнального шляху, тому нами була проведена оцінка рівня активації Smad-залежного сигнального шляху МПК. При порівнянні остеоіндуктивних властивостей рекомбінантних гомодимерів МПК2/2, МПК6/6 і гетеродимеру МПК2/7 було показано, що гетеродимери МПК2/7 є потужнішими активаторами сигнального шляху МПК, ніж гомодимери МПК2/2 у п’ять разів вищій концентрації. Для такої ж активації сигнального шляху МПК, необхідно було б використати гомодимери МПК7/7 за тридцять раз вищої концентрації. Ймовірно, цей рекомбінантний протеїн частково інактивується через взаємодію з продуктом його гена-мішені – сигнальним протеїном Noggin, антагоністом МПК. Механізм такого ефекту був виявлений недавно [117]. У той же час, гетеродимери МПК2/7 виявили порівнюваний ефект із гомодимерами МПК6/6, які використовували у п’ять разів вищій концентрації.

Отримано препарати рекомбінантних МПК шляхом експресії їх генів покращеними версіями плазмідних конструкцій, а також здійснено їх оптимізацію *in vitro*. Показано, що препарат рекомбінантих МПК, отриманий в результаті ко-трансфекції у співвідношенні 85 і 15 % плазмідами з генами, які кодують структуру протеїнів МПК2 і МПК7, виявився найбільш ефективним індуктором остеобластної диференціації модельної культури клітин. Відомо, що МПК2 і

МПК7 активують свій сигнальний шлях через формування гетеротетрамерного комплексу, який складається з мінімум двох субодиниць кожного з МПК рецепторів типу I і II [210].

Наші дослідження, так само як і дослідження інших науковців демонструють найкращі остеоіндуктивні властивості гетеродимерів МПК2/7 порівняно з відповідними гомодимерами [9]. Гомодимери МПК2/2, в основному, зв'язуються з рецепторами ALK3 і ALK6, тоді як гомодимери МПК7/7 вибірково зв'язуються з рецептром ALK2 у комбінації з рецептором ALK6. Кращі остеоіндуктивні властивості гетеродимерів МПК2/7 можуть бути зумовлені об'єднанням рецепторів ALK3 і ALK2 в єдиний комплекс (рис. 4.1).

Згідно даних літератури, гетеродимери МПК2/7 є нечутливими до інгібування Noggin та індукують значно нижчий рівень експресії гена цього протеїну порівняно з гомодимерами МПК2/2 і МП7/7 [220], що може бути ще одним поясненням краще виражених остеоіндуктивним властивостей гетеродимерів МПК2/7 порівняно із відповідними гомодимерами.

Відомо, що процедура заморожування-розморожування препаратів, які містять протеїни, призводить до конформаційних змін останніх. Такі зміни можуть супроводжуватися структурними порушеннями, втратою біологічної активності і деградацією протеїнів, зокрема їх комплексів [4, 28]. Тому, нами також була вивчена можливість збереження біологічної активності, зокрема остеоіндуктивних властивостей отриманих препарарів рекомбінантних МПК після їх короткотривалого зберігання при низьких температурах.

Показано, що заморожування і зберігання препаратів рекомбінантних МПК протягом 3-х год при –70ºС, а також протягом 3-х тижнів при –20°С суттєво не впливали на їх остеоіндуктивні властивості порівняно із свіжими препаратами рекомбінантних МПК, які зберігали протягом такого ж періоду часу при 4°С, і які не зазнавали циклу заморозки-розморозки, відповідно.

Відомо, що зрілі форми МПК2 і МПК7 людини – це невеликі секреторні протеїни, які належать до різних підгруп МПК і, які містять 114 і 139 амінокислотних залишків, відповідно [29, 61, 75, 178].

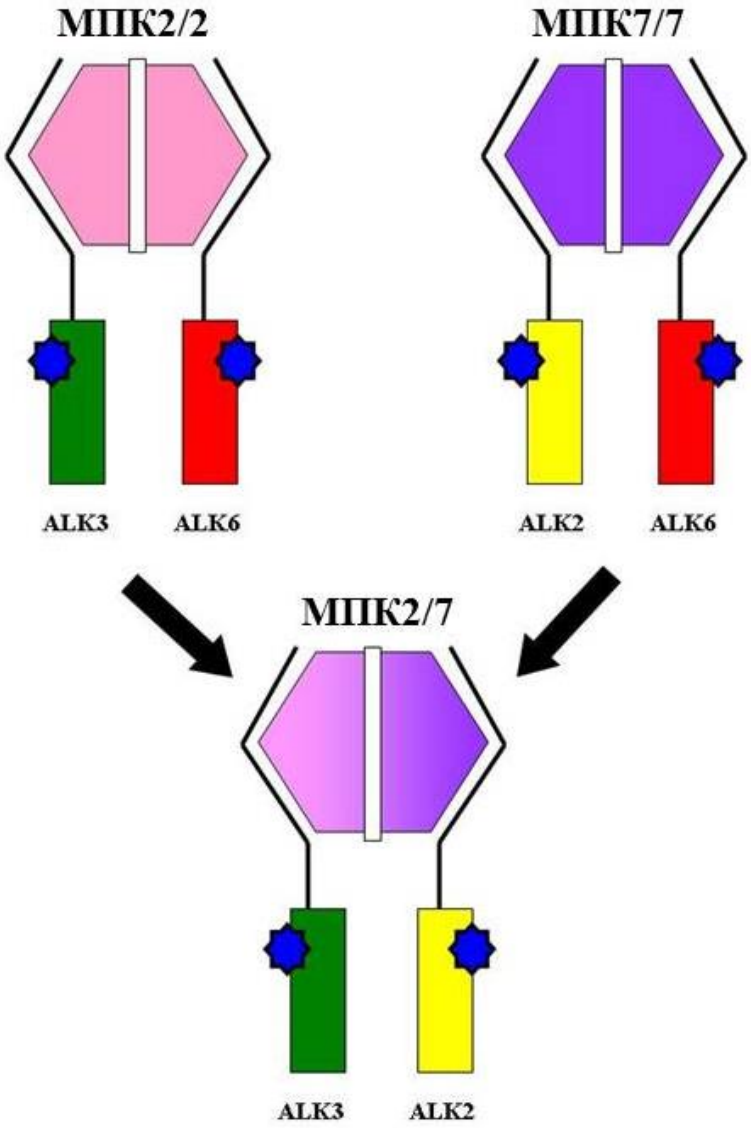


Рис. 4.1. Схема утворення й активації гетеромерного рецепторного комплексу МПК типу I після індукції гетеродирами МПК2/7.

Примітка. Гомодимери МПК2/2, переважно, зв'язуються з рецепторами ALK3 і ALK6, тоді як гомодимери МПК7/7 вибірково зв'язується з рецепторами ALK2 і ALK6. Кращі остеоіндуктивні властивості гетеродимерів МПК2/7 можуть бути зумовлені об'єднанням рецепторів ALK3 і ALK2 в єдиний комплекс.

При цьому амінокислотна послідовність МПК7 ідентична амінокислотній послідовності МПК2 на 60 %. Ці протеїни, як і інші представники надродини

ТФР-β, є дуже стабільними завдяки особливостям своєї структурної організації, зокрема наявністю кількох дисульфідних містків між залишками цистеїнів у складі поліпептидного ланцюга. Молекули МПК7 і МПК2 містять по три внутрішньомолекулярних дисульфідних містки, що забезпечує їх структурну цілісність і міцність [72, 75, 178].

Подібно до інших представників МПК, МПК2 і МПК7, існують у вигляді відповідних гомо- або гетеродимерів, де дві молекули МПК з'єднані між собою ще одним міжмолекулярним дисульфідним містком, що додатково стабілізує такі комплекси [61, 75, 178]. Димерна природа МПК є необхідною умовою для прояву їх біологічної активності, оскільки руйнування дисульфідних містків, що утримують молекули разом, призводить до їх інактивації [61].

Відомо, що МПК можуть витримувати жорсткі умови інкубації без суттєвої інактивації протеїну [176, 209]. Зокрема, у 2011 році доктором M. Takata і співавторами показано, що екстракти МПК7 з голівки стегнової кістки людини зберігали свою біологічну активність після витримування при –190ºС і –73ºС [192]. Іншим дослідженням продемонстровано, що інкубація рекомбінантного МПК2 людини при 50-70°С протягом короткого періоду часу не призводила до суттєвих втрат його остеоіндуктивних властивостей [158]. Таким чином, отримані нами результати, можна пояснити особливостями структурної організації МПК, яка, очевидно, забезпечує формування толерантності цих протеїнів до змін температурного режиму.

Отже, отримані препарати рекобінантних МПК можуть бути успішно використанні для індукції остеобластної диференціації *in vitro*, а також створення високоефективних кістково-пластичних матеріалів для регенерації кісткової тканини або ж мати інше біологічне застосування.

Дослідження біосумісності та остеоіндуктивних властивостей біодеградабельних кістково-пластичних матеріалів на поліуретановій основі. Корекція спадкових аномалій скелету, дегенеративно-дистрофічні захворювання суглобів (серед яких наслідки РА), травми обширних ділянок кістки, переломи,

що тривалий час не загоюються, вимагають ефективного відновлення кісткової тканини.

З іншого боку, МПК є індукторами утворення кісткової тканини в ході ембріогенезу, критично необхідними для підтриманя гомеостазу скелету [38], і тому сьогодні високоперспективними є кістково-пластичні матеріали з використанням МПК для локальної індукції остеогенезу в зоні кісткового дефекту. Поряд з використанням оновлених методів оперативної техніки, на даний час актуальною є проблема вибору кістково-пластичного матеріалу, оскільки відомо, що саме остеопластика відкриває великі можливості для повної реабілітації пацієнтів [3].

На сьогоднішній день усі існуючі кістково-пластичні матеріали поділяють, залежно від походження, на декілька груп, а саме – автогенні, алогенні, ксеногенні, алопластичні (синтетичні, штучно синтезовані кісткові замінники) та композиційні [3, 5].

Матеріали, які належать до перелічених груп, мають як позитивні властивості, так і недоліки, зважаючи на які було визначено основні вимоги до них. Отже, кістково-пластичні матеріали повинні володіти певними механічними, фізико-хімічними та біологічними властивостями, щоб необхідно для забезпечення заданого характеру взаємодії з внутрішнім середовищем організму. Зокрема, основними вимогами до ефективних кістково-пластичних матеріалів є: а) остеогенність – здатність матеріалу викликати ріст кісткової тканини за рахунок остеогенних клітин (автокістка), б) остеоіндукція – здатність стимулювати ріст кісткової тканини в результаті впливу матеріалу на диференціювання МСК (білки крові, фактори росту, біоактивні компоненти, які сприяють росту кістки), в) остеокондукція – здатність матеріалу відігравати роль пасивного матриксу для росту нової кістки з наступною резорбцією матеріалу (біодеградабельність).

Окрім цього, такі матеріали повинні володіти а) пористістю, що забезпечує проростання нової кісткової тканини), б) біо- та імуносумісністю, а також інфекційною безпечністю, і в) доступністю та низькою ціною [3].

Остеоіндуктивні властивості вже існуючих кістково-пластичних матеріалів на основі гідроксиапатиту часто бувають непридатними для ефективної регенерації кісткової тканини, а полілактатні композити в процесі їх біодеградації приводять до часткового підкислення в місці їх імплантації. Тому зростають вимоги до нових кістково-пластичних матеріалів, що містять МПК для високоефективної локальної регенерації кістки в дефектній ділянці. У співпраці з дослідниками Гданської політехніки ми спробували замінити їх подібними біодеградабельними матеріалами на поліуретановій основі.

Поліуретани (polyurethanes, PU) широко використовуються в медичній біології. Зокрема, добре відомими є їх модифікації з допомогою введення наповнювача в матрицю PU. В інженерії кісткової тканини до найбільш розповсюджених наповнювачів належать фосфати кальцію, такі як гідроксиапатит [50, 121], наногідроксиапатит [49, 121] і ортофосфат кальцію [19, 121]. Нещодавно було запропоновано нове рішення для модифікації PU у вигляді гліцерофосфату кальцію [70, 121].

Гліцерофосфат кальцію – це кальцієва сіль гліцерофосфорної кислоти. Ця сполука широко використовується як поживна речовина, компонент харчових добавок або мінеральних кормів, і вважається безпечним інгредієнтом/харчовою добавкою [121].

Відомо, що PU, з включеннями β-гліцерофосфату як біологічно активного компоненту ланцюга, сприяє адгезії МСК людини, їх росту та остеогенній диференціації. Тобто, використання β-гліцерофосфату як компонента, що подовжує ланцюг покращує біологічну активність PU, який застосовується як матеріал для регенерації кісткової тканини. Крім того, гліцерофосфати мають високий потенціал щодо процесів мінералізації, а також належної адгезії та проліферації клітин [101, 121].

З огляду на вищевикладене, для дослідження використовували біодеградабельний кістково-пластичний матеріал на поліуретановій основі – PURs, а також його модифікований варіант – PURs-M з включеннями β-гліцерофосфату кальцію для стимуляції процесів регенерації кісткової тканини.

Досліджувані екстракти поліуретанових кістково-пластичних матеріалів, незалежно від концентрації, показали хорошу біосумісність, не виявивши цитотоксичної дії щодо модельної культури клітин лінії C2C12. Отримані результати свідчать про перспективість таких матеріалів для застосування в інженерії кісткової тканини. Показано, що додавання екстрактів PURs та PURs-M до культурального середовища клітин лінії C2C12 не інгібувало їх МПК2/7-індуковані ранні стадії остеобластної диференціації (як з додаванням так і без додавання вітаміну С), але і суттєво не підсилювало її. Такий результат, ймовірно, можна пояснити недостатньою деградацією досліджуваних кістково-пластичних матеріалів при їх інкубації протягом одного тижня, а також тим, що, у випадку PURs-M, зростання концентрації іонів Кальцію, які вивільняються в ході біодеградації даного матеріалу, не є критично необхідними для цієї стадії остеогенезу.

4.2 Функціональний вклад взаємодії ІЛ-6 і ФНП-α у пригнічення остеобластної диференціації

Вперше показано, що ІЛ-6 інгібує активацію сигнального шляху Wnt в первинних FLS, отриманих від пацієнтів хворих РА. Гіпотеза про взаємодію сигнального шляху Wnt з ІЛ-6 виникла як результат того, що останній, як добре відомо, є геном-мішенню як ФНП-α так і ІЛ-1β [79, 94], а сигнальний шлях Wnt відомий як головний регулятор ремоделювання суглобів [44]. У цьому найцікавішим ефектом є кооперація між ІЛ-6 і ФНП-α при інгібування сигналів Wnt, оскільки анти-ІЛ-6 терапія є важливою альтернативою при лікуванні хворих РА, які нечутливі до блокаторів ФНП-α [194, 214].

Цікавим є той факт, що фібробласти миші лінії NIH-3T3, які значно меншою мірою чутливіші до інгібіторної дії ФНП-α, ніж FLS людини і без стимуляції лігандами Wnt3a не відповідають на дію ІЛ-6. Значно нижча чутливість фібробластів лінії NIH-3T3 до інгібіторних ефектів ІЛ-6 у поєднанні з ФНП-α або

ж з DKK-1 дозволяє припустити, що вища чутливість FLS є їх важливою клітинно-специфічною особливістю, що, в свою чергу, є важливим для розитку і прогресування РА. ФНП-α не проявив ніяких ефектів у поєднанні з DKK-1 чи з іншими двома агентами (ІЛ-6/ІЛ-6Р і DKK-1). У цьому випадку, така відсутність ефектів ФНП-α наводить на думку про перекриття механізмів, що було запропоновано у 2007 році доктром D. Diarra та коллегами, і які показали, що DKK-1 є основним посередником в регуляції ремоделювання суглобів [44].

Роздуми щодо клітинно-специфічних особливостей FLS також підтверджуються результатами, які були отримані при обробці рекомбінантним Hyper-ІЛ-6 клітин лінії KS483 – значне підсилення ранніх стадій остеобластної диференціації при стабільному нокдауні експресії мРНК гена ІЛ-6 з допомогою відповідних мшРНК. Імовірно, що взаємодія ІЛ-6 з DKK-1, утворення якого індукується ФНП-α, може бути центральним механізмом, який опосередковує вплив ІЛ-6 на інгібування остеобластної диференціації.

Відомо, що під час розвитку РА відбувається зниження співвідношення OPG/RANKL і зростання рівня циркулюючого RANKL, що позитивно корелює із рівнем С-реактивного протеїну. При розвитку РА також зростають рівні DKK-1, склеростину і остеокальцину [194].

З іншого боку, анти-ІЛ-6 терапія призводить до зниження рівня DKK-1 у сироватці пацієнтів з РА [194]. Несподівано, але аналогічне дослідження, проведене з синовіальними рідинами і запаленими тканинами суглобів виявило зворотню кореляцію між рівнями протеїну DKK-1 і ІЛ-6 в запалених суглобах *in vivo* [214]. Однак, ці дослідження описують лише зміни і не пояснюють їх можливого механізму, і наше дослідження є першим, що надає можливе його трактування.

Показано, що нокдаун експресії мРНК гена ІЛ-6 частково усуває негативний вплив ФНП-α на остеобластну диференціацію МСК миші лінії С2С12. Такий результат дозволяє припустити, що ІЛ-6 є важливим медіатором в опосередкованому ФНП-α інгібуванні остеогенезу. Незважаючи на той факт, що ІЛ-6 і ФНП-α є добре відомими ключовими цитокінами, задіяними у патогенезі

РА, детальний механізм чи механізми взаємодії ІЛ-6 та ФНП-α, що призводить до інгібування кісткоутворення, і досі залишаються недостатньо добре вивченими.

Враховуючи відомі дані, було неочікуваним виявити, що нокдаун експресії мРНК гена ІЛ-6 перетворює ФНП-α з інгібітора в активатор остеобластної диференціації. Це свідчить про те, що активація/інгібування та регуляція остеогенезу залишаються в недостатній мірі добре вивченими, зокрема при запалені чи у процесі старіння організму. Це складна система, яка включає багато компонентів і взаємодій, частина з яких і досі є або малодослідженими або невідомими.

Встановлено, що ІЛ-6 є важливим інгібітором пізніх стадій остеогенезу, що можна пояснити існуванням досі невідомою прямою чи непрямою негативною взаємодією між ІЛ-6 і сигнальним шляхом Wnt, у якому DKK-1 відіграє важливу роль [44, 194, 214].

Відомо, що основна функція протеїну DKK-1 полягає у пригніченні сигнального шляху Wnt через інгібування взаємодії ко-рецептора LRP5/6 з протеїнами Wnt. Також протеїн DKK-1 через формування потрійного комплексу з трансмембранним протеїном Kremen1/2 і ко-рецептором LRP5/6 сприяє інтерналізаії і подальшій деградації останнього. Вірогідно, що ІЛ-6 підсилює функцію DKK-1 [8, 141]. Інгібування сигнального шляху Wnt даним цитокіном у скелетних тканинах, імовірно, є головним механізмом, який призводить до опосередкованої віком чи запаленням руйнування кісткової тканини і суглобів (рис. 4.2).

Таким чином, отримані дані, а також результати досліджень інших науковців дозволяють припустити, що взаємодія між сигнальними шляхами ІЛ-6 та Wnt є новим ключовим механізмом регуляції гомеостазу тканин суглобів при патогенезі РА. Детальне вивчення цього механізму, а також функціонального вкладу ІЛ-6 в інгібування сигнального шляху Wnt є критичним для точного розуміння його ролі у патогенезі і розвитку РА, що може стати основою для розробки нових стратегій діагностики і лікування цього та інших захворювань з подібною етіологією.

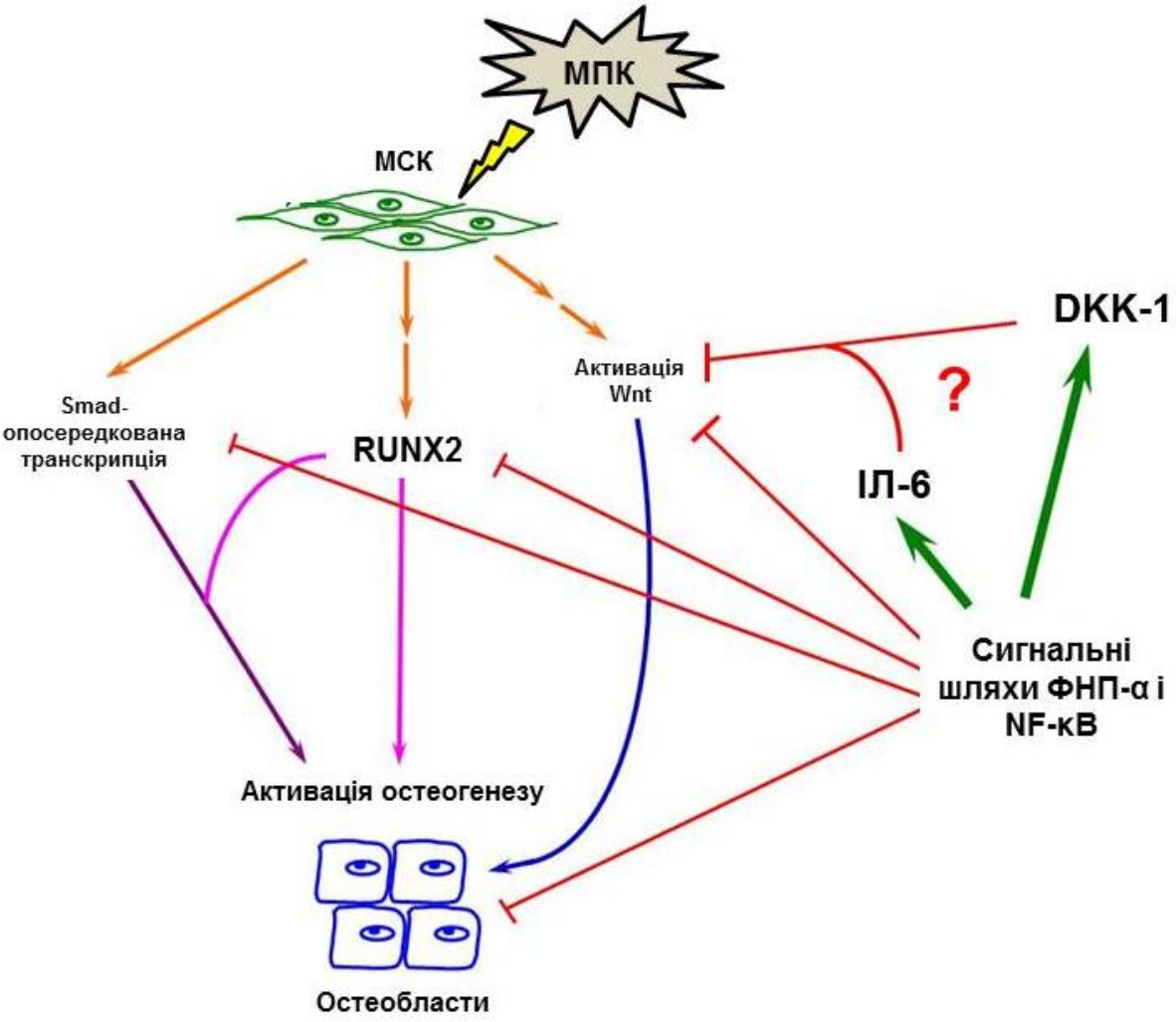


Рис. 4.2. Схема вкладу взаємодії між ІЛ-6 і сигнальним шляхом Wnt у ремоделюванні тканин суглобів.

Примітка. МПК і Wnt-протеїни запускають центарльні механізми, що індукують і підтримують формування скелетних тканин. МПК індукують остеобластну диференціацію МСК. Запальні процеси, опосередковані ФНП-α і активацією сигнального шляху NF-κB, інгібують Smad-залежний сигнальний шлях МПК, активацію сигнального каскаду Wnt, а також функціональну активність гена-мішені ФНП-α, RUNX2, який є ключовим фактором остеобластної диференціації. ФНП-α індукує експресію генів, які кодують ІЛ-6 і протеїну DKK-1 – ключового інгібітора остеобластної диференціації. Взаємодія між ІЛ-6 і DKK-1 є важливою для прозапального контролю активації скелетогенного сигнального шляху Wnt та ремоделювання тканин суглобів.

4.3 Роль генів *pttg1* і *pttg-bp1* в регуляції остеобластної диференціації

Формування скелету хребетних – це складний процес, який включає систему скоординованих біологічних подій, серед яких важливою є регуляція диференціації МСК в остеобласти, остеокласти і хондроцити. Незважаючи на те, що охарактеризовані численні транскрипційні фактори, які забезбечують координацію процесів під час формування скелету, було виявлено лише обмежену кількість транскрипційних факторів, які регулюють розвиток клітинних компонентів скелету. Серед них SOX9, який регулює дозрівання хондроцитів; fos, що задіяний у розвитку остеокластів, а також RUNX2 та Osterix, які залученні в регуляції диференціації остеобластів. Роль RUNX2 розпочали вивчати детально після того, як було виявлено, що миші з дефіцитом транскрипційного фактора RUNX2, були позбавлені кістки. Аналіз мишей з нокаутом гена *RUNX2* показав, що вони повністю позбавлені остеобластів. Цей висновок та дані, що вказують на те, що RUNX2 контролює експресію генів, специфічних для остеобластів, призвела до висновку, що RUNX2 є ключовим транскрипційним фактором, який опосередковує остеобластну диференціацію [51, 112, 190].

У 2004 році доктором M. Stock і співавторами було показано, що *pttg-bp1* є геном-мішенню транскрипційного фактора RUNX2 [190]. Згідно літературних даних, рівень експресії гена *pttg-bp1* зменшується з часом перебігу РА порівняно з початковими стадіями захворювання [125]. У свою чергу, продукт гена *pttg-bp1*, PTTG-BP1, необхідний для зв'язування і транслокації в ядро секурину – протеїнового продукту гена *pttg1*.

Відомо, що МПК і сигнальний ланцюг Wnt є ключовими сигнальними шляхами, які індукують та підтримують формування скелетних тканин [32, 130, 134, 164]. У співпраці з доктором C. Krause, канд.біол.наук Корчинським О. Г. показано, що надекспресія гена *pttg1* призводить до значного гальмування регуляторних сигналів Wnt в клітинах-мішенях. Такий результат дозволив припустити, що система PTTG1/PTTG-BP1 виконує функцію нового негативного

регулятора гомеостазу кісткової та, вірогідно, хрящової тканин, а також задіяний у патогенезі РА.

Досліджено ефекти надекспресії генів *pttg1* і *pttg-bp1* та блокування експресії їх мРНК з допомогою відповідних мшРНК на ранні і пізні стадії остеобластної диференціації МСК миші, індукованої МПК2/7. Показано, що тимчасова надекспресія гена *pttg-bp1* в значній мірі інгібує МПК-індуковані ранні стадії остеобластної диференціації модельної культури клітин. При тимчасовій надекпресії гена *pttg1* і за наявності ФНП-α в середовищі значно підсилюються остеогенні процеси порівняно з контролем. Це може свідчити про роль PTTG1 у регуляції концентрації ФНП-α. Такі дані дають підставу вважати PTTG1 задіяним у деструкції скелетних тканин, викликаних запальним процесом (як відомо, ФНП-α є прозапальним цитокіном).

Досліджено ефекти тимчасових надекспресії і нокдауну генів *pttg1* і *pttg-bp1* на активацію сигнального шляху Wnt, який, як відомо з літературних джерел, активується на пізніх стадіях остеогенезу [117]. Встановлено, що тимчасова надекспресія гена *pttg1* інгібує пізні стадії остеобластної диференціації та мінералізацію кісткового матриксу модельними культурами клітин. Тоді як нокдаун експресії гена *pttg1* веде до значної активації як ранніх так і пізніх стадій остеогенної диференціації цих клітин.

Для отримання більш точних результатів проведено ряд досліджень щодо вивчення ролі гена *pttg1* в регуляції остеобластної диференціації МСК миші з стабільним нокдауном даного гена. Показано, що ефективні конструкції мшРНК (анти-pttg1 мшРНК-1 і анти-pttg1 мшРНК-2) дозволили підсилити ранні стадії остеобластної диференціації стабільних мультиклональних культур клітин ліній C2C12 і KS483, обумовлені ефективним пригніченням експресії гена *pttg1*.

Отже, PTTG1 є важливим транскрипційним репресором остеогенезу і, можливо, задіяний у руйнуванні кісткової тканини, спричиненому запальним процесом, а також може відігравати роль інгібітора ремоделювання кісткової тканини. Таким чином, інгібування сигнального шляху Wnt протеїном PTTG1 вперше може пояснити фенотипові прояви, які виникають у результаті

направленої інактивації (нокауту) гена *pttg1*. Виявлено новий механізм негативної регуляції сигнального шляху Wnt продуктом гена *pttg1*, що є критично важливим для точного розуміння молекулярної основи патогенезу та розвитку РА.

4.4 Ефекти нових похідних 4-тіазолідинону щодо опосередкованого ФНП-α інгібування остеобластної диференціації

Незважаючи на значну частоту захворюваності РА у світі (до 1,8% дорослого населення), ефективних методів лікування РА і досі не створено. Сучасні способи терапії РА включають широке використання ряду методик, які грунтуються на застосуванні блокаторів ФНП-α та ІЛ-6. Ці препарати можуть значно сповільнити розвиток РА чи звести до мінімуму деградацію суглобів.

На жаль, жоден із існуючих засобів не здатний повністю зупинити руйнування уражених тканин суглобів і забезпечити їх ефективну регенерацію. Тому, важливими є пошук і створення високоефективних терапевтичних препаратів, які змогли б усунути негативний вплив запального процесу на деградацію кісткової та хрящової тканин суглобів, а також сприяти їх відновленню.

Синтез нових сполук, що грунтується на модифікації хімічних груп молекул, є одним з найперспективніших підходів у розробці нових лікарських засобів. 4-тіазолідинони – це похідні тіазолідинону, які у 4-ому положенні містять карбонільну групу. Ця структура є основою ряду синтетичних фармацевтичних сполук, які виявляють різну біологічну активність, зокрема антимікробну, протиракову, протисудомну, протипаразитну, противірусну та ін [80, 184, 196]. Така різноманітність біологічної відповіді на дію цих речовин привертає увагу багатьох дослідників [76, 196].

Досліджено протизапальну активність нових похідних 4-тіазолідинону щодо ФНП-α-опосередкованих запальних процесів під час остеобластної диференціації МСК. Новосинтезовані похідні 4-тіазолідинону, які

використовувались в експериментах, відрізняються між собою наявністю і розміщенням у молекулі специфічних функціональних груп (рис. 2.2).

Досліджувані сполуки (Les-4368, Les-4370, Les-3882 і Les-3288) проявили мінімальну цитотоксичність щодо модельної культури клітини, що, у свою чергу, є важливим і необхідним для уникнення шкідливих побічних ефектів у тканинах-мішенях.

З'ясовано, які з досліджуваних новосинтезованих похідних 4-тіазолідинону виявляють протизапальну дію. Сполуки Les-4368 і Les-3882 усували негативний ефект ФНП-α на остеобластну диференціацію модельної культури МСК. Ці сполуки конвертували дію ФНП-α з інгібітора остеогенезу в його стимулятор. У той самий час, сполуки Les-4370 і Les-3288 виявились неефективними щодо модуляції остеобластної диференціації за умов запалення, індукованого ФНП-α. Показано, що похідні 4-тіазолідинону, Les-4368 і Les-3882, володіють протизапальними властивостями у широкому діапазоні концентрацій. Зокрема, найкращий ефект виявила сполука Les-3882, яка 1,6 рази підсилювала остеобластну диференціацію модельної культури клітин у порівнянні з контролем.

Відомо, що сигнальний шлях NF-κB – це основний сигнальний механізм, який опосередковує ефекти прозапальних цитокінів. Зокрема, ФНП-α належить до найпотужніших фізіологічних активаторів даного сигнального шляху. Крім того, ФНП-α відіграє роль ключового медіатора запалення [184]. Модуляція активації сигнального шляху NF-κB сполуками Les-4368 і Les-3882, може бути центральним механзімом, який опосередковує їхню протизапальну активність. Як відомо, протеїн I-κBα – це критично важливий компонент сигнального шляху NF-κB, який контролює його активацію (рис. 1.4). Тому, для з'ясування імовірного молекулярного механізму, що опосередковує ефекти досліджуваних новосинтезованих похідних 4-тіазолідинону, ми визначали рівень активації даного сигнального шляху, через детекцію рівня експресії гена протеїну I-κBα за дії нових похідних 4-тіазолідинону. Встановлено, що сполуки Les-4368 і Les-3882, по-різному модулюють активацію сигнального шляху NF-κB, виявляючи при

цьому протилежні ефекти на рівень експресії гену, який кодує І-кВα. Дія Les-3882 вела до зниження рівня експресії гена інгібіторного протеїну І-кВα після обробки ФНП-α, тоді як вплив Les-4368, навпаки, вів до зростання рівня експресії гена даного протеїну. Для пояснення такої різниці в модуляції сигнального шляху NF-кВ, а також для детальнішого з'ясування механізму цього процесу, необхідно провести додаткові дослідження структурно-функціональних зв'язків нових синтетичних похідних 4-тіазолідинону.

Підсумовуючи дані, наведені в розділі «Аналіз і узагальнення одержаних результатів», у дисертаційній роботі вперше експериментально продемонстровано існування кооперативного інгібувального ефекту ІЛ-6 разом з ФНП-α і DKK-1 на остеогенний сигнальний шлях Wnt. Враховуючи те, що прогресування РА призводить до ураження прилягаючої кісткової тканини в суглобах, проведено оцінку *in vitro* функціонального вкладу взаємодії ІЛ-6 і ФНП-α в інгібування остеогенезу. Для цього використовували обробку рекомбінантними цитокінами у поєднанні з блокуванням експресії мРНК гена *ІЛ-6* з допомогою мшРНК в МСК миші під час їх остеобластної диференціації. Показано, що стабільний нокдаун експресії мРНК гена *ІЛ-6* підсилював ранні стадії остеобластної диференціації, а також усував негативний вплив ФНП-α на остеобластну диференціацію і перетворював його з інгібітора у потенціатор остеогенезу. До того ж, нокдаун експресії мРНК гена *ІЛ-6* підсилював пізні стадії остеобластної диференціації цих клітин. Показано, що ІЛ-6 є важливим медіатором в інгібуванні остеобластної диференціації, опосередкованим ФНП-α. Найімовірніше, що антиостеогенні ефекти ІЛ-6 обумовлені його негативною взаємодією з сигнальним шляхом Wnt.

Досліджено ефекти надекспресії і нокдауну генів *pttg1* і *pttg-bp1* на активацію сигнального шляху Wnt і МПК. Встановлено, що ектопічна експресія гена *pttg-bp1* призводить до інгібування остеогенної диференціації, тоді як нокдаун експресії мРНК гена *pttg1*, опосередкований малими шпильковими РНК, навпаки, підсилює її. Показано, що ектопічна ко-експресія генів *pttg1* і *pttg-bp1*

інгібує активацію сигнального шляху Wnt, тоді як нокдаун експресії мРНК цих генів з допомогою відповідних мшРНК, виявляє протилежний ефект. З'ясовано, що система PTTG1/PTTG-BP1 є важливим транскрипційним репресором остеогенезу і, можливо, задіяна у руйнуванні кісткової тканини, спричиненому запальним процесом.

Незважаючи на значну частоту захворюваності РА у світі, ефективних методів лікування цього захворювання і досі не створено. Тому, важливими є пошук і створення високодієвих терапевтичних препаратів, які змогли б усунути негативний вплив запального процесу на деградацію кісткової та хрящової тканин суглобів, а також сприяти їх регенерації. Досліджено похідні 4-тіазолідинону, які володіють здатністю модулювати остеобластну диференціацію МСК. Показано, що сполуки Les-4368, Les-4370, Les-3882 і Les-3288 виявляють мінімальну цитотоксичність, що, у свою чергу, є важливим і необхідним для уникнення шкідливих побічних ефектів у тканинах-мішенях.

Досліджено ефекти похідних 4-тіазолідинону Les-4368, Les-4370, Les-3882, і Les-3288 щодо опосередкованої фактором некрозу пухлин α прозапальної дії під час остеобластної диференціації МСК. Показано, що сполуки Les-4368 і Les-3882 у концентрації 1 мкМ, усували негативний вплив ФНП-α на остеобластну диференціацію цих клітин. Більше того, ці речовини конвертували дію останнього з інгібітора остеогенезу в його стимулятор. Проведено дослідження для з'ясування молекулярного механізму протизапальної активності сполук Les-4368 і Les-3882. Встановлено, що обробка МСК сполуками Les-3882 і Les-4368 з наступною стимуляцією ФНП-α по-різному модулюють активацію сигнального шляху NF-κB, що, потенційно, може бути ключовим механізмом, який опосередковує їхні протизапальні ефекти.

Було отримано і здійснено оптимізацію *in vitro* остеоіндуктивних властивостей препаратів рекомбінантних МПК, які успішно використовували в дисертаційній роботі для індукції остеобластної диференціації *in vitro* і, які також можуть бути застосовані в інших біологічних цілях. Також показано, що екстракти поліуретанових кістково-пластичних матеріалів, PURs і PURs-M, є

нетоксичними і не інгібують ранні стадії остеобластної диференціації МСК лінії C2C12, що робить їх перспективними для клінічного застосування в інженерії кісткової тканини.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше надано експериментальні докази існування кооперативного інгібувального ефекту ІЛ-6 разом з ФНП-α і DKK-1 на остеогенний сигнальний шлях Wnt. Для цього використано сучасні методи біохімії, молекулярної і клітинної біології, зокрема визначення активності лужної фосфатази, люциферази і β-галактозидази, Вестерн-блот аналіз клітинних протеїнів з використанням антитіл до відповідних регуляторних протеїнів, технології люциферазних репортерів, малих шпилькових РНК, трансфекція клітин плазмідами із заданими генами, культивування клітин і цитохімічне забарвлення клітин, що диференціюються, статистичне опрацювання результатів досліджень. Результати досліджень щодо отримання препаратів рекомбінантних кісткових морфогенетичних протеїнів 2 і 7 та оптимізації їх остеоіндуктивних властивостей можна успішно використовувати для стимуляції індукції остеобластної диференціації *in vitro*, регенерації кісткової тканини, а також для створення високоефективних регенеративних кісткових матриксів.

За результатами досліджень зроблено наступні основні висновки:

1. Найефективнішим індуктором остеобластної диференціації на моделі клітин лінії С2С12 є препарат рекомбінантного МПК, що утворюється за сумісної трансфекції клітин оптимізованими варіантами плазмід, МПК2-pDEF і МПК7-pSport6.1, у співвідношенні 85 до 15 %, відповідно ($p \leq 0{,}01 – p \leq 0{,}001$).

2. Глибоке заморожування та зберігання при при температурі -70ºС препаратів рекомбінантних МПК з оптимізованими остеоіндуктивними властивостями не призводить до достовірної втрати їх остеоіндуктивних властивостей порівняно з свіжовиділеними препаратами МПК.

3. Екстракти поліуретанових кістковопластичних матеріалів (PURs та PURs-M**)** є нетоксичними і не інгібують ранньої остеобластної диференціації МСК лінії С2С12.

4. ІЛ-6 разом з ФНП-α чи DKK-1 проявляє кооперативний інгібувальний ефект щодо остеогенного сигнального шляху Wnt. Зокрема, у первинних

синовіальних фібробластах людини, фактор некрозу пухлин α так само як і продукт його гена-мішені, інтерлейкін 6, інгібують активацію сигнального шляху Wnt у 2,67 ($p \leq 0,05$) і 4,39 ($p \leq 0,01$) разу, відповідно, порівняно з контролем. Поєднання дії ІЛ-6 і ФНП-α призводить до інгібування сигнального шляху Wnt у 13,5 ($p \leq 0,01$) разу. Обробка фібробластів миші лінії NIH-3T3 інтерлейкіном 6 та його рецептором разом з надекспресією гена протеїну DKK-1 призводить до інгібування даного сигнального шляху в 1,42 ($p \leq 0,05$) разу порівняно з контролем.

5. Ефективні конструкції мшРНК (анти-ІЛ-6 мшРНК-1) дозволили частково усунути негативний вплив ФНП-α на остеобластну диференціацію клітин лінії C2C12. У випадку анти-ІЛ-6 мшРНК-2 вдалося конвертувати ФНП-α з інгібітора у потенціатор остеобластної диференціації цих клітин у 1,71 ($p \leq 0,05$) разу порівняно з контролем.

6. Тимчасовий нокдаун експресії мРНК гена *ІЛ-6* з допомогою мшРНК, підсилює пізні стадії остеобластної диференціації клітин лінії KS483. Це відображається у 1,5 разу вищій активності процесів мінералізації позаклітинного матриксу цими клітинами порівняно з контролем.

7. Стабільний нокдаун експресії мРНК гена *ІЛ-6* з допомогою мшРНК, усуває негативний вплив ФНП-α на остеобластну диференціацію мультиклональної культури клітин лінії C2C12, а також суттєво підсилює перебіг ранніх стадій остеогенезу цих клітин і мультиклональної культури клітин лінії KS483 (в окремих експериментах від 2,7 до 6 рази порівняно з контролем).

8. Ектопічна експресія гена *pttg-bp1* призводить до інгібування ранніх стадій остеобластної диференціації клітин лінії C2C12 порівняно з контролем – у 6,93 ($p \leq 0,01$) разу, тоді як тимчасовий нокдаун генів *pttg1* та *pttg-bp1* з допомогою мшРНК, суттєво підсилює остеобластну диференціацію цих клітин – у 2,52 ($p \leq 0,01$) і 1,89 ($p \leq 0,05$) разу, відповідно. Під час тимчасової надекпресії гена *pttg1* і за наявності ФНП-α в середовищі, остеогенні процеси інтенсифікувались в 2,41 ($p \leq 0,05$) разу.

9. Ектопічна ко-експресія генів *pttg1* і *pttg-bp1* інгібує активацію сигнального шляху Wnt, що відображається у зниженні в 2,5 разу інтенсивності

мінералізації кісткового матриксу клітинами лінії KS483 порівняно з контролем. У той же час нокдаун експресії мРНК генів *pttg1* і *pttg-bp1* з допомогою мшРНК або ж їх поєднання, додатково підсилює мінералізацію кісткового матриксу цими клітинами у 3,0, 1,5 та 2,5 разу, відповідно.

10. Похідні 4-тіазолідинону, сполуки Les-4368, Les-4370, Les-3882 і Les-3288 (у концентраціях 0,02; 0,1; 0.5 і 1,0 мкМ), виявляють мінімальну цитотоксичність, що, у свою чергу, є важливим і необхідним для уникнення шкідливих побічних ефектів у тканинах-мішенях. Дія на клітини лінії C2C12 сполуками Les-3882 і Les-4368 призводить до усунення негативного впливу ФНП-α на остеобластну диференціацію цих клітин, додатково підсилює її, а також перетворює ФНП-α з інгібітора остеогенезу в його стимулятор. Найкращий ефект виявила сполука Les-3882, яка вже у низькій дозі (0,1 мкМ) підсилювала остеобластну диференціацію у 1,56 ($p \leq 0,05$) разу порівняно з контролем.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Коваленко ВН. Ревматоидный артрит: этиопатогенез, клиника, диагностика, лечение. Ліки України. 2005;90(1):24-6.

2. Костюрина ГН, Лебец ИС, Коломиец АМ, Богмат ЛФ, Сороколат ЮВ. Хронические артриты у детей и подростков. Харків:Основа; 2002.

3. Мисула ІР, Скочило ОВ. Кістково-пластичні матеріали для заміщення дефектів щелеп: від історії до сьогодення. Шпитальна хірургія. 2013;3:96-101.

4. Нардид ОА. Влияние низких температур на белковые системы. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2014;24(2):83-101.

5. Павленко АВ. Остеопластические материалы в стоматологии:прошлое, настоящее, будущее. Современная стоматология. 2008;4:103-8.

6. Свінціцький АС. Ревматоїдний артрит: вчора, сьогодні, завтра. Здоров'я України. 2007;12:162.

7. Abbas S, Zhang YH, Clohisy JC, Abu-Amer Y. Tumor necrosis factor-alpha inhibits pre-osteoblast differentiation through its type-1 receptor. Cytokine. 2003;22(1-2):33-41.

8. Ahn VE, Chu ML, Choi HJ, Tran D, Abo A, Weis WI. Structural basis of Wnt signaling inhibition by Dickkopf binding to LRP5/6. Dev Cell. 2011;21(5):862-73. doi:10.1016/j.devcel.2011.09.003.

9. Aoki H, Fujii M, Imamura T, Yagi K, Takehara K, Kato M, et al. Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. J Cell Sci. 2001;114(Pt 8):1483-9.

10. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism association 1987 revised criteria for the classifcation of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1988;31(3):315-24.

11. Ataie-Kachoie P, Pourgholami M, Morris D. Inhibition of the Il-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. Cytokine Growth Factor Rev. 2013;24(2):163-73. doi:10.1016/j.cytogfr.2012.09.001.

12. Atkins GJ, Kostakis P, Pan B, Farrugia A, Gronthos S, Evdokiou A, et al. RANKL expression is related to the differentiation state of human osteoblasts. J Bone Miner Res. 2003;18(6):1088-98. doi:10.1359/jbmr.2003.18.6.1088.

13. Aubin JE. Bone stem cells. J Cell Biochem Suppl. 1998;30-31:73-82.

14. Bai D, Ueno L, Vogt PK. Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. Int J Cancer. 2009;125(12):2863-70. doi:10.1002/ijc.24748.

15. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. Nat Med. 2013;19(2):179-92. doi:10.1038/nm.3074.

16. Bartoccioni E, Michaelis D, Hohlfeld R. Constitutive and cytokine-induced production of interleukin-6 by human myoblasts. Immunol Lett. 1994;42(3):135-8.

17. Berthon A, Martinez A, Bertherat J, Val P. Wnt/β-catenin signaling in adrenal physiology and tumor development. Mol Cell Endocrinol. 2012;351(1):87-95. doi:10.1016/j.mce.2011.09.009.

18. Bloemen V, Schoenmaker T, de Vries TJ, Everts V. IL-1β favors osteoclastogenesis via supporting human periodontal ligament fibroblasts. J Cell Biochem. 2011;112(7):1890-7. doi:10.1002/jcb.23109.

19. Bonzani IC, Adhikari R, Houshyar S, Mayadunne R, Gunatillake P, Stevens MM. Synthesis of two-component injectable polyurethanes for bone tissue engineering. Biomaterials. 2007;28(3):423-33. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.08.026.

20. Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. J Cell Sci. 2008;121(Pt 6):737-46. doi:10.1242/jcs.026096.

21. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. Cell Signal. 2011;23(4):609-20. doi:10.1016/j.cellsig.2010.10.003.

22. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. J Clin Invest. 2008;118(11):3537–45. doi:10.1172/JCI36389.

23. Bromley M, Woolley DE. Chondroclasts and osteoclasts at subchondral sites of erosion in the rheumatoid joint. Arthritis Rheum. 1984;27(9):968-75.

24. Brzustewicz E, Bryl E. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis – Practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of personalized therapy. Cytokine. 2015;76(2):527-36. doi:10.1016/j.cyto.2015.08.260.

25. Butler SJ, Dodd J. A role for BMP heterodimers in roof plate-mediated repulsion of commissural axons. Neuron. 2003;38(3):389-401.

26. Cameron MJ, Kelvin DJ. Cytokines, Chemokines and Their Receptors. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013. Available from Madame Curie Bioscience Database https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6294/.

27. Campbell IK, Gerondakis S, O'Donnell K, Wicks IP. Distinct roles for the NF-kappaB1 (p50) and c-Rel transcription factors in inflammatory arthritis. J Clin Invest. 2000;105(12):1799-806. doi:10.1172/JCI8298.

28. Cao E, Chen Y, Cui Z, Foster PR. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. Biotechnol Bioeng. 2003;82(6):684-90. doi:10.1002/bit.10612.

29. Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications. Arch Biochem Biophys. 2014;561:64-73. doi:10.1016/j.abb.2014.07.011.

30. Charatcharoenwitthaya N, Khosla S, Atkinson EJ, McCready LK, Riggs BL. Effect of blockade of TNF-alpha and interleukin-1 action on bone resorption in early postmenopausal women. J Bone Miner Res. 2007;22(5):724-9. doi:10.1359/jbmr.070207.

31. Chen H, Senda T, Kubo KY. The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. Med Mol Morphol. 2015;48(2):61-8. doi:10.1007/s00795-015-0099-y.

32. Chen G, Deng C, Li YP. TGF-β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. Int J Biol Sci. 2012;8(2):272-88. doi:10.7150/ijbs.2929.

33. Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004;5(5):392-401. doi:10.1038/nrm1368.

34. Cheng Q, Cant CA, Moll T, Hofer-Warbinek R, Wagner E, Birnstiel ML, et al. NFκB subunit-specific regulation of the IκBα promoter.J Biol Chem.1994;269:13551-7.

35. Chiao PJ, Miyamoto S, Verma IM. Autoregulation of IκBα activity. Proc Natl Acad Sci USA. 1994;91:28–32.

36. Chizzolini C, Dayer JM, Miossec P. Cytokines in chronic rheumatic diseases: is everything lack of homeostatic balance? Arthritis Res Ther. 2009;11(5):246. doi:10.1186/ar2767.

37. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 2012;51 Suppl 5:3-11. doi:10.1093/rheumatology/kes113.

38. Chuva de Sousa Lopes SM, Feijen A, Korving J, Korchynskyi O, Larsson J, Karlsson S. Connective tissue growth factor expression and Smad signaling during mouse heart development and myocardial infarction. Dev Dyn. 2004;231(3):542-50. doi:10.1002/dvdy.20162.

39. Cope AP, Schulze-Koops H, Aringer M. The central role of T cells in rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol. 2007;25 Suppl 46:4-11.

40. De Benedetti F, Rucci N, Del Fattore A, Peruzzi B, Paro R, Longo M, et al. Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. Arthritis Rheum. 2006;54(11):3551-63. doi:10.1002/art.22175.

41. De Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. Cytokine Growth Factor Rev. 2004;15(1):1-11.

42. De Rossi M, Bernasconi P,Baggi F, deWaalMalefyt R,Mantegazza R. Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation.Int Immunol. 2000;12(9):1329-35.

43. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature. 2003;425(6958):577-84. doi:10.1038/nature02006.

44. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. Nat Med. 2007;13(2):156-63. doi:10.1038/nm1538.

45. Di Donato JA, Mercurio F, Karin M. NF-κB and the link between inflammation and cancer. Immunol Rev. 2012;246(1):379-400. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01099.x.

46. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. Injury. 2005;36(12):1392-404. doi:10.1016/j.injury.2005.07.019.

47. Dinarello CA. Historical Review of Cytokines. Eur J Immunol. 2007;37 Suppl 1:34-45. doi:10.1002/eji.200737772.

48. Dong J, Cui X, Jiang Z, Sun J. MicroRNA-23a modulates tumor necrosis factor-alpha-induced osteoblasts apoptosis by directly targeting Fas. J Cell Biochem. 2013;114(12):2738-45. doi:10.1002/jcb.24622.

49. Dong Z, Li Y, Zou Q. Degradation and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering. Appl Surf Sci. 2009;255:6087–91.

50. Du J, Zou Q, Zuo Y, Li Y. Cytocompatibility and osteogenesis evaluation of HA/GCPU composite as scaffolds for bone tissue engineering. Int J Surg. 2014;12(5):404-7. doi:10.1016/j.ijsu.2014.03.005.

51. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell. 1997;89(5):747-54.

61. El Bialy I, Jiskoot W, Reza Nejadnik M. Formulation, delivery and stability of bone morphogenetic proteins for effective bone regeneration. Pharm Res. 2017;34(6):1152-70. doi:10.1007/s11095-017-2147-x.

62. Eyre S, Hinks A, Flynn E, Martin P, Wilson AG, Maxwell JR, et al. Confirmation of association of the REL locus with rheumatoid arthritis susceptibility in the UK population. Ann Rheum Dis. 2010;69(8):1572-3. doi:10.1136/ard.2009.122887.

63. Fisher M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff P., Kallen KJ, Wollmer A, et al. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. Nat Biotechnol. 1997;15(2):142-5. doi:10.1038/nbt0297-142.

64. Fukushima H, Jimi E, Okamoto F, Motokawa W, Okabe K. IL-1-induced receptor activator of NF-kappa B ligand in human periodontal ligament cells involves ERK-dependent PGE2 production. Bone. 2005;36(2):267-75. doi:10.1016/j.bone.2004.09.011.

65. Fujii M, Takeda K, Imamura T, Aoki H, Sampath TK, Enomoto S, et al. Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. Mol Biol Cell. 1999;10(11):3801-13.

66. Gabriel SE. The epidemiology of rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin North Am. 2001;27(2):269-81.

67. Galli C, Piemontese M, Lumetti S, Manfredi E, Macaluso GM, Passeri G. The importance of Wnt pathways for bone metabolism and their regulation by implant topography. Eur Cell Mater. 2012;24:46-59.

68. Gilbert LC, Rubin J, Nanes MS. The p55 TNF receptor mediates TNF inhibition of osteoblast differentiation independently of apoptosis. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005;288(5):E1011-8. doi:10.1152/ajpendo.00534.2004.

69. Goldring SR. Bone and joint destruction in rheumatoid arthritis: what is really happening? J Rheumatol Suppl. 2002;65:44-8.

70. Gorna K, Gogolewski S. Preparation, degradation, and calcification of biodegradable polyurethane foams for bone graft substitutes. J Biomed Mater Res A. 2003;67(3):813-27. doi:10.1002/jbm.a.10148.

71. Grabiec AM, Korchynskyi O, Tak PP, Reedquist KA. Histone deacetylase inhibitors suppress rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte and macrophage IL-6 production by accelerating mRNA decay. Ann Rheum Dis. 2012;71(3):424-31. doi:10.1136/ard.2011.154211.

72. Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC, Taga R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. Braz J Med Biol Res. 2005;38(10):1463-73. doi:/S0100-879X2005001000003.

73. Gravallese EM, Harada Y, Wang JT, Gorn AH, Thornhill TS, Goldring SR. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. Am J Pathol. 1998;152(4):943-51.

74. Gregersen PK, Amos CI, Lee AT, Lu Y, Remmers EF, Kastner DL, et al. REL, encoding a member of the NF-kappaB family of transcription factors, is a newly defined risk locus for rheumatoid arthritis. Nat Genet. 2009;41(7):820-3. doi:10.1038/ng.395.

75. Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC, Carlson WD. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. P Natl Acad Sci USA. 1996;93(2):878–883. doi:10.1073/pnas.93.2.878.

76. Gupta A. Treating osteoporosis. Aust Prescr. 2016;39(2):40–46. doi:10.18773/austprescr.2016.028.

77. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. Ann N Y Acad Sci. 2006;1092:385-96. doi:10.1196/annals.1365.035.

78. Harrison CA, Al-Musawi SL, Walton KL. Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF-β superfamily ligands. Growth Factors. 2011;29(5):174-86. doi:10.3109/08977194.2011.608666.

79. Hashizume M, Mihara M. The roles of interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Arthritis. 2011;2011:765624. doi:10.1155/2011/765624.

80. Havrylyuk D, Zimenkovsky B, Vasylenko O, Gzella A, Lesyk R. Synthesis of new 4-thiazolidinone-, pyrazoline-, and isatin-based conjugates with promising antitumor activity. J Med Chem. 2012;55(20):8630-41. doi:10.1021/jm300789g.

81. Haynes DR, Crotti TN, Loric M, Bain GI, Atkins GJ, Findlay DM. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. Rheumatology (Oxford). 2001;40(6):623-30.

82. Heinecke K, Seher A, Schmitz W, Mueller TD, Sebald W, Nickel J. Receptor oligomerization and beyond: a case study in bone morphogenetic proteins. BMC Biol. 2009;7:59. doi:10.1186/1741-7007-7-59.

83. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. Biochem J. 2003;374(Pt 1):1-20. doi:10.1042/BJ20030407.

84. Heldin CH, Moustakas A. Role of Smads in TGFβ signaling. Cell Tissue Res. 2012;347(1):21-36. doi:10.1007/s00441-011-1190-x.

85. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. Nature. 1997;390(6659):465-71. doi:10.1038/37284.

86. Hoeppner LH, Secreto FJ, Westendorf JJ. Wnt signaling as a therapeutic target for bone diseases. Expert Opin Ther Targets. 2009;13(4):485-96. doi:10.1517/14728220902841961.

87. Heffeter P, Jakupec MA, Körner W, Chiba P, Pirker C, Dornetshuber R, et al. Multidrugresistant cancer cells are preferential targets of the new antineoplastic lanthanum compound KP772 (FFC24). Biochem Pharmacol. 2007;73(12):1873-86. doi:10.1016/j.bcp.2007.03.002.

88. Hoffmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclearfactor kappaB signaling. Immunol Rev. 2006;210:171-86. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00375.x.

89. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. Nat Rev Drug Discov. 2005;4(12):988-1004. doi:10.1038/nrd1902.

90. Hennigan S, Kavanaugh A. Interleukin-6 inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis. Ther Clin Risk Manag. 2008; 4(4): 767–775.

91. Horbelt D, Denkis A, Knaus P. A portrait of transforming growth factor β superfamily signalling: background matters. Int J Biochem Cell Biol. 2012;44(3):469-74. doi:10.1016/j.biocel.2011.12.013.

92. Imai K, Chiba T, Maeda G, Morikawa M. The role of WNT in rheumatoid arthritis and its therapeutic implication. Mini Rev Med Chem. 2009;9(3):318-23.

93. Issack PS, Heflet DL, Lane JM. Role of Wnt signaling in bone remodeling and repair. HSS J. 2008;4(1):66-70. doi:10.1007/s11420-007-9072-1.

94. Jang CH, Choi JH, Byun MS, Jue DM. Chloroquine inhibits production of TNF-α, IL-1β and IL-6 from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes/macrophages by different modes. Rheumatology (Oxford). 2006;45(6):703-10. doi:10.1093/rheumatology/kei282.

95. Joffe I, Epstein S. Osteoporosis associated with rheumatoid arthritis: pathogenesis and management. Semin Arthritis Rheum. 1991;20(4):256-72.

96. Johnson ML, Kamel MA. The Wnt signaling pathway and bone metabolism. Curr Opin Rheumatol. 2007;19(4):376-82. doi:10.1097/BOR.0b013e32816e06f9.

97. Jung SM, Kim KW, Yang CW, Park SH, Ju JH. Cytokine-mediated bone destruction in rheumatoid arthritis. J Immunol Res. 2014;2014:263625. doi:10.1155/2014/263625.

98. Karmakar S, Kay J, Gravallese EM. Bone damage in rheumatoid arthritis: mechanistic insights and approaches to prevention. Rheum Dis Clin North Am. 2010;36(2):385-404. doi:10.1016/j.rdc.2010.03.003.

99. Kasperkovitz PV, Verbeet NL, Smeets TJ, van Rietschoten JG, Kraan MC, van der Pouw Kraan TC, et al. Activation of the Stat1 pathway in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2004;63(3):233–9. doi:10.1136/ard.2003.013276.

100. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. J Cell Biol. 1994;127(6 Pt 1):1755-66.

101. Kavanaugh TE, Clark AY, Chan-Chan LH, Ramírez-Saldaña M, Vargas-Coronado RF, Cervantes-Uc JM, et al. Human mesenchymal stem cell behavior on segmented polyurethanes prepared with biologically active chain extenders. J Mater Sci Mater Med. 2016;27(2):38. doi:10.1007/s10856-015-5654-5.

102. Kawai VK, Stein CM, Perrien DS, Griffin MR. Effects of anti-tumor necrosis factor α agents on bone. Curr Opin Rheumatol. 2012;24(5):576-85. doi:10.1097/BOR.0b013e328356d212.

103. Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. Science. 1996;271(5247):360-2.

104. Kim JH, Jin HM, Kim K, Song I, Youn BU, Matsuo K, et al. The mechanism of osteoclast differentiation induced by IL-1. J Immunol. 2009;183(3):1862-70. doi:10.4049/jimmunol.0803007.

105. Kim N, Kadono Y, Takami M, Lee J, Lee SH, Okada F, et al. Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. J Exp Med. 2005;202(5):589-95. doi:10.1084/jem.20050978.

106. Kitamura H, Kawata H, Takahashi F, Higuchi Y, Furuichi T, Ohkawa H. Bone marrow neutrophilia and suppressed bone turnover in human interleukin-6 transgenic mice. A cellular relationship among hematopoietic cells, osteoblasts, and osteoclasts mediated by stromal cells in bone marrow. Am J Pathol. 1995;147(6):1682-92.

107. Kitajima I, Nakajima T, Imamura T, Takasaki I, Kawahara K, Okano T,et al. Induction of apoptosis in murine clonal osteoblasts expressed by human T-cell leukemia virus type I tax by NF-kappa B and TNF-alpha. J Bone Miner Res. 1996;11(2):200-10. doi:10.1002/jbmr.5650110209.

108. Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. Reproduction. 2006;132(2):191-206. doi:10.1530/rep.1.01074.

109. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. J Exp Med. 2000;191(2):275-86.

110. Komine M, Kukita A, Kukita T, Ogata Y, Hotokebuchi T, Kohashi O. Tumor necrosis factor-alpha cooperates with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in generation of osteoclasts in stromal cell-depleted rat bone marrow cell culture. Bone. 2001;28(5):474-83.

111. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. Organogenesis. 2008;4(2):68-75.

112. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruptionof Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing tomaturational arrest of osteoblasts. Cell. 1997;89(5):755-64.

113. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. Nature. 1994;368(6469):339-42. doi:10.1038/368339a0.

114. Korchynskyi O. Adenoviral vectors: convenient tools for gene delivery to primary mammalian cells. Biotechnol Acta. 2012;5(5):16-26.

115. Korchynskyi O, ten Dijke. Bone morphogenetic protein receptors and their nuclear effectors in bone formation. In: Vukicevic S, Sampath T, editors. Bone morphogenetic proteins: From discovery to clinical applications, Basel:Birkhauser Verlag; 2002. p. 41-54.

116. Korchynskyi O, ten Dijke P. Identifcation and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specifc response elements in the id1 promoter. J Biol Chem. 2002;277(7):4883-91. doi:10.1074/jbc.M111023200.

117. Krause C, Korchynskyi O, de Rooij K, Weidauer SE, de Gorter DJ, van Bezooijen RL, et al. Distinct modes of inhibition by sclerostin on bone morphogenetic protein and Wnt signaling pathways. J Biol Chem. 2010;285(53):41614-26. doi:10.1074/jbc.M110.153890.

118. Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. J Clin Invest. 2006;116(5):1202-9. doi:10.1172/JCI28551.

119. Krupak VI, Malysheva KhV, Pavlenko OK, Shafranska GI, de Rooij K, Löwik CWGM, et al. The PTTG1 is a novel inhibitor of osteogenic differentiation of mouse mesenchymal stem cells. Bìol Tvarin. 2016;18(1):61–68.

120. Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, Gélinas C. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer-role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. Oncogene. 2003;22(56):8961-82. doi:10.1038/sj.onc.1207230.

121. Kucinska-Lipka J, Gubanska I, Korchynskyi O, Malysheva K, Kostrzewa M, Włodarczyk D, et al. The influence of calcium glycerophosphate (GPCa) modifier on physicochemical, mechanical, and biological performance of polyurethanes applicable as biomaterials for bone tissue scaffolds fabrication. Polymers. 2017;9(8):329. doi:10.3390/polym9080329.

122. Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, Itonaga I, Fujikawa Y, Athanasou NA. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. Bone. 2003;32(1):1-7.

123. Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology, bone signaling pathways and treatment of osteoporosis. Cytokine Growth Factor Rev. 2004;15(1):49-60.

124. Leboy P, Grasso-Knight G, D'Angelo M, Volk SW, Lian JV, Drissi H, et al. Smad-Runx interactions during chondrocyte maturation. J Bone Joint Surg Am. 2001;83-A Suppl 1(Pt 1):15-22.

125. Lequerré T, Bansard C, Vittecoq O, Derambure C, Hiron M, Daveau M, et al. Early and long-standing rheumatoid arthritis: distinct molecular signatures identified by gene-expression profiling in synovia. Arthritis Res Ther. 2009;11(3):R99. doi:10.1186/ar2744.

126. Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Désiré L, Mira H, Consiglio A, et al. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. Nature. 2005;437(7063):1370-5. doi:10.1038/nature04108.

127. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. J Bone Joint Surg Am. 2002;84-A(6):1032-44.

128. Lissenberg-Thunnissen SN, de Gorter DJ, Sier CF, Schipper IB. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. Int Orthop. 2011;35(9):1271-80. doi:10.1007/s00264-011-1301-z.

129. Lodder M.C., Haugeberg G., Lems W.F. Demographic and clinical characteristics in longstanding rheumatoid arthritis: a three country comparison. Ann Rheum Dis. 2001;60 Suppl:123.

130. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol. 2004;20:781-810. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126.

131. Long MW. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. Blood Cells Mol Dis. 2001;27(3):677-90. doi:10.1006/bcmd.2001.0431.

132. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. Endocr Rev. 2008;29(4):403-40. doi:10.1210/er.2007-0038.

133. Lowery JW, Amich JM, Andonian A, Rosen V. N-linked glycosylation of the bone morphogenetic protein receptor type 2 (BMPR2) enhances ligand binding. Cell Mol Life Sci. 2014;71(16):3165-72. doi:10.1007/s00018-013-1541-8.

134. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/β-catenin signaling: components, mechanisms, and disease. Dev Cell. 2009;17(1):9-26. doi:10.1016/j.devcel.2009.06.016.

135. Malysheva K, Pavlenko O, Stoika R, Korchynskyi O. ShRNA-mediated knockdown of pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG1): optimization of the effect and targeting of early osteoblast differentiation in murine mesenchymal stem cells. Animal Biology. 2017;19(2):70-8.

136. Malysheva KhV, Finiuk NS, Pavlenko OK, Havrylyuk DYa, Lesyk RB, Stoika RS, et al. 4-thiazolidinone–based derivatives rescue TNFα-inhibited osteoblast differentiation in mouse mesenchymal precursor cells. Ukr Biochem J. 2017;89(Special Issue):112–123.

137. Malysheva KhV, Spasyuk IM, Pavlenko OK, Stoika RS, Korchynskyi OG. Generation of optimized preparations of bone morphogenetic proteins for bone regeneration. Ukr Biochem J. 2016;88(6):87–97.

138. Malysheva K, de Rooij K, Lowik CW, Baeten DL, Rose-John S, Stoika R, et al. Interleukin 6/Wnt signaling interaction in rheumatoid arthritis: interleukin 6 inhibits Wnt signaling in synovial fibroblasts and osteoblasts. Croat Med J. 2016; 57(2):89–98. doi:10.3325/cmj.2016.57.89.

139. Malysheva KhV, de Rooij K, Löwik CWGM, Baeten DL, Stoika RS, Korchynskyi OG. ShRNA-mediated knockdown of interleukin 6 expression rescues tumor necrosis factor α - inhibited osteogenesis in mouse mesenchymal precursor cells. Studia Biologica. 2015;9:5–14.

140. Manara M, Sinigaglia L. Bone and TNF in rheumatoid arthritis: clinical implications. RMD Open. 2015;1 Suppl 1:e000065. doi:10.1136/rmdopen-2015-000065.

141. Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. Nature. 2002;417(6889):664-7. doi:10.1038/nature756.

142. May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B. Immunol Today. 1998;19(2):80-8.

143. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 2011;365(23):2205-19. doi:10.1056/NEJMra1004965.

144. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Nat Rev Immunol. 2007;7(6):429-42. doi:10.1038/nri2094.

145. Meyer PW, Hodkinson B, Ally M, Musenge E, Wadee AA, Fickl H, et al. Circulating cytokine profiles and their relationships with autoantibodies, acute phase reactants, and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. Mediators Inflamm. 2010;2010:158514. doi:10.1155/2010/158514.

146. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2016;8(3):227-41. doi:10.1002/wsbm.1331.

147. Molina-Jiménez F, Benedicto I, Murata M, Martín-Vílchez S, Seki T, Antonio Pintor-Toro J, et al. Expression of pituitary tumor-transforming gene 1 (PTTG1)/securin in hepatitis B virus (HBV)-associated liver diseases: evidence for an HBV X protein-mediated inhibition of PTTG1 ubiquitination and degradation. Hepatology. 2010;51(3):777-87. doi:10.1002/hep.23468.

148. Monaco C, Nanchahal J, Taylor P, Feldmann M. Anti-TNF therapy: past, present and future. Int Immunol. 2015;27(1):55-62. doi:10.1093/intimm/dxu102.

149. Morvan F, Boulukos K, Clément-Lacroix P, Roman Roman S, Suc-Royer I, Vayssière B, et al. Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. J Bone Miner Res. 2006;21(6):934-45. doi:10.1359/jbmr.060311.

150. Nakajima T, Kinoshita S, Sasagawa T, Sasaki K, Naruto M, Kishimoto T, et al. Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(6):2207-11.

151. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. Biochem Biophys Res Commun. 2000;275(3):768-75. doi:10.1006/bbrc.2000.3379.

152. Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, et al. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. J Biol Chem. 2002;277(7):5330-8. doi:10.1074/jbc.M102750200.

153. Nozawa K, Fujishiro M, Takasaki Y, Sekigawa I. Inhibition of rheumatoid arthritis by blocking connective tissue growth factor. World J Orthop. 2014;5(5):653-9. doi:10.5312/wjo.v5.i5.653.

154. Nukaga J, Kobayashi M, Shinki T, Song H, Takada T, Takiguchi T, et al. Regulatory effects of interleukin-1beta and prostaglandin E2 on expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in human periodontal ligament cells. J J Periodontol. 2004;75(2):249-59. doi:10.1902/jop.2004.75.2.249.

155. Nusse R, van Ooyen A, Cox D, Fung YK, Varmus H. Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. Nature. 1984;307(5947):131-6.

156. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. Nature. 1980;287(5785):795-801.

157. O'Brien CA, Lin SC, Bellido T, Manolagas SC. Expression levels of gp130 in bone marrow stromal cells determine the magnitude of osteoclastogenic signals generated by IL-6-type cytokines. J Cell Biochem. 2000;79(4):532-41.

158. Ohta H, Wakitani S, Tensho K, Horiuchi H, Wakabayashi S, Saito N, et al. The effects of heat on the biological activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2. J Bone Miner Metab. 2005;23(6):420–425. doi:10.1007/s00774-005-0623-6.

159. Ozaki K, Leonard WJ. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. J Biol Chem. 2002;277(33):29355-8. doi:10.1074/jbc.R200003200.

160. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. J Immunol. 2002;169(6):3353-62.

161. Parameswaran N, Patial S. Tumor Necrosis Factor-α Signaling in Macrophages. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2010;20(2):87-103.

162. Park JY, Pillinger MH. Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Bull NYU Hosp Jt Dis. 2007;65 Suppl 1:4-10.

163. Pecina M, Vukicevic S. Biological aspects of bone, cartilage and tendon regeneration. Int Orthop. 2007;31(6):719-20. doi:10.1007/s00264-007-0425-7.

164. Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(52):20764-9. doi:10.1073/pnas.0805133106.

165. Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). Mol Endocrinol. 1997;11(4):433-41. doi:10.1210/mend.11.4.9911.

166. Poli V, Balena R, Fattori E, Markatos A, Yamamoto M, Tanaka H, et al. Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. EMBO J. 1994;13(5):1189–1196.

167. Polzer K, Joosten L, Gasser J, Distler JH, Ruiz G, Baum W, et al. Interleukin-1 is essential for systemic inflammatory bone loss. Ann Rheum Dis. 2010;69(1):284-90. doi:10.1136/ard.2008.104786.

168. Rabelo Fde S, da Mota LM, Lima RA, Lima FA, Barra GB, de Carvalho JF, et al. The Wnt signaling pathway and rheumatoid arthritis. Autoimmun Rev. 2010;9(4):207-10. doi:10.1016/j.autrev.2009.08.003.

169. Rawadi G, Roman-Roman S. Wnt signalling pathway: a new target for the treatment of osteoporosis. Expert Opin Ther Targets. 2005;9(5):1063-77. doi:10.1517/14728222.9.5.1063.

170. Reddi AH. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. Tissue Eng. 2000;6(4):351-9. doi:10.1089/107632700418074.

171. Rinkenbaugh AL, Baldwin AS. The NF-κB Pathway and Cancer Stem Cells. Cells. 2016;5(2):16. doi:10.3390/cells5020016.

172. Rodriguez M, Thompson J, Hay RT, Dargemont C. Nuclear retention of IκBα protects it from signal-induced degradation and inhibits NFκB transcriptional activation. J Biol Chem. 1999;274:9108–9115.

173. Rubinek T, Chesnokova V, Wolf I, Wawrowsky K, Vlotides G, Melmed S. Discordant proliferation and differentiation in pituitary tumor-transforming gene-null bone marrow stem cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;293(3):1082-92. doi:10.1152/ajpcell.00145.2007.

174. Salehi F, Kovacs K, Scheithauer BW, Lloyd RV, Cusimano M. Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update. Endocr Relat Cancer. 2008;15(3):721-43. doi:10.1677/ERC-08-0012.

175. Sambrook PN. The skeleton in rheumatoid arthritis: common mechanisms for bone erosion and osteoporosis? J Rheumatol. 2000;27(11):2541-2.

176. Sampath TK, Reddi AH. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981;78(12):7599-603.

177. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. Biochim Biophys Acta. 2011;1813(5):878-88. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.

178. Scheufler C, Sebald W, Hulsmeyer M. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 angstrom resolution. J Mol Biol. 1999;287(1):103–15. doi:10.1006/jmbi.1999.2590.

179. Schett G, Gravallese E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. Nat Rev Rheumatol. 2012;8(11):656-64. doi:10.1038/nrrheum.2012.153.

180. Schroers A, Hecht O, Kallen KJ, Pachta M, Rose-John S, Grötzinger J. Dynamics of the gp130 cytokine complex: a model for assembly on the cellular membrane. Protein Sci. 2005;14(3):783-90. doi:10.1110/ps.041117105.

181. Scott DL, Kingsley GH. Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 2006;355(7):704-12. doi:10.1056/NEJMct055183.

182. Senkiv J, Finiuk N, Kaminskyy D, Havrylyuk D,Wojtyra M, Kril I, et al. 5-Ene-4-thiazolidinones induce apoptosis in mammalian leukemia cells. Eur J Med Chem. 2016;117:33-46. doi:10.1016/j.ejmech.2016.03.089.

183. Sharma RP, Chopra VL. Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in Drosophila melanogaster. Dev Biol. 1976;48(2):461-5.

184. Simmonds RE, Foxwell BM. Signalling, inflammation and arthritis: NF-kappaB and its relevance to arthritis and inflammation. Rheumatology (Oxford). 2008;47(5):584-90. doi:10.1093/rheumatology/kem298.

185. Singh JA, Christensen R, Wells GA, Suarez-Almazor ME, Buchbinder R, Lopez-Olivo MA, et al. A network meta-analysis of randomized controlled trials of biologics for rheumatoid arthritis: a Cochrane overview. CMAJ. 2009;181(11):787-96. doi:10.1503/cmaj.091391.

186. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. Lancet. 2007;370(9602):1861-74. doi:10.1016/S0140-6736(07)60784-3.

187. Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. Nat Rev Drug Discov. 2003;2(6):473-88. doi:10.1038/nrd1109.

188. Srirangan S, Choy EH. The role of Interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. Ther Adv Musculoskelet Dis. 2010;2(5):247–56. doi:10.1177/1759720X10378372.

189. Steiner G, Tohidast-Akrad M, Witzmann G, Vesely M, Studnicka-Benke A, Gal A, et al. Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 1999;38(3):202-13.

190. Stock M, Schäfer H, Fliegauf M, Otto F. Identifcation of Novel Target Genes of the Bone Specifc Transcription Factor Runx2. J Bone Miner Res. 2004;19(6):959-72. doi:10.1359/jbmr.2004.19.6.959.

191. Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC. NFκB controls expression of inhibitor IκBα: Evidence for an inducible autoregulatory pathway. Science. 1993;259(5103):1912-5.

192. Takata M, Sugimoto N, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Nishida H, et al. Activity of bone morphogenetic protein-7 after treatment at various temperatures: freezing vs. pasteurization vs. allograft. Cryobiology. 2011;63(3):235-9. doi:10.1016/j.cryobiol.2011.09.001.

193. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, et al. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. Nature. 2000;407(6803):530-5. doi:10.1038/35035117.

194. Terpos E, Fragiadaki K, Konsta M, Bratengeier C, Papatheodorou A, Sfikakis PP. Early effects of IL-6 receptor inhibition on bone homeostasis: a pilot study in women with rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol. 2011;29(6):921-5.

195. Tfelt-Hansen J, Kanuparthi D, Chattopadhyay N. The emerging role of pituitary tumor transforminggene in tumorigenesis. Clin Med Res. 2006;4(2):130–137.

196. Tripathi AC, Gupta SJ, Fatima GN, Sonar PK, Verma A, Saraf SK. 4-Thiazolidinones: the advances continue….Eur J Med Chem. 2014;72:52-77. doi:10.1016/j.ejmech.2013.11.017.

197. Tsurukai T, Udagawa N, Matsuzaki K, Takahashi N, Suda T. Roles of macrophage-colony stimulating factor and osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. J Bone Miner Metab. 2000;18(4):177-84.

198. Urist MR. Bone formation by autoinduction. Science. 1965;150(3698):893-9.

199. van der Horst G, van Bezooijen RL, Deckers MM, Hoogendam J, Visser A, Löwik CW, et al. Differentiation of murine preosteoblastic KS483 cells depends on autocrine bone morphogenetic protein signalling during all phases of osteoblast formation. Bone. 2002;31(6):661-9.

200. Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Cytokines in rheumatoid arthritis. Curr Rheumatol Rep. 2002;4(3):208-17.

201. Vivar N, Van Vollenhoven RF. Advances in the treatment of rheumatoid arthritis. F1000Prime Rep. 2014;6:31. doi:10.12703/P6-31.

202. Wagner ER, Zhu G, Zhang BQ, Luo Q, Shi Q, Huang E, et al. The therapeutic potential of the Wnt signaling pathway in bone disorders. Curr Mol Pharmacol. 2011;4(1):14-25.

203. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. Cell Death Differ. 2003;10(1):45-65. doi:10.1038/sj.cdd.4401189.

204. Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, Zhang Q, et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. Genes Dis. 2014;1(1):87-105. doi:10.1016/j.gendis.2014.07.005.

205. Wang Z, Yu R, Melmed S. Mice lacking pituitary tumor transforming gene show testicular and splenic hypoplasia, thymic hyperplasia, thrombocytopenia, aberrant cell cycle progression, and premature centromere division. Mol Endocrinol. 2001;15(11):1870-9. doi:10.1210/mend.15.11.0729.

206. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. J Clin Invest. 2005;115(2):282-90. doi:10.1172/JCI23394.

207. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. Annu Rev Cell Dev Biol. 1998;14:59-88. doi:10.1146/annurev.cellbio.14.1.59.

208. Wong PK, Quinn JM, Sims NA, van Nieuwenhuijze A, Campbell IK, Wicks IP. Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. Arthritis Rheum. 2006;54(1):158-68. doi:10.1002/art.21537.

209. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW,et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science. 1988;242(4885):1528-34.

210. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. Nature. 1994;370(6488):341-7. doi:10.1038/370341a0.

211. Wu J, Cohen SM. Repression of Teashirt marks the initiation of wing development. Development. Development. 2002;129(10):2411-8.

212. Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, et al. Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. Science. 1995;270(5244):2008-11.

213. Yang Y. Wnt signaling in development and disease. Cell Biosci. 2012;2:14. doi:10.1186/2045-3701-2-14.

214. Yeremenko N, Zwerina K, Rigter G, Pots D, Fonseca JE, Zwerina J, et al. Tumor necrosis factor and interleukin-6 differentially regulate Dkk-1 in the inflamed arthritic joint. Arthritis Rheumatol. 2015;67(8):2071-5. doi:10.1002/art.39183.

215. Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K, Ebisu S. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF-κB signaling pathways. J Biol Chem. 2008;283(17):11535-40. doi:10.1074/jbc.M607999200.

216. Youssef S, Steinman L. At once harmful and beneficial: the dual properties of NF-kappaB. Nat Immunol. 2006;7(9):901-2. doi:10.1038/ni0906-901.

217. Yu R, Cruz-Soto M, Li Calzi S, Hui H, Melmed S. Murine pituitary tumor-transforming gene functions as a securin protein in insulin-secreting cells. J Endocrinol. 2006;191(1):45-53. doi:10.1677/joe.1.06885.

218. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. Cell Res. 2009;19(1):128-39. doi:10.1038/cr.2008.328.

219. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. Int Anesthesiol Clin. 2007;45(2):27-37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e.

220. Zhu W, Kim J, Cheng C, Rawlins BA, Boachie-Adjei O, Crystal RG, et al. Noggin regulation of bone morphogenetic protein (BMP) 2/7 heterodimer activity in vitro. Bone. 2006;39(1):61-71.

221. Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW. Identifcation of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. Science. Science. 1999;285(5426):418-22.

Додаток А

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Malysheva K.** ShRNA-mediated knockdown of interleukin 6 expression rescues tumor necrosis factor α - inhibited osteogenesis in mouse mesenchymal precursor cells / **K. Malysheva**, K. de Rooij, C. Löwik, D. Baeten, R. Stoika, O. Korchynskyi // Studia Biologica. – 2015. –V. 9. – P. 5-14. *(Дисертантка провела дослідження на мезенхімних стовбурових клітинах ліній C2C12 і KS483, здійснила приготування клітинних лізатів для люциферазного аналізу та статистичну обробку результатів, проаналізувала літературні джерела, взяла участь в аналізі даних, написанні та оформленні статті).*

2. Krupak V. The PTTG1 is a novel inhibitor of osteogenic differentiation of mouse mesenchymal stem cells / V. Krupak, **K. Malysheva**, O. Pavlenko, G. Shafranska, K. de Rooij, C. Löwik, R. Stoika, O. G. Korchynskyi // Animal Biology. – 2016. – V. 18, № 1. – P. 61-68. *(Дисертантка виконала експериментальні дослідження на мезенхімних стовбурових клітинах ліній C2C12 і KS483 та статистичну обробку даних, проаналізувала літературні джерела, взяла участь в аналізі даних, написанні та оформленні статті; внесла рівнозначний вклад у статтю поруч з першим автором).*

3. **Malysheva K.** Interleukin 6/Wnt signaling interaction in rheumatoid arthritis: interleukin 6 inhibits Wnt signaling in synovial fibroblasts and osteoblasts / **K. Malysheva**, M. de Rooij, C. Lowik, D. Baeten, S. Rose-John, R. Stoika, O. Korchynskyi // Croatian Medical Journal. – 2016. – V. 57, № 2. – P. 89-98. *(Дисертантка провела дослідження на мезенхімних стовбурових клітинах ліній C2C12 і KS483, здійснила приготування клітинних лізатів для люциферазного аналізу, проаналізувала літературні джерела, взяла участь в аналізі даних, написанні та оформленні статті).*

4. **Malysheva K.** Generation of optimized preparations of bone morphogenetic proteins for bone regeneration / **K. Malysheva**, I. Spasyuk, O. Pavlenko, R. Stoika, O. Korchynskyi // Ukrainian Biochemical Journal. – 2016. – V. 88, № 6. – P. 87-97.

(Дисертантка виконала експериментальні дослідження на мезенхімних стовбурових клітинах лінії C2C12, здійснила приготування клітинних лізатів для люциферазного аналізу і статистичну обробку результатів, проаналізувала отримані дані, літературні джерела та оформила статтю).

5. **Malysheva K.** ShRNA-mediated knockdown of pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG1): optimization of the effect and targeting of early osteoblast differentiation in murine mesenchymal stem cells / **K. Malysheva**, O. Pavlenko, R. Stoika, O. Korchynskyi // Animal Biology. – 2017. – V. 19, № 2. – P. 70-78. *(Дисертантка виконала експериментальні дослідження на мезенхімних стовбурових клітинах ліній C2C12 і KS483 та статистичну обробку результатів, проаналізувала отримані дані, літературні джерела та оформила статтю).*

6. **Malysheva K.** 4-thiazolidinone–based derivatives rescue TNFα-inhibited osteoblast differentiation in mouse mesenchymal precursor cells / **K. Malysheva**, N. Finiuk, O. Pavlenko, D. Havrylyuk, R. Lesyk, R. Stoika, O. Korchynskyi // Ukrainian Biochemical Journal. – 2017. – V. 89 (Special Issue). – P. 112-123. *(Дисертантка провела експериментальні дослідження на мезенхімних стовбурових клітинах лінії C2C12 та статистичну обробку даних, проаналізувала літературні джерела, взяла участь в аналізі даних, написанні та оформленні статті).*

7. Kucinska-Lipka J. The influence of calcium glycerophosphate (GPCa) modifier on physicochemical, mechanical, and biological performance of polyurethanes applicable as biomaterials for bone tissue scaffolds fabrication / J. Kucinska-Lipka, I. Gubanska, O. Korchynskyi, **K. Malysheva**, M. Kostrzewa, D. Włodarczyk, J. Jakub Karczewski, H. Janik // Polymers. – 2017. – V. 9, № 8. – P. 329. Режим доступу до журн.: http://www.mdpi.com/2073-4360/9/8/329. *(Дисертантка виконала експериментальні дослідження на мезенхімних стовбурових клітинах лінії C2C12).*

8. **Malysheva Kh.** Knockdown of IL-6 expression rescues TNFα-inhibited osteogenesis / **Kh. Malysheva**, K. de Rooij, C. W. G. M. Löwik, R. Stoika, O. Korchynskyi // Сборник научных трудов по материалам Международной

научно-практической конференции «Наука и образование в XXI веке» (31 октября 2014 г., Тамбов). – Тамбов, 2014. – С. 9–11 *(заочна форма участі)*.

9. **Malysheva Kh.** Knockdown of IL-6 expresion rescues osteogenesis from inhibition by TNFα / **Kh. Malysheva**, R. Stoika, O. Korchynskyi // Матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (5-6 грудня 2014 р., Львів). – Львів, 2014. – С. 198 *(усна доповідь)*.

10. **Malysheva Kh.** ShRNA-mediated knockdown of IL-6 expression rescues TNFα-inhibited osteogenesis in mouse mesenchymal precursor cells / **Kh. Malysheva**, K. de Rooij, C. Löwik, D. Baeten, R. Stoika, O. Korchynskyi // International Conference on Advances in Cell Biology and Biotechnology (October 11-13, 2015, Lviv). – Lviv, 2015. – P. 84 *(стендова доповідь)*.

11. **Malysheva K.** Interleukin 6/Wnt signaling interaction in rheumatoid arthritis: interleukin 6 inhibits Wnt signaling in synovial fibroblasts and osteoblasts / **K. Malysheva**, K. de Rooij, C. W. Lowik, D. L. Baeten, S. Rose-John, R. Stoika, O. Korchynskyi // Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference in Prague. (April 7-10, 2016, Prague). – Prague, 2016. – P. 65 *(усна доповідь)*.

12. **Malysheva K.** Dickkopf-1 and Interleukin 6 interaction as a potential mechanism of Wnt pathway inhibition in rheumatoid arthritis / **K. Malysheva**, K. de Rooij, C. W. Lowik, D. L. Baeten, S. Rose-John, R. Stoika, O. Korchynskyi // The 41st FEBS Congres «Molecular and systems biology for a better life» (September 3-8, 2016, Kusadasi). – Kusadasi, 2016. – V. 283, № 1. – P. 25-26 *(заочна форма участі)*.

13. **Malysheva K.** 4-thiazolidinone–based derivatives rescue TNFα-inhibited osteogenesis in mouse mesenchymal precursor cells / **K. Malysheva**, N. Finiuk, O. Pavlenko, D. Havrylyuk, R. Lesyk, R. Stoika, O. Korchynskyi // 7th TriNet Meeting - RECOOP Annual Project Review Meeting Hotel Gellert (October 6-9, 2016, Budapest). – Budapest, 2016. – P. 85 *(усна доповідь)*.

14. **Malysheva K.** 4-thiazolidinone–based derivatives rescue TNFα-inhibited osteoblast differentiation in mouse mesenchymal precursor cells / **K. Malysheva**,

N. Finiuk, O. Pavlenko, D. Havrylyuk, R. Lesyk, R. Stoika, O. Korchynskyi // RECOOP 12th Bridges in Life Sciences Annual Conference (April 7-8, 2017, Budapest). – Budapest, 2017. – P. 21 *(усна доповідь)*.

Додаток Б

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
В.о. проректора з наукової роботи
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького
доктор медичних наук, професор

_____ Наконечний А.Й.
«26» грудня 2017 р.

КАРТА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

1. Результати досліджень, отримані при виконанні дисертаційної роботи Малишевої Христини Володимирівни на тему «Блокування сигнального шляху Wnt інтерлейкіном 6: роль у розвитку та прогресуванні ревматоїдного артриту», зокрема ті, що стосуються аналізу впливу похідних 4-тіазолідинону *in vitro* на інгібування остеобластної диференціації мезенхімних стовбурових клітин, опосередкованого фактором некрозу пухлин α, використовуються у навчальному процесі кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького при викладанні навчальних дисциплін «Медична хімія», «Біоорганічна хімія» та «Фармацевтична хімія».
2. Результати досліджень за темою дисертаційної роботи Малишевої Христини Володимирівни розглянуто і схвалено на засіданні кафедри фармацевтичної, органічної і біоорганічної хімії фармацевтичного факультету Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 5 від 20.12.2017).

Завідувач кафедри фармацевтичної,
органічної і біоорганічної хімії
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького
доктор фармацевтичних наук,
професор Р.Б. Лесик

Додаток В

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
Декан біологічного факультету
Львівського національного
університету імені Івана Франка
кандидат біологічних наук,

_____ Хамар І.С.
«14» грудня 2017р.

КАРТКА ЗВОРОТНЬОГО ЗВ'ЯЗКУ

Викладені у дисертаційній роботі Малишевої Христини Володимирівни «Блокування сигнального шляху Wnt інтерлейкіном 6: роль у розвитку та прогресуванні ревматоїдного артриту» результати досліджень є корисними для вивчення патогенетичних механізмів розвитку ревматоїдного артриту, а також інших споріднених захворювань і прийняті для використання у навчальному процесі кафедри біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка при викладанні нормативних курсів «Проблемні питання сучасної біології» і «Молекулярні механізми регуляції проліферації, диференціації та відмирання клітин».

Матеріали кандидатської дисертаційної роботи здобувача Малишевої Христини Володимирівни розглянуто на засіданні кафедри біохімії біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка та визнано, що результати цієї роботи є актуальними, мають науково-практичну, методичну та практичну цінність для біології та біохімії, зокрема.

Завідувач кафедри біохімії
ЛНУ імені Івана Франка
доктор біологічних наук, професор Н.О. Сибірна