

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН**

МАЛИШЕВА ХРИСТИНА ВОЛОДИМИРІВНА

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

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

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Львів – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті біології клітини НАН України та Інституті біології тварин НААН

Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Стойка Ростислав Стефанович,
Інститут біології клітини НАН України,
завідувач відділу регуляції проліферації клітин та апоптозу

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Рибальченко Володимир Корнійович,
Київський національний університет імені Тараса
Шевченка МОН України, завідувач Науково-дослідного
сектору «Мембранології і цитології» Навчально-наукового
центру «Інститут біології та медицини»;

доктор біологічних наук, професор
Колибо Денис Володимирович,
Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України,
завідувач лабораторії імунобіології,
заступник директора з наукової роботи

Захист відбудеться « 6 » лютого 2018 р. о 12 годині на засіданні спеціалізованої
вченої ради Д 35.368.01 Інституту біології тварин НААН за адресою: 79034, м.
Львів, вул. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біології тварин НААН за
адресою: 79034, м. Львів, вул. Стуса, 38.

Автореферат розісланий « 5 » січня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О. І. Віщур

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Ревматоїдний артрит (РА) – 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 %, РА має непересічне медико-соціальне значення, оскільки за відсутності ефективного лікування призводить до швидкого розвитку інвалідності та скорочення тривалості життя пацієнтів (Коваленко В., 2005; Свінцицький А., 2007; Gabriel S. et al., 2001; Choy E. et al., 2012; McInnes I. et al., 2011; Hashizume M. et al., 2011). В Україні, за останніми даними відділу медичної статистики МОЗ, поширеність РА становить 115 тис. хворих, 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 РА у суглобах відбувається неконтрольоване розростання шару фібробластоподібних клітин (синовіоцитів), що утворюють так званий паннус (Свінцицький А., 2007; McInnes I. et al., 2011). Активовані синовіоцити продукують великий надлишок синовіальної рідини з високим вмістом різних прозапальних цитокінів, серед яких ключову роль відіграють інтерлейкін 1 β , фактор некрозу пухлин α (ФНП- α) та інтерлейкін 6 (ІЛ-6) (McInnes I. et al., 2007; Jang C. et al., 2006; Choy E. et al., 2012). Водночас високий вміст прозапальних цитокінів призводить до потужної активації їх сигнальних шляхів. В результаті відбувається незворотне руйнування хрящової тканини та прилеглої до неї кістки (утворення ерозій кістки), що є найбільш болісним із ускладнень захворювання (Schett G. et al., 2012; McInnes I. et al., 2011). Етіологія РА, а також молекулярні механізми, які запускають автоімунні процеси і опосередковують його перебіг, залишаються маловідомими (Choy E. et al., 2012; Smolen J. et al., 2003; Park J. et al., 2007).

Вважають, що активація сигнальних шляхів морфогенетичних протеїнів кістки (МПК) та Wnt-протеїнів є ключовими механізмами, що індують і підтримують формування скелетних тканин (Baron R. et al., 2013; Chen G. et al., 2012; Kwan Tat S. et al., 2003). Молекулярно-біологічні та генетичні дослідження підтверджують важливість сигнального шляху Wnt у регуляції метаболізму кісткової тканини (Johnson M. et al., 2007; Issack P. et al., 2008; Galli C. et al., 2012). У здоровому організмі процеси резорбції та утворення кісткової тканини є тонко збалансовані. Однак, під час запального артрити баланс цих процесів порушується (Diarra D. et al., 2007).

Згідно з літературними даними, рівень експресії гена *pttg-bp1* (*pbfl*: PTTG binding factor 1), який кодує структуру протеїну, необхідного для зв'язування й транслокації в ядро секурину – продукту гена пухлинної трансформації клітин гіпофізу 1 (*pttg1*), зменшується з часом перебігу РА порівняно з початковими стадіями захворювання (Lequerré T. et al., 2009). Водночас, *pttg-bp1* є геном-мішенню протеїну RUNX2 – ключового транскрипційного фактора, який опосередковує остеобластну диференціацію (Stock M. et al., 2004).

Дисертаційна робота націлена на дослідження процесів, які можуть брати участь у деградації скелетних тканин при РА. 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 до дисертаційної роботи, є частиною науково-дослідної роботи відділу регуляції проліферації клітин та 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.). Частина досліджень проводили в межах 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 й завдання дослідження. Мета роботи – з'ясувати негативний регуляторний вплив генів ІЛ-6, *pttg1* та *pttg-bp1* на диференціацію мезенхімних стовбурових клітин (МСК), а також його вклад у розвиток і прогресування РА.

Для досягнення та реалізації мети були поставлені наступні **завдання**:

- ❖ Оптимізувати *in vitro* остеоіндуктивні властивості препаратів рекомбінантних МПК.
- ❖ За допомогою блокування експресії мРНК гена ІЛ-6, використовуючи малі шпилькові (мш) РНК, оцінити функціональний вклад взаємодії ІЛ-6 і ФНП- α в інгібування активації сигнального шляху Wnt.
- ❖ Дослідити роль ІЛ-6 і продукту гена *pttg1* в регуляції остеобластної диференціації, індукованої МПК, шляхом тимчасового пригнічення експресії мРНК генів ІЛ-6, *pttg1* та *pttg-bp1* з допомогою мшРНК.
- ❖ Дослідити роль гена *pttg1* в регуляції остеобластної диференціації мезенхімних стовбурових клітин шляхом тимчасової надекспресії генів *pttg1* та *pttg-bp1*.
- ❖ Проаналізувати ефекти *in vitro* нових похідних 4-тіазолідинону щодо опосередкованого ФНП- α інгібування остеобластної диференціації мезенхімних стовбурових клітин, індукованої МПК.

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 – ФНП- α .

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

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше показано, що ІЛ-6 разом з ФНП- α і протеїном DKK-1 виявляє кооперативний інгібувальний ефект щодо остеогенного сигнального шляху Wnt. З'ясовано, що пригнічення експресії гена ІЛ-6 з допомогою мшРНК підсилює ранні та пізні стадії остеобластної диференціації МСК. Виявлено, що ектопічна експресія гена *pttg-bp1* інгібує ранні та пізні стадії остеобластної диференціації МСК, 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 ФНП- α на остеобластну диференціацію МСК, а також підсилювати її.

Практичне значення отриманих результатів. Результати досліджень щодо отримання препаратів рекомбінантних МПК 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 (ІЛ-6, ФНП- α , а також секурину) у підтриманні гомеостазу кісткової тканини та їх вплив на диференціацію МСК, 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, дібрано літературу й обговорено остаточний 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 у галузі медицини та природничих наук і Медичного факультету (Жешувський університет, Польща) у співпраці з канд.біол.наук Корчинським О. Г., якому автор висловлює щире подяку за допомогу у цій роботі. Мультиклональні культури клітин ліній C2C12 і KS483 зі стабільною експресією 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 та біоорганічної хімії Львівського медичного національного університету імені Данила Галицького, та надані для роботи в рамках науково-технічної співпраці. Біодеградабельні 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 і 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-й щорічній науковій зустрічі TriNet «RECOOP Annual Project Review Meeting» (Будапешт, Угорщина, 2016 р.), 11-й та 12-й 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі висвітлено сучасні дані щодо патофізіології РА, його значення у виникненні ерозій кісткової тканини. Підсумовано відомості про роль ключових прозапальних цитокінів, ІЛ-6 і ФНП- α , а також секурину – протеїнового продукту гена *pttg1* у розвитку РА. Проаналізовано відомі сьогодні дані щодо ролі сигнальних шляхів протеїнів Wnt і МПК у формуванні та регуляції метаболізму скелетних тканин.

Матеріали і методи досліджень. У роботі використано 4 клітинні лінії миші й людини (іморталізовані МСК миші ліній C2C12 і KS483, фібробласти миші лінії NIH-3T3 і клітини нирки ембріона людини лінії HEK293). Окремі експерименти проведено на людських первинних синовіоцитах (fibroblast-like synoviocytes, FLS), а також на МСК людини. Основну частину досліджень виконано на двох клітинних лініях МСК миші (C2C12 і KS483). Досліджувані клітини вирощували у середовищі DMEM («Biowest», Франція) за наявності 10% фетальної бичачої сироватки крові («Biowest», Франція), 2 мМ глютаміну, 25 мкг/мл гентаміцину і 10 нг/мл рекомбінантного фактору росту фібробластів 2 (у випадку МСК людини) у

зволоженої атмосфері з 5% CO₂ за температури +37°C. Життєздатність клітин оцінювали за допомогою зафарбовування 0,1% розчином трипанового синього.

Для детекції активації сигнального шляху протеїнів Wnt використовували плазмідну конструкцію, що містить Wnt-специфічний репортер *Bat-Luc*. Аналіз активності люциферази здійснювали за допомогою тест-набору фірми «Promega» (США). Вимірювання біоломінісцентної активності люциферази в клітинних лізатах проводили за допомогою універсального люмінометра Victor2 «Perkin Elmer» (США).

Активність β-галактозидази в клітинних лізатах визначали фотометричним методом з використанням *o*-нітрофеніл-β-D-галактопіранозиду як субстрату згідно з загальноприйнятою методикою (Korchynskyi O. & ten Dijke P., 2002). Оптичну густину кінцевого забарвленого продукту вимірювали при λ=420 нм за допомогою універсального люмінометра Victor2 «Perkin Elmer» (США).

Роль ІЛ-6, продуктів генів *pttg1* і *pttg-bp1* в регуляції остеобластної диференціації клітин вивчали, використовуючи технологію мшРНК. Нокдаун експресії генів ІЛ-6, *pttg1* і *pttg-bp1* здійснювали за допомогою перевірених плазмідних конструкцій з генами мшРНК, що специфічно пригнічують експресію мишачих варіантів мРНК досліджуваних генів, і які були придбані як частина MISSION shRNA library у фірми «Sigma-Aldrich/Merck» (США). Ефективність нокдауну експресії генів ІЛ-6, *pttg1* і *pttg-bp1* перевіряли за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Трансфекцію, або трансдукцію, клітин ссавців і людини *in vitro* проводили, використовуючи такі трансфекційні реагенти, як поліетиленімін («Polysciences Inc.», США), GeneJuice («Merck Millipore», США) і диетилетаноламін-декстран («Sigma-Aldrich/Merck», США).

Препарати МПК отримували шляхом трансфекції чи ко-трансфекції клітин-продуцентів плазмідними конструкціями з генами протеїнів МПК2 і/або МПК7. Кондиціоноване середовище (КС), яке містило секретовані МПК2 і/або МПК7, використовували для стимуляції остеобластної диференціації клітин. Індукцію остеобластної диференціації також здійснювали шляхом ко-трансдукції клітин плазмідними конструкціями з генами, які кодують протеїни МПК2 і МПК7.

Інтенсивність остеогенної диференціації визначали шляхом спектрофотометричного вимірювання активності лужної фосфатази (ЛФ) у клітинних лізатах з використанням *p*-нітрофенілфосфату («Pierce-Thermo Fisher Scientific», США) як субстрату згідно з загальноприйнятою методикою (van der Horst *et al.*, 2003). Оптичну густину вимірювали за допомогою сканувального планшет-рідера Absorbance Reader BioTek EL*800 («BioTek Instruments Inc.», США).

Ділянки мінералізації під час остеобластної диференціації клітин виявляли шляхом специфічного гістохімічного забарвлення депозитів солей кальцію алізариновим червоним S («ICN Biomedical Inc.», США).

Активацію/інактивацію сигнального шляху NF-κB у клітинах під впливом експериментальних умов визначали методом Вестерн-блотингу протеїнових екстрактів клітин, попередньо розділених електрофорезом в поліакриламідному гелі (12%) за наявності додецилсульфату натрію і з використанням антитіл до відповідних протеїнів.

Аналіз результатів експериментів здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «GraphPad Prism 6». Статистичне опрацювання результатів досліджень про-водили з використанням t-критерію Стьюдента. Порівнювали дві мінливих величини на підставі показника статистичної значущості відмінностей «*p*». Відмінність між дво-ма величинами вважали достовірною, коли значення «*p*» було меншим за 0,05. Набір і макетування тексту проводили з допомогою програми «Microsoft Office Word 2010».

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Створення оптимізованих препаратів рекомбінантних МПК. Відомо, що гетеродимери МПК, які складаються із субодиниць, що належать до різних груп (наприклад МПК2/7) 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 (Aoki H. et al., 2001). Для отримання препаратів рекомбінантних МПК було використано загальноприйняту модель – клітини-продуценти лінії НЕК293. Досліджено 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 (Katagiri T. et al., 1994). Попередньо для перевірки ефективності комбінованої дії МПК2 і МПК7 порівняно з їх гомодимерами, обидві кДНК зазначених протеїнів було клоновано в ідентичний вектор pShuttle-CMV.

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 конструкцій в еквімолярних концентраціях була в 5,43 ($p \leq 0,001$) разу ефективнішою (рис. 1, а). Враховуючи низьку остеоіндуктивну активність отриманих препаратів, були сконструйовані оптимізовані версії плазмід для експресії генів протеїнів МПК2 і МПК7 (МПК2-pDEF і МПК7-pSport6.1), які 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 (рис. 1, а). Проведено більш точне визначення співвідношень концентрацій векторів, що експресують гени протеїнів МПК2 і МПК7. Показано, що препарат рекомбінантних МПК, який містив 85 МПК2 і 15 % МПК7, є у 4,17 ($p \leq 0,001$) разу ефективнішим індуктором остеобластної диференціації 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. 1, б).

Відомо, що процедура заморожування-розморожування препаратів, які містять протеїни, призводить до конформаційних змін останніх. Такі зміни можуть супроводжуватися структурними порушеннями, втратою біологічної активності та деградацією протеїнів, зокрема їх комплексів (Сао Е. et al., 2003; Нардид О., 2014). Показано, що зберігання препаратів рекомбінантних МПК при низькій температурі (-70°C) протягом 3 год не призводить до суттєвої втрати їх остеоіндуктивних властивостей порівняно з препаратами рекомбінантних МПК після їх

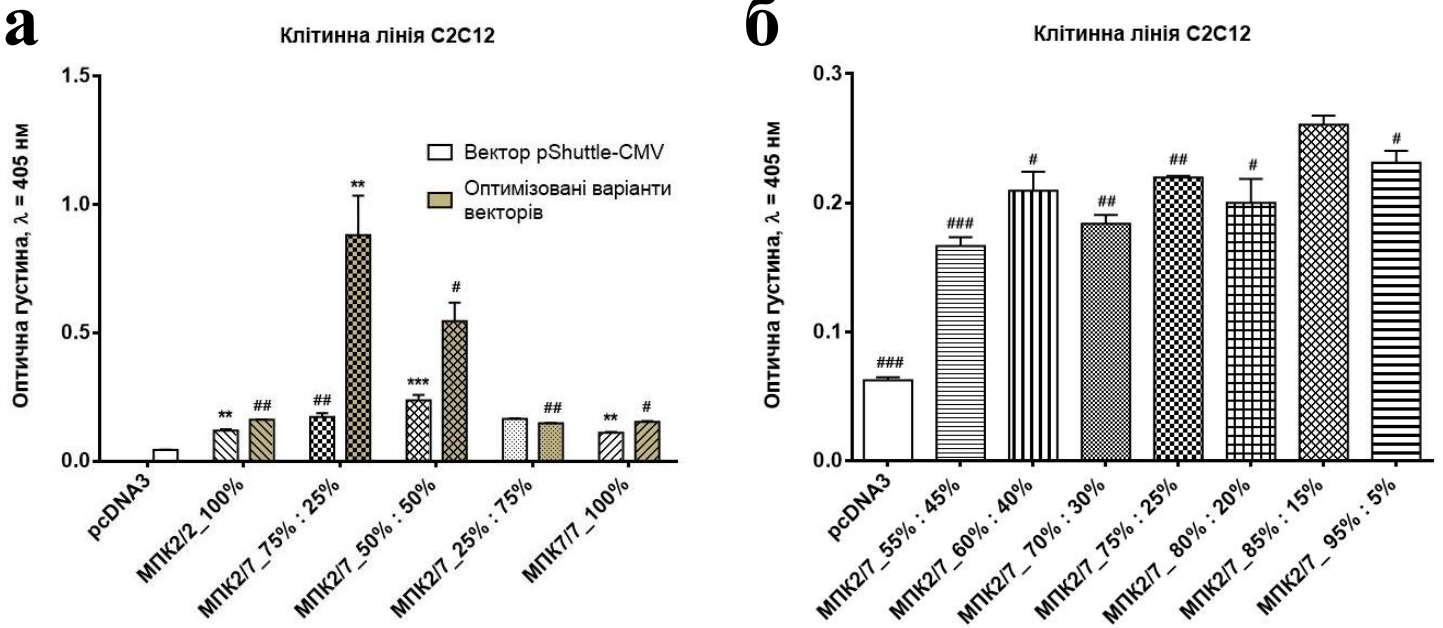


Рис. 1. Активність ЛФ у лізатах клітин лінії C2C12 після обробки КС, яке містило гомо- і/або гетеродимери МПК2 чи МПК7 у зазначених пропорціях (а і б). Примітка. * (#) – $p \leq 0,05$; ** (##) – $p \leq 0,01$; ***(###) – $p \leq 0,001$, * - різниця порівняно з контролем, # - різниця порівняно з клітинами, обробленими препаратом МПК, що містив експресовані оптимізованими варіантами векторів МПК2 і МПК7 у пропорції 75 до 25% (а) або 85 до 15% (б), відповідно.

короткочасного зберігання при 4°C (рис. 2). Таким чином, отримані нами результати можна пояснити особливостями структурної організації МПК, яка, очевидно, забезпечує формування толерантності цих протеїнів до змін температурного режиму.

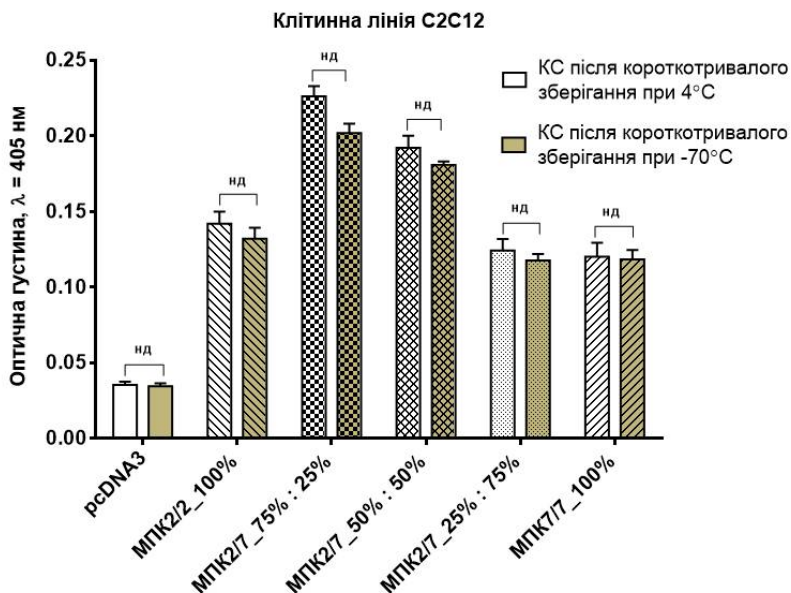


Рис. 2. Активність ЛФ у лізатах клітин лінії C2C12 після обробки КС, яке містило гомо- і/або гетеродимери МПК2 чи МПК7 у зазначених пропорціях. Примітка. Зміни статистично недостовірні (нд), $p > 0,05$.

дуковані плазмідною конструкцією на основі аденовірусу зі Wnt-специфічним люциферазним репортером *Bat-Luc*. Сигнальний шлях Wnt у клітинах-мішенях

Отже, було отримано і здійснено оптимізацію *in vitro* остеоіндуктивних властивостей препаратів рекомбінантних МПК. Такі препарати можуть успішно використовуватись для різних біологічних цілей, зокрема для індукції остеобластної диференціації *in vitro*.

Дослідження функціонального вкладу взаємодії ІЛ-6 і ФНП- α в інгібування остеобластної диференціації. Попередньо були досліджені ефекти ІЛ-6 на активацію сигнального шляху Wnt в FLS людини і фібробластах миші за впливу ФНП- α . Для цього клітини тимчасово транс-

активували надекспресією гена протеїну Wnt3a за допомогою відповідної аденовірусної конструкції. 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, що містить ген протеїну Wnt3a, за MOI (multiplicity of infection) =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 ($p \leq 0,05$) рази нижче порівняно з необробленими клітинами. Інгібувальна дія ІЛ-6 у поєднанні з його розчинним рецептором ІЛ-6Р також була вираженішою при вищому рівні активації цього сигнального шляху – відповідно у 3,2 ($p \leq 0,01$) і 4,39 ($p \leq 0,01$) рази нижче. Встановлено, що ІЛ-6 у поєднанні з ФНП- α виявляли кооперативний інгібувальний ефект щодо сигнального шляху Wnt при трансдукції аденовірусом, що містить ген Wnt3a, у кількості як MOI=300 так і MOI=600. Зокрема, за MOI=300 поєднання дії ІЛ-6 і ФНП- α призводило до інгібування сигнального шляху Wnt у 12,83 ($p \leq 0,01$) рази, а за MOI=600 у 13,5 ($p \leq 0,01$) рази порівняно з необробленими клітинами (рис. 3, а).

Фібробласти миші NIH-3T3 значно менше чутливі до інгібаторної дії ФНП- α , ніж FLS людини і без стимуляції лігандами Wnt3a не відповідають на дію ІЛ-6. Однак, 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 ($p \leq 0,01$) рази порівняно з необробленими клітинами). Було також поєднано дію ІЛ-6 і його рецептора, ФНП- α чи їх комбінацію з надекспресією гена протеїну DKK-1, який є ключовим інгібитором сигнального шляху Wnt (Diarra D. et al., 2007). Показано, що поєднання обробки клітин ІЛ-6 у комбінації з його рецептором разом із надекспресією гена протеїну DKK-1 призводило до інгібування цього сигнального шляху в 1,42 ($p \leq 0,05$) рази 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 (рис. 3, б).

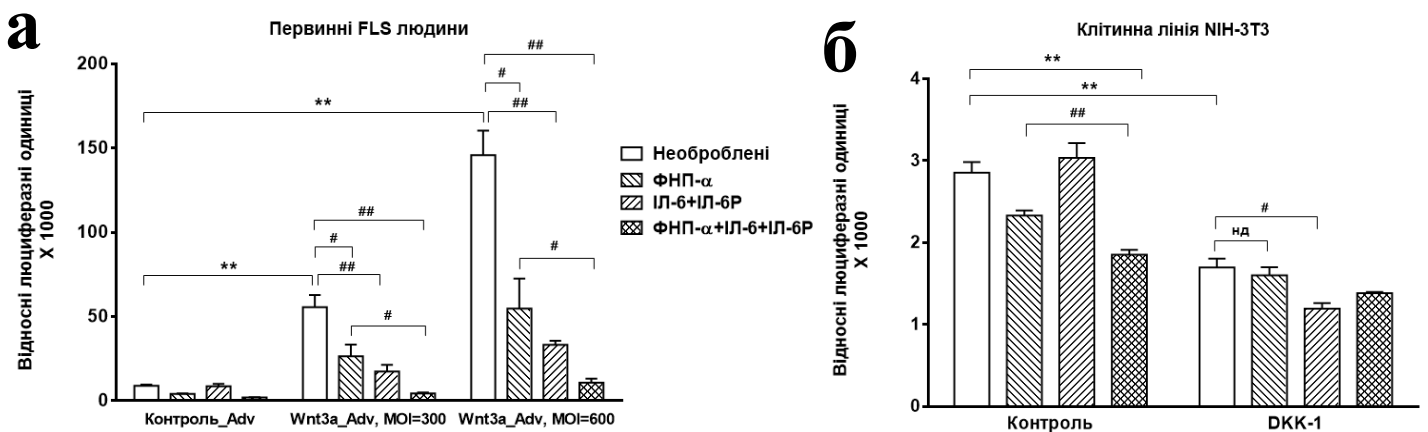


Рис. 3. Активність люциферази у лізатах первинних FLS людини після їх трансдукції аденовірусними конструкціями, які експресують Wnt-специфічну репортерну люциферазну касету *Bat-Luc* і ген *Wnt3a* (а) і у лізатах клітин лінії NIH-3T3 після їх трансфекції плазмідними конструкціями, які експресують Wnt-специфічну репортерну люциферазну касету *Bat-Luc*, ген *Wnt3a* і ген *DKK-1* (б) та інкубації з ІЛ-6 (100 нг/мл), ІЛ-6Р (500 нг/мл) і 10 нг/мл ФНП- α або їх поєднанням. Примітка. * (#) – $p \leq 0,05$; ** (##) – $p \leq 0,01$; нд (недостовірно) – $p > 0,05$, * - різниця порівняно з контролем, # - різниця між дослідними групами.

Враховуючи те, що прогресування РА призводить до ураження прилеглої кісткової тканини в суглобах, 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 мРНК гена ІЛ-6 з допомогою мшРНК в МСК миші ліній C2C12 і KS483 під час їх МПК-опосередкованої остеобластної диференціації. Стабільний нокдаун експресії мРНК гена ІЛ-6 підсилював МПК2/7-опосередковану остеобластну диференціацію (в окремих експериментах від 2,7 до 6 разів порівняно з контролем) клітин ліній C2C12 і KS483 (рис. 4, а і б), а також усував негативний ефект ФНП- α на остеобластну диференціацію клітин лінії C2C12 і перетворював його з інгібітора у потенціатор остеогенезу. Зокрема, зазначено 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 scg мшРНК (рис. 4, а). Водночас, подібно до активації сигнального шляху Wnt в клітинах лінії NIH-3T3 (рис. 3, б), обробка Нурег-ІЛ-6 не впливала на ранні стадії остеобластної диференціації клітин лінії KS483 (рис. 4, б). Не вдалося поєднати МПК2/7-опосередковану індукцію остеобластної диференціації клітин KS483 з обробкою ФНП- α у зв'язку з їх масовою загибеллю, індукованою даним цитокіном (Dong J. et al., 2013; Kitajima I. et al., 1996).

Згідно з даними літератури, активація сигнального шляху Wnt відбувається на пізніх стадіях остеогенезу (Krause C. et al., 2010). Стимуляція гетеродимерами МПК2/7 клітин лінії KS483 у 2-3 рази підсилювала їх пізні стадії остеобластної диференціації, тоді як одночасна надекспресія 6 варіантів мшРНК, які специфічно блокують експресію гена ІЛ-6, додатково підсилювала остеобластну диференціацію цих клітин. Більш ефективну диференціацію спостерігали через утворення

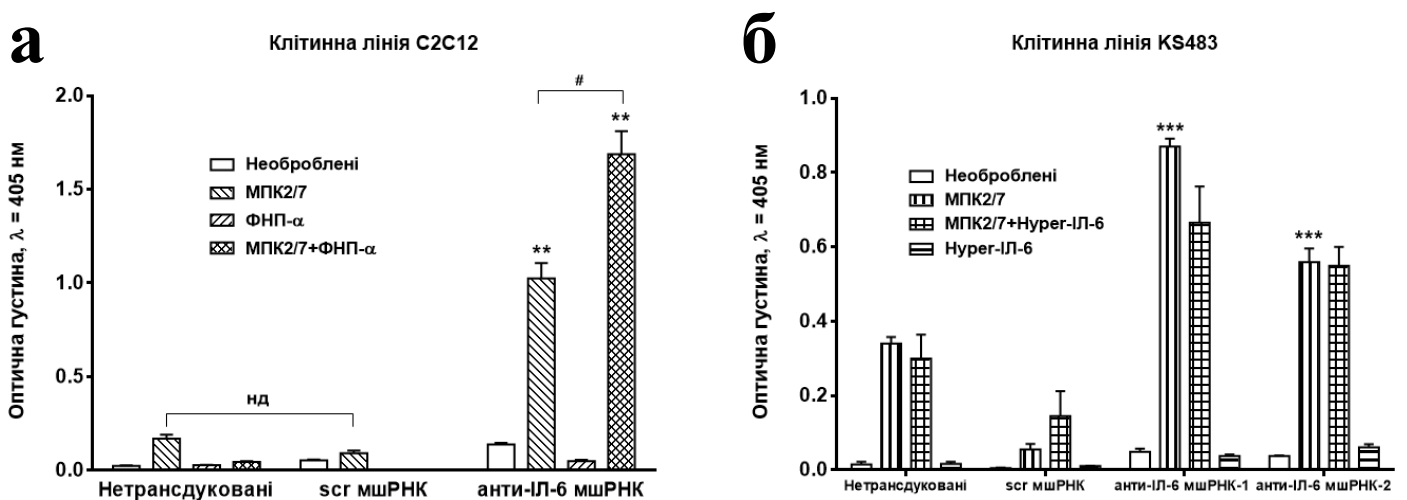


Рис. 4. Активність ЛФ у лізатах клітин лінії C2C12 за умов блокування експресії мРНК гена ІЛ-6, опосередкованого мшРНК після їх МПК2/7-опосередкованої індукції та обробки рекомбінантним ФНП- α у концентрації 10 нг/мл (а) і у лізатах клітин лінії KS483 в умовах блокування експресії мРНК гена ІЛ-6, опосередкованого мшРНК після їх МПК2/7-опосередкованої індукції та обробки рекомбінантним Нурег-ІЛ-6 у концентрації 10 нг/мл (б). Примітка. * (#) – $p \leq 0,05$; ** (##) – $p \leq 0,01$; ***(###) – $p \leq 0,001$; нд (недостовірно) – $p > 0,05$, * - різниця порівняно з контролем, # - різниця між дослідними групами.

специфічних вузликів і мінералізації позаклітинного матриксу порівняно з контрольним варіантом – scg мшРНК (рис. 5).



Рис. 5. 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.

сигналів Wnt, оскільки анти-ІЛ-6 терапія є важливою альтернативою при лікуванні хворих РА, які нечутливі до блокаторів ФНП-α (Terpos E. et al., 2011; Yermenko N. et al., 2015). Також виявлено, що ІЛ-6 є важливим інгібітором пізніх стадій остеогенезу, що може бути поясненням існування досі невідомої прямої чи непрямої негативної взаємодії між ІЛ-6 і сигнальним шляхом Wnt, у якому DKK-1 відіграє важливу роль (Diarra D. et al., 2007; Terpos E. et al., 2011). Відомо, що основна функція протеїну DKK-1 полягає у сприянні інтерналізації і подальшій деградації LRP5/6 – ко-рецептора сигнального шляху Wnt. Імовірно, що ІЛ-6 підсилює функцію DKK-1 (Ahn V. et al., 2011). Інгібування сигнального шляху Wnt цим цитокіном у скелетних тканинах, можливо, є головним механізмом, який призводить до руйнування кісткової тканини і суглобів, зумовленого віком чи запаленням (рис. 6). Показано, що нокдаун експресії мРНК гена ІЛ-6 частково усуває негативний вплив ФНП-α або ж перетворює ФНП-α з інгібітора в активатор остеобластної

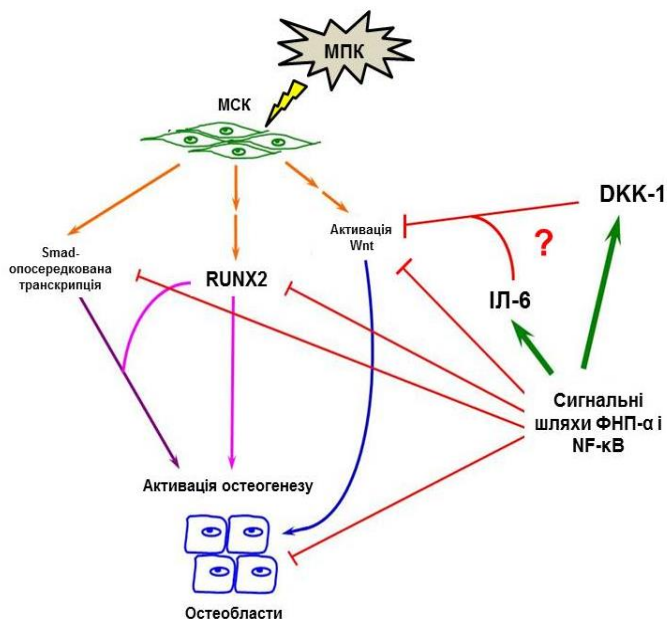


Рис. 6. Схема вкладу взаємодії між ІЛ-6 і сигнальним шляхом Wnt у ремоделюванні тканин суглобів. Примітка. МПК і Wnt-протеїни запускають центральні механізми, що індукують і підтримують формування скелетних тканин. МПК індукують остеобластну диференціацію МСК. Запальні процеси, опосередковані ФНП-α і активацією сигнального шляху NF-κB, інгібують Stad-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 індукуює 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.

Отже, нами вперше показано, що ІЛ-6 разом з DKK-1 і ФНП-α виявляє кооперативний інгібувальний ефект щодо остеогенного сигнального шляху Wnt. Зокрема, ІЛ-6 інгібує активацію сигнального шляху Wnt в первинних фібро-бластоподібних синовіоцитах, отриманих від пацієнтів хворих РА. У цьому найцікавішим ефектом є кооперація між ІЛ-6 і ФНП-α при інгібуванні

диференціації МСК миші. Такий результат дає змогу 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, що беруть участь у патогенезі РА, механізми інгібування кісткоутворення ІЛ-6 та ФНП- α й досі залишаються недостатньо вивченими.

Дослідження ролі генів *pttg1* і *pttg-bp1* в регуляції остеобластної диференціації. У співпраці з доктором С. Краусе, канд.біол.наук. Корчинським О. Г. показано, що надекспресія гена *pttg1* призводить до значного гальмування регуляторних сигналів Wnt в клітинах-мішенях. Такий результат дає змогу припустити, що система PTTG1/PTTG-BP1 виконує функцію нового негативного регулятора гомеостазу кісткової та, вірогідно, хрящової тканин, а також бере участь у патогенезі РА. З'ясовано, що тимчасова надекспресія гена *pttg-bp1* призводить до інгібування МПК2/7-індукованих ранніх стадій остеобластної диференціації клітин лінії C2C12 в 6,93 ($p \leq 0,01$) разу порівняно з контролем. Водночас при тимчасовій надекспресії гена *pttg1* остеогенні процеси незначно ($p > 0,05$) 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. 7, а). Встановлено, що опосередкований мшРНК нокдаун експресії генів *pttg1* та *pttg-bp1* призводив до зростання інтенсивності 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* зазначали незначне підсилення остеогенних процесів (рис. 7, б).

Було досліджено ефекти надекспресії і нокдауну генів *pttg1* і *pttg-bp1* на активацію сигнального шляху Wnt. Показано, що сумісна надекспресія генів *pttg1* і *pttg-bp1* інгібує активацію сигнального шляху Wnt у цих клітинах, що відображалось в пригніченні МПК2/7-індукованої мінералізації кісткового матриксу

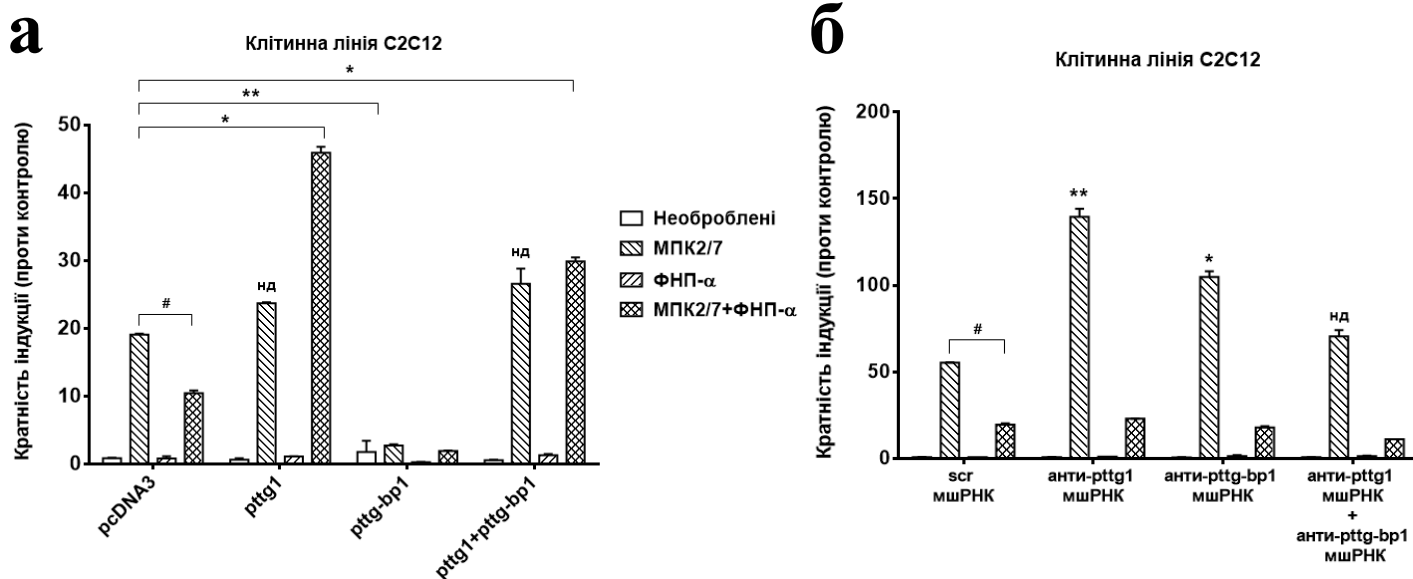


Рис. 7. Активність ЛФ у лізатах клітин лінії C2C12 за умов надекспресії генів *pttg1* і *pttg-bp1* (а) і в умовах нокдауну експресії мРНК генів *pttg1* і *pttg-bp1* з допомогою мшРНК (б) після їх МПК2/7-опосередкованої індукції та обробки рекомбінантним ФНП- α у концентрації 10 нг/мл. Примітка. * (#) – $p \leq 0,05$; ** (##) – $p \leq 0,01$; нд (недостовірно) – $p > 0,05$, * - різниця порівняно з контролем, # - різниця між контрольними групами.

у 2,5 разу порівняно з контролем (рис. 8, а). Показано, що стимуляція клітин МПК2/7 значно підсилює пізні стадії їх остеобластної диференціації, а надекспресія мшРНК, що блокує експресію *pttg1*, *pttg-bp1*, або ж їх поєднання додатково (відповідно у 3, 1,5 і 2,5 рази) підсилює остеобластну диференціацію цих клітин, що відображається в стимуляції процесів мінералізації кісткового матриксу та утворенні вузликів (рис. 8, б).



Рис. 8. Результати гістохімічного забарвлення 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*, опосередкованого мшРНК (б).

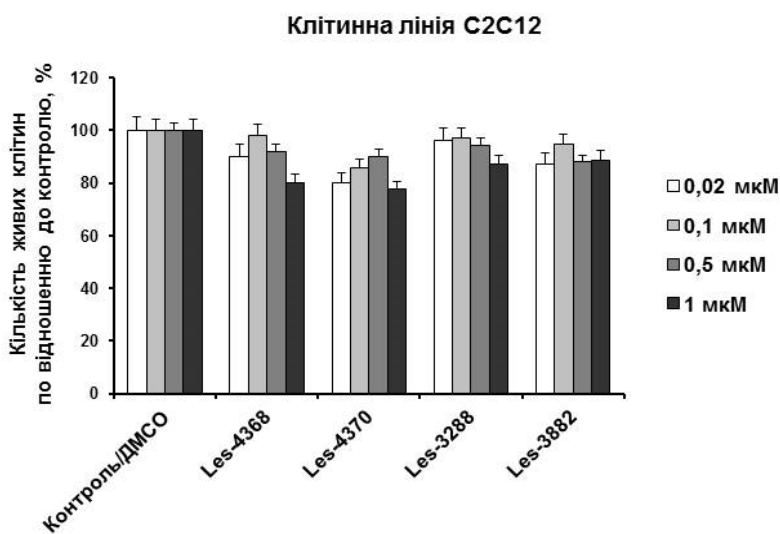


Рис. 9. Результати МТТ-аналізу життєздатності клітин лінії C2C12 після їх обробки новими похідними 4-тіазолідинону (Les-4368, Les-4370, Les-3882 і Les-3288) у концентрації від 0,02 до 1,0 мкМ.

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.

Дослідження ефектів нових похідних 4-тіазолідинону щодо опосередкованого ФНП-а інгібування МПК-індукованої остеобластної диференціації МСК. Досліджено цитотоксичну дію сполук Les-4368, Les-4370, Les-3882, і Les-3288 щодо МСК миші лінії C2C12. Вищезазначені сполуки додавали до культурального середовища у різних концентраціях (0,02; 0,1; 0,5 і 1,0 мкМ). Показано, що сполуки Les-3882 і Les-3288 в зазначених концентраціях не виявили значної ($p > 0,05$) цитотоксичності 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 контролем, але все ще залишалася в межах допустимих значень (рис. 9).

Проведено оцінку протизапальної активності нових похідних 4-тіазолідинону Les-4368, Les-4370, Les-3882, і Les-3288 щодо опосередкованих

ФНП- α прозапальних ефектів під час остеобластної диференціації клітин (рис. 10, а і б). Сполуки Les-4368 і Les-3882, усували негативний вплив ФНП- α на остеобластну диференціацію цих клітин. Більше того, ці речовини конвертували дію останнього 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 остеогенез (рис. 10, а). Показано, що сполуки Les-4368 і Les-3882 володіють протизапальними властивостями у широкому діапазоні концентрацій (0,02; 0,1 і 0,3 мкМ). Сполука Les-4368 у концентрації 0,02 мкМ та сполука Les-3882 у всіх трьох варіантах додатково підсилюють остеобластну диференціацію порівняно з контролем. Найкращий ефект виявила сполука Les-3882, яка у концентрації 0,1 мкМ підсилювала остеобластну диференціацію клітин C2C12 в 1,56 ($p \leq 0,05$) разу порівняно з контролем (рис. 10, б).

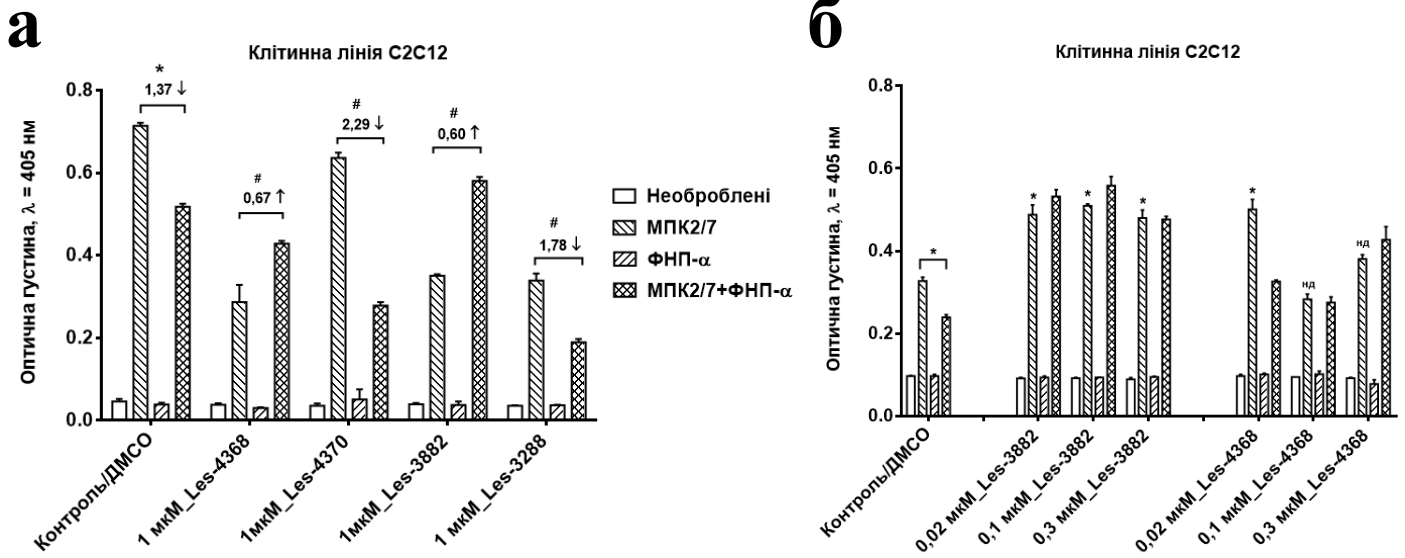


Рис. 10. Активність ЛФ у лізатах клітин лінії C2C12 після їх інкубації з Les-4368, Les-4370, Les-3882 чи Les-3288 у концентрації 1 мкМ (а) або у концентрації від 0,02 до 0,3 мкМ (б) та обробки ФНП- α (10 нг/мл). Примітка. * (#) – $p \leq 0,05$; нд (недостовірно) – $p > 0,05$, * - різниця порівняно з контролем або між контрольними групами, # - різниця між дослідними групами.

Проведено дослідження для з'ясування молекулярного механізму протизапальної активності сполук Les-4368 і Les-3882. Модуляція активації сигнального шляху NF- κ B сполуками Les-4368 і Les-3882 може бути ключовим механізмом, який опосередковує їхні протизапальні ефекти. Протеїн I- κ B α є критично важливим компонентом, що контролює активацію даного сигнального шляху. Обробка клітин лінії C2C12 сполуками Les-3882 і Les-4368 з подальшою стимуляцією ФНП- α протягом 1 год по-різному модулює активацію сигнального шляху NF- κ B. Зокрема, дія Les-3882 у концентрації 0,3 мкМ призводить до нижчого рівня експресії I- κ B α після обробки ФНП- α (в 1,9 разу), тоді як Les-4368 у тій же концентрації, навпаки, призводить до зростання рівня експресії даного протеїну порівняно з необробленими варіантами (рис. 11, а і б).

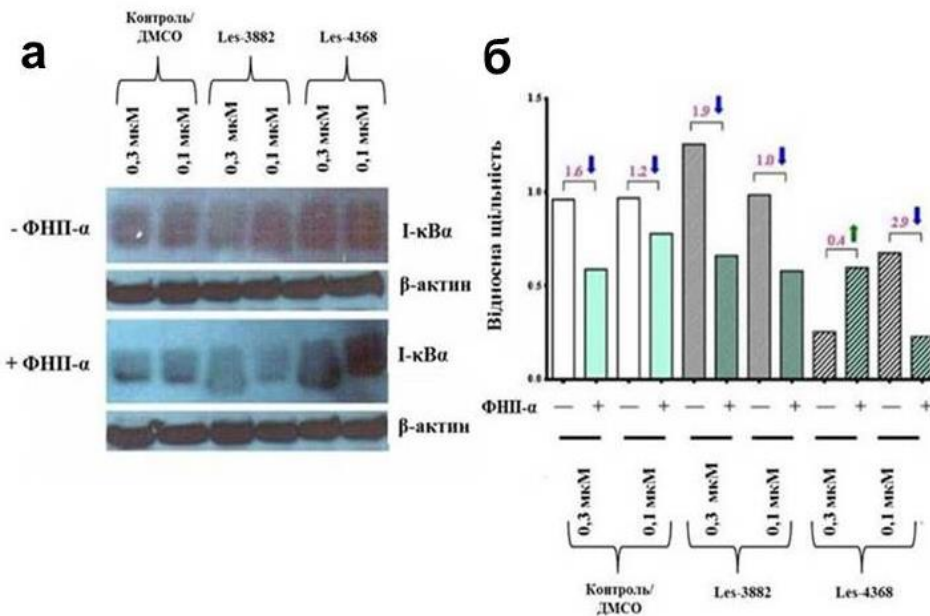


Рис. 11. Результати Вестерн-блот аналізу демонструють ефект сполук Les-4368 і Les-3882 в зазначених концентраціях на рівень експресії протеїну І-кВа після інкубації з ФНП- α (10 нг/мл) протягом 1 год (а і б) в клітинах лінії C2C12.

Отже, нові похідні 4-тіазолідинону, а саме сполуки Les-3882 і Les-4368, усувають негативний ефект прозапального цитокіну ФНП- α на ранній стадії остеобластної диференціації МСК миші лінії C2C12. Найвищу активність продемонструвала сполука Les-3882, яка в 1,56 разу порівняно з контролем підсилювала остеобластну диференціацію цих клітин в низькій концентрації (0,1 мкМ), ймовірно, шляхом модуляції сигнального шляху NF- κ B.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше надано експериментальні докази існування кооперативного інгібувального впливу ІЛ-6 разом з ФНП- α і ДКК-1 на остеогенний сигнальний шлях Wnt. Результати щодо отримання і оптимізації остеоіндуктивних властивостей препаратів рекомбінантних МПК можна успішно використовувати для індукції остеобластної диференціації *in vitro*.

За результатами досліджень зроблено наступні основні висновки:

1. Найефективнішим індуктором остеобластної диференціації на моделі клітин лінії C2C12 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 температурі -70°C препаратів, рекомбінантних МПК, з оптимізованими остеоіндуктивними властивостями не призводить до достовірної втрати їх остеоіндуктивних властивостей порівняно з свіжовиділеними препаратами МПК.

3. ІЛ-6 разом з ФНП- α чи ДКК-1 проявляє кооперативний інгібувальний ефект щодо остеогенного сигнального шляху Wnt. У первинних синовіальних фібробластах людини ФНП- α , так само як і ІЛ-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 ІЛ-6 та його рецептором разом з надекспресією гена протеїну ДКК-1 призводить до інгібування даного сигнального шляху в 1,42 ($p \leq 0,05$) разу порівняно з контролем.

4. Стабільний нокдаун експресії мРНК гена ІЛ-6 підсилює МПК2/7-опосередковану остеобластну диференціацію (в окремих експериментах від 2,7 до 6 разів порівняно з контролем) клітин ліній C2C12 і KS483, а також усуває негативний ефект ФНП- α на остеобластну диференціацію клітин лінії C2C12 і перетворює його з інгібітора у потенціатор остеогенезу.

5. 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 кісткового матриксу цими клітинами порівняно з контролем.

6. 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 надекспресії гена *pttg1* і за наявності ФНП- α в середовищі остеогенні процеси інтенсифікувались в 2,41 ($p \leq 0,05$) разу.

7. Ектопічна ко-експресія генів *pttg1* і *pttg-bp1* інгібує активацію сигнального шляху Wnt, що відображається у зниженні в 2,5 рази інтенсивності мінералізації кісткового матриксу клітинами лінії KS483 порівняно з контролем. Водночас 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 рази, відповідно.

8. 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 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. Korchynskiy // *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. Korchynskiy // *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. Korchynskiy // *Animal Biology*. – 2017. – V. 19, № 2. – P. 70-78. (Дисертантка виконала експериментальні дослідження на мезенхімних стовбурових клітинах лінії C2C12 і KS483 та статистичну обробку результатів, проаналізувала отримані дані, літературні джерела та оформила статтю).

6. **Malysheva K.** 4-thiazolidinone-based derivatives rescue TNF α -inhibited osteoblast differentiation in mouse mesenchymal precursor cells / **K. Malysheva**, N. Finiuk, O. Pavlenko, D. Havrylyuk, R. Lesyk, R. Stoika, O. Korchynskiy // *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. Korchynskiy, **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 TNF α -inhibited osteogenesis / **Kh. Malysheva**, K. de Rooij, C. W. G. M. Löwik, R. Stoika, O. Korchynskiy // 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. (Дисертантка брала участь у проведенні експериментальних досліджень, узагальнила і описала дані, представила матеріали на конференції у вигляді тез).

9. **Malysheva Kh.** Knockdown of IL-6 expression rescues osteogenesis from inhibition by TNF α / **Kh. Malysheva**, R. Stoika, O. Korchynskiy // 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. (Дисертантка брала участь у проведенні експериментальних досліджень, узагальнила і описала дані, написала тези представила матеріали на конференції у вигляді усної доповіді).

10. **Malysheva Kh.** ShRNA-mediated knockdown of IL-6 expression rescues TNF α -inhibited osteogenesis in mouse mesenchymal precursor cells / **Kh. Malysheva**, K. de Rooij, C. Löwik, D. Baeten, R. Stoika, O. Korchynskiy // International Conference on Advances in Cell Biology and Biotechnology (October 11-13, 2015, Lviv). – Lviv, 2015. – P. 84. (Дисертантка провела експериментальні дослідження, узагальнила і описала дані, написала тези і представила матеріали на конференції у вигляді стендової доповіді).

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. Korchynskiy // Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference in Prague. (April 7-10, 2016, Prague). – Prague, 2016. – P. 65. (Дисертантка брала участь у проведенні експериментальних досліджень, узагальнила і описала дані, написала тези і представила матеріали на конференції у вигляді усної доповіді).

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. Korchynskiy // The 41st FEBS Congress «Molecular and systems biology for a better life» (September 3-8, 2016, Kusadasi). – Kusadasi, 2016. – V. 283, № 1. – P. 25-26. (Дисертантка брала участь у проведенні експериментальних досліджень, узагальнила і описала дані, представила матеріали на конференції у вигляді тез).

13. **Malysheva K.** 4-thiazolidinone-based derivatives rescue TNF α -inhibited osteogenesis in mouse mesenchymal precursor cells / **K. Malysheva**, N. Finiuk, O. Pavlenko, D. Havrylyuk, R. Lesyk, R. Stoika, O. Korchynskiy // 7th TriNet Meeting - RECOOP Annual Project Review Meeting Hotel Gellert (October 6-9, 2016, Budapest). – Budapest, 2016. – P. 85. (Дисертантка провела експериментальні дослідження, узагальнила і описала дані, написала тези і представила матеріали на конференції у вигляді усної доповіді).

14. **Malysheva K.** 4-thiazolidinone-based derivatives rescue TNF α -inhibited osteoblast differentiation in mouse mesenchymal precursor cells / **K. Malysheva**, N. Finiuk, O. Pavlenko, D. Havrylyuk, R. Lesyk, R. Stoika, O. Korchynskiy // RECOOP 12th Bridges in Life Sciences Annual Conference (April 7-8, 2017, Budapest). – Budapest, 2017. – P. 21. (Дисертантка провела експериментальні дослідження, узагальнила і описала дані, написала тези і представила матеріали на конференції у вигляді усної доповіді).

АНОТАЦІЇ

Малишева Х. В. Блокування сигнального шляху Wnt інтерлейкіном 6: роль у розвитку та прогресуванні ревматоїдного артрити. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Інститут біології тварин НААН, Львів, 2017.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню негативного регуляторного впливу генів інтерлейкіну 6, секурину (*pttg1*, ген пухлинної трансформації клітин гіпофізу 1) та РТТГ-зв'язуючого протеїну 1 (*pttg-bp1*) на остеобластну диференціацію мезенхімних стовбурових клітин миші. Вперше виявлено, що

інтерлейкін 6 разом з фактором некрозу пухлин α і DKK-1 проявляє кооперативний інгібувальний ефект щодо остеогенного сигнального шляху Wnt. Показано, що нокдаун експресії мРНК гена інтерлейкіну 6 з допомогою малих шпилькових РНК усуває негативний вплив фактора некрозу пухлин α на остеобластну диференціацію, а також підсилює перебіг її ранніх і пізніх стадій. 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 малих шпилькових РНК виявляє протилежний ефект. Продемонстровано, що нові похідні 4-тіазолідинону (сполуки Les-3882 і Les-4368) усувають негативний вплив фактора некрозу пухлин α на остеобластну диференціацію мезенхімних стовбурових клітин миші, а також перетворюють його з інгібітора остеогенезу в стимулятор. Результати досліджень щодо отримання препаратів рекомбінантних морфогенетичних протеїнів кістки та оптимізації їх остеоіндуктивних властивостей можна успішно використовувати для індукції остеобластної диференціації *in vitro*.

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

Малышева Х. В. Блокировка сигнального пути Wnt интерлейкином 6: роль в развитии и прогрессировании ревматоидного артрита. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 – биохимия. – Институт биологии животных НААН, Львов, 2017.

Диссертационная работа посвящена исследованию негативного регуляторного влияния генов интерлейкина 6, секурина (*pttg1*, ген опухолевой трансформации клеток гипофиза 1) и РТТГ-связывающего протеина 1 (*pttg-bp1*) на остеобластную дифференциацию мезенхимальных стволовых клеток мыши. Впервые обнаружено, что интерлейкин 6 вместе с фактором некроза опухолей α и DKK-1 проявляет кооперирующий ингибиторный эффект в отношении остеогенного сигнального пути Wnt. Показано, что нокдаун экспрессии мРНК гена интерлейкина 6 с помощью малых шпильковых РНК, устраняет негативное влияние фактора некроза опухолей α на остеобластную дифференциацию, а также усиливает течение ее ранних и поздних стадий. Установлено, что эктопическая экспрессия гена *pttg-bp1* приводит к ингибированию остеогенной дифференциации, тогда как нокдаун экспрессии мРНК гена *pttg1*, опосредованный малыми шпильковыми РНК, наоборот, усиливает ее. Показано, что эктопическая ко-экспрессия генов *pttg1* и *pttg-bp1* ингибирует активацию сигнального пути Wnt, тогда как нокдаун экспрессии мРНК этих генов, опосредованный короткими шпильковыми РНК, оказывает противоположный эффект. Продемонстрировано, что новые производные 4-тиазолидинона (соединения Les-3882 и Les-4368) устраняют негативное влияние фактора некроза опухолей α на остеобластную дифференциацию мезенхимальных стволовых клеток

мышь, а также превращают его из ингибитора остеогенеза в стимулятор. Результаты исследований по получению препаратов рекомбинантных морфогенетических протеинов кости и оптимизации их остеоиндуктивных свойств можно успешно использовать для индукции остеобластной дифференциации *in vitro*.

Ключевые слова: сигнальный путь Wnt, интерлейкин 6, ген опухолевой трансформации клеток гипофиза 1, PTTG-связывающий протеин 1, фактор некроза опухолей α , малые шпильковые РНК, морфогенетические протеины кости, остеобластная дифференциация, мезенхимальные стволовые клетки мыши.

Malysheva Kh. V. Wnt signaling pathway inhibition by interleukin 6 and its role in the development and progression of rheumatoid arthritis. – Manuscript.

Thesis for the degree of candidate of biological sciences in speciality 03.00.04 – biochemistry. – Institute of Animal Biology NAAS, Lviv, 2017.

Although rheumatoid arthritis (RA) has been the subject of numerous investigations, the real cause of the disease is still unknown and its etiology and pathogenesis remain poorly understood. The thesis is devoted to the study of the negative regulatory influence of interleukin 6 (IL-6) and PTTG1/PTTG-BP1 axis on activation of Wnt signaling pathway and consequently osteoblastic differentiation of mouse mesenchymal stem cells (MSC), its role in the development and progression of RA. It was firstly shown that IL-6 inhibited the activation of Wnt signaling in primary human synoviocytes, and, together with tumor necrosis factor α (TNF- α) and DKK-1, inhibited the activation of Wnt response. Small hairpin (sh) RNA-mediated knockdown of IL-6 mRNA significantly increased early bone morphogenetic proteins (BMP2/7)-induced osteogenesis and rescued it from the negative effect of TNF- α , as well as intensified bone matrix mineralization in mouse MSC. Thus, the anti-osteoblastic effects of IL-6 are most likely mediated by its negative interaction with Wnt signaling pathway.

We have also investigated the effect of *pttg1* gene overexpression on activation of BMP and Wnt signaling pathways. It was found that ectopic expression of *pttg1* gene inhibited BMP2/7-induced osteogenic differentiation and bone matrix mineralization in mouse MCS. At the same time shRNA-mediated knockdown of mRNA *pttg1* gene led to a substantial activation of bone formation in these cells. Thus, PTTG1 is an important repressor of osteogenesis, and it may be involved in skeletal tissue destruction caused by the inflammatory processes.

We performed *in vitro* evaluation of functional effects of novel 4-thiazolidinone-based derivatives denoted as Les-4368, Les-4370, Les-3882 and Les-3288 that were used in different doses on the TNF- α -mediated inhibition of the BMP-induced osteoblast differentiation in mouse MSC. Treatment of these cells with TNF- α completely inhibited their myogenic differentiation, as well as strongly inhibited the BMP-induced osteogenesis. Strikingly, the treatment of mouse MCS with Les-4368 and Les-3882 rescued the osteoblast differentiation from negative control of TNF- α , and, moreover, converted this cytokine from the inhibitor of osteogenesis into its stimulator. Western-blot analysis of Inhibitory κ B α (I- κ B α) degradation was used to elucidate a mechanism of the anti-inflammatory effects. We found that Les-3882 and Les-4368 which demonstrated their efficiency in modulation of the anti-osteogenic effects of TNF- α had an opposite effect on the I- κ B α level. The best effect was shown by the Les-3882 that stimulated

osteoblast differentiation at low dose (0.1 μM), presumably, via modulation of NF- κB signaling pathway.

We conducted *in vitro* optimization of osteoinductive properties of recombinant BMPs preparations to be used to induce 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 BMP preparation produced upon co-transfection of 85 % of BMP2 and 15 % of BMP7 plasmids, that is most likely due to generation of conditions most favorable for formation of BMP2/7 heterodimers. Frozen BMP2/7 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 BMP2/7 preparations.

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.