

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»

На правах рукописи

ВАСИЛЬЕВ ФИЛИПП ФИЛИППОВИЧ

**АССОЦИАЦИЯ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ РЕЦЕПТОРОВ
TNF α И IL1 С УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ ИХ
МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ И РАСТВОРИМЫХ РЕЦЕПТОРОВ**

14.03.09 – «Клиническая иммунология, аллергология»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Сенников С.В.

Новосибирск
2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Провоспалительные цитокины TNF α и IL1	11
1.2 Рецепторы к TNF α и IL1	15
1.2.1 Мембраносвязанные рецепторы TNF α	15
1.2.2 Растворимые рецепторы TNF α	27
1.2.3 Мембраносвязанные рецепторы IL1	29
1.2.4 Растворимые рецепторы IL1	34
1.3 Аллельный полиморфизм генов рецепторов цитокинов	37
1.3.1 Полиморфизм генов рецепторов TNF α	39
1.3.2 Полиморфизм генов рецепторов IL1	41
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	44
2.1 Объекты исследования	44
2.2 Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови человека	44
2.3 Культивирование мононуклеарных клеток <i>in vitro</i>	45
2.4 Определение уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1 на субпопуляциях мононуклеарных клеток	45
2.5 Определение уровня цитокинов TNF α , IL1 β и растворимых рецепторов к TNF α и IL1	49
2.6 Выделение геномной ДНК	49
2.7 Генотипирование рецепторов I и II типов для TNF α и IL1	50
2.8 Методы статистической обработки	53
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	55
3.1 Уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 на субпопуляциях мононуклеарных клеток	55

3.2 Сывороточные уровни цитокинов TNF α и IL1 β и растворимых рецепторов к TNF α и IL1	61
3.3 Корреляционные взаимосвязи в системах рецепторов TNF α и IL1	61
3.4 Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов рецепторов TNF α и IL1 среди условно здоровых индивидов	64
3.5 Ассоциация аллельных вариантов генов рецепторов TNF α с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов и сывороточным уровнем растворимых рецепторов.....	70
3.6 Ассоциация аллельных вариантов генов рецепторов IL1 с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов и сывороточным уровнем растворимых рецепторов.....	76
ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
ВЫВОДЫ.....	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	105

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Многофункциональные медиаторы – фактор некроза опухоли альфа (TNF α , tumor necrosis factor alpha) и интерлейкин-1 (IL1, interleukin 1) тесно взаимосвязаны по своим функциям и эффектам и играют значимую роль в реализации иммунных реакций иммунопатологических процессов.

Для TNF α и IL1 показано существование мембраносвязанных и растворимых рецепторов двух типов. Биологические эффекты TNF α реализуются через связывание с двумя типами мембраносвязанных форм рецепторов – тип I (CD120a, TNFR1) и тип II (CD120b, TNFR2) с молекулярными массами 55 кДа и 75 кДа соответственно [Cabal-Hierro and Lazo 2012; Chu et al. 2013]. Биологические эффекты IL1 реализуются после связывания со специфическими мембраносвязанными рецепторами IL1 I типа (IL1R1). Рецептор IL1 II типа (IL1R2) не обладает способностью передавать сигналы, т.е. действует для цитокина как рецептор-«ловушка» [Garlanda et al. 2013; Dinarello 2013]. Основной функцией растворимых рецепторов TNF α и IL1 является ингибирование биологических эффектов TNF α и IL1 путем конкуренции с мембраносвязанными рецепторами за связывание с лигандом.

Известно, что плотность поверхностных молекул рецепторов на клетке может иметь важное значение для осуществления биологической активности лиганда [Besschetnova et al. 2008; Moraga et al. 2009]. Для оценки уровня экспрессии рецепторов TNF α и IL1 важно оценивать не только количество клеток, несущих рецепторы TNF α и IL1, но и количество самих экспрессируемых рецепторов, поскольку от плотности экспрессии на поверхности клеток соответствующих рецепторов может зависеть эффективность действия самих плейотропных медиаторов TNF α и IL1. При сниженной экспрессии рецепторов биологические эффекты цитокина на данную популяцию клеток будут выражены минимально, и наоборот, если экспрессия рецепторов на иммунокомпетентных

клетках будет повышена, то клеточные популяции будут более чувствительны к действию TNF α и IL1.

В литературе представлен ряд работ по изучению экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1. Но при этом очень малое внимание уделяется содержанию данных рецепторов на клетку. В проточной цитометрии стандартно используется метод фенотипической оценки популяций лейкоцитов по процентному содержанию клеток, экспрессирующих тот или иной маркер, либо исследуется плотность экспрессии мембраносвязанных молекул по среднему значению интенсивности флуоресценции. Однако для более информативной оценки уровня экспрессии необходимо проводить точный подсчет количества молекул рецепторов на поверхности клеток.

Таким образом, от уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов и уровня растворимых форм рецепторов в значительной степени зависит эффективность действия TNF α и IL1. Уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1 может характеризоваться индивидуальной вариабельностью, обусловленной генетической предрасположенностью, и, в частности, аллельным полиморфизмом.

Генетический полиморфизм имеет большое значение в формировании полиморфной структуры системы цитокинов и их рецепторов, и вносит значимый вклад в индивидуальные особенности иммунного ответа [Сенников с соавт. 2002]. SNP (single nucleotide polymorphism) – это однонуклеотидные вариации в геномной ДНК с частотой редкого аллеля не менее 1% [Fareed and Afzal 2013]. Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в промоторных областях генов могут оказывать влияние на скорость транскрипции генов, структуру сайтов связывания транскрипционных факторов, контролирующих активность промотора, стабильность и уровень мРНК [Shastri 2009; Fareed and Afzal 2013], и тем самым обуславливать разницу в уровне продукции белка. Полиморфизм генов цитокинов находится в фокусе интенсивных исследований в течение последних 15 лет. При этом были установлены ассоциации полиморфизмов с предрасположенностью к

заболеваниям, характеру течения заболевания, его исходом и подбором терапии [Khripko et al. 2008; Коненков с соавт. 2012; Силков с соавт. 2012; Шкаруба с соавт. 2012; Коненков с соавт. 2013]. Наличие взаимосвязи отдельных аллельных вариантов с уровнем продукции соответствующего цитокина может оказывать влияние на характер и тяжесть течения заболеваний.

В научных исследованиях последних лет много внимания уделялось изучению полиморфизма генов цитокинов. Гораздо менее изученными остаются полиморфизмы генов рецепторов цитокинов. Таким образом, исследование полиморфизма генов рецепторов цитокинов в их связи с продукцией соответствующего белка актуальны при изучении функционирования цитокиновой сети при иммунном ответе организма. Одновременное исследование рецепторов к основным провоспалительным цитокинам TNF α и IL1 имеет большое значение для понимания механизмов возникновения воспаления. В настоящее время неизвестно, как уровень экспрессии мембраносвязанных и растворимых форм рецепторов TNF α и IL1 меняется в зависимости от генетического полиморфизма этих генов и изучение функциональности полиморфизма генов данных рецепторов приобретает особую актуальность.

Цель работы

Изучить ассоциированность аллельных вариантов генов рецепторов TNF α и IL1 с уровнем экспрессии их мембраносвязанных форм на мононуклеарных клетках, а также с уровнем растворимых рецепторов TNF α и IL1 в сыворотке крови.

Задачи исследования:

1. Исследовать уровень экспрессии мембраносвязанных форм рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 на субпопуляциях мононуклеарных клеток периферической крови условно здоровых индивидов.

2. Исследовать уровень экспрессии мембраносвязанных форм рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 на моноцитах в спонтанной и стимулированной культуре мононуклеарных клеток периферической крови условно здоровых индивидов.
3. Определить уровень растворимых форм рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 в сыворотке крови условно здоровых индивидов.
4. Изучить уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов и сывороточный уровень растворимых рецепторов у носителей разных полиморфных вариантов генов рецепторов TNF α (-609 G/T, -1207 G/C, -1709 A/T, -3609 C/T) и рецепторов IL1 (-1100 A/G, -12075 C/T, -1780 C/T, +6974 G/T).

Научная новизна работы

Впервые исследовано число мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1 на субпопуляциях мононуклеарных клеток (МНК) условно здоровых индивидов. Установлены количественные различия в уровне экспрессии мембраносвязанных рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток здоровых индивидов. Впервые определена частота встречаемости аллельных вариантов промоторов генов рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 у здоровых индивидов Юго-Западной Сибири. Впервые показана ассоциация полиморфных вариантов промоторов генов рецепторов TNF α I и II типа с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α I и II типов на субпопуляциях мононуклеарных клеток, а также сывороточным уровнем растворимых рецепторов TNF α I типа. Впервые установлена ассоциация между аллельными вариантами промоторных участков генов рецепторов IL1 I и II типа и уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов IL1 I и II типа на субпопуляциях мононуклеарных клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы

В настоящем исследовании получены результаты, свидетельствующие о различиях как в количестве клеток, экспрессирующих рецепторы I и II типов для

TNF α и IL1, так и в числе мембраносвязанных форм рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 на субпопуляциях мононуклеарных клеток условно здоровых индивидов. Получены результаты, указывающие на то, что повышенный процент клеток, экспрессирующих рецепторы I и II типов для TNF α и IL1, не всегда сопряжен с повышенным количеством рецепторов на клетках, что может иметь важное значение для понимания патогенеза и интерпретации экспериментальных данных. Результаты исследования экспрессии рецепторов TNF α и IL1 при стимуляции ЛПС культуры мононуклеарных клеток условно здоровых индивидов свидетельствуют о разном влиянии ЛПС на уровень экспрессии рецепторов.

В данной работе продемонстрированы результаты ассоциации исследованных полиморфных вариантов генов рецепторов TNF α и IL1 с уровнем экспрессии их мембраносвязанных рецепторов и сывороточным уровнем растворимых рецепторов, свидетельствующие о том, что данные полиморфные варианты генов рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 являются функциональными. Результаты исследования определяют перспективность проведения дальнейшего изучения данных полиморфных вариантов генов рецепторов TNF α и IL1 в качестве биологических маркеров при разработке комплексных критериев прогноза риска развития заболеваний, тяжести их течения и эффективности проводимой терапии. Результаты исследования демонстрируют значимость генетического полиморфизма в формировании индивидуальных различий в уровне экспрессии рецепторов TNF α и IL1.

Оптимизирован протокол пробоподготовки для оценки уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α I и II типов методом проточной цитофлуориметрии с помощью калибровочных частиц BD QuantiBRITE PE. Оптимизирован протокол оценки уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов IL1 I и II типов методом проточной цитофлуориметрии с помощью калибровочных частиц BD QuantiBRITE PE. Оптимизированные протоколы пробоподготовки дают возможность получать точные, воспроизводимые данные по уровню экспрессии рецепторов TNF α и IL1. Полученные нормативные

значения уровня экспрессии рецепторов и относительного числа клеток, экспрессирующих мембраносвязанные формы рецепторов TNF α и IL1 в субпопуляциях иммунокомпетентных клеток условно здоровых индивидов позволят произвести оценку изменений этих показателей при различных иммунопатологических состояниях.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Субпопуляции мононуклеарных клеток различаются не только в числе клеток, экспрессирующих рецепторы TNF α и IL1, но и в количестве рецепторов TNF α и IL1 на клетках.
2. Полиморфные варианты промоторов генов *TNFRSF1A* -1207 G/C, *TNFRSF1B* -3609 C/T, *IL1R1* -12075 C/T и *IL1R2* -1780 C/T, +6974 G/T ассоциированы с изменением уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1 на субпопуляциях мононуклеарных клеток.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

1. Семинарах экспериментального отдела ФГБНУ «НИИФКИ» (г. Новосибирск, 2012, 2013 гг.).
2. Семинарах лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «НИИФКИ» (г. Новосибирск, 2012, 2013 гг.).
3. VIII отчетной конференции ФГБНУ «НИИФКИ» «Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике» (г. Новосибирск, 21-23 июня 2011 года).
4. Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» (г. Иркутск, 2-3 июля 2012 года).
5. Форуме «Объединенный иммунологический форум – 2013» (г. Нижний Новгород, 30 июня – 5 июля 2013 года).

6. Всероссийской научно-практической конференции «ЭРЭЛ – 2013» (г. Якутск, 3-6 декабря 2013 года).
7. IV Конгрессе с международным участием «Экология и здоровье человека на Севере» (г. Якутск, 4-7 декабря 2013 года).
8. Молодежной научной конференции с международным участием «Генетика и здоровье: актуальные вопросы и современные технологии» (г. Якутск, 11 июня 2014 года).
9. V Конгрессе с международным участием «Экология и здоровье человека на Севере» (г. Якутск, 24-29 ноября 2014 года).

По теме диссертации опубликовано 13 работ, в том числе 6 статей в изданиях, рекомендованных ВАК.

Самостоятельность выполненной работы

Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором на базе лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии» (г. Новосибирск). Большую признательность автор выражает научному руководителю профессору, д.м.н. Сергею Витальевичу Сенникову за подробное конструктивное обсуждение полученных результатов, а также всем сотрудникам лаборатории молекулярной иммунологии за благожелательное отношение в ходе выполнения работы.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Провоспалительные цитокины TNF α и IL1

Цитокины играют ключевую роль в регуляции и реализации воспалительных процессов. Среди них выделяют провоспалительные цитокины, которые инициируют и поддерживают воспаление, и противовоспалительные – понижающие выраженность воспалительного процесса. Основными провоспалительными цитокинами являются два медиатора, тесно взаимосвязанные по своим биологическим эффектам – фактор некроза опухоли альфа и интерлейкин-1. Медиаторы фактор некроза опухоли альфа и интерлейкин-1 обеспечивают развитие полноценной воспалительной реакции в организме человека.

Фактор некроза опухоли альфа (ФНО, ФНО-альфа, TNF, TNF-alpha, TNF α) – многофункциональный плейотропный цитокин, играющий важную роль в процессах воспаления и формирования защитных реакций организма [Fiers 1991; Wallach et al. 1999]. TNF α относится к надсемейству лигандов TNFSF (TNF superfamily), состоящему из более чем 20 молекул, наиболее значимыми из которых являются FASL, CD40, LT α , RANKL, TRAIL и др. [Grewal 2009]. Основными продуцентами TNF α являются моноциты и макрофаги, а также Т- и В-лимфоциты, эозинофилы, фибробласты, тучные клетки [MacEwan 2002; Wajant et al. 2003].

TNF α синтезируется в виде 26 кДа трансмембранного протеина (transmembrane TNF, mTNF α), состоящего из 233 аминокислотных остатков [Kriegler et al. 1988; Luettiq 1989]. Внеклеточный домен мембраносвязанной формы TNF α разрезается специфической металлопротеазой TACE (TNF α -converting enzyme) между аланином 76 и валином 77, и образуется зрелая растворимая форма TNF α с молекулярной массой 17кДа, имеющая в своем составе 157 аминокислотных остатков [Bazzoni and Beutler 1996; Moss et al. 1997; Black et al. 1997]. Обе формы TNF α являются биологически активными.

Причем эффекты мембраносвязанной формы TNF α преимущественно опосредуются рецепторами TNF α II типа. Активной формой белка TNF α является гомотример, теряющий активность при диссоциации субъединиц на мономеры [Tang et al. 1996]. Структура зрелого 17 кДа белка TNF α имеет форму колокола и состоит из антипараллельных β -складок [Bazan 1993] (Рисунок 1). Ген TNF α (*TNF*) расположен на 6 хромосоме человека [Spies et al. 1986].



Рисунок 1 – Кристаллографическая структура гомотримера TNF α [Magis et al. 2012].

TNF α участвует в реализации многих местных и системных реакций воспаления; обуславливает пролиферацию и дифференцировку клеток [MacEwan 2002]; стимулирует фагоцитарную и цитотоксическую активность клеток [Beyaert and Fiers 1994]; регулирует процессы апоптоза и некроза клеток [Laster et al. 1988]; усиливает экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках, ангиогенез, синтез цитокинов и простагландинов [Nehlgans and Männel 2002]; увеличивает активность синтазы оксида азота (NOS); обуславливает развитие кахексии, лихорадки, гипотензии, септического шока и синтез белков острой фазы [Locksley et al. 2001; Malik

1992]. TNF α вовлечен в патогенез многих заболеваний, таких как ревматоидный артрит, болезнь Бехтерева, псориаз, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, туберкулез, рассеянный склероз, системная красная волчанка и др. [Bradley 2008].

Интерлейкин-1 (ИЛ-1, IL1) – цитокин с широким диапазоном биологических и физиологических эффектов. IL1 входит в группу провоспалительных цитокинов и играет центральную роль в остром и хроническом воспалении [Dinarello 2009; Dinarello 2010; Nambu and Nakae 2010]. Семейство лигандов IL1 включает IL1 α , IL1 β и рецепторный антагонист IL1 (IL1RA) [Dinarello 1996; Arend and Evans 2003]. Основными клетками, продуцирующими IL1 α и IL1 β , являются моноциты, макрофаги, нейтрофилы и гепатоциты [Arend et al. 2008]. IL1 α синтезируется в виде предшественника с молекулярной массой 31 кДа (pro-IL1 α). Мембраносвязанный pro-IL1 α является биологически активным, то есть способным связывать рецептор IL1 и передавать сигналы в клетку. Как IL1 α , так и IL1 β лишены сигнальных пептидов и обычного пути секреции через эндоплазматический ретикулум. Процессинг pro-IL1 α кальпаином (Ca²⁺-активируемая цистеиновая протеаза) может приводить к секреции зрелой растворимой формы IL1 α с молекулярной массой 17 кДа. Однако, большая часть pro-IL1 α так и остается на мембране клетки [Niki et al. 2004; Arend et al. 2008]. IL1 β также синтезируется как предшественник с молекулярной массой 31 кДа (pro-IL1 β), отщепляется от мембраны клетки ферментом каспазы-1 (ICE, IL1 β -converting enzyme) [Black et al. 1988]. Активация каспазы-1 регулируется белковым комплексом, известным как инфламасома [Franchi et al. 2009]. Мембраносвязанный pro-IL1 β не обладает способностью связываться с рецептором IL1, т.е. является биологически неактивным [Arend et al. 2008]. Гомология в аминокислотной последовательности IL1 α и IL1 β составляет 27%. Молекулы IL1 α и IL1 β имеют сходную пространственную структуру и представляют собой белковые глобулы, состоящие из 12 β -

складок [Priestle et al. 1989; Graves et al. 1990] (Рисунок 2). Гены $IL1\alpha$ (*IL1A*) и $IL1\beta$ (*IL1B*) находятся в составе 2 хромосомы [Webb et al. 1986; Modi et al. 1988].

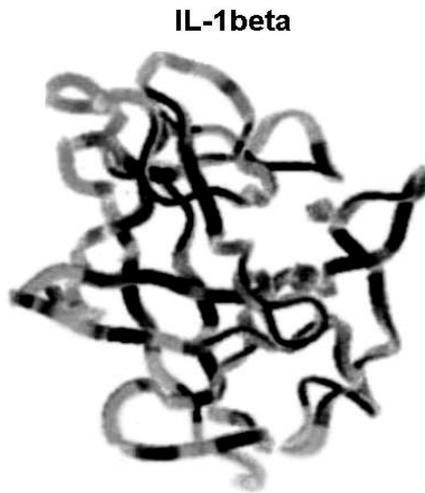


Рисунок 2 – Кристаллографическая структура $IL1\beta$ [Vigers et al. 1997].

$IL1$ индуцирует и регулирует воспалительные процессы; ко-стимулирует активацию Т-клеток [Nakae et al. 2001; Nakae et al. 2003; Dinarello 2009]; стимулирует пролиферацию и созревание В-клеток [Dinarello 2009]; индуцирует дифференцировку Т-хелперов 17 [Acosta-Rodriguez et al. 2007; Chung et al. 2009]. Медиатор $IL1$ стимулирует синтез цитокинов, простагландина E_2 ($ПГЕ_2$), белков острой фазы; индуцирует выработку циклооксигеназы-2, фосфолипазы A_2 , NOS; оказывает стимулирующий эффект на созревание остеокластов, синтез коллагеназы синовиальными клетками, синтез остеокласт-активирующего фактора и гематопоетина-1; индуцирует экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках и синтез хемокинов стромальными клетками [Dinarello 1994, Gabay et al. 2010]. Кроме того, $IL1$ участвует в формировании костной ткани, секреции инсулина, регулировании аппетита. К системным эффектам $IL1$ относят гипотензию, лихорадку, нейтрофилию и тромбоцитоз [Dinarello 2009; Gabay et al. 2010].

1.2 Рецепторы к TNF α и IL1

Ответ клеток иммунной системы на действие цитокинов возможен лишь при условии экспрессии на поверхности этих клеток соответствующих рецепторов. Для многофункциональных плейотропных цитокинов TNF α и IL1 показано существование рецепторов двух типов. Каждый из типов рецепторов может находиться как в мембраносвязанной, так и в растворимой форме (Рисунок 3).

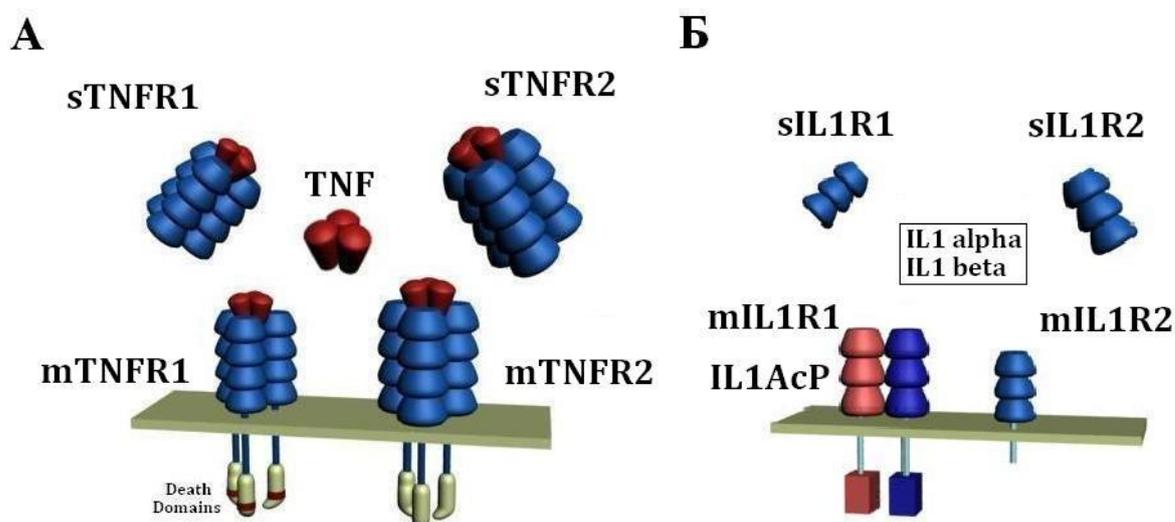


Рисунок 3 – Схематическое изображение рецепторов к TNF α и IL1 (А) Мембраносвязанные (mTNFR1 и mTNFR2) и растворимые (sTNFR1 и sTNFR2) рецепторы к TNF α (Б) Мембраносвязанные (mIL1R1 и mIL1R2) и растворимые (sIL1R1 и sIL1R2) рецепторы к IL1.

1.2.1 Мембраносвязанные рецепторы TNF α

На данный момент к надсемейству рецепторов TNF α (TNF receptor superfamily, TNFRSF) причисляют 29 молекул рецепторов. Большинство из рецепторов данного надсемейства являются трансмембранными белками I типа, имеющими внутриклеточный N-конец и внеклеточный C-конец [Wiens and Glenney 2011]. Отличительной чертой рецепторов TNFRSF является

наличие во внеклеточном участке от 1 до 6 доменов, богатых цистеином [Mallett and Barclay 1991; Locksley et al. 2001; Vodmer et al. 2002]. Рецепторы TNFRSF условно можно разделить на три группы: 1) Рецепторы «смерти», имеющие в своем внутриклеточном участке домены «смерти» (Death domains, DD); 2) Рецепторы, лишенные DD и передающие сигналы через связывание с одним из TNF receptor-associated factor (TRAF); 3) растворимые рецепторы и рецепторы-«ловушки», не обладающие способностью передавать сигналы.

Биологические эффекты TNF α реализуются через два типа мембраносвязанных рецепторов – тип I (p55 или p60, CD120a, TNFR1, TNFRSF1A, 55-60кДа) и тип II (p75 или p80, CD120b, TNFR2, TNFRSF1B, 75-80кДа) [Brockhaus et al. 1990; Wajant et al. 2003].

Мембраносвязанные рецепторы TNF α впервые были описаны Aggarwal с соавт. в 1985 году [Aggarwal et al. 1985]. В 1990 году сразу несколькими группами исследователей были клонированы кДНК двух различных рецепторов к TNF α , позднее названные как рецепторы TNF α I и II типа [Loetscher et al. 1990; Schall et al. 1990; Smith et al. 1990].

Структура мембраносвязанных рецепторов TNF α

Оба типа рецепторов TNF α являются трансмембранными гликопротеинами I типа, внеклеточные участки которых гомологичны на 28% и состоят из 4 высококонсервативных доменов, богатых цистеином [Aggarwal et al. 2001; MacEwan 2002]. Дистальные домены внеклеточных участков рецепторов TNF α I и II типа называются pre-ligand assembly domain (PLAD) и отвечают за образование рецепторных комплексов [Chan et al. 2000; Chan 2007].

Мембраносвязанный рецептор TNF α I типа состоит из 434 аминокислотных остатков: 190 аминокислотных остатков во внеклеточном участке, 23 аминокислотных остатка в трансмембранном участке и 221

аминокислотный остаток во внутриклеточном участке [Cabal-Hierro and Lazo 2012]. Мембраносвязанный рецептор TNF α II типа состоит из 439 аминокислотных остатков, из которых 235 составляют внеклеточный участок, 30 – трансмембранный и 174 – внутриклеточный участок [Aggarwal et al. 2001; Cabal-Hierro and Lazo 2012].

В отличие от гомологичных внеклеточных доменов, во внутриклеточных цитоплазматических участках рецепторов TNF α I и II типов установлено различие, предопределяющее наличие разных сигнальных путей. Рядом с С-концом внутриклеточного домена рецептора TNF α I типа имеется участок из приблизительно 80 аминокислотных остатков – домен «смерти» (DD), который вовлечен в TNF-обусловленный апоптоз [Tartaglia et al. 1993]. Рецептор TNF α II типа лишен такого домена в своей внутриклеточной части, но имеет серин-богатые участки, которые затем могут подвергаться фосфорилированию [Darnay et al. 1994].

Экспрессия рецепторов TNF α

Рецептор TNF α I типа более широко распространен и экспрессируется практически на всех типах клеток организма, тогда как рецептор TNF α II типа в основном экспрессируется на клетках иммунной системы и клетках гемопоэтического ряда, таких как макрофаги, нейтрофилы, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, тимоциты и тучные клетки [Aggarwal et al. 2001; Wajant et al. 2003; Mukai et al. 2010]. Также рецептор TNF α II типа экспрессируется на эндотелиальных клетках, кардиомиоцитах и клетках предстательной железы [Aggarwal et al. 2001].

Регуляция уровня экспрессии рецепторов TNF α может осуществляться на транскрипционном уровне [Kemper et al. 1993; Santee et al. 1996]. Уровень экспрессии белка и мРНК рецепторов TNF α I и II типов может регулироваться различными факторами, в частности, цитокинами (Таблица

1). TNF α в зависимости от типа клетки может как повышать, так и понижать уровень экспрессии рецепторов TNF α .

Таблица 1 – Влияние цитокинов на уровень экспрессии рецепторов TNF α

Цитокины	Влияние на уровень экспрессии рецепторов TNF α	Источник литературы
TNF α	Понижает/повышает уровень экспрессии TNFRs	Tsujimoto and Vilcek 1987; Winzen et al. 1992; Winzen et al. 1993; Kalthoff et al. 1993; Trefzer et al. 1993
IFN α , IFN β , IFN γ	Повышают уровень экспрессии TNFR1 и TNFR2	Aggarwal et al. 1985; Pandita et al. 1992
IL1	Понижает уровень экспрессии TNFRs	Holtmann and Wallach 1987
IL2	Повышает уровень экспрессии TNFRs	Owen-Shaub et al. 1989; Reddy et al. 2001
IL3	Повышает уровень экспрессии TNFR2	Rae and MacEwan 2004
IL4	Понижает уровень экспрессии TNFRs	Taylor 1994; Hart et al. 1996
IL10	Повышает уровень TNFRs	Hart et al. 1996; Dickensheets et al. 1997; Takasugi et al. 2006
GM-CSF	Повышает уровень экспрессии TNFR2	Rae and MacEwan 2004

Также на уровень экспрессии рецепторов TNF α могут влиять: модуляторы протеинкиназы С – форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) [Holtmann and Wallach 1987], стауроспорин [Zhang et al. 1994; Taylor 1994]; активаторы протеинкиназы А – дибутирил-цАМФ и форсколин [Patino et al. 2000]; ретиноевая кислота [Chambaut-Guerin et al. 1995]; арахидоновая кислота [Moghaddami et al. 2003]; липополисахарид (ЛПС) [Leeuwenberg et al. 1994; Wittebole et al. 2005]; глюкокортикоиды [Yan et al. 2003].

Уровень рецепторов TNF α может варьировать в зависимости от возраста [Aggarwal et al. 1999] и массы тела [Hube et al. 1999; Good et al 2006; Tzanavari et al. 2010]. Дополнительным фактором, влияющим на баланс мембраносвязанных и растворимых рецепторов TNF α , является протеолитическое расщепление рецепторов («шеддинг») с поверхности клетки. В свою очередь, «шеддинг» может индуцироваться медиаторами воспаления [Madge et al. 1999], а также монооксидом азота и пероксидом водорода, которые вовлечены в активацию металлопротеаз, ответственных за протеолитическое расщепление мембраносвязанных рецепторов TNF α [Bradley et al. 1993; Hino et al. 1999].

Аффинность связывания

TNF α обладает высокой аффинностью связывания с мембраносвязанными рецепторами к TNF α [Aggarwal et al. 2001]. В многочисленных исследованиях аффинности медиатора TNF α к мембраносвязанным рецепторам TNF α I и II типов были получены достаточно противоречивые результаты. В ряде исследований было установлено, что аффинность связывания рецепторов TNF α II типа (K_d от 70 до 200 пмоль) выше, чем у рецепторов TNF α I типа (K_d от 100 до 600 пмоль) [Tsujimoto et al. 1985; Kull et al. 1985; Schall et al. 1990; Van Ostade et al. 1993; Loetscher et al. 1993; MacEwan 2002]. Однако в исследовании Grell с соавт. [1998] было установлено, что рецептор I типа обладает большей аффинностью

к TNF α , и что при связывании медиатора с рецептором TNF α I типа образуются более устойчивые лиганд-рецепторные комплексы. Также было показано, что медиатор TNF α приблизительно в 20-30 раз быстрее диссоциирует с рецептора TNF α II типа, в сравнении с диссоциацией рецептора TNF α I типа [Grell et al. 1998].

Сигнальные пути рецепторов TNF α

По результатам кристаллографического исследования лиганд-рецепторного комплекса (TNF-TNFR) было установлено, что с одним гомотримерным лигандом TNF α связываются три рецептора [Banner et al. 1993]. Рецепторы TNF α связываются с лигандом в трех участках, расположенных в межсубъединичных областях [Banner et al. 1993].

Ранее считалось, что тримеризация мономеров рецепторов TNF α происходит в ответ на действие лиганда [Banner et al. 1993]. Но в последующих работах было установлено, что образование комплекса рецепторов из трех мономерных рецепторов TNF α может происходить независимо от присутствия лиганда, посредством pre-ligand assembly domains (PLAD) [Chan et al. 2000]. На данный момент считается, что лиганд-рецепторные комплексы, образованные доменами PLAD, обладают рядом преимуществ: высокой аффинностью связывания с медиатором TNF α ; обеспечивают быстрый ответ на стимуляцию цитокинами; предотвращают от образования смешанных рецепторных комплексов [Chan 2007]. Смешанные рецепторные комплексы, образующиеся преимущественно при лиганд-индуцированной тримеризации и состоящие из рецепторов TNF α как I, так и II типов, могут ограничивать проведение сигналов в клетку [Chan 2007]. Тем не менее, в ряде исследований было установлено, что рецепторы TNF α II типа в данных смешанных комплексах облегчают проведение проапоптотических сигналов [Heller et al. 1992; Haridas et al. 1998; Weiss et al. 1998; Declercq et al. 1998; Chan and Lenardo 2000; Chan et al. 2003]. При

связывании с гомотримером TNF α в рецепторном комплексе происходят конформационные изменения, обеспечивающие успешное проведение сигналов в клетку [Chan et al. 2001].

Сигнальные пути рецепторов TNF α I типа

Активация рецепторов TNF α I типа может осуществляться при связывании как с растворимой, так и с мембраносвязанной формой TNF α . Но преимущественно рецепторы TNF α I типа связываются с растворимой формой TNF α [Grell et al. 1995; Grell et al. 1998].

Связывание медиатора TNF α с рецепторами TNF α I типа может приводить к образованию двух различных комплексов, обуславливающих разные сигнальные пути: Комплекс I активирует провоспалительный путь и обуславливает выживаемость клетки; Комплекс II активирует проапоптотический путь и обуславливает клеточную гибель [Micheau and Tschopp 2003]. На данный момент принято считать, что баланс сигнальных путей рецепторов TNF α I типа, определяющий дальнейшую судьбу клетки, в основном регулируется NF- κ B-индуцирующими белками – cIAP1 и cIAP2 (cellular inhibitors of apoptosis proteins). Кроме того, сигнальные пути рецепторов TNF α I типа могут зависеть от «доступного» цитоплазматического пула комплексов TRAF2-cIAP [Wajant 2011].

Конформационные изменения, обусловленные взаимодействием рецепторов TNF α I типа с медиатором TNF α , приводят к отщеплению от внутриклеточных доменов рецептора ингибиторных белков silencer of death domains (SODD) [Jiang et al. 1999; Chen and Goeddel 2002]. Далее привлекаются адаптерные белки: TNFR-associated death domain (TRADD) [Hsu et al. 1995; Pobezinskaya et al. 2008] и серин/треониновая протеинкиназа receptor-interacting protein-1 (RIP-1) [Hsu et al. 1996]. TRADD и RIP-1 содержат на С-концевом участке домены «смерти», которые обладают способностью связываться с доменами «смерти» рецептора TNF α I типа

[Wajant and Scheurich 2011]. Молекулы RIP-1 и TRADD способны связываться с рецепторами TNF α I типа независимо друг от друга [Devin et al. 2000; Zheng et al. 2006]. Кроме того, данные адаптерные белки способны связываться друг с другом [O'Donnell and Ting 2011]. Далее, TRADD привлекает еще один адаптерный белок – убиквитин-лигазу класса RING – TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) [Takeuchi et al. 1996; Wajant and Scheurich 2011]. Взаимосвязь TRADD с TRAF2 является значительно более устойчивой, нежели взаимодействие напрямую рецептора с TRAF2 [Park et al. 2000].

RIP-1 привлекает MEK kinase 3 (MEKK-3, также известен как MAP3K3, mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3) и transforming growth factor-beta-activated kinase (TAK1), что впоследствии активирует комплекс ИКК (inhibitor of κ B kinase). При активации комплекса ИКК происходит фосфорилирование $I\kappa$ B α , приводящее к его убиквитинированию и деградации [DiDonato et al. 1997; Häcker and Karin 2006]. В результате этого высвобождаются субъединицы NF- κ B, которые затем транслоцируются в ядро и запускают транскрипцию генов [Kruppa et al. 1992; Li and Verma 2002].

При связывании TRAF2 с комплексом ИКК [Devin et al. 2001] привлекаются ингибиторные белки cIAP1 и cIAP2. Данные ингибиторы каспазы также обладают убиквитин-лигазной активностью и играют важную роль в деградации $I\kappa$ B [Chen 2005]. При этом также активируется NF- κ B.

При активации рецептора TNF α I типа также может привлекаться еще одна киназа MAP3K – apoptosis-signaling kinase-1 (ASK-1) [Nishitoh et al. 1998], которая будет взаимодействовать с TRAF2 и при этом активировать киназы MAP2K – MEK-4 (MAPK/ERK kinase-4) и MEK-6 (MAPK/ERK kinase-6). А MAP2K киназы в свою очередь могут задействовать c-Jun N-terminal kinases (JNK) и p38 MAPK [Ichijo et al. 1997], что в результате

приведет к активации транскрипционного фактора AP-1 (activator protein 1) [Blüml et al. 2012].

Рецепторы TNF α могут также активировать ERK (extracellular signal-regulated kinases) сигнальные пути. При этом также активируется комплекс ИКК, что приводит к высвобождению TPL2 (tumor progression locus 2) и запуску MEK-ERK пути [Belich et al. 1999; Rousseau et al. 2008].

При активации рецепторов TNF α I типа, к адаптерным белкам TRADD также могут привлекаться молекулы Fas-associated protein with death domain (FADD) [Yeh et al. 1998] и прокаспаза-8 [Varfolomeev et al. 1998] и таким образом, образовывать сигнальный комплекс II, также именуемый DISC (death induced signal complex) [Micheau and Tschopp 2003; Schneider-Brachert et al. 2004; Cabal-Hierro and Lazo 2012]. При активации NF- κ B антиапоптотические белки cFLIP (cellular FLICE-like inhibitory protein) [Irmeler et al. 1997] транслоцируются в данный комплекс и блокируют активацию каспазы-8. В случае лимитирования активации транскрипционного фактора NF- κ B, запускаются проапоптотические сигнальные пути через комплекс DISC [Wang et al. 1998; Cabal-Hierro and Lazo 2012]. Прокаспаза-8 инактивирует адаптерные белки RIP-1 и RIP-3 [Blackwell et al. 2009], что приводит к активации каспазы-8 и инициации каскада эффекторных каспаз, обуславливающих апоптотические процессы [Chen and Goeddel 2002].

Сигнальные пути рецепторов TNF α II типа

Рецепторы TNF α II типа преимущественно активируются мембраносвязанными формами TNF α [Grell et al. 1995]. Связывание медиатора TNF α с рецепторами TNF α II типа приводит к прямому взаимодействию внутриклеточных доменов рецепторов TNF α II типа с адаптерным белком TRAF2, который впоследствии привлекает молекулы TRAF1, TRAF3, cIAP1 и cIAP2 [Rothe et al. 1994; Rothe et al. 1995]. Таким образом, TRAF2 является ключевой фигурой сигнальных путей рецепторов

TNF α II типа, приводящих к транскрипционной активации генов, отвечающих за пролиферацию и выживаемость клетки [Rothe et al. 1994].

Известно, что активация транскрипционного фактора NF- κ B может происходить по каноническому (классическому) или альтернативному (не каноническому) пути [Aggarwal 2003; Hauer et al. 2005; Rickert et al. 2011]. Классический путь включает участие в фосфорилировании I κ B α субъединиц IKK β и IKK γ (NEMO, NF- κ B essential modulator) киназного комплекса IKK [Aggarwal 2003]. Альтернативный путь активации проходит без участия IKK γ , но требует наличия NF- κ B-inducing kinase (NIK) [Aggarwal 2003]. Активация альтернативного пути запускает протеолитический процессинг p100 и образование p52 гетеродимеров транскрипционного фактора NF- κ B [Rauert et al. 2010]. Таким образом, рецепторы TNF α II типа в отличие от рецепторов I типа обладают способностью запускать активацию NF- κ B как по классическому, так и по альтернативному пути [Rauert et al. 2010]. Кроме того, сигнальные пути рецепторов TNF α II типа могут быть обусловлены привлечением MAPK киназ [Zhao et al. 2007], приводящих к активации транскрипционного фактора AP-1 [Cabal-Hierro and Lazo 2012].

Функции рецепторов TNF α

Мыши, нокаутные по гену *TNFRSF1A*, имеют нарушения в образовании первичных фолликулярных В-клеток, сети фолликулярных дендритных клеток и зародышевых центров во всех вторичных лимфоидных органах [Le Hir et al. 1996; Pasparakis et al. 1997; Pasparakis et al. 2000]. Данные дефекты не обнаружены у мышей, нокаутных по гену *TNFRSF1B*, что позволяет говорить о том, что рецепторы TNF α I типа являются главными рецепторами, обуславливающими биологические эффекты TNF α при развитии лимфоидных органов [Matsumoto et al. 1997].

Рецепторы TNF α играют защитную роль в борьбе против различных возбудителей инфекционных заболеваний. Рецепторы TNF α I типа участвуют

в образовании гранул, состоящих из дифференцированных макрофагов. Данные гранулы инкапсулируют внутриклеточные патогены, такие как *Mycobacteria*, и тем самым предотвращают его дальнейшее распространение [Flynn et al. 1995; Jacobs et al. 2000]. Также рецепторы TNF α I типа обуславливают защитные реакции при инфекциях, вызываемых вирусами, *Lysteria*, *Corynebacterium parvum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* и *Staphylococcus aureus* [Schlüter and Deckert 2000; Endres et al. 1997; Peschon et al. 1998;]. Роль рецепторов TNF α I типа также была показана при заболеваниях, вызываемых внутриклеточным протозойным паразитом *Leishmania major* [Nashleanas et al. 1998]. В исследовании на мышинной модели полимикробного сепсиса было установлено, что делеция гена *TNFRSF1A* приводила к ослаблению заболевания, а делеция гена *TNFRSF1B* вызывала усиление симптомов заболевания, и снижение выживаемости [Ebach et al. 2005].

Считается, что большинство биологических эффектов TNF α опосредуется через рецепторы TNF α I типа [MacKay et al. 1994]. Рецепторы TNF α I типа участвуют в индукции и развитии множества различных иммунных патологий [Peschon et al. 1998; Kollias et al. 1999; Akassoglou et al. 2003]. Мутация гена рецептора TNF α I типа вызывает развитие периодического синдрома, ассоциированного с рецептором фактора некроза опухоли (TNF receptor associated periodic syndrome, TRAPS) [MacDermott et al. 1999]. Мыши, дефицитные по гену *TNFRSF1A* были менее чувствительны к развитию коллаген-индуцирующего артрита [Toda et al. 2001]. Рецепторы TNF α I типа участвуют в развитии деструкции костных структур посредством повышения образования остеокластов [Zhang et al. 2001]. В исследовании Люо с соавт. [2006] была установлена важная роль рецепторов TNF α I типа в процессах ангиогенеза.

Рецепторы TNF α II типа вовлечены в различные аутоиммунные заболевания, при которых либо обуславливают их развитие, либо выполняют

защитную роль [Fontaine et al. 2002; Marchetti et al. 2004; Rodriguez et al. 2009]. Рецепторы TNF α II типа участвуют в патогенезе таких заболеваний как ревматоидный артрит [Dieude et al. 2002], болезнь Крона [Holtmann et al. 2002], системная красная волчанка [Komata et al. 1999], неспецифический язвенный колит [Pierik et al. 2004], склеродермия [Ischikawa et al. 2002]. Также рецепторы TNF α II типа обладают кардиопротективным действием [Monden et al. 2007] и обуславливают развитие нейроваскулярных повреждений в экспериментальной модели малярии [Stoelcker et al. 2002]. У мышей, дефицитных по гену *TNFRSF1A*, было установлено ухудшение развития артрита [Kontoyannis et al. 1999] и экспериментального аутоиммунного энцефалита [Suvannavejh et al. 2000]. Рецепторы TNF α II типа играют важную роль в ангиогенезе [Goto et al. 2006], регуляции различных молекул адгезии (ICAM-1, Selectin-E), миграции интестинальных эпителиальных клеток и клеток Лангерганса [Takayama et al. 1999; Corredor et al. 2003]. Кроме того, показано участие данных рецепторов в пролиферации миофибробластов [Theiss et al. 2005] и антиген-индуцированной дифференцировке Т-клеток [Kim and Teh 2001]. Так, трансгенные мыши, дефицитные по гену *TNFRSF1B*, вырабатывали пониженный антиген-специфичный CD8⁺ Т-клеточный ответ на действие бактерии *Listeria monocytogenes* [Kim et al. 2006]. Известно, что Т-регуляторные клетки преимущественно экспрессируют рецепторы TNF α II типа [Chen and Oppenheim 2010]. На данный момент, имеются достаточно противоречивые сведения по роли рецепторов TNF α II типа в биологии Т-регуляторных клеток. Так, в работе Van Mierlo с соавт. [2008] было установлено, что *in vitro* Т-регуляторные клетки от мышей, дефицитных по гену *TNFRSF1B*, функционируют нормально. Однако в исследовании Housley с соавт. [2011] было показано, что *in vivo* TNFR2-дефицитные Т-регуляторные клетки обладают пониженной резистентностью в модели экспериментального колита. Кроме того, вследствие особенностей кинетики связывания

медиатора TNF α с рецептором TNF α II типа [Grell et al. 1998; Krippner-Heidenreich et al. 2002], одной из функций мембраносвязанных рецепторов TNF α II типа является локальное повышение числа молекул TNF α на поверхности клетки и дальнейшая передача рецептору TNF α I типа [Tartaglia et al. 1993].

Известно, что рецепторы TNF α II типа в определенных клетках и определенных состояниях могут обуславливать клеточную гибель [Debuydt et al. 2004; Viragyn et al. 2008]. Фосфорилирование серин-богатых внутриклеточных участков рецепторов TNF α II типа может приводить к деградации основного адаптерного белка TRAF2 [Rodriguez et al. 2011; Cabal-Hierro and Lazo 2012]. Снижение числа TRAF2 может приводить к подавлению антиапоптотических сигнальных путей и, тем самым увеличивать цитотоксичность рецепторов TNF α I типа [Weiss et al. 1997; Fotin-Mleczek et al. 2002; Rodriguez et al. 2011].

1.2.2 Растворимые рецепторы TNF α

Для иммунорегуляторного медиатора TNF α показано также существование двух растворимых форм рецепторов TNF α I и II типа (sTNFR1 и sTNFR2) [Engelmann et al. 1990; Lantz et al. 1990]. Растворимые рецепторы TNF α представляют собой внеклеточные домены мембраносвязанных рецепторов [Nophar et al. 1990]. Растворимые рецепторы могут связываться как с растворимой, так и с мембраносвязанной формой TNF α [Watts et al. 1999].

Растворимые рецепторы TNF α образуются в основном протеолитическим отщеплением от мембраносвязанных форм рецепторов TNF α [Nophar et al. 1990; Aderka et al. 1992]. Растворимые рецепторы TNF α II типа также могут образовываться путем альтернативного сплайсинга [Lainez et al. 2003; Fernandez-Real et al. 2006]. Образование растворимых рецепторов путем протеолитического отщепления может индуцироваться TNF α [Lantz et

al. 1990], IL6 [Tilg et al. 1994], IL1 β [Bargetzi et al. 1993], IL2 [Miles et al. 1992], TGF β , IFN β , IFN γ [Aderka et al. 1993], ретиноидами [Totpal et al. 1995] и форболовыми эфирами [Aggarwal and Natarajan, 1996].

Растворимые рецепторы TNF α находят в малых концентрациях в крови, моче и спинномозговой жидкости здоровых индивидов. Уровень растворимых рецепторов TNF α I и II типа в сыворотке крови здоровых индивидов составляет $0,7 \pm 0,2$ и $2,2 \pm 0,4$ нг/мл, соответственно [Aderka et al. 1992]. При сепсисе, воспалительных заболеваниях, аутоиммунных заболеваниях уровень растворимых рецепторов TNF α II типа возрастает в десятки раз. В исследовании Lainez с соавт. [2003] было показано, что уровень DS-TNFR2 (differential spliced isoform of TNFR2) в сыворотке крови здоровых индивидов составляет всего 1/5 от общего числа растворимых рецепторов TNF α II типа.

Основной функцией растворимых рецепторов TNF α является ингибирование биологических эффектов TNF α путем препятствования связыванию медиатора с мембраносвязанными рецепторами. Они являются «буфером» для TNF α , ингибируют его эффекты при высоких концентрациях и, таким образом, обеспечивают воздействие на клетки низких контролируемых уровней цитокина [Aderka 1996]. Кроме того, растворимые рецепторы могут выступать в роли переносчиков TNF α , а также образовывать своеобразный пул связанных рецепторов, из которого потом будет медленно высвобождаться TNF α [Aderka 1996]. Растворимые рецепторы стабилизируют биоактивность TNF α путем удлинения времени персистирования в системном кровотоке [Aderka 1996]. Они увеличивает период полувыведения TNF α в сыворотке до 6 часов [Mohler et al. 1993; Aderka et al. 1994] и повышают уровень биодоступного TNF α [Mohler et al. 1993].

1.2.3 Мембраносвязанные рецепторы IL1

Семейство лигандов IL1 состоит по меньшей мере из 11 молекул, и включает в себя IL1 α , IL1 β , рецепторный антагонист IL1 (IL1RA), IL18 и IL33 [O'Neill 2008; Dinarello 2009; Nambu and Nakae 2010]. IL1RA блокирует связывание IL1 α , IL1 β с рецепторами, и таким образом, функционирует как специфический ингибитор IL1 [Arend et al. 1998].

Надсемейство TIR (Toll/IL1 receptors) включает в себя молекулы рецепторов, имеющих в своем внутриклеточном участке домены TIR. В свою очередь, рецепторы надсемейства TIR можно условно поделить на две группы: 1) Рецепторы, имеющие во внеклеточном участке иммуноглобулин-подобные домены (IL1R1, IL1RAcP, IL18R α , SIGIRR и др.) [Mithcam et al. 1996]; 2) Рецепторы, имеющие участки с лейцин-богатыми повторами (TLR1, TLR2 и др.) [Medzhitov et al. 1997]. Хотя рецепторы IL1 II типа не имеют в своем составе домены TIR, их все же причисляют к данному семейству в виду высокой гомологичности рецептору IL1 I типа [Boraschi and Tagliabue 2006].

Также классически выделяют семейство IL1/IL1R, состоящее из трех лигандов, двух агонистов (IL1 α , IL1 β), одного антагониста (IL1RA) и двух рецепторов (IL1R1 и IL1R2). Кроме того, некоторые исследователи выделяют отдельное семейство рецепторов IL1, включающее в себя 10 трансмембранных гликопротеинов [Nambu and Nakae 2010].

Мембраносвязанные рецепторы IL1 I типа впервые были клонированы Sims с соавт. [1988] в 1988 году. Клонирование рецепторов IL1 II типа впервые было проведено в 1991 году [McMahan et al. 1991].

Структура рецепторов IL1

Рецепторы IL1 I типа представляют собой гликопротеины с молекулярной массой 80 кДа, состоят из 576 аминокислотных остатков,

имеют три иммуноглобулин-подобных домена во внеклеточном сегменте, трансмембранный и цитоплазматический домены (213 аминокислот) [Sims et al. 1988; Dinarello 2001].

Рецепторы IL1 II типа являются трансмембранными гликопротеинами с молекулярной массой 60 кДа, состоят из 398 аминокислотных остатков, также имеют по три иммуноглобулин-подобных домена в своей внеклеточной части, трансмембранный домен и короткий цитоплазматический домен (29 аминокислот) [Dinarello 2001].

Хотя мембраносвязанные рецепторы IL1 I и II типа характеризуются высокой гомологичностью по своим внеклеточным доменам, внутриклеточные домены рецепторов имеют значительное различие. Рецепторы IL1 II типа имеют очень короткие цитоплазматические участки, не содержащие домены TIR, что в свою очередь, предопределяет неспособность к инициации сигнальных путей [Sims et al. 1994; Boraschi and Tagliabue 2006].

Экспрессия рецепторов IL1

Мембраносвязанные рецепторы IL1 I типа экспрессируются преимущественно на эндотелиальных клетках, гладкомышечных клетках, эпителиальных клетках, гепатоцитах, фибробластах, кератиноцитах, эпидермальных дендритных клетках и Т-лимфоцитах [Dower et al. 1985; Dinarello et al. 2001]. Мембраносвязанные рецепторы IL1 II типа экспрессируются в основном на моноцитах, нейтрофилах и В-лимфоцитах [Matshushima et al. 1986; Mantovani et al. 2001].

Регуляция уровня экспрессии рецепторов IL1 может осуществляться на транскрипционном уровне. Также на уровень экспрессии рецепторов IL1 могут влиять: форболовые эфиры, ПГЕ₂, дексаметазон [Re et al. 1994], эпидермальный фактор роста, IL1 β , IFN γ , IL2, IL4, IL13, TNF α [Koch et al.

1992; Colotta et al. 1994; Dickensheets and Donnelly 1997; Orlando et al. 1997; Bellehumeur et al. 2009], TGF β , ЛПС и др. [Saccani et al. 1998; Dinarello 2009].

Аффинность связывания

Из трёх лигандов ИЛ1 (ИЛ1 α , ИЛ1 β , ИЛ1РА), наибольшей степенью аффинности к мембраносвязанным рецепторам ИЛ1 I типа обладает антагонист рецептора ИЛ1. ИЛ1 β обладает наименьшей аффинностью к мембраносвязанной форме рецептора ИЛ1 I типа.

Мембраносвязанные рецепторы ИЛ1 II типа, наоборот, характеризуются наибольшей степенью аффинности к ИЛ1 β и наименьшей к рецепторному антагонисту [Dinarello 2001].

Сигнальные пути рецепторов ИЛ1

По результатам кристаллографического исследования лиганд-рецепторного комплекса (ИЛ1-ИЛ1R1) было установлено, что два N-терминальных иммуноглобулин-подобных домена внеклеточного участка рецептора ИЛ1 I типа соединены устойчивой дисульфидной связью. Рецепторы ИЛ1 связываются с лигандом в двух участках, расположенных в межсубъединичной бороздке дистальных доменов и боковой поверхности проксимального домена [Vigers et al. 1997]. Один рецептор ИЛ1 связывает одну молекулу лиганда ИЛ1.

При связывании лиганда с рецептором ИЛ1 I типа в первом внеклеточном домене рецептора происходят конформационные изменения, привлекающие ИЛ1РАсР (ИЛ1 receptor accessory protein) [Casadio et al. 2001]. ИЛ1РАсР – вторая рецепторная субъединица, необходимая для передачи сигналов через рецепторы ИЛ1 I типа [Greenfeder et al. 1995; Korherr et al. 1997; Cullinan et al. 1998]. ИЛ1РАсР является трансмембранным белком с молекулярной массой 60 кДа и состоит из 570 аминокислотных остатков. Хотя ИЛ1РАсР структурно гомологичен рецептору ИЛ1 I типа, он не обладает

способностью связывать лиганды IL1. Однако IL1RAcP, связавшись с комплексом IL1/IL1R1, формирует высокоаффинный гетеротримерный комплекс. Привлечение IL1RAcP возможно лишь при связывании рецепторов IL1 с лигандами IL1 α и IL1 β . Рецепторный антагонист IL1 не обладает способностью связываться с IL1RAcP [Greenfeder et al. 1995].

Гетеротримерный комплекс (IL1/IL1R1/IL1AcP) посредством высококонсервативных цитозольных участков, именуемых TIR (Toll-IL1R1-like) домены [Radons et al 2003], привлекает внутриклеточные адаптерные белки MyD88 (Myeloid differentiation factor 88), IRAK-4 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 4) [Brikos et al. 2007], IRAK-1 и TRAF-6 [Cao et al. 1996; Cao et al. 1996; Kawagoe et al. 2008]. Фосфорилирование IRAK приводит к образованию комплекса, отщепляющегося от рецептора IL1 и связывающегося с мембраносвязанными transforming growth factor- β activated kinase (TAK)-1-transforming growth factor- β activated protein kinase 1 binding protein (TAB)1-TAB2 [Jiang et al. 2002]. Что в свою очередь приводит к активации IKK [Zandi et al. 1997], фосфорилированию и деградации I κ B белков, и последующей активации NF- κ B. Связывание молекулы TAK-1 также может приводить к активации сигнальных путей, таких как p38 MAPK (mitogen-associated protein kinase), JNK и ERK1/2 [Ninomiya-Tsuji et al. 1999; Arend et al. 2008].

Функции рецепторов IL1

IL1 является мощным провоспалительным цитокином. Как было отмечено выше, его эффекты обусловлены мембраносвязанными рецепторами IL1 I типа в комплексе с IL1RAcP. Хотя оба этих протеина высокоомологичны, но только рецептор IL1 I типа способен связывать лиганд IL1, IL1RAcP не обладает такой способностью и выступает лишь как вторая цепь рецепторного комплекса, необходимая для передачи сигналов [Cullinan et al. 1998] (Рисунок 4).

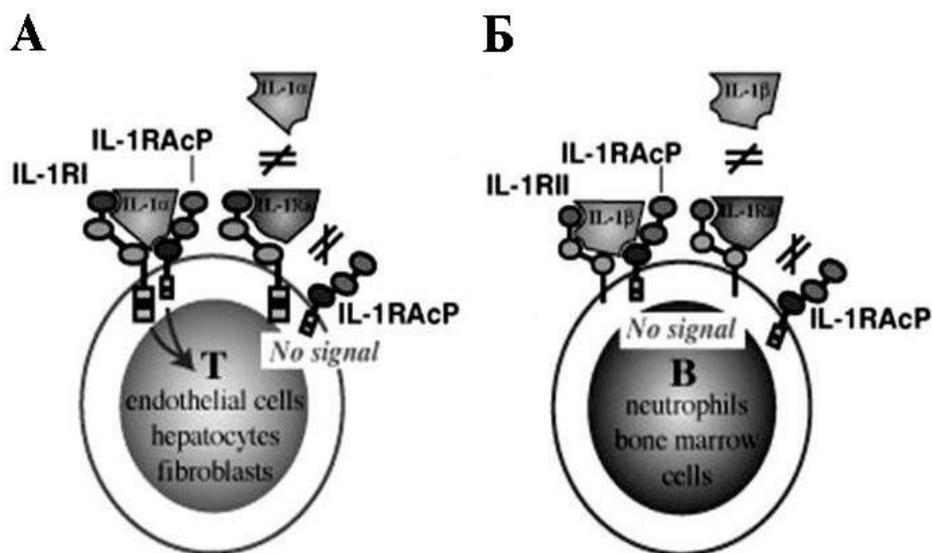


Рисунок 4 – Мембраносвязанные рецепторы IL1 (А) Связывание рецептора IL1 I типа с IL1 α (Б) Связывание рецептора IL1 II типа с IL1 β . При связывании рецепторов IL1 I и II типов с IL1RA, IL1RAcP не привлекается [Bendtzen et al. 2002].

У мышей, нокаутных по гену *IL1R1*, отмечается снижение интенсивности реакции воспалительного ответа и торможение реакций гиперчувствительности замедленного типа [Dinarello 2009]. Продукция IL17 требует обязательного наличия рецепторов IL1 I типа на Т-клетках [Sutton et al. 2006]. Мыши, дефицитные по гену *IL1R1*, более чувствительны к инфекции *Listeria monocytogenes* [Dinarello 2009].

Рецептор IL1 II типа предотвращает связывание IL1 с сигнальными рецепторами IL1 I типа [Colotta et al. 1993; Colotta et al. 1994; Neumann et al. 2000]. Ингибирующий эффект рецептора IL1 II типа также связан с его способностью привлекать IL1RAcP, необходимый для передачи сигналов рецепторам IL1 I типа [Lang et al. 1998; Malinowsky et al. 1998] (Рис. 4). Данный механизм ингибирования эффектов IL1 получил название «ко-рецепторная конкуренция» [Lang et al. 1998]. При этом подавление эффектов IL1 будет обладать большим потенциалом, ввиду того, что ингибирование

путем связывания рецептора-«ловушки» IL1R2 с IL1, может быть легко преодолено увеличением концентрации лиганда. Изменение уровня экспрессии рецепторов IL1RAcP протекает значительно сложнее [Boraschi and Tagliabue 2006]. Таким образом, баланс IL1R2 и IL1RAcP может предопределять функциональный ответ клетки на медиатор IL1. В исследованиях Bossu с соавт. [1995] и Re с соавт. [1996] было установлено, что повышенная экспрессия рецепторов IL1 II типа на клетках может приводить к отсутствию ответа клетки на IL1.

1.2.4 Растворимые рецепторы IL1

Для многофункционального медиатора IL1 показано также существование двух растворимых форм рецепторов IL1 I и II типа (sIL1R1 и sIL1R2). Растворимые рецепторы IL1 представляют собой внеклеточные домены мембраносвязанных рецепторов IL1 [Dower et al. 1989; Symons et al. 1991; Arend et al. 1994]. Они образуются протеолитическим отщеплением специфическими металлопротеазами [Orlando et al. 1997; Cui et al. 2003]. sIL1R2 также могут образовываться путем альтернативного сплайсинга [Liu et al. 1996].

Основной функцией растворимых рецепторов IL1 является ингибирование биологических эффектов IL1 путем конкуренции с мембраносвязанными рецепторами IL1 I типа за связывание с лигандом [Symons et al. 1995; Arend et al. 2008]. Кроме того, растворимые рецепторы IL1 I типа могут функционировать как «буферы» для лигандов IL1 [Dinarello 1994]. В исследовании Netea с соавт. [1999], проведенном на мышах, было показано, что при внутривенном введении sIL1R1 увеличивается концентрация IL1 α , но не IL1 β и TNF α .

Растворимые формы рецепторов IL1 I и II типа находят в незначительных концентрациях в крови и моче здоровых индивидов. Уровень растворимых рецепторов IL1 I и II типа увеличивается в сыворотке

крови, моче и синовиальной жидкости при тяжелых воспалительных заболеваниях, сепсисе [Giri et al. 1994], менингококковой инфекции [van Deuren et al. 1997], обострении ревматоидного артрита [Arend et al. 1994], волосатоклеточном лейкозе и др. [Dinarello 2001]. Концентрация растворимых рецепторов IL1 I типа обычно приблизительно в 10 раз ниже концентрации рецепторов IL1 II типа [Okamoto et al. 2009].

Растворимые рецепторы IL1 I типа обладают высокой степенью аффинности к IL1RA, и, следовательно, предпочтительно связываются с данным лигандом. Аффинность связывания с растворимым рецептором IL1 I типа различна для каждой из трех молекул IL1: IL1RA > IL1 α > IL1 β [Dinarello 2001]. Аффинность связывания IL1 с растворимым рецептором IL1 I типа ниже, чем с мембраносвязанным IL1 I типа [Jacques et al. 2006]. Клиническая значимость растворимых рецепторов IL1 I типа до сих пор остается не выясненной.

Растворимый рецептор IL1 II типа идеально подходит для применения в клинической практике, вследствие того, что обладает высокой аффинностью к IL1 β и низкой к IL1RA. При воздействии ЛПС происходит увеличение данных типов рецепторов IL1. Связывание IL1 β с растворимым рецептором IL1 II типа является почти необратимым процессом [Jacques et al. 2006].

Также существуют растворимые формы IL1RAcP, образуемые путем альтернативного сплайсинга [Greenfeder et al. 1995]. Они также могут действовать как негативные регуляторы медиатора IL1, путем формирования неактивного комплекса с функциональными мембраносвязанными рецепторами IL1 I типа [Jensen et al. 2000].

Основную роль в развитии воспалительного процесса играют провоспалительные цитокины, в частности TNF α и IL1. Проявление биологических эффектов TNF α и IL1 зависит от уровня экспрессии рецепторов на клетках. Известно, что различия в уровне экспрессии могут

быть обусловлены полиморфизмом генов. Аллельный полиморфизм генов рецепторов TNF α и IL1 может приводить как к повышению, так и к понижению уровня продукции белка [Силков с соавт. 2012].

1.3 Аллельный полиморфизм генов рецепторов цитокинов

Впечатляющие успехи современной генетики связаны с изучением мультифакториальных заболеваний. Решающее значение в этом имели исследования природы и фенотипических проявлений генетического полиморфизма – индивидуальных особенностей структуры генома.

Аллельный (генетический полиморфизм) – изменения генома, встречающиеся в популяции, по крайней мере, в двух вариантах (аллелях) с частотой не менее 1%. Генетический полиморфизм может быть качественным, когда происходят замены нуклеотидов, либо количественным, когда в ДНК варьирует число нуклеотидных повторов различной протяженности.

Наиболее частым типом генетического полиморфизма являются однонуклеотидные замены (SNP, single nucleotide polymorphism) [Brookes 1999; Fareed and Afzal 2013]. Такие замены весьма многочисленны и встречаются через каждые 250-400 п.о. Их общее число в геноме оценивается в 10-13 миллионов [Баранов 2009].

На сегодняшний день хорошо известно, что полиморфизм характерен практически для всех генов человека. Более того, установлено, что он имеет выраженную этническую и популяционную специфику. Эта особенность позволяет широко использовать полиморфные генные маркеры в этнических и популяционных исследованиях [Лимборская с соавт. 2002].

Существует множество баз данных, содержащих описание и результаты исследований единичных нуклеотидных полиморфизмов. Наиболее емкими из них являются базы данных SNPedia и NCBI (National Center for Biotechnology Information) dbSNP (database SNP) [Johnson 2009].

Полиморфные варианты могут располагаться как в экзонах, так и в интронах, а также в промоторных участках генов. Замены единичных нуклеотидов, приводящие к изменению аминокислоты, называются

несинонимическими. Следствием таких генетических полиморфизмов является появление белков (ферментов) с разной функциональной активностью. Синонимические полиморфизмы по большей части расположены в промоторных областях, интронах и не влияют на аминокислотную последовательность транслируемого белка. Однако замены нуклеотидов в промоторных областях генов могут оказывать существенное влияние на экспрессионную активность генов и уровень продукции белка (стабильность мРНК, скорость транскрипции, изменение структуры сайтов связывания факторов транскрипции).

Полиморфные варианты генов цитокинов и их рецепторов, индуцирующие высокие или низкие уровни синтеза белка, называются функциональными. Так, например, носители аллелей А и Т в функциональных полиморфных вариантах гена *TNF* -863 С/А и -857 С/Т, соответственно, характеризовались повышенным уровнем продукции медиатора $TNF\alpha$ [Hohjoh and Tokunaga 2001]. Носители аллеля А в точке *TNF* -308 G/A обладали повышенной транскрипционной активностью гена *TNF* [Wilson et al. 1997]. А индивиды с генотипом АА в точке *TNF* -238 G/A, наоборот, имели пониженный уровень продукции медиатора [Reich et al. 2002].

В многочисленных исследованиях были установлены взаимосвязи определенных аллельных вариантов генов цитокинов и их рецепторов с развитием и течением заболеваний [Хрипко с соавт. 2006]. Результаты исследований ассоциации полиморфизмов генов цитокинов и их рецепторов с различными заболеваниями отражены в базах данных [Bidwell et al. 1999; Naukim et al. 2002; Hollegaard and Bidwell 2006]. Было установлено, что аллель А полиморфизма промоторной области гена *TNF* -308 G/A ассоциирован с системной красной волчанкой [Werth et al. 2000], шизофренией [Boin et al. 2001], целиакией [de la Concha et al. 2000], септическим шоком [Waterer et al. 2001] и другими заболеваниями. Также

была установлена ассоциация гаплотипа точек SNP -1031С, -863А, -857С гена *TNF* с болезнью Крона [Kawasaki et al. 2000]. Наличие генотипа АА в точке *TNF* -238 G/A являлось протективным фактором при раковых заболеваниях [Jang et al. 2001]. Повышенный риск развития рака желудка был обнаружен у носителей аллеля Т в точке *IL1B* -511 С/Т [Machado et al. 2001]. Также было выявлено, что носительство аллеля Т являлось предрасполагающим фактором развития осложнений менингококковой инфекции [Read et al. 2001].

Таким образом, с помощью исследований генетического полиморфизма можно выявить индивидуальные различия в работе иммунной системы. Исследования роли SNP в патогенезе заболеваний позволяет прогнозировать риск возникновения, тяжесть и исход заболевания.

1.3.1 Полиморфизм генов рецепторов $TNF\alpha$

Ген *TNFRSF1A* расположен на 13 участке короткого плеча 12 хромосомы (12p13) и состоит из 10 экзонов [Baker et al. 1991; Fuchs et al. 1992]. Ген *TNFRSF1B* располагается на 36 участке короткого плеча 1 хромосомы (1p36) и имеет длину приблизительно 43 тыс. п.о. Ген *TNFRSF1B* состоит из 10 экзонов (от 34 п.о. до 2,5 тыс. п.о.) и 9 интронов (от 343 п.о. до 19 тыс. п.о.) [Baker et al. 1991; Beltinger et al. 1996].

Промоторная область гена *TNFRSF1A* имеет множество участков инициации транскрипции, характеризуется высоким содержанием GC-мотивов и отсутствием ТАТА и СААТ последовательностей [Kemper and Wallach 1993]. Промотор гена *TNFRSF1B* также имеет высокое число GC-мотивов, содержит кЕ2-мотивы и несколько ТАТА последовательностей [Santee and Owen-Schaub 1996]. Промоторный участок гена рецептора $TNF\alpha$ II типа также характеризуется наличием сAMP-responsive element, а также консенсусных последовательностей для различных факторов транскрипции, таких как T cell factor-1, Ikaros, AP-1, СК-2, Interleukin-6 receptor E (IL6RE),

ISRE, IRF-1, GAS, NF- κ B и Sp1 [Santee and Owen-Schaub 1996]. В исследовании Kuhnert с соавт. [1994] было показано, что участок (1827 п.о.) на 3'-конце первого интрона гена *TNFRSF1B* также обладает промоторной активностью. Сайты протеолитического отщепления внеклеточных доменов и образования растворимых форм рецепторов sTNFR1 и sTNFR2 расположены в шести экзонах генов *TNFRSF1A* и *TNFRSF1B* [Beltinger et al. 1996].

В промоторной области генов надсемейства TNFR располагается большое число полиморфных вариантов, которые могут оказывать влияние на уровень экспрессии [Kim et al. 2005]. Наличие того или иного аллельного варианта гена *TNFRSF1A* и *TNFRSF1B* ассоциируется с увеличением частоты различных патологических процессов. Так, например, носительство генотипа TT в полиморфном варианте промотора гена *TNFRSF1A* -609 G/T повышало риск развития системной красной волчанки [Miyagawa et al. 2008] и гепатоцеллюлярной карциномы [Kim et al. 2008]. В исследовании Park с соавт. [2013] была установлена ассоциация сразу трех полиморфных вариантов гена *TNFRSF1A* (rs767455, rs4149577 и rs1800693) с риском развития оптиконевромиелита (болезнь Девика). В работе Gregory с соавт. [2012] была показана вовлеченность полиморфного варианта rs1800693 в эффективность проводимой анти-ФНО терапии у больных рассеянным склерозом. В работе Lu с соавт. [2007] было установлено, что аллель G в точке *TNFRSF1A* A/G +36 ассоциирован с резистентностью к палиндромному ревматизму. Также была установлена ассоциация данного аллеля с болезнью Крона и неспецифическим язвенным колитом [Lappalainen et al. 2008].

В исследовании, проведенном Miyagawa с соавт. [2008] было показано, что частоты аллелей в однонуклеотидном полиморфизме гена *TNFRSF1A* -1207 G/C статистически значимо различаются между контрольной группой и группой больных системной красной волчанкой. В работе Steenholdt с соавт. [2012], было установлено, что индивиды, гомозиготные по аллелю A в SNP -

1709 A/T гена *TNFRSF1B* характеризуются повышенным риском развития осложнений при инъекции инфликсимабом (ремикейд). В исследовании Matsukura с соавт. [2008] было показано, что при болезни Крона минорный аллель в SNP *TNFRSF1A* A/G +36 предрасполагает к неэффективной терапии инфликсимабом. Минорный аллель SNP *TNFRSF1B* M196R был ассоциирован с ревматоидным артритом [Barton et al. 2001] и низким уровнем растворимых рецепторов TNF α II типа [Stark et al. 2003], также у больных ревматоидным артритом статистически значимо реже встречалась комбинация генотипов *TNFRSF1A* -609 GT + *TNFRSF1B* -3609 CC [Шкаруба с соавт. 2012].

1.3.2 Полиморфизм генов рецепторов IL1

Гены *IL1R1* (75 тыс. п.о.) и *IL1R2* (38 тыс. п.о.) расположены на 12-13 участке длинного плеча 2 хромосомы (2q12-13). Ген *IL1R1* состоит из 12 экзонов, ген *IL1R2* из 9 экзонов [Sims et al. 1995]. Гены рецепторов IL1 I и II типа характеризуются наличием сразу нескольких промоторных участков [Sims et al. 1995; Ye et al. 1996; Dale and Nicklin 1999]. Промоторные участки гена рецептора IL1 I типа лишены TATA и CAAT-мотивов. Данные промоторы (обозначенные как экзон 1A, 1B, 1C) образуют транскрипты с разными 5'-нетранслируемыми участками [Ye et al. 1993; Ye et al. 1996] и содержат сайты связывания PEA3, Sp1, AP-1, ATF, CREB, E2A, GR и NF κ B [Sims et al. 1995]. Промоторные участки гена рецептора IL1 II типа (экзон 1A и 1B) содержат последовательности для связывания с факторами транскрипции AP2, E2A, GR, NF κ B и PEA3 [Sims et al. 1995].

За последнее десятилетие было проведено большое количество исследований по изучению связи полиморфных вариантов генов рецепторов IL1 I и II типов с возможностью развития различных заболеваний. Nakki с соавт. [2010] установили, что SNP промотора гена *IL1R1* -1100 A/G ассоциирован со степенью тяжести течения остеоартрита. Ассоциация SNP -

12075 С/Т гена *IL1R1* была обнаружена с сахарным диабетом [Bergholdt et al. 1995; Metcalfe et al. 1996], прогрессией синдрома приобретенного иммунодефицита [Do et al. 2006] и бронхиальной астмой [Mahdavian et al. 2009]. Ассоциация аллельного варианта гена *IL1R2* G/T rs2310173 была установлена с болезнью Бехтерева [Reveille et al. 2010]. Аллель С полиморфизма промотора гена *IL1R1* -1028 А/С являлся фактором риска развития папиллярной карциномы щитовидной железы [Park et al. 2012]. В исследовании Hartland с соавт. [2004] было установлено, что носительство генотипа АА в точке *IL1R1* HinfI1622 А/Г повышает риск развития инфекции *Helicobacter pylori*.

Таким образом, многофункциональные плейотропные цитокины TNF α и IL1 являются медиаторами с широким диапазоном биологических и физиологических эффектов, и играют важную роль в процессах воспаления и формирования защитных реакций организма. Функциональный ответ клеток на действие данных медиаторов возможен лишь при условии экспрессии специфичных мембраносвязанных рецепторов. Также биологические эффекты медиаторов могут зависеть от уровня продукции растворимых форм рецепторов.

Уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1 может характеризоваться индивидуальной вариабельностью, обусловленной генетическим полиморфизмом. В последнее время все большее внимание уделяется полиморфизму генов человека. Наиболее активно изучаются полиморфизмы генов цитокинов и их связь с различными патологическими состояниями. Меньшее внимание уделяется полиморфизму генов рецепторов цитокинов, который до сих пор остается недостаточно изученным.

Генетический полиморфизм, обусловленный единичными нуклеотидными заменами в промоторной части генов рецепторов цитокинов TNF α и IL1, может определять уровень и характер продукции соответствующих белков. Ввиду выраженных провоспалительных эффектов

данных цитокинов, полиморфизм генов рецепторов может определять различный характер протекания воспалительного ответа и специфических иммунологических реакций. Полиморфные варианты -609 G/T, -1207 G/C, -1709 A/T, -3609 C/T генов *TNFRSF1A* и *TNFRSF1B*, а также -1100 A/G, -12075 C/T, -1780 C/T, +6974 G/T генов *IL1R1* и *IL1R2* расположены в промоторных участках, и, следовательно, могут влиять на уровень экспрессии. В настоящее время неизвестно, как уровень экспрессии мембраносвязанных и растворимых форм рецепторов TNF α и IL1 меняется в зависимости от аллельного полиморфизма этих генов и, таким образом, изучение влияния полиморфизма генов данных рецепторов приобретает особую актуальность.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования являлись: 1) Мононуклеарные клетки периферической крови условно здоровых индивидов; 2) Сыворотка периферической крови условно здоровых индивидов; 3) Геномная ДНК лейкоцитов периферической крови условно здоровых индивидов. Образцы цельной крови были получены в пункте заготовки крови №1 ГБУЗ НСО «Новосибирский центр крови». Выборка сформирована из числа жителей г. Новосибирска (Юго-Западная Сибирь, Россия) в возрасте от 19 до 55 лет (n=150, 83 мужчины, 67 женщин; средний возраст: 34 ± 1 года).

2.2 Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови человека

Забор периферической крови (9 мл.) проводился в вакуумную пробирку VACUETTE, содержащую в качестве антикоагулянта K_3 -EDTA («Greiner Bio-One», Австрия). Мононуклеарные клетки периферической крови условно здоровых индивидов были выделены стандартным методом на градиенте плотности фиколла («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция) – урографина («Schering AG», Германия) ($1,077 \text{ г/см}^3$) [Вюум 1968]. Кровь разбавляли культуральной средой RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург) в соотношении 1:1. Затем 5 мл разбавленной крови наслаивали на 3 мл раствора фиколла-урографина и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 мин. По окончании центрифугирования собирали клетки интерфазного кольца и переносили в среду RPMI-1640 для удаления примеси фиколла-урографина. Центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин, удаляли надосадочную жидкость. Повторяли отмывку дважды. Осадок ресуспендировали в полной культуральной среде RPMI-1640, содержащей 10% FCS («HyClone», США), 2 mM L-глутамина (ООО «БиолоТ», Санкт-

Петербург), 5×10^{-4} М 2-меркаптоэтанола («Sigma-Aldrich», США), 10 мМ HEPES буфера («Sigma-Aldrich», США), 80 мкг/мл гентамицина («KRKA», Словения), 100 мкг/мл бензилпенициллина (ОАО «Биосинтез», Пенза).

2.3 Культивирование мононуклеарных клеток *in vitro*

Мононуклеарные клетки в концентрации 2 млн/мл культивировались в 96-луночных круглодонных планшетах («TPP», Швейцария), в присутствии и отсутствии ЛПС *Escherichia coli* (серотип 055:B5, «Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 200 нг/мл [Leeuwenberg et al. 1994]. Культивирование проводили в полной культуральной среде RPMI-1640 в течение 24 часов во влажной атмосфере при температуре 37°C и концентрации CO₂ 5%.

2.4 Определение уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1 на субпопуляциях мононуклеарных клеток

Определение процентного содержания клеток, экспрессирующих мембраносвязанные рецепторы I и II типов для TNF α и IL1, проводилось методом проточной цитофлуориметрии. При проведении метода были использованы антитела, меченные фикоэритрином (PE), фирмы «R&D systems» (США): anti-human TNFR1 PE, anti-human TNFR2 PE, anti-human IL-1R1 и anti-human IL-1R2 PE. Для иммунофенотипирования субпопуляций мононуклеарных клеток периферической крови использовались антитела фирмы «eBioscience» (США): anti-CD3 APC, anti-CD14 FITC и anti-CD19 PE-Cy7.

Для создания калибровочной кривой и перевода значений интенсивности флуоресценции клеток, экспрессирующих соответствующий маркер, в абсолютные показатели количества рецепторов, использовался набор BD QuantiBRITE PE («BD Biosciences», США), содержащий 4 фракции лиофилизированных бус, каждая из которых несет различный уровень

фикоэритрина. Пробирка с бусами была разведена в 500 мкл $1 \times$ PBS (137 мМ NaCl, 2,68 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4 , 1,47 мМ KH_2PO_4 , 0,53 мМ EDTA и 0,1% NaN_3), перемешана и проанализирована на проточном цитометре BD FACS Aria («BD Biosciences», США). На точечном графике FSC-A/SSC-A выделяли популяцию бус и записывали 10000 событий. Далее на гистограмме PE флуоресценции выставляли маркеры по четырем пикам калибровочных частиц (Low, Med Low, Med High, High). Анализ калибровочных частиц BD QuantiBRITE PE представлен на Рисунке 5.

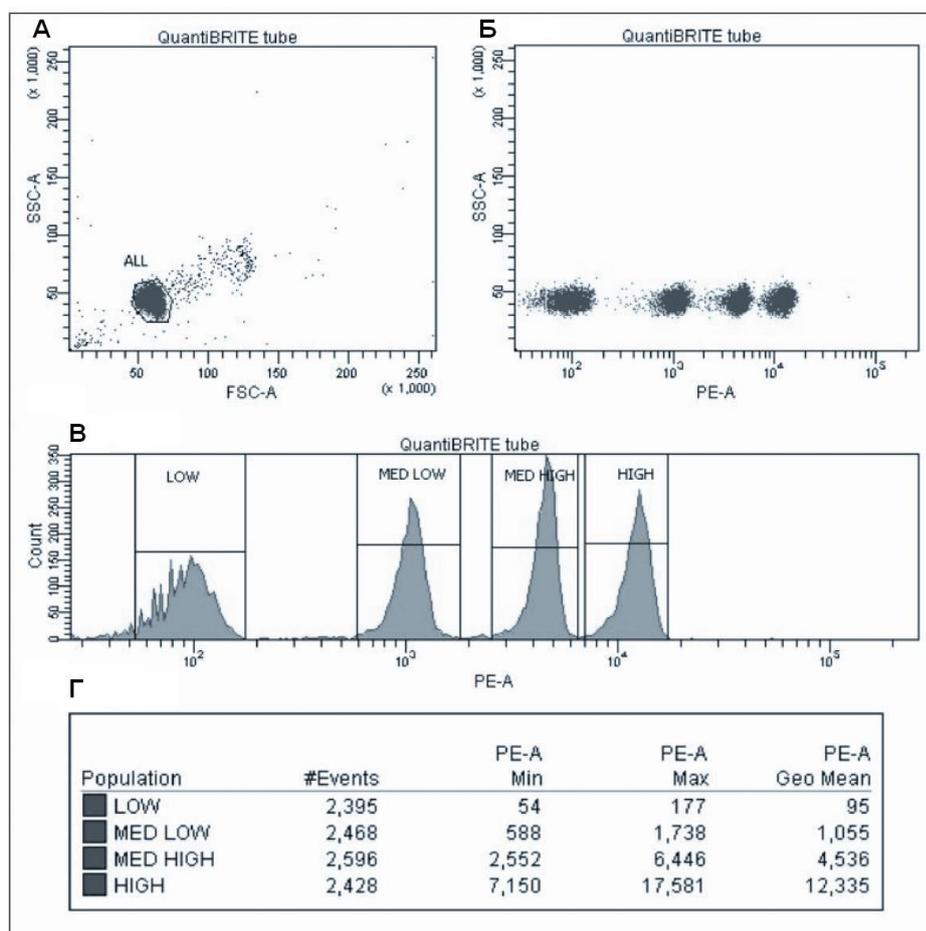


Рисунок 5 – Анализ калибровочных частиц QuantiBRITE PE («BD Biosciences», США). (А) Гейт калибровочных частиц на точечном графике FSC-A/SSC-A. (Б) Калибровочные частицы на точечном графике PE/SSC-A. (В) Гистограмма PE флуоресценции. Маркеры выставлены по четырем пикам калибровочных частиц (Low, Med Low, Med High, High). (Г) Статистика.

По результатам анализа бус был построен график зависимости логарифмических значений числа молекул фикоэритрина от интенсивности флуоресценции и была установлена математическая линейная зависимость логарифмических значений (Рисунок 6).

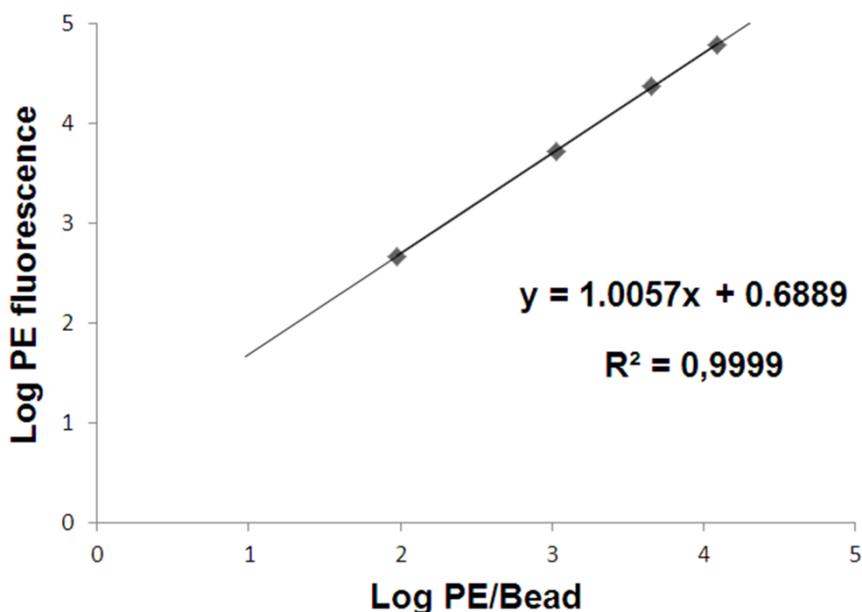


Рисунок 6 – Калибровочная кривая BD QuantiBRITE PE. Зависимость логарифмических значений числа молекул PE от интенсивности флуоресценции.

По полученной формуле с использованием значений интенсивности флуоресценции каждой из субпопуляций были подсчитаны абсолютные значения количества рецепторов на клетках.

Для получения наилучших показателей стабильности и воспроизводимости эксперимента нами был подобран оптимальный протокол проведения пробоподготовки для определения уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1. Перед проведением эксперимента путем титрования антител была определена концентрация насыщения. Свежевыделенную суспензию мононуклеарных клеток центрифугировали при 1300 об/мин в течение 10 минут при комнатной

температуре, проводили дважды отмывку в 1 мл PBS с 1% BSA (Sigma-Aldrich, США). Затем в маркированные 12×75 -мм пробирки добавляли по 25 мкл клеток (1×10^5) и по 1 мкл (3 мкг) человеческого IgG (ФГУП «НПО «Микроген», Москва) для блокировки Fc-рецепторов. Далее инкубировали в темном месте при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем добавляли насыщающую концентрацию anti-TNFR1, anti-TNFR2, anti-IL-1R1 и anti-IL-1R2 антител, а также по 1 мкл anti-CD3 APC, anti-CD14 FITC и anti-CD19 PE-Cy7 антител для иммунофенотипирования субпопуляций мононуклеарных клеток. Клетки с антителами инкубировали в течение 40 минут при 4°C в темноте. Далее клетки дважды отмывали от не связавшихся антител, в 1 мл PBS с 1% BSA. Затем в пробирки добавляли по 100 мкл PBS и сразу анализировали на проточном цитометре, без фиксации.

Исследование содержания рецепторов TNF α и IL1 проводилось при тех же параметрах напряжения фотоэлектронного умножителя (ФЭУ) по PE-детектору, что и при проведении анализа калибровочных бус, что позволило нам конвертировать значения интенсивности флуоресценции в число PE молекул на клетку.

Поскольку для использованных нами антител соотношение молекул PE на антитело равно 1:1, полученное число молекул PE соответствовало числу рецепторов. Проверка настроек цитометра проводилась с помощью Cytometer Setup and Tracking (CS&T) beads (BD Biosciences, США).

По показателям прямого и бокового светорассеяния (на точечном графике FSC-A/SSC-A) выделяли анализируемые популяции, располагающиеся в лимфоцитарном и моноцитарном регионах, затем по субпопуляционным маркерам (на точечных графиках APC-A/FITC-A и APC-A/PE-Cy7-A) выделяли субпопуляции T-, B-лимфоцитов и моноцитов. Записывали как минимум 10000 выделенных событий. Затем на гистограммах контрольной пробы выставляли интервальный гейт и в последующем на гистограммах представляли события в анализируемых

субпопуляциях, положительные по маркерам мембраносвязанных рецепторов.

2.5 Определение уровня цитокинов TNF α , IL1 β и растворимых рецепторов к TNF α и IL1

Для определения уровня TNF α , IL1 β и растворимых рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 были использованы образцы сыворотки крови условно здоровых индивидов. Для получения образцов сыворотки набирали по 4 мл венозной крови в вакуумные пробирки VACUETTE, содержащие активатор свертываемости («Greiner Bio-One», Австрия). Определение сывороточного уровня цитокинов TNF α , IL1 β и растворимых рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью коммерческих диагностических наборов:

- альфа-TNF–ИФА-БЕСТ (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск);
- Интерлейкин-1 бета–ИФА-БЕСТ (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск);
- Human sTNF R1 ELISA Kit и Human sTNF R2 ELISA Kit («RayBiotech», США);
- Human IL1 sR1 ELISA Kit и Human IL1 sR2 ELISA Kit («RayBiotech, США), в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Оптическую плотность окрашенных растворов в лунках измеряли при помощи спектрофотометра с вертикальным прохождением света Anthos 2020 при длине волны 450 нм («Anthos Labtec», Австрия).

2.6 Выделение геномной ДНК

Геномную ДНК выделяли из МНК периферической крови условно здоровых индивидов методом фенол-хлороформной экстракции [Maniatis 1982]. Клеточную массу разводили в RCLB (Red Cell Lysis Buffer) буфере (10 mM Tris-HCl pH=7,5, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl), центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Клеточный осадок ресуспендировали в 400 мкл

раствора, содержащего 100 мМ Tris-HCl pH=8, 100 мМ NaCl, 10 мМ EDTA. Затем добавляли 50 мкл 10% додецил сульфат натрия (SDS) и 10 мкл протеиназы К (10 мг/мл). Перемешивали и инкубировали при 55°C в течение 2 часов. Затем добавляли 200 мкл фенола и 200 мкл хлороформа, смесь перемешивали до образования гомогенной взвеси и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 15 минут. Верхнюю фазу переносили в чистую пробирку. Добавляли 10 мкл ЛПААГ, 40 мкл 3М AcNa pH=5,4. Для осаждения чистой ДНК из раствора, к нему добавляли 1 мл 90% этанола, тщательно перемешивали и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. Затем смесь центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 минут. Убирали надосадочную жидкость, осторожно отмывали осадок 75% этанолом. Убирали надосадочную жидкость и подсушивали осадок в термостате при 37°C. Осадок ДНК растворяли в деионизованной воде.

2.7 Генотипирование рецепторов I и II типов для TNF α и IL1

Полиморфные позиции SNP, исследованные нами для связи с уровнем экспрессии рецепторов, были выбраны из базы данных NCBI dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Критерием выбора SNP являлись расположение в промоторных участках генов рецепторов и высокая частота минорной аллели.

Генотипирование полиморфных вариантов генов *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B*, *IL1R1* и *IL1R2* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей рестрикцией продукта амплификации – ПДРФ (анализ полиморфизма длин рестрицированных фрагментов). Последовательности праймеров к точкам SNP *TNFRSF1A* -609 G/T, *TNFRSF1A* -1207 C/G, *TNFRSF1B* -1709 A/T, *IL1R1* -12075 C/T были подобраны ранее [Bergholdt et al. 1995; Allen et al. 2001; Culpan et al. 2007]. Последовательности праймеров к точкам SNP *TNFRSF1B* -3609 C/T, *IL1R1* -1100 A/G, *IL1R2* -1780 и *IL1R2* +6974 G/T были подобраны с использованием программы NCBI/Primer-

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Праймеры (Таблица 2) были синтезированы в ЗАО «Биосан» (Новосибирск).

Таблица 2 – Праймеры и эндонуклеазы рестрикции, использованные для генотипирования SNP

SNP	Праймер	Последовательности праймеров (5' – 3')	Рестрик таза
<i>TNFRSF1A</i> -609 rs4149570	Прямой Обратный	CGGACGCTTATCTAT ATCTC TTGTAGTCCAGTCACAAGCA	Bst4C I
<i>TNFRSF1A</i> -1207 rs4149569	Прямой Обратный	TTGGGAGATGTCTGCATCAA TTCTTCGTTTGCTTGTTTTTCA	BstC8 I
<i>TNFRSF1B</i> -1709 rs652625	Прямой Обратный	GAGTGCTGAGTGAGAAACTG AGCTTGAATTCGTTCCCAGG	DseD I
<i>TNFRSF1B</i> -3609 rs590368	Прямой Обратный	ATGCTTTTGTCCATGCAGGT GCTGTACCCCGTATTAGCTG	Msp I
<i>IL1R1</i> -1100 rs3917225	Прямой Обратный	TCTGGGGCATACTCACAGGGGT AGCTGGGTTGTGGTAGCCTTACTG	AsuHP I
<i>IL1R1</i> -12075 rs2234650	Прямой Обратный	TTGGAGGATGGCCCATGAAGACC CTGTTACGCGCCCGGATGAAAAA	Pst I
<i>IL1R2</i> -1780 rs4141134	Прямой Обратный	CCATGCCATCTGCTCTTGGCCAT GACCAGACTTTGGAAAGGCCTCC	Msp I
<i>IL1R2</i>	Прямой	CTTACATGGCTGGTGCCTTT	Dra III

+6974 rs2071008	Обратный	TATCTCCCATCCCACATGGT	
--------------------	----------	----------------------	--

ПЦР проводили в амплификаторе PTC-200 DNA Engine («MJ Research Inc.», США). Реакционная смесь в объеме 20 мкл содержала 1-2 ед. *Taq*-ДНК полимеразы (НПО «СибЭнзим», Новосибирск), 0,5 мкМ каждого из праймеров, 0,25 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 50-200 нг геномной ДНК. Реакционный буфер прилагался к ДНК-полимеразе и содержал 60 мМ Tris-HCl (pH 8,5 при 25°C), 1,5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанола, 0,1% Тритона X-100. Условия термоциклирования ПЦР были следующие:

- *TNFRSF1A* -609 G/T (95°C – 3 мин, 94°C – 20 сек, 61°C – 15 сек, 72°C – 20 сек, 30 циклов, 72°C – 2 мин);
- *TNFRSF1A* -1207 C/G (95°C – 3 мин, 94°C – 20 сек, 58°C – 15 сек, 72°C – 20 сек, 35 циклов, 72°C – 2 мин);
- *TNFRSF1B* -1709 A/T (95°C – 3 мин, 94°C – 20 сек, 64°C – 15 сек, 72°C – 20 сек, 30 циклов, 72°C – 2 мин);
- *TNFRSF1B* -3609 C/T (95°C – 3 мин, 94°C – 20 сек, 63°C – 15 сек, 72°C – 20 сек, 35 циклов, 72°C – 2 мин);
- *IL1R1* -1100 A/G (95°C – 3 мин, 94°C – 20 сек, 57°C – 15 сек, 72°C – 20 сек, 30 циклов, 72°C – 2 мин);
- *IL1R1* -12075 C/T (95°C – 3 мин, 94°C – 20 сек, 70°C – 15 сек, 72°C – 20 сек, 30 циклов, 72°C – 2 мин);
- *IL1R2* -1780 C/T (95°C – 3 мин, 94°C – 20 сек, 60°C – 15 сек, 72°C – 20 сек, 38 циклов, 72°C – 2 мин);
- *IL1R2* +6974 G/T (95°C – 3 мин, 94°C – 20 сек, 58°C – 15 сек, 72°C – 20 сек, 30 циклов, 72°C – 2 мин).

Продукты амплификации подвергали рестрикции соответствующими эндонуклеазами (Таблица 2): рестрикционная смесь включала 2,5-5 мкл амплификата и 5-10 единиц активности соответствующей рестриктазы. Рестрикцию продуктов амплификации проводили в течение 18 часов при 65°C для *TNFRSF1A* -609 G/T, 55°C для *TNFRSF1A* -1207 C/G и 37°C для *TNFRSF1B* -1709 A/T, *TNFRSF1B* -3609 C/T, *IL1R1* A/G -1100, *IL1R1* C/T -12075, *IL1R2* C/T -1780, *IL1R2* G/T +6974. Инкубирование проводили на термошейкере TS-100 («BioSan», Латвия).

Продукты рестрикции анализировали с помощью капиллярного электрофореза QIAxcel System («Qiagen», Германия) или электрофореза в 2% агарозном геле (ООО «Медиген», Новосибирск), приготовленном на трис-ацетатном буфере (TAE), при напряжении 140-150В в течение 20-25 минут. Источник питания – EPS 601 («Amersham Biosciences», США). В качестве маркера молекулярного веса использовали гидролизат плазмиды pUC19, полученный при расщеплении рестриктазой *Msp* I (НПО «СибЭнзим») и QX DNA Size Marker100bp-3kb («Qiagen»). Продукты амплификации и рестрикции, при разделении в агарозных гелях, визуализировали в ультрафиолетовом свете, молекулярный вес фрагментов оценивали с помощью видеоденситометра ImageMaster VDS («Pharmacia Biotech», США).

2.8 Методы статистической обработки

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 7.0 («StatSoft», США). Полученные данные были подвергнуты проверке на нормальность распределения (критерий Колмогорова-Смирнова), которая показала, что распределение большинства показателей является ненормальным. Корреляции между исследуемыми параметрами устанавливались с использованием коэффициента корреляции Спирмана. Соответствие распределения частот генотипов Равновесию Харди-Вайнберга

устанавливалось с помощью online калькулятора [<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>]. Уравнение Харди-Вайнберга: $p^2+2pq+q^2=1$, где p – частота доминантного аллеля, q – частота рецессивного аллеля [Rodriguez et al. 2009]. Достоверность различий частот генотипов оценивалась с помощью критерия χ^2 (df=1) с поправкой Йетса и точного критерия Фишера. Расчёт проводился с использованием статистических калькуляторов OpenEpi [<http://www.openepi.com>] и GenExpert [http://gen-exp.ru/calculator_or.php]. Для статистического анализа независимых переменных применялся непараметрический критерий Манн-Уитни, для сравнения зависимых переменных – критерий Вилкоксона. Связь генотипов с уровнем экспрессии рецепторов тестировали, применяя непараметрический дисперсионный критерий Крускала-Уоллиса и критерий Манн-Уитни. Все выявленные различия считались достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$. При множественных сравнениях расчет уровня значимости проводился с использованием поправки Бонферрони [Bland et al. 1995]. С учетом отсутствия нормального распределения данных по большинству показателей, результаты в иллюстрациях приведены в виде медианы и диапазона значений квартилей (25% и 75%). В пояснениях к иллюстрациям количество индивидов в группе обозначено n .

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 на субпопуляциях мононуклеарных клеток

На первом этапе работы нами было проведено определение уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1. Определение количества рецепторов TNF α и IL1 проводилось методом проточной цитофлуориметрии с использованием калибровочных частиц BD QuantiBRITE PE. Для получения наилучших показателей стабильности и воспроизводимости эксперимента нами были подобраны оптимальные условия проведения эксперимента, а именно была определена насыщающая концентрация антител путем титрования, для снижения неспецифического связывания были подобраны условия температурного режима и условия блокировки Fc-фрагментов (см. раздел 2.4).

Данный метод позволил нам провести количественную оценку экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1 на различных субпопуляциях мононуклеарных клеток периферической крови условно здоровых индивидов. В ходе работы нами было исследовано как процентное содержание клеток, экспрессирующих мембраносвязанные рецепторы I и II типов для TNF α и IL1 в CD14⁺, CD3⁺ и CD19⁺ субпопуляциях клеток периферической крови, так и число рецепторов на клетках.

При исследовании экспрессии рецепторов TNF α на интактных субпопуляциях мононуклеарных клеток условно здоровых индивидов было установлено, что в популяции CD14⁺ моноцитов процент клеток, экспрессирующих рецепторы TNF α I типа, был значимо выше, чем в субпопуляциях CD3⁺ Т-лимфоцитов и CD19⁺ В-лимфоцитов ($p < 0,001$). При сравнении анализируемых субпопуляций мононуклеарных клеток статистически значимый наименьший процент клеток, несущих рецепторы TNF α II типа, был выявлен в субпопуляции CD19⁺ В-лимфоцитов ($p < 0,001$).

С помощью калибровочных частиц BD Quantibrite PE были получены средние значения количества мембраносвязанных рецепторов TNF α . При сравнении анализируемых субпопуляций МНК статистически значимый наименьший уровень экспрессии рецепторов TNF α I и II типа установлен в субпопуляции CD3⁺ Т-лимфоцитов ($p < 0,001$). Наибольший уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α I и II типа выявлен в субпопуляциях CD19⁺ В-лимфоцитов и CD14⁺ моноцитов, соответственно ($p < 0,001$). Результаты представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α I и II типов на субпопуляциях интактных CD3⁺, CD19⁺, CD14⁺ клеток и CD14⁺ клеток в спонтанной и ЛПС-стимулированной культуре мононуклеарных клеток условно здоровых доноров (n=150)

	Процент клеток, экспрессирующих рецепторы		Число рецепторов на клетку	
	TNFR1	TNFR2	TNFR1	TNFR2
Интактные CD19 ⁺ клетки	1,3 (0,9-2,1)*	7,9 (5,8-12,3)*	1153,7 (891,9-1490,8)*	1102,5 (933,4-1309,2)*
Интактные CD3 ⁺ клетки	1,5 (0,9-2,6)*	36,6 (28,4-47,6)**	427,3 (349,2-524,7)**	570,3 (516,8-627,1)**
Интактные CD14 ⁺ клетки	11,4 (4,0-28,8)	28,3 (12,2-43,3)***	869,4 (756,9-1017,9)***	1273,9 (1053,0-1450,6)***
CD14 ⁺ клетки в спонтанной культуре	9,8 (5,8-35,0)	50,0 (31,2-72,1) [†]	1267,5 (1053,0-1521,1) [†]	1983,4 (1677,9-2268,9) [†]

МНК ¹				
CD14 ⁺ клетки в стимулирова нной культуре МНК ¹	9,6 (4,0-32,3)	79,2 (71,6-87,8)	1718,2 (1245,0-2559,1)	4177,0 (3133,1- 5173,5)

Примечание: Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

¹Мононуклеарные клетки в концентрации 2 млн/мл, культивировались в присутствии и отсутствии ЛПС *Escherichia coli* (серотип 055:B5) в концентрации 200 нг/мл в течение 24 часов.

* Статистически значимо отличается от CD14⁺ клеток ($p < 0,001$).

** Статистически значимо отличается от CD19⁺ и CD14⁺ клеток ($p < 0,001$).

*** Статистически значимо отличается от CD14⁺ клеток спонтанной культуры МНК ($p < 0,001$).

† Статистически значимо отличается от CD14⁺ клеток стимулированной культуры МНК ($p < 0,001$).

Для оценки экспрессии рецепторов TNF α и IL1 при активации клеток проводилось исследование мембраносвязанных форм рецепторов на CD14⁺ моноцитах в культуре МНК при добавлении поликлонального активатора ЛПС. Выбор для исследования популяции моноцитов обусловлен тем, что на CD14⁺ клетках отмечался меньший разброс значений, наибольший процент TNFR⁺ и IL1R⁺ позитивных клеток, и наибольшее количество рецепторов, в сравнении с субпопуляциями Т- и В-лимфоцитов.

Для исследования изменений экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α при стимуляции ЛПС оценивали процент CD14⁺TNFR⁺ клеток и количество рецепторов TNF α на CD14⁺ клетках. Было установлено,

что при культивировании в течение 24 часов в популяции CD14⁺ моноцитов спонтанной культуры МНК процент клеток несущих рецепторы TNF α I и II типов составляет 9,8 и 50%, соответственно. При стимуляции ЛПС процентное содержание клеток, экспрессирующих данные рецепторы в популяции CD14⁺ моноцитов, составило 9,6 и 79,2%, соответственно для I и II типов. При этом статистически значимое увеличение по сравнению со спонтанной культурой выявлено только для рецепторов TNF α II типа ($p < 0,001$). При сравнении экспрессии рецепторов TNF α на CD14⁺ моноцитах спонтанной и ЛПС-стимулированной культуры МНК показано значимое повышение числа рецепторов TNF α I типа с 1267,5 до 1988,4 ($p < 0,001$), а также значимое повышение рецепторов TNF α II типа с 1718,2 до 4177 ($p < 0,001$) (Таблица 3). Кроме того, обнаружены различия между интактными CD14⁺ клетками и CD14⁺ клетками в спонтанной культуре МНК по проценту TNFR2⁺ позитивных клеток, и по среднему числу рецепторов TNF α I и II типов на клетках.

С использованием коммерческих антител фирмы R&D Systems (США), к I и II типу поверхностных рецепторов IL1, меченных флуорохромом PE, было определено процентное содержание клеток, экспрессирующих на своей поверхности данные молекулы. В субпопуляциях CD3⁺ Т-лимфоцитов, CD19⁺ В-лимфоцитов и CD14⁺ моноцитов, отмечалось статистически значимое различие между процентным содержанием клеток, экспрессирующих IL1R1 и IL1R2 ($p < 0,05$). В популяции CD14⁺ моноцитов было выявлено большее процентное содержание IL1R1⁺ позитивных клеток, чем в субпопуляциях CD3⁺ Т-лимфоцитов и CD19⁺ В-лимфоцитов ($p < 0,001$).

При сравнении анализируемых субпопуляций МНК статистически значимое наименьшее среднее число рецепторов IL1 I и II типов было установлено в субпопуляциях CD14⁺ моноцитов и CD3⁺ Т-лимфоцитов, соответственно ($p < 0,001$). Во всех исследованных субпопуляциях МНК

наблюдалась значимая разница по числу IL1R1 и IL1R2 на клетках ($p < 0,05$).
Результаты представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов IL1 I и II типов на субпопуляциях интактных CD3⁺, CD19⁺, CD14⁺ клеток и CD14⁺ клеток в спонтанной и ЛПС-стимулированной культуре мононуклеарных клеток условно здоровых доноров (n=150)

	Процент клеток, экспрессирующих рецепторы		Число рецепторов на клетку	
	IL1R1	IL1R2	IL1R1	IL1R2
Интактные CD3 ⁺ клетки	10,1 (7,1-13,9) [*]	2,9 (1,5-5,7)	1148,9 (931,8-1537,5) [*]	611,3 (485,4-750,6) ^{***}
Интактные CD19 ⁺ клетки	3,4 (2,6-5,2) ^{**}	2,8 (2,0-4,8)	1597,0 (1222,6-1908,9) ^{**}	1128,1 (960,4-1369,4)
Интактные CD14 ⁺ клетки	61,0 (40,0-74,6) [†]	2,9 (1,5-7,4) [†]	920,6 (731,5-1226,9) [†]	1035,4 (801,3-1389,5) [†]
CD14 ⁺ клетки в спонтанной культуре МНК ¹	46,1 (28,6-70,3) ^a	14,5 (8,9-59,4) ^a	1568,7 (1306,0-1981,8) ^a	1621,3 (1341,3-2155,2) ^a
CD14 ⁺ клетки в стимулированной культуре МНК ¹	75,7 (64,2-82,0)	8,4 (4,3-28,7)	3519,9 (2865,0-4473,6)	1507,0 (1155,3-1915,4)

Примечание: Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

¹Мононуклеарные клетки в концентрации 2 млн/мл, культивировались в присутствии и отсутствии ЛПС *Escherichia coli* (серотип 055:B5) в концентрации 200 нг/мл в течение 24 часов.

* Статистически значимо отличается от CD14⁺ клеток ($p < 0,001$).

** Статистически значимо отличается от CD3⁺ и CD14⁺ клеток ($p < 0,001$).

*** Статистически значимо отличается от CD19⁺ и CD14⁺ клеток ($p < 0,001$).

† Статистически значимо отличается от CD14⁺ клеток спонтанной культуры МНК ($p < 0,001$).

^a Статистически значимо отличается от CD14⁺ клеток стимулированной культуры МНК ($p < 0,05$).

При сравнении уровня экспрессии рецепторов IL1 на CD14⁺ моноцитах спонтанной и ЛПС-стимулированной культуры МНК установлено статистически значимое повышение как процента клеток, экспрессирующих IL1R1, так и количества IL1R1 на клетках ($p < 0,001$). Для рецептора IL1 II типа отмечается статистически значимое снижение процента клеток, экспрессирующих IL1R2 и снижение числа рецепторов на клетках ($p < 0,05$) (Таблица 4). Также установлена статистически значимая разница между интактными CD14⁺ клетками и CD14⁺ клетками в спонтанной культуре МНК по проценту IL1R⁺ позитивных клеток и по числу рецепторов на клетках ($p < 0,001$). В популяции CD14⁺ моноцитов в спонтанной культуре МНК было выявлено большее процентное содержание IL1R2⁺ позитивных клеток и большее число рецепторов IL1R1 и IL1R2 ($p < 0,001$).

Таким образом, нами получены данные, свидетельствующие о разнице в экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1 на различных субпопуляциях мононуклеарных клеток. При этом разница была установлена

как по проценту TNFR⁺ и IL1R⁺ позитивных клеток, так и по среднему числу рецепторов TNF α и IL1 на клетках.

3.2 Сывороточные уровни цитокинов TNF α и IL1 β и растворимых рецепторов к TNF α и IL1

На втором этапе работы нами было определено содержание медиаторов TNF α и IL1 β в сыворотке крови 150 условно здоровых индивидов. Уровень TNF α в сыворотке крови условно здоровых индивидов составил $2,64 \pm 0,6$ пг/мл, уровень IL1 β – $0,2 \pm 0,11$ пг/мл.

Далее нами было определено сывороточное содержание растворимых рецепторов I и II типов для TNF α и IL1. Установлено, что сывороточный уровень растворимых рецепторов TNF α II типа ($3051,44 \pm 131,01$ пг/мл) достоверно выше уровня растворимых рецепторов TNF α I типа ($718,41 \pm 21,62$ пг/мл) ($p < 0,001$). Уровень растворимых рецепторов IL1 II типа ($6242,17 \pm 128,22$ пг/мл) был достоверно выше уровня рецепторов IL1 I типа ($12,88 \pm 4,33$ пг/мл) ($p < 0,001$).

3.3 Корреляционные взаимосвязи в системах рецепторов TNF α и IL1

Полученные данные по экспрессии мембраносвязанных рецепторов и содержанию растворимых рецепторов анализировали для выявления корреляционных связей.

Корреляции между уровнями sTNFR1 и sTNFR2, а также sIL1R1 и sIL1R2 нами не обнаружено. При анализе возможных корреляционных связей между показателями растворимых рецепторов и уровнем цитокина была выявлена прямая зависимость содержания sTNFR1 с сывороточным уровнем TNF α . Также было установлено, что уровень TNF α связан отрицательной корреляцией с абсолютным количеством TNFR1 на интактных CD19⁺ В-клетках. Выявлено, что процент CD14⁺TNFR2⁺ позитивных клеток прямо коррелирует с числом TNFR2 на CD14⁺ моноцитах.

Была обнаружена отрицательная корреляционная зависимость между сывороточным уровнем растворимых рецепторов IL1 II типа и количеством мембраносвязанных рецепторов IL1 II типа на интактных Т-лимфоцитах. Корреляционный анализ позволил установить сильную прямую связь между спонтанными и ЛПС-стимулированными культурами МНК как по проценту клеток, экспрессирующих рецепторы TNF α и IL1, так и по числу рецепторов TNF α и IL1 на клетках.

Корреляционный анализ не установил достоверной связи между медиатором IL1 β и уровнями рецепторов IL1. Результаты корреляционного анализа представлены в Таблице 5.

Таблица 5 – Корреляционные взаимосвязи в системах рецепторов TNF α и IL1 (n=150, Spearman Rank, $p < 0,05$)

Рецепторы TNFα		
Сывороточный уровень TNF α	+0,32	Сывороточный уровень растворимых рецепторов sTNFR1
Сывороточный уровень TNF α	-0,38	Количество TNFR1 на интактных В-лимфоцитах
Процентное содержание интактных моноцитов, экспрессирующих TNFR2	+0,43	Количество TNFR2 на интактных моноцитах
Процентное содержание моноцитов, экспрессирующих TNFR1 в спонтанной культуре МНК	+0,74	Процентное содержание моноцитов, экспрессирующих TNFR1 в стимулированной культуре МНК
Количество TNFR1 на моноцитах в спонтанной культуре МНК	+0,37	Количество TNFR1 на моноцитах в стимулированной культуре МНК

Процентное содержание моноцитов, экспрессирующих TNFR2 в спонтанной культуре МНК	+0,31	Процентное содержание моноцитов, экспрессирующих TNFR2 в стимулированной культуре МНК
Рецепторы IL1		
Сывороточный уровень растворимых рецепторов sIL1R2	-0,34	Количество IL1R2 на интактных Т-лимфоцитах
Процентное содержание моноцитов, экспрессирующих IL1R1 в спонтанной культуре МНК	+0,50	Процентное содержание моноцитов, экспрессирующих IL1R1 в стимулированной культуре МНК
Количество IL1R1 на моноцитах в спонтанной культуре МНК	+0,48	Количество IL1R1 на моноцитах в стимулированной культуре МНК
Процентное содержание моноцитов, экспрессирующих IL1R2 в спонтанной культуре МНК	+0,64	Процентное содержание моноцитов, экспрессирующих IL1R2 в стимулированной культуре МНК

Таким образом, проведенный анализ показал наличие статистически значимых корреляционных связей между показателями растворимых и мембраносвязанных рецепторов как к TNF α , так и к IL1. Также существует статистически значимая положительная корреляция между показателями рецепторов в спонтанной и ЛПС-стимулированной культурах МНК.

3.4 Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов рецепторов TNF α и IL1 среди условно здоровых индивидов

От уровня экспрессии рецепторов на клетках зависит степень проявления биологических эффектов медиаторов [Besschetnova et al. 2008; Moraga et al. 2009]. Различие в уровне экспрессии рецепторов может быть обусловлено генетической предрасположенностью, и в частности, полиморфизмом генов. Вследствие этого, нами были подобраны полиморфные точки SNP генов рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 для изучения их ассоциации с уровнем экспрессии рецепторов. Полиморфные позиции SNP были выбраны из базы данных NCBI dbSNP. Критерием выбора SNP являлись расположение в промоторных участках генов рецепторов и высокая частота минорного аллеля.

Частоты аллелей и генотипов исследованных полиморфных вариантов промоторных участков генов рецепторов TNF α и IL1 условно здоровых жителей г. Новосибирска приведены в Таблице 6. Распределение частот генотипов и аллелей всех исследуемых полиморфизмов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга ($p > 0,05$).

Таблица 6 – Частоты генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 у здоровых жителей г. Новосибирска (Юго-Западная Сибирь, Россия), n=150

SNP	Генотип	Частота генотипа			χ^2	$\chi^2 p$
		наблюдаемая		ожидаемая		
		%	n	n		
<i>TNFRSF1A</i> G/T -609, n=149	GG	30,9	46	48,5	0,693	0,405
	GT	52,3	78	73,0		
	TT	16,8	25	27,5		
	G	57,0	–	–		

	T	43,0	–	–		
<i>TNFRSF1A</i> G/C -1207, n=150	GG	34,7	52	52,2	0,005	0,942
	GC	48,7	73	72,6		
	CC	16,6	25	25,2		
	G	59,0	–	–		
	C	41,0	–	–		
<i>TNFRSF1B</i> A/T -1709, n=150	AA	90,7	136	136,3	0,359	0,548
	AT	9,3	14	13,3		
	TT	0	0	0,3		
	A	95,0	–	–		
	T	5,0	–	–		
<i>TNFRSF1B</i> C/T -3609, n=150	CC	35,3	53	55,2	0,570	0,450
	CT	50,7	76	71,6		
	TT	14,0	21	23,3		
	C	61,0	–	–		
	T	39,0	–	–		
<i>IL1R1</i> A/G -1100, n=147	AA	38,1	56	55,7	0,009	0,921
	AG	46,9	69	69,6		
	GG	15,0	22	21,7		
	A	62,0	–	–		
	G	38,0	–	–		
<i>IL1R1</i> C/T -12075, n=125	CC	21,6	27	31,8	2,890	0,089
	CT	57,6	72	62,5		
	TT	20,8	26	30,8		
	C	50,0	–	–		
	T	50,0	–	–		
<i>IL1R2</i> T/C -1780,	TT	38,9	58	61,9	1,896	0,168
	TC	51,0	76	68,3		

n=149	CC	10,1	15	18,9		
	T	64,0	–	–		
	C	36,0	–	–		
<i>IL1R2</i> T/G +6974, n=145	TT	78,6	114	113,0	0,652	0,419
	TG	19,3	28	30,0		
	GG	2,1	3	2,0		
	T	88,0	–	–		
	G	12,0	–	–		

Примечание: А – adenine (аденин), Т – thymine (тимин), G – guanine (гуанин), С – cytosine (цитозин).

χ^2 – «хи»-квадрат равновесие Харди-Вайнберга.

Для сравнения распределения частот генотипов с другими популяциями (Таблица 7) были использованы сведения по исследуемым точкам SNP из базы данных *NCBI* по популяциям:

– ss28458709: для европеоидов – HarMap-CEU и азиатов – HarMap-JPT (для *TNFRSF1A* -609 G/T);

– ss5604282: для европеоидов – PGA-EUROPEAN-PANEL; ss65836385: для европеоидов – HarMap-CEU и азиатов – HarMap-JPT (для *TNFRSF1B* -1709 A/T);

– ss43969772: для европеоидов – HarMap-CEU и азиатов – HarMap-JPT (для *TNFRSF1B* -3609 C/T);

– ss44140732: для европеоидов – HarMap-CEU и азиатов – HarMap-JPT (для *IL1R1* -1100 A/G);

– ss44323945: для европеоидов – HarMap-CEU и азиатов – HarMap-JPT (для *IL1R2* -1780 T/C);

– ss77127197: для европеоидов – HarMap-CEU и азиатов – HarMap-JPT (для *IL1R2* +6974 T/G).

Таблица 7 – Частоты генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 у европеоидных и азиатских популяциях базы данных *NCBI* и у здоровых индивидов Юго-Западной Сибири

SNP	Генотип	Частота генотипа, %					
		Жители Юго-Западной Сибири		Европеоидная популяция из базы данных <i>NCBI</i>		Азиатская популяция из базы данных <i>NCBI</i>	
<i>TNFRSF1A</i> G/T -609	GG	n=149	30,9	n=226	42,5	n=172	46,5
	GT		52,3		47,8		33,7
	TT		16,8		9,7		19,8
<i>TNFRSF1A</i> G/C -1207	GG	n=150	34,7	n=46	13,0	n=192 ¹	60,8
	GC		48,7		56,5		34,4
	CC		16,6		30,5		4,8
<i>TNFRSF1B</i> A/T -1709	AA	n=150	90,7	n=226	87,6	n=172	98,8
	AT		9,3		11,5		1,2
	TT		0		0,9		0
<i>TNFRSF1B</i> C/T -3609	CC	n=150	35,3	n=220	34,5	n=164	39,0
	CT		50,7		53,6		46,4
	TT		14,0		11,9		14,6
<i>IL1R1</i> A/G -1100	AA	n=147	38,1	n=226	24,7	n=172	33,7
	AG		46,9		49,6		58,1
	GG		15,0		25,7		8,2
<i>IL1R1</i> C/T -12075	CC	n=125	21,6	n=140 ²	43,0	n=50 ³	46,0
	CT		57,6		48,0		40,0
	TT		20,8		9,0		14,0
<i>IL1R2</i>	TT	n=149	38,9	n=226	33,6	n=172	91,9

T/C -1780	TC		51,0		49,6		8,1
	CC		10,1		16,8		0
<i>IL1R2</i> T/G +6974	TT	n=145	78,6	n=226	21,7	n=172	1,2
	TG		19,3		53,3		32,6
	GG		2,1		25,0		66,3

Примечание: ¹ Miyagawa et al. 2008.

² Uboldi de Capei et al. 2003.

³ Trejaut et al. 2004.

Полученные частоты аллелей и распределение генотипов для полиморфных точек *TNFRSF1A* -609 G/T и *IL1R1* -12075 C/T более характерны для азиатских популяций. Частоты минорных аллелей для *TNFRSF1A* -1207 G/C и *IL1R1* -1100 A/G в исследуемой нами выборке занимали промежуточное место между частотами в популяциях Европы и Азии. Частоты аллелей и генотипов остальных исследованных точек SNP больше соответствовали европейским популяциям, представленным в базе данных NCBI.

При сравнении частот генотипов исследуемых полиморфных вариантов генов рецепторов TNF α и IL1 у групп здоровых индивидов мужского и женского пола, статистически значимых различий не обнаружено. Результаты представлены в Таблице 8.

Таблица 8 – Частоты генотипов полиморфных вариантов генов рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 у здоровых мужчин и женщин г. Новосибирска (Юго-Западная Сибирь, Россия), n=150

SNP	Генотип	Частота генотипа, % (n)		χ^2	$\chi^2 p$
		Муж. (n=83)	Жен. (n=67)		

<i>TNFRSF1A</i> G/T -609	GG	32,5 (27)	28,8 (19)	0,67	0,72
	GT	49,4 (41)	56,1 (37)		
	TT	18,1 (15)	15,2 (10)		
<i>TNFRSF1A</i> G/C -1207	GG	36,1 (30)	32,8 (22)	0,24	0,89
	GC	48,2 (40)	49,3 (33)		
	CC	15,7 (13)	17,9 (12)		
<i>TNFRSF1B</i> A/T -1709	AA	88,0 (73)	94,0 (63)	1,62	0,45
	AT	12,0 (10)	6,0 (4)		
	TT	0 (0)	0 (0)		
<i>TNFRSF1B</i> C/T -3609	CC	34,9 (29)	46,3 (31)	2,07	0,35
	CT	50,6 (42)	40,3 (27)		
	TT	14,5 (12)	13,4 (9)		
<i>IL1R1</i> A/G -1100	AA	40,2 (33)	35,4 (23)	0,69	0,71
	AG	43,9 (36)	50,8 (33)		
	GG	15,9 (13)	13,8 (9)		
<i>IL1R1</i> C/T -12075	CC	20,6 (14)	22,8 (13)	0,11	0,95
	CT	58,8 (40)	56,1 (32)		
	TT	20,6 (14)	21,1 (12)		
<i>IL1R2</i> T/C -1780	TT	43,4 (36)	33,3 (22)	1,58	0,45
	TC	47,0 (39)	56,1 (37)		
	CC	9,6 (8)	10,6 (7)		
<i>IL1R2</i> T/G +6974	TT	83,8 (67)	72,3 (47)	3,61	0,16
	TG	13,8 (11)	26,2 (17)		
	GG	2,5 (2)	1,5 (1)		

Многие из известных аллельных вариантов различаются по уровню экспрессии соответствующих генов, определяя тем самым различный уровень продукции и, соответственно, различный уровень эффектов. Полиморфизмы, расположенные в интронах и регуляторных областях могут

влиять на уровень транскрипции и трансляции, стабильность мРНК и механизмы сплайсинга пре-мРНК [Shastry 2009; Fareed and Afzal 2013].

В настоящее время, в литературных данных нет работ по изучению влияния полиморфизма генов данных рецепторов на их уровень экспрессии. В виду этого, представлялось интересным исследовать как уровень экспрессии мембраносвязанных и растворимых форм рецепторов TNF α и IL1 меняется в зависимости от аллельного полиморфизма этих генов.

3.5 Ассоциация аллельных вариантов генов рецепторов TNF α с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов и сывороточным уровнем растворимых рецепторов

Различие в уровне экспрессии рецепторов может быть обусловлено рядом факторов, в том числе аллельным полиморфизмом генов рецепторов [Culpan et al. 2007; Sainz et al. 2010]. В виду выраженных провоспалительных эффектов цитокина TNF α , полиморфизм генов рецепторов к TNF α может определять различный характер протекания воспалительного ответа и специфических иммунологических реакций. Полиморфные варианты -609 G/T, -1207 G/C, -1709 A/T, -3609 C/T генов *TNFRSF1A* и *TNFRSF1B* расположены в промоторных участках, и, следовательно, могут влиять на уровень экспрессии.

При анализе данных по сывороточному содержанию растворимых форм рецепторов TNF α и данных генотипирования установлено, что индивиды, гомозиготные по аллелю T в позиции -609 G/T *TNFRSF1A* (rs4149570) характеризовались сниженным уровнем растворимых рецепторов TNF α I типа в сравнении с гомозиготными носителями аллеля G (Mann-Whitney *U* test, TT vs GG, $p=0,006$; Kruskal-Wallis *H* test, $p=0,032$) (Рисунок 7).

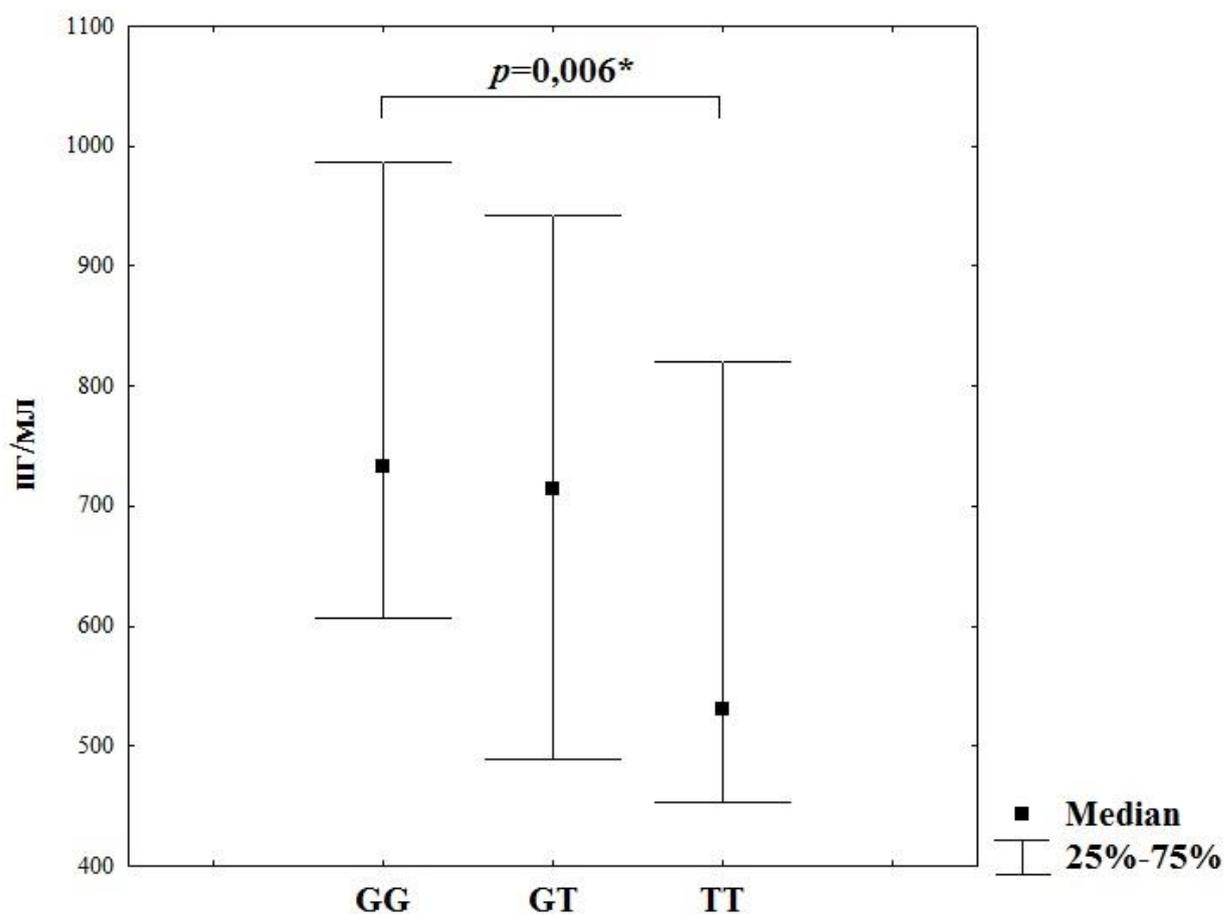


Рисунок 7 – Сывороточный уровень растворимых форм рецепторов TNF α I типа у носителей разных генотипов в точке -609 G/T промотора гена *TNFRSF1A* (n=149), Mann-Whitney *U* test: TT vs GG, $p=0,006$.

Примечание: * статистически значимо после применения поправки Бонферрони. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

Также у индивидов с генотипом TT была выявлена тенденция к снижению количества мембраносвязанных рецепторов TNFR1 на интактных CD19⁺ В-клетках (Mann-Whitney *U* test, TT vs GT, $p=0,099$).

Ассоциация уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α I типа с генотипом была установлена для полиморфного варианта в позиции -1207 G/C промотора гена рецептора *TNFRSF1A* (rs4149569). Гомозиготный вариант CC статистически значимо чаще встречался в группе с пониженной

плотностью рецепторов TNF α I типа на поверхности интактных моноцитов (Mann-Whitney U test, CC vs GC, $p=0,012$; Kruskal-Wallis H test, $p=0,025$) (Рисунок 8). Ассоциации данного полиморфного варианта с уровнем растворимых рецепторов TNF α I типа нами не обнаружено.

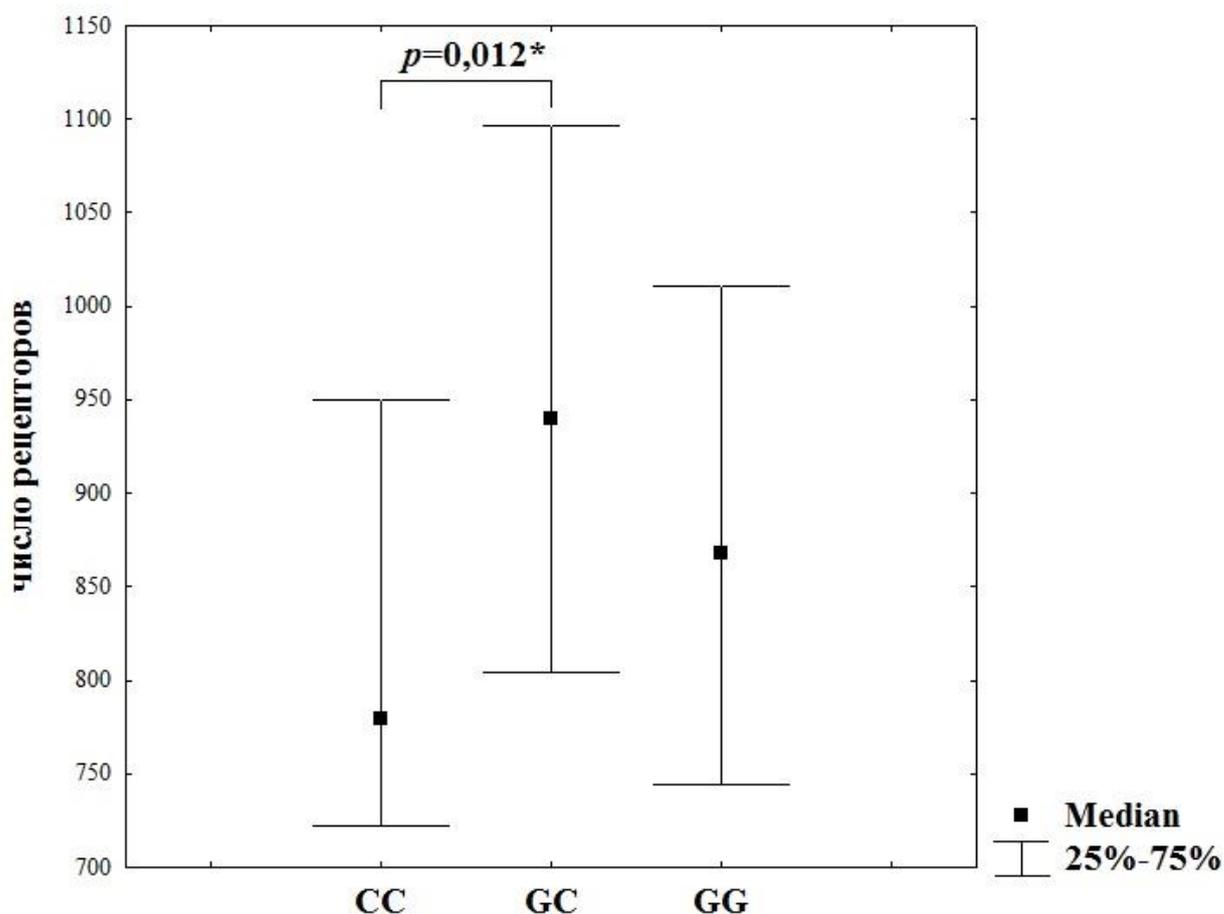


Рисунок 8 – Уровень мембраносвязанных форм рецепторов TNF α I типа на интактных CD14⁺ моноцитах у носителей разных генотипов в точке -1207 G/C *TNFRSF1A* (n=150), Mann-Whitney U test: CC vs GC, $p=0,012$.

Примечание: * статистически значимо после применения поправки Бонферрони. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

Анализ уровня экспрессии рецепторов TNFR2 и данных генотипирования в позиции -1709 A/T (rs652625) промотора гена *TNFRSF1B*

не выявил ассоциаций. Также не обнаружено связи между исследуемым однонуклеотидным полиморфизмом и уровнем растворимых рецепторов sTNFR2.

В SNP -3609 C/T (rs590368) промотора гена *TNFRSF1B*, индивиды с генотипом CC имели пониженное процентное содержание интактных CD14⁺ клеток, экспрессирующих рецепторы TNF α II типа, по сравнению с носителями генотипа CT (Mann-Whitney *U* test, CC vs CT, $p=0,015$; Kruskal-Wallis *H* test, $p=0,041$) (Рисунок 9). Ассоциации точки -3609 C/T с уровнем растворимых рецепторов TNF α II типа нами не обнаружено.

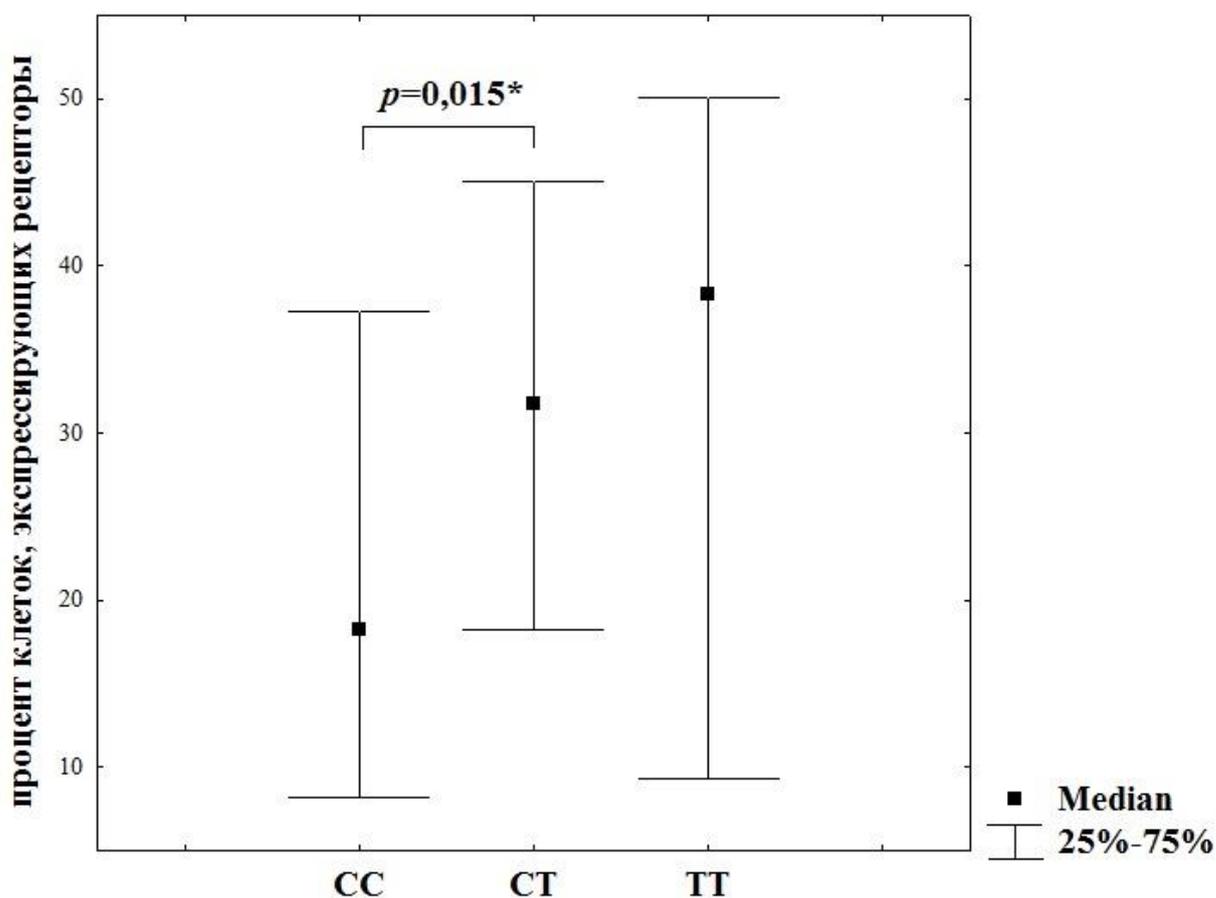


Рисунок 9 – Процентное содержание интактных CD14⁺ клеток, экспрессирующих TNFR2 у носителей разных генотипов в точке -3609 C/T *TNFRSF1B* (n=150), Mann-Whitney *U* test: CC vs CT, $p=0,015$.

Примечание: * статистически значимо после применения поправки Бонферрони. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

При проведении анализа комбинаций генотипов исследуемых полиморфных вариантов генов рецепторов TNF α были установлены значимые различия между индивидами с комбинациями GT+CC и GT+CT, а также GT+CC и GG+CT в позициях -609 G/T *TNFRSF1A* и -3609 C/T *TNFRSF1B*. Так, индивиды с комбинацией GT+CC, характеризовались повышенным числом рецепторов TNFR1 на интактных субпопуляциях CD19⁺ В-лимфоцитов (Mann-Whitney U test, GT+CC vs GT+CT, $p=0,018$; GT+CC vs GG+CT, $p=0,014$) (Рисунок 10А) и CD3⁺ Т-лимфоцитов (Mann-Whitney U test, GT+CC vs GT+CT, $p=0,019$) (Рисунок 10Б). Статистически значимых различий между индивидами с комбинациями GT+CT и GG+CT не выявлено.

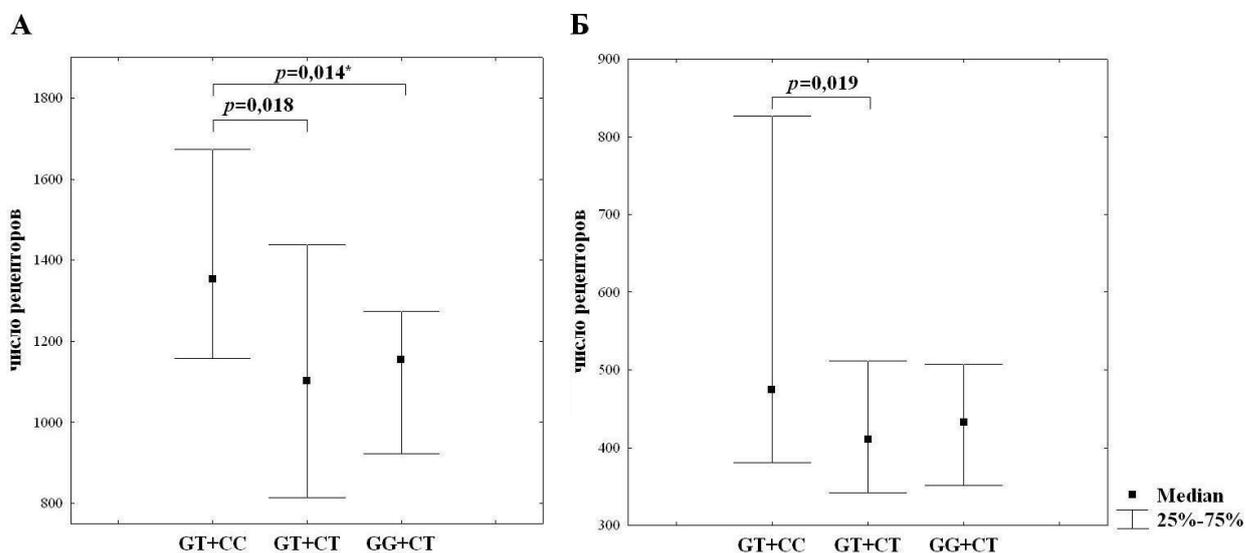


Рисунок 10 – Ассоциация комбинаций генотипов полиморфных вариантов -609 G/T *TNFRSF1A* и -3609 C/T *TNFRSF1B* с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α (n=149). (А) Уровень мембраносвязанных форм рецепторов TNF α I типа на интактных CD19⁺ В-лимфоцитах у носителей разных комбинаций генотипов в точках -609 G/T

TNFRSF1A и -3609 C/T *TNFRSF1B*, Mann-Whitney U test: GT+CC vs GT+CT, $p=0,018$; GT+CC vs GG+CT, $p=0,014$. (Б) Уровень мембраносвязанных форм рецепторов TNF α I типа на интактных CD3⁺ Т-лимфоцитах у носителей разных комбинаций генотипов в точках -609 G/T *TNFRSF1A* и -3609 C/T *TNFRSF1B*, Mann-Whitney U test: GT+CC vs GT+CT, $p=0,019$.

Индивиды с комбинацией генотипов GT+CC в позициях -609 G/T *TNFRSF1A* и -3609 C/T *TNFRSF1B* также характеризовались пониженным процентом клеток, несущих рецепторы TNFR2 в субпопуляциях CD3⁺ Т-лимфоцитов (Mann-Whitney U test: GT+CC vs GG+CT, $p=0,014$) (Рисунок 11).

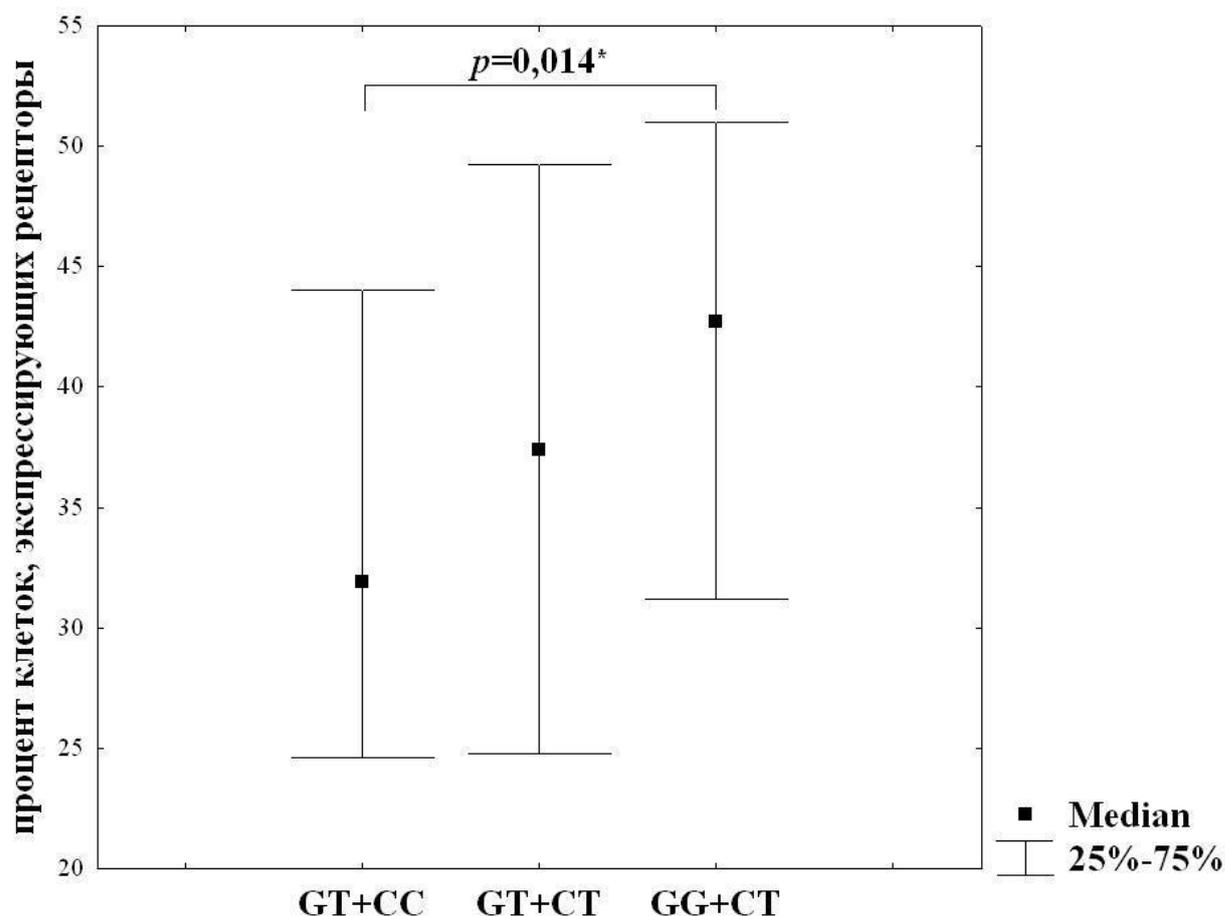


Рисунок 11 – Процент клеток, экспрессирующих мембраносвязанные рецепторы TNF α II типа на CD3⁺ Т-лимфоцитах у носителей разных комбинаций генотипов в точках -609 G/T *TNFRSF1A* и -3609 C/T *TNFRSF1B*, Mann-Whitney U test: GT+CC vs GG+CT, $p=0,014$.

Примечание: * статистически значимо после применения поправки Бонферрони. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

Таким образом, нами обнаружены ассоциации двух исследуемых полиморфных вариантов генов рецепторов TNF α с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов. Только для одного однонуклеотидного полиморфизма гена рецептора TNF α I типа установлена связь с уровнем растворимых рецепторов.

3.6 Ассоциация аллельных вариантов генов рецепторов IL1 с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов и сывороточным уровнем растворимых рецепторов

На следующем этапе было проведено исследование ассоциации аллельного полиморфизма генов рецепторов IL1 I и II типов с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов и сывороточным уровнем растворимых рецепторов. Известно, что полиморфные варианты генов *IL1R1* и *IL1R2* -1100 A/G, -12075 C/T, -1780 C/T и +6974 G/T расположены в промоторных областях и, соответственно, могут влиять на уровень экспрессии.

Статистически значимой связи между исследованными SNP и сывороточными уровнями растворимых рецепторов IL1 I и II типов нами не обнаружено. При исследовании ассоциации SNP A/G -1100 (rs3917225) промоторного участка гена *IL1R1* с уровнем экспрессии рецепторов IL1 установлено, что индивиды с генотипом GG характеризуются тенденцией к повышению числа мембраносвязанных IL1R1 на интактных CD14⁺ клетках, в отличие от индивидов с генотипом AA (Mann-Whitney *U* test, GG vs AA, $p=0,039$) (Рисунок 12).

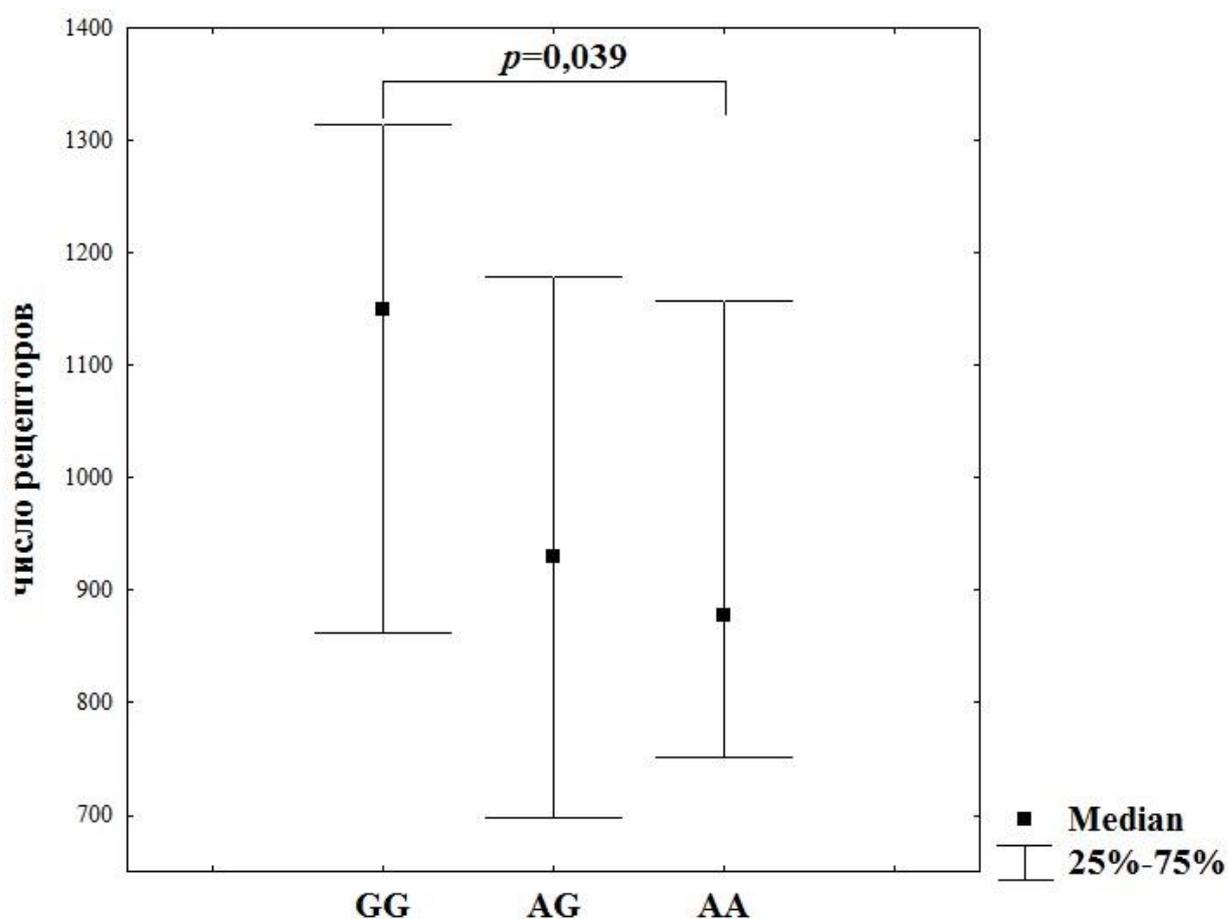


Рисунок 12 – Число мембраносвязанных рецепторов IL1 I типа на интактных CD14⁺ моноцитах у носителей разных генотипов в точке -1100 A/G гена *IL1R1* (n=147), Mann-Whitney *U* test: GG vs AA, $p=0,039$.

Примечание: Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

При анализе данных генотипирования SNP гена *IL1R1* C/T -12075 (rs2234650) установлено, что здоровые индивиды с генотипом TT в сравнении с носителями генотипа CT, характеризуются пониженным процентным содержанием клеток, экспрессирующих IL1R1 в популяциях интактных CD14⁺ моноцитов (Mann-Whitney *U* test, TT vs CT, $p=0,002$; Kruskal-Wallis, $p=0,017$) (Рисунок 13).

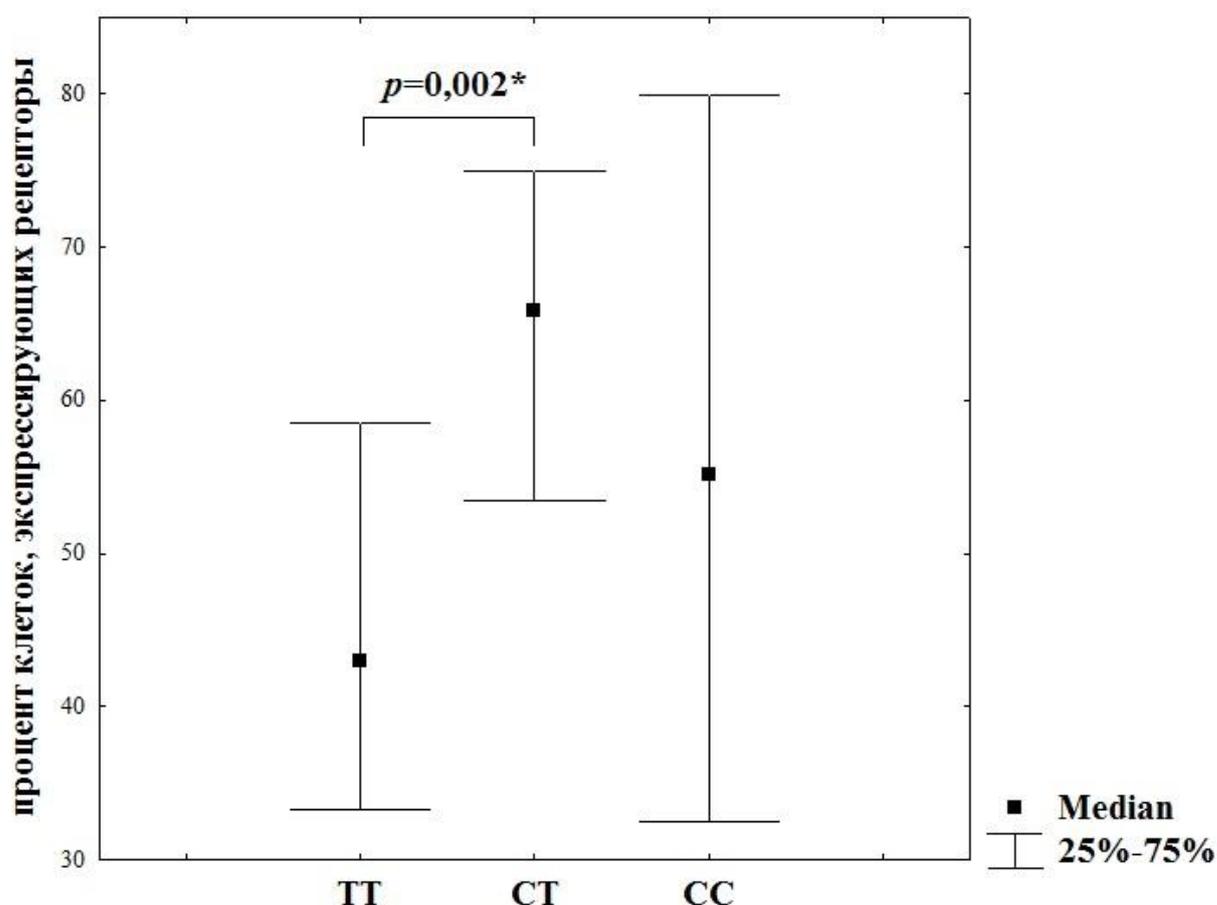


Рисунок 13 – Процентное содержание интактных $CD14^+$ клеток, экспрессирующих IL1R1 у носителей разных генотипов в точке -12075 C/T гена *IL1R1* (n=125), Mann-Whitney *U* test: TT vs CT, $p=0,002$.

Примечание: * статистически значимо после применения поправки Бонферрони. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

Также здоровые индивиды с генотипом TT в точке -12075 *IL1R1* в сравнении с носителями генотипа CT, характеризуются наличием тенденции к понижению процентного содержания клеток, экспрессирующих IL1R1 в популяциях $CD14^+$ моноцитов спонтанной культуры МНК (Mann-Whitney *U* test: TT vs CT, $p=0,019$) (Рисунок 14А) и в субпопуляции интактных $CD19^+$ В-лимфоцитов (Mann-Whitney *U* test, TT vs CT, $p=0,048$) (Рисунок 14Б).

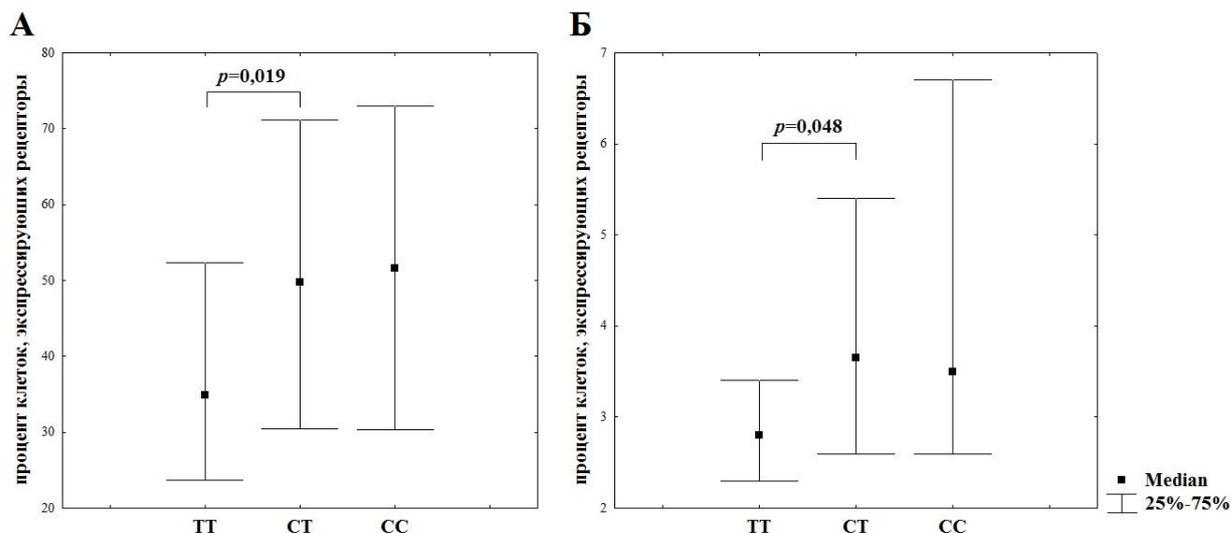


Рисунок 14 – Ассоциация полиморфного варианта -12075 C/T гена *IL1R1* с уровнем экспрессии мембраносвязанных IL1R1 (n=125). (А) Процентное содержание CD14⁺ моноцитов, экспрессирующих мембраносвязанные рецепторы IL1R1 в спонтанной культуре МНК у носителей разных генотипов в точке -12075 C/T гена *IL1R1*, Mann-Whitney *U* test: TT vs CT, $p=0,019$. (Б) Процентное содержание интактных CD19⁺ клеток, экспрессирующих IL1R1 у носителей разных генотипов в точке -12075 C/T гена *IL1R1*, Mann-Whitney *U* test: TT vs CT, $p=0,048$.

Примечание: Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

Гомозиготные носители аллеля С в точке -12075 C/T гена *IL1R1* характеризовались тенденцией к повышению числа IL1R1 на интактных CD14⁺ клетках, в сравнении с гетерозиготными носителями СТ (Mann-Whitney *U* test, CC vs CT, $p=0,023$) (Рисунок 15).

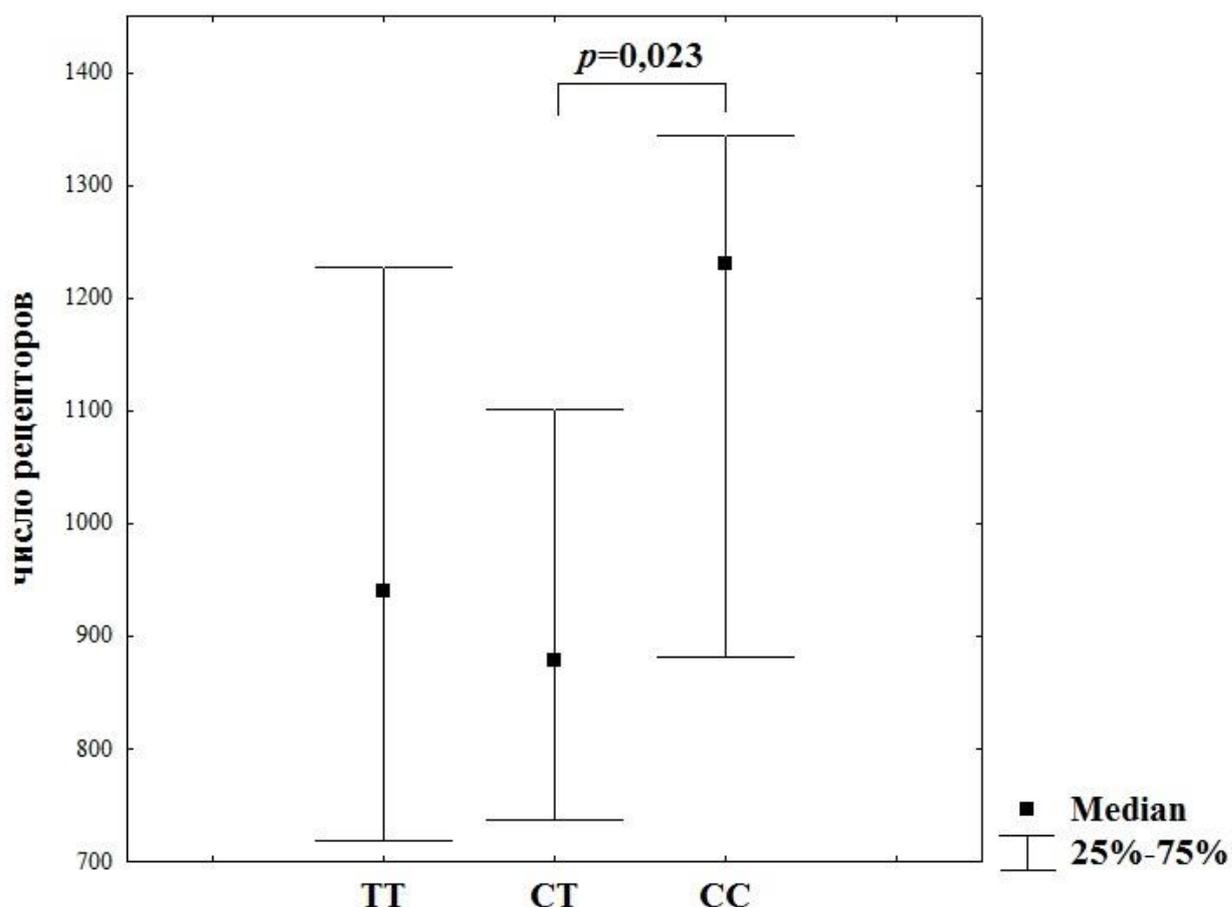


Рисунок 15 – Число мембраносвязанных IL1R1 на интактных CD14⁺ моноцитах у носителей разных генотипов у носителей разных генотипов в точке -12075 C/T гена *IL1R1* (n=125), Mann-Whitney *U* test: CC vs CT, $p=0,023$. Примечание: Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

При исследовании ассоциации между процентным содержанием клеток, экспрессирующих IL1R2 и полиморфными вариантами в SNP промотора гена *IL1R2* -1780 T/C (rs4141134) установлено, что индивиды с генотипом CC характеризуются повышенным процентным содержанием клеток, экспрессирующих IL1R2 в субпопуляции интактных CD3⁺ T-клеток (Mann-Whitney *U* test, CC vs TT, $p=0,0005$; CC vs TC, $p=0,035$; Kruskal-Wallis test, $p=0,006$) (Рисунок 16А). Кроме того, индивиды гомозиготные по аллелю С имели тенденцию к повышению процента интактных CD14⁺ моноцитов,

экспрессирующих рецепторы IL1R2 (Mann-Whitney *U* test, CC vs TT, $p=0,022$) (Рисунок 16Б).

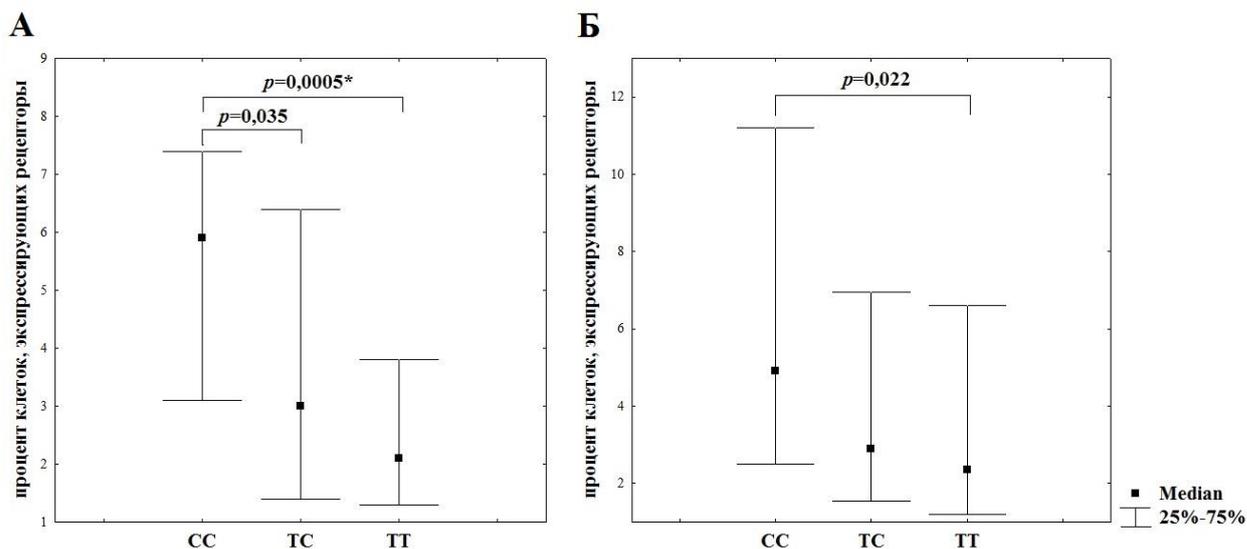


Рис. 16 – Ассоциация полиморфного варианта -1780 Т/С гена *IL1R2* с уровнем экспрессии мембраносвязанных IL1R2 ($n=149$). (А) Процентное содержание интактных CD3⁺ клеток, экспрессирующих IL1R2 у носителей разных генотипов в точке -1780 Т/С гена *IL1R2*, Mann-Whitney *U* test: CC vs TC, $p=0,035$; CC vs TT, $p=0,0005$. (Б) Процентное содержание интактных CD14⁺ клеток, экспрессирующих IL1R2 у носителей разных генотипов в точке SNP -1780 Т/С гена *IL1R2*, Mann-Whitney *U* test: CC vs TT, $p=0,022$.

Примечание: * статистически значимо после применения поправки Бонферрони. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

Исследование данных по количеству рецепторов IL1 и данных генотипирования показало, что здоровые индивиды с генотипом CC в rs4141134 характеризуются пониженной плотностью IL1R2 на CD14⁺ моноцитах стимулированной культуры МНК (Mann-Whitney *U* test, CC vs TT, $p=0,008$; CC vs TC, $p=0,0002$; Kruskal-Wallis test, $p=0,001$) (Рисунок 17А), а также имеют менее выраженный индекс стимуляции экспрессии IL1R2 на CD14⁺ моноцитах при культивировании в присутствии ЛПС (Mann-Whitney

U test, CC vs TC, $p=0,002$; CC vs TT, $p=0,028$; Kruskal-Wallis test, $p=0,006$) (Рисунок 17Б). Индекс стимуляции ЛПС был рассчитан как простое отношение числа мембраносвязанных IL1R2 на CD14⁺ клетках в культурах с и без ЛПС стимуляции.

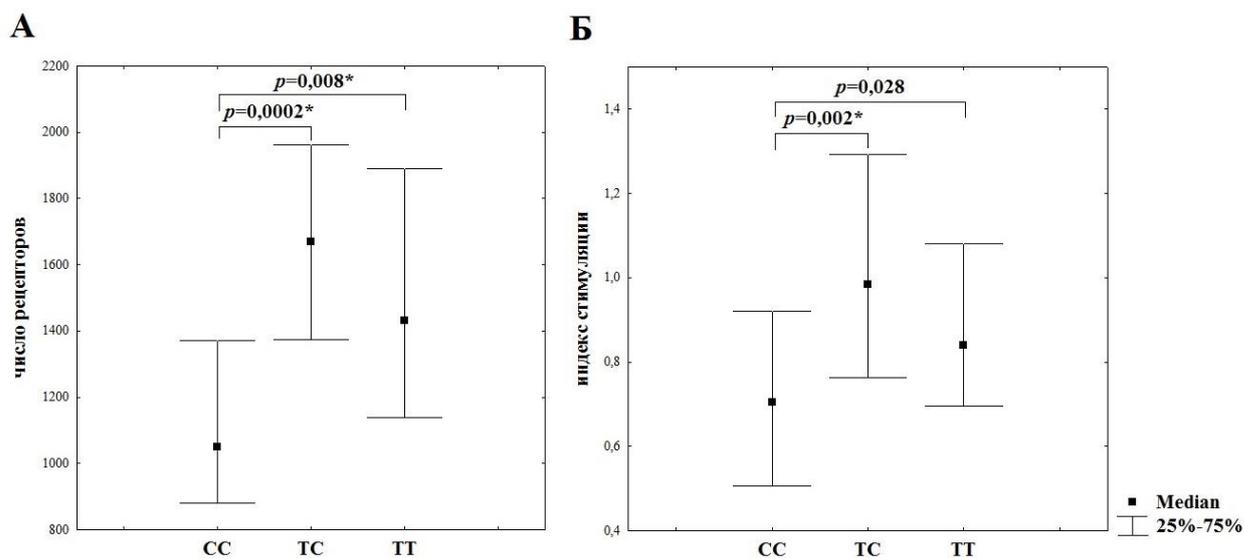


Рисунок 17 – Ассоциация полиморфного варианта -1780 Т/С гена *IL1R2* с уровнем экспрессии мембраносвязанных IL1R2 (n=149). (А) Число мембраносвязанных рецепторов IL1 II типа на CD14⁺ моноцитах в ЛПС-стимулированной культуре МНК у носителей разных генотипов в точке -1780 Т/С гена *IL1R2*, Mann-Whitney *U* test: CC vs TT, $p=0,008$; CC vs TC, $p=0,0002$. (Б) Индекс стимуляции экспрессии IL1R2 при культивировании в присутствии ЛПС у носителей разных генотипов в SNP -1780 Т/С гена *IL1R2*, Mann-Whitney *U* test: CC vs TT, $p=0,028$; CC vs TC, $p=0,002$. Индекс стимуляции ЛПС был рассчитан как простое отношение числа мембраносвязанных IL1R2 на CD14⁺ клетках в культурах с и без ЛПС стимуляции.

Примечание: * статистически значимо после применения поправки Бонферрони. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

Исследование ассоциации SNP гена *IL1R2* +6974 T/G (rs2071008) выявило ассоциацию генотипа с уровнем экспрессии мембраносвязанных *IL1R2*. Индивиды с генотипом TT характеризовались пониженным числом мембраносвязанных рецепторов *IL1* II типа на CD14⁺ моноцитах ЛПС-стимулированной культуры МНК, в отличие от индивидов с генотипом TG (Mann-Whitney *U* test, TT vs TG, $p=0,007$; Kruskal-Wallis test, $p=0,032$) (Рисунок 18). Частота генотипа GG составила всего 2,1%, вследствие этого, учет результатов по различию индивидов с данным генотипом с уровнем экспрессии рецепторов *IL1* не проводился.

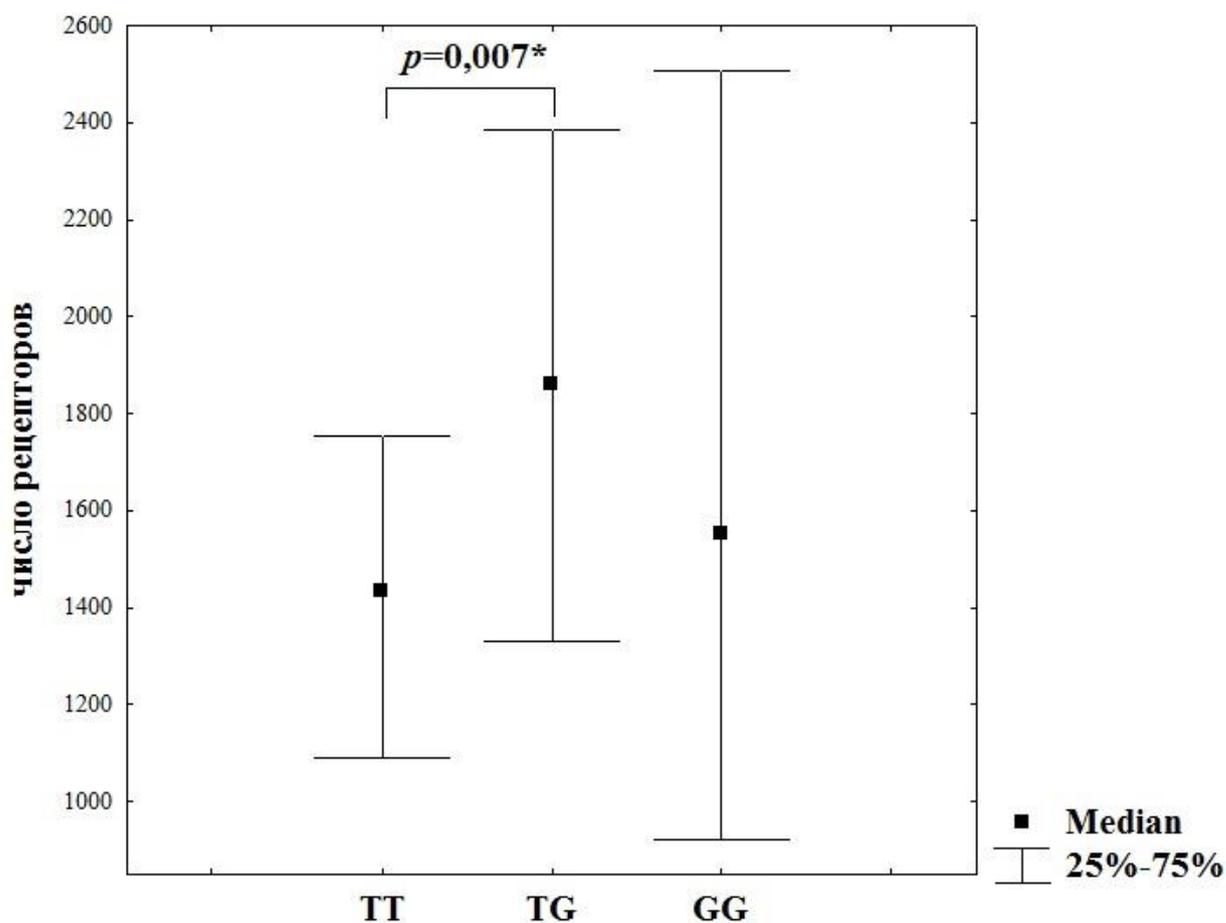


Рисунок 18 – Число мембраносвязанных рецепторов *IL1* II типа на CD14⁺ моноцитах в ЛПС-стимулированной культуре МНК у носителей разных генотипов в точке +6974 T/G гена *IL1R2* (n=145), Mann-Whitney *U* test: TT vs TG, $p=0,007$.

Примечание: * статистически значимо после применения поправки Бонферрони. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

При проведении анализа ассоциации комбинаций генотипов исследуемых полиморфных вариантов генов рецепторов IL1 с уровнем экспрессии рецепторов достоверных различий не выявлено.

Таким образом, нами обнаружены ассоциации полиморфных вариантов генов рецепторов IL1 I и II типа с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов. Ни для одного из исследуемых однонуклеотидных полиморфизмов генов рецепторов IL1 не установлено связи с уровнем растворимых рецепторов IL1.

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Стандартные методы оценки экспрессии поверхностных маркеров по процентному содержанию позитивных клеток и по показателям интенсивности флуоресценции представляются недостаточно информативными. В свете имеющихся литературных данных о том, что от плотности экспрессируемых рецепторов может зависеть функциональный ответ этой клетки на лиганд [Reynes et al. 2000; Gudypati et al. 2001; Besschetnova et al. 2008; Moraga et al. 2009], исследование среднего числа рецепторов на клетке является необходимым для получения более полной информации об уровне экспрессии мембраносвязанных рецепторов.

Существует несколько вариантов методов определения уровня экспрессии мембраносвязанных структур на поверхности клеток, наиболее часто применяемым является использование калибровочных частиц с известным содержанием флуорохромов [D'hautcourt 2000; Rossmann et al. 2007], а также описан метод, основанный на кинетике реакции связывания антител с рецептором [Orlova et al. 2011]. В нашей работе использовался метод, проводимый с использованием коммерческих калибровочных бус BD QuantiBRITE PE на проточном цитофлуориметре [Pannu et al. 2001; Wang et al. 2011; Jasper et al. 2011]. Данный подход имеет свои преимущества и недостатки. Основными преимуществами данной методики является то, что метод информативен, прост в выполнении, расчете, легко воспроизводим. Основным недостатком, ограничивающим использование данного метода, является то, что определение плотности экспрессии поверхностных антигенов возможно лишь при условии использования PE-меченых антител, поскольку у производителя не представлено иных вариантов калибровочных бус.

В настоящей работе нами был оптимизирован протокол пробоподготовки для изучения абсолютного количества рецепторов TNF α и

IL1 методом проточной цитофлуориметрии с использованием калибровочных частиц BD QuantiBRITE PE. Для получения наилучших показателей стабильности и воспроизводимости эксперимента нами были подобраны оптимальные условия температурного режима, подобрано время инкубации, количество отмывок. Путем титрования была определена концентрация антител, необходимая для насыщения. Для снижения неспецифического связывания с Fc-фрагментами на поверхности клеток были подобраны условия блокировки: температура инкубации, условия инкубации, концентрация IgG.

Данный метод позволил провести количественную оценку экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1 на различных субпопуляциях мононуклеарных клеток периферической крови условно здоровых доноров. При анализе экспрессии рецепторов TNF α и IL1 в субпопуляциях CD3⁺ Т-лимфоцитов, CD19⁺ В-лимфоцитов и CD14⁺ моноцитов, были выявлены количественные различия как по проценту клеток, несущих данные рецепторы, так и по числу рецепторов на клетках. Можно предположить, что в зависимости от данных значений, различные субпопуляции клеток будут иметь разную степень реагирования на цитокины TNF α и IL1. Вероятно, что при большей плотности рецепторов и большем проценте клеток, экспрессирующих данные рецепторы, эффекты TNF α и IL1 на данные клетки будут более выраженными.

На основании полученных результатов по изучению уровня экспрессии рецепторов TNF α и IL1 на различных субпопуляциях иммунокомпетентных клеток условно здоровых индивидов можно прийти к заключению, что повышение процентного содержания клеток, экспрессирующих данные рецепторы не во всех случаях сопряжено с повышением абсолютного числа рецепторов на клетках.

Так, например, субпопуляция CD19⁺ В-лимфоцитов с наименьшим процентом клеток, несущих рецепторы TNF α I типа характеризовалась

наибольшим количеством экспрессируемых рецепторов, а на субпопуляции $CD3^+$ Т-лимфоцитов, наоборот, обнаруживался наибольший процент клеток, экспрессирующих рецепторы $TNF\alpha$ II типа, и при этом наименьшая плотность данных рецепторов. Сравнение анализируемых субпопуляций моноклеарных клеток показало, что в популяции $CD14^+$ моноцитов наблюдается наибольший процент $IL1R1^+$ позитивных клеток, но при этом наименьшее число $IL1R1$ на клетку. А в субпопуляции $CD3^+$ Т-лимфоцитов выявлена наименьшая плотность $IL1R2$, но при этом не наблюдается различия по проценту клеток, экспрессирующих $IL1R2$ в $CD14^+$, $CD3^+$ и $CD19^+$ субпопуляциях.

Известно, что $IL1R1$, в отличие от рецептора-«ловушки» $IL1R2$, является рецептором способным передавать сигналы, и тем самым обуславливать биологические эффекты $IL1$ [Stylianou et al. 1992; Colotta et al. 1993; Sims et al. 1993; Dinarello 2013]. И соответственно, можно предполагать, что функциональный ответ популяции клеток на $IL1$ будет зависеть от баланса $IL1R1$ и $IL1R2$. При исследовании интактных субпопуляций моноклеарных клеток было установлено, что в популяции $CD14^+$ моноцитов, процент $IL1R1^+$ позитивных клеток был в 20 раз больше процента $IL1R2^+$ позитивных клеток, но при этом по числу $IL1R1$ и $IL1R2$ на $CD14^+$ клетках наблюдались лишь незначительные различия. На субпопуляции $CD3^+$ Т-клеток был установлен трехкратный и двукратный перевес $IL1R1$ над $IL1R2$ по проценту клеток, экспрессирующих рецепторы и по количеству рецепторов на клетках, соответственно.

На следующем этапе исследования оценивалась экспрессия рецепторов на $CD14^+$ моноцитах в культуре МНК человека, для более подробного изучения изменений в системах рецепторов $TNF\alpha$ и $IL1$ в условиях смоделированной ситуации активации провоспалительных реакций. Выбор для исследования популяции моноцитов обусловлен тем, что в данной популяции отмечался как наибольший процент $TNFR^+$ и $IL1R^+$ позитивных

клеток, так и наибольшее количество рецепторов, в сравнении с субпопуляциями Т- и В-лимфоцитов. Также в данной популяции был обнаружен наименьший разброс значений.

Ранее, были проведены исследования, в которых было установлено, что при культивировании с ЛПС через 24 часа отмечается значительное усиление экспрессии рецепторов TNF α I и II типов, определяемое по MFI, в популяциях CD14⁺ моноцитов [Leeuwenberg et al. 1994]. В нашем исследовании установлено, что при стимуляции ЛПС в популяции моноцитов происходит значительное повышение процента клеток, экспрессирующих рецепторы TNF α II типа и количества данных рецепторов на одну клетку, тогда как для рецептора TNF α I типа показано только значимое повышение числа рецепторов. Таким образом, стимуляция ЛПС культуры МНК условно здоровых индивидов оказывает более выраженный эффект на экспрессию рецепторов TNF α II типа.

Также в ходе данной работы было проведено изучение изменения уровня экспрессии IL1R1 и IL1R2 при стимуляции ЛПС. В работе Saccani с соавт. [1998] и Penton-Rol с соавт. [1999] было установлено, что при культивировании с ЛПС в моноцитах отмечается увеличение уровня мРНК IL1R1 и снижение уровня мРНК IL1R2. В настоящей работе получены данные согласующиеся с этими исследованиями. При сравнении экспрессии IL1R1 на CD14⁺ моноцитах спонтанной и ЛПС-стимулированной культуры МНК выявлено увеличение в популяции CD14⁺ моноцитов процента IL1R1⁺ позитивных клеток и количества IL1R1 на CD14⁺ моноцитах. При изучении экспрессии рецептора IL1 II типа при стимуляции ЛПС выявлено значимое снижение процента IL1R2⁺ позитивных CD14⁺ моноцитов и среднего числа IL1R2 на CD14⁺ клетках.

Кроме того, обнаружены различия в уровне экспрессии рецепторов TNF α и IL1 между интактными и не стимулированными CD14⁺ клетками. При сравнении интактных CD14⁺ моноцитов и CD14⁺ моноцитов,

культивированных в течение 24 часов, отмечается схожее увеличение числа IL1R1 и IL1R2 приблизительно на 600 рецепторов. При этом происходит снижение процента IL1R1⁺ клеток и повышение процента IL1R2⁺ клеток. Для рецепторов TNF α показано повышение процента клеток, экспрессирующих рецепторы TNFR2, и среднего числа обоих типов рецепторов. По всей видимости, данные изменения в уровне экспрессии рецепторов TNF α и IL1 обусловлены изменением микроокружения при культивировании.

В ходе данного исследования был проведен корреляционный анализ в системах рецепторов TNF α и IL1. В литературных данных имеются достаточно противоречивые сведения по корреляции TNF α с его растворимыми рецепторами. Так, в исследовании Spinas с соавт. [1992] была установлена корреляция между уровнями TNF α и sTNFR1, но не выявлено корреляции с sTNFR2. А в работе Koga с соавт. [2000] была установлена корреляция между TNF α и sTNFR2, но не выявлено корреляции TNF α с sTNFR1. В нашем исследовании установлено, что сывороточный уровень TNF α положительно коррелирует с уровнем sTNFR1 в сыворотке крови здоровых индивидов. Уровень TNF α также связан отрицательной корреляцией с уровнем мембраносвязанных TNFR1 на клетках, что согласуется с имеющимися литературными данными о том, что TNF α понижает число мРНК рецепторов TNF α I типа [Winzen et al. 1993]. Сывороточный уровень sIL1R2 отрицательно коррелировал с количеством мембраносвязанных рецепторов IL1 II типа на интактных Т-лимфоцитах. По-видимому, данная корреляция связана с протеолитическим слущиванием мембраносвязанных рецепторов от мембраны клетки. Наличие отрицательной корреляции между содержанием растворимых рецепторов IL1 II типа с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов данного типа на Т-лимфоцитах, может свидетельствовать о различном вкладе субпопуляций в образование растворимых форм рецепторов.

Кроме того, были выявлены значимые корреляционные зависимости между уровнями рецепторов на CD14⁺ моноцитах спонтанной и ЛПС-стимулированной культурах МНК. Положительная корреляция была установлена между процентом CD14⁺ клеток, экспрессирующих TNFR2 и числом TNFR2 на CD14⁺ моноцитах. Вероятно, данная корреляция связана с тем, что при поликлональной активации происходит увеличение как процента CD14⁺TNFR2⁺ клеток, так и количества рецепторов на моноцитах.

Таким образом, нами установлены различия в уровне экспрессии мембраносвязанных рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 на иммунокомпетентных клетках. Известно, что различия в уровне экспрессии могут быть обусловлены генетическим полиморфизмом.

Генетический полиморфизм играет важную роль в определении индивидуальных особенностей иммунного ответа путем влияния на формирование полиморфности цитокиновой сети. При исследовании полиморфизма генов цитокинов и их рецепторов были установлены связи определенных SNP («биомаркеры») с риском развития, тяжестью течения и исходом различных мультифакториальных заболеваний [Hollegaard and Bidwell 2006; Smith and Humphries 2009]. При этом было выявлено, что аллельные варианты генов цитокинов и их рецепторов оказывают влияние на продукцию и функциональную активность белков цитокиновой сети опосредовано через изменение функциональных сайтов, контролирующих транскрипцию, созревание и транспортировку соответствующих мРНК [Shastry 2009; Fareed and Afzal 2013].

Были изучены частоты аллелей и распределение генотипов полиморфных точек SNP генов рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 у здоровых индивидов г. Новосибирска. При сравнении распределения частот аллелей и генотипов исследованных SNP с другими популяциями из базы данных NCBI dbSNP, было установлено, что частоты аллелей и генотипов для полиморфных точек *TNFRSF1A* -609 G/T и *IL1R1* -12075 C/T больше

характерны для азиатских популяций. Данные распространенности аллелей и генотипов полиморфных вариантов *TNFRSF1B* -1709 A/T, *TNFRSF1B* -3609 C/T, *IL1R2* -1780 T/C и *IL1R2* +6974 T/G соответствовали данным, полученным в европейских популяциях. В исследуемой нами выборке частота минорных аллелей однонуклеотидных полиморфизмов *TNFRSF1A* -1207 G/C и *IL1R1* -1100 A/G оказалась выше, чем в европейских популяциях, и ниже, чем в популяциях Азии. По-видимому, полученные результаты (промежуточное место между Европой и Азией) по частоте аллелей и распределению генотипов исследованных SNP обусловлены своеобразием генофонда ее населения.

Известно, что исследованные нами SNP расположены в промоторных участках генов рецепторов I и II типов для TNF α и IL1, и, следовательно, могут влиять на уровень экспрессии рецепторов. В промоторной области генов семейства TNFR располагается значительное количество регуляторных полиморфизмов, которые могут оказывать влияние на уровень экспрессии [Kim et al. 2005]. В литературе представлен ряд работ по изучению связи полиморфного варианта гена *TNFRSF1A* -609 G/T с различной патологией. Так, аллель T был ассоциирован с риском развития системной красной волчанки [Miyagawa et al. 2008] и ухудшал прогноз течения заболевания у больных раком легких [Lee et al. 2010] и неходжскинской лимфомой [Heemann et al. 2012], но при этом играл защитную роль при раке ротовой полости [Gupta et al. 2008], снижал риски развития рака кишечника [Slattery et al. 2011] и инвазивного легочного аспергиллёза [Sainz et al. 2010]. В работе Kim с соавт. [2008] было установлено, что однонуклеотидный полиморфизм *TNFRSF1A* -609 G/T ассоциирован с гепатоцеллюлярной карциномой и что аллель T ответственен за пониженную экспрессию рецепторов TNF α I типа. В нашей работе установлено, что гомозиготные носители аллеля T в точке -609 G/T промотора гена рецептора *TNFRSF1A* характеризуются пониженным сывороточным уровнем растворимых рецепторов TNF α I типа. Известно, что

растворимые рецепторы являются ингибиторами биологических эффектов TNF α [Engelmann et al. 1989]. Соответственно, чем их меньше, тем ниже конкуренция за связывание медиатора с мембраносвязанными рецепторами для передачи сигналов в клетку. Также у индивидов с генотипом TT была выявлена тенденция к снижению количества мембраносвязанных рецепторов TNFR1 на интактных CD19⁺ В-клетках. Учитывая, что растворимые рецепторы TNF α I типа образуются путем протеолитического отщепления от мембраносвязанных рецепторов TNF α [Lantz et al. 1990; Hwang et al. 1993], можно сделать заключение, что меньшее количество растворимых рецепторов TNFR1 у индивидов с генотипом TT определено меньшей экспрессией рецепторов TNF α I типа на клетках. А меньшая экспрессия рецепторов TNF α в свою очередь, вероятно, вызвана тем, что G аллель участвует в образовании сайта связывания транскрипционного фактора IRF8 (interferon regulatory factor 8), вовлеченного в TNFR1-обусловленную активацию NF κ B сигнального пути [Sainz et al. 2010].

В исследовании, проведенном Miyagawa с соавт. [2008] было показано, что частоты аллеля С в точке гена *TNFRSF1A* -1207 G/C у больных системной красной волчанкой статистически значимо выше, чем у здоровых индивидов. В нашем исследовании, установлено, что носители генотипа CC в точке гена *TNFRSF1A* -1207 G/C, характеризуются меньшей плотностью рецепторов TNF α I типа на интактных CD14⁺ моноцитах. С помощью программы TRANSFAC («BIOBASE Biological Database», Германия) [Wingender 2008] и AliBaba2.1 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>) было обнаружено, что в данном SNP при наличии аллеля С предполагается отсутствие сайтов связывания с факторами транскрипции, а при наличии аллеля G в последовательности, возможно связывание с факторами транскрипции – C/EBP α , AP-2 α и Sp1. C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein alpha) понижает способность к клеточной пролиферации посредством ингибирования циклин-зависимых киназ 2 и 4 (CDK2, CDK4)

[Wang et al. 2001]. AP-2 alpha (Activating enhancer binding Protein 2 alpha) и Sp1 (Specificity protein 1) – белки с молекулярными массами 52 кДа и 81 кДа, участвующие в регуляции многих клеточных процессов, включая рост и дифференцировку, апоптоз и др. [Shi et al. 2014; Chu and Ferro 2005]. Возможно, что разница в экспрессии поверхностных TNFR1 на клетках у индивидов с разными генотипами связана с одним из этих факторов транскрипции.

В литературных данных встречается ряд работ по изучению связи полиморфизма -1709 гена *TNFRSF1A* с определенной патологией [Potter et al. 2010; Guan et al. 2011]. В работе Steenholdt с соавт. [2012], было установлено, что носительство аллеля А в позиции -1709 А/Т гена *TNFRSF1B* повышает риск развития осложнений при инъекции инфликсимабом. В исследовании Шкаруба с соавт. [2012] было показано, что комбинация генотипов *TNFRSF1A* -609 GT + *TNFRSF1B* -3609 CC у больных ревматоидным артритом встречается статистически значимо меньше, чем у здоровых индивидов.

В настоящей работе не обнаружено ассоциации между исследуемым однонуклеотидным полиморфизмом в позиции -1709 А/Т (rs652625) промотора гена *TNFRSF1B* с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов и сывороточным уровнем растворимых рецепторов sTNFR2.

Индивиды, гомозиготные по аллелю С в позиции -3609 С/Т промотора гена рецептора TNF α II типа, имели наименьшее процентное содержание CD14⁺ клеток, экспрессирующих рецепторы TNFR2. Биологические эффекты TNF α реализуются путем взаимодействия с двумя типами мембраносвязанных рецепторов – TNFR1 и TNFR2. Известно, что TNFR2 при одновременной экспрессии с TNFR1 способен индуцировать деградацию адаптерного белка TRAF2 и тем самым приводить к усилению цитотоксичности TNFR1 [Fotin-Mleczek et al. 2002; Cabal-Hierro and Lazo 2012]. Таким образом, можно предполагать, что от баланса рецепторов

TNFR1 и TNFR2 в конечном счете будет зависеть дальнейшая судьба клетки. Вероятно, что на субпопуляциях с большим процентным содержанием клеток, экспрессирующих TNFR2, анти-апоптотические сигналы будут находиться на меньшем уровне, и, следовательно, клетки будут больше предрасположены к гибели.

В литературе встречается ряд работ по изучению SNP промотора гена *IL1R1* -1100 A/G. В исследовании Näkki с соавт. [2010] было показано, что данный полиморфный вариант ассоциирован с тяжестью протекания остеоартрита. Одним из наиболее изученных полиморфизмов гена *IL1R1* является SNP -12075 C/T [Cinek et al. 2004; Ravindran et al. 2004; D'Amora et al. 2006; Rodrigo et al. 2007; Rezaei et al. 2009; Khalilzadeh et al. 2009; Ribizzi et al. 2010; Schulz et al. 2014]. Была обнаружена ассоциация данного полиморфного варианта с сахарным диабетом [Bergholdt et al. 1995; Metcalfe et al. 1996], прогрессией синдрома приобретенного иммунодефицита [Do et al. 2006] и астмой [Mahdavian et al. 2009]. В исследовании Mahmoudi с соавт. [2014] было показано, что у носителей аллеля С в данном SNP риск развития анкилозирующего спондилоартрита в 2 раза выше, нежели у индивидов, гомозиготных по аллелю Т.

В настоящей работе установлено, что индивиды с генотипом GG в -1100 A/G и CC в -12075 C/T гена *IL1R1* характеризуются повышенным числом мембраносвязанных IL1R1 на интактных CD14⁺ клетках. Известно что, активность медиаторов может зависеть от плотности рецепторов на клетках [Reynes et al. 2000; Gudypati et al. 2001; Moraga et al. 2009]. Таким образом, можно предполагать, что индивиды с данными генотипами будут более подвержены действию медиатора IL1, в виду повышенной экспрессии сигнального рецептора IL1 I типа. Кроме того, здоровые индивиды с гомозиготным вариантом генотипа TT в SNP гена *IL1R1* C/T -12075 имели пониженный процент клеток, экспрессирующих IL1R1 как на интактной популяции CD14⁺ моноцитов, так и в популяции CD14⁺ моноцитов

спонтанной культуры МНК. Полученные данные свидетельствуют о том, что аллель Т ассоциирован с низкой экспрессией мембраносвязанных IL1R1 на популяции CD14⁺ клеток. В связи с этим, можно предполагать, что индивиды с генотипом ТТ будут характеризоваться пониженным функциональным ответом моноцитов на медиатор IL1.

Полиморфизмы гена *IL1R2* до сих пор остаются менее изученными. В нашей работе были исследованы два полиморфных варианта промоторной области гена *IL1R2* -1780 Т/С и +6974 Т/Г (локализуется в альтернативном промоторе). Индивиды с генотипом СС в -1780 Т/С характеризовались повышенным процентным содержанием CD3⁺ и CD14⁺ клеток, экспрессирующих мембраносвязанные IL1R2. Процентное содержание клеток, несущих на своей поверхности специфичные рецепторы может предопределять степень реализации эффектов медиатора. Вероятно, что при повышенном проценте клеток, экспрессирующих рецепторы, клеточные популяции будут более чувствительны к действию медиатора. Но, в данном случае, повышенный процент IL1R2⁺ позитивных клеток будет оказывать обратный эффект, т.е. блокировать передачу сигнала в клетку, путем повышения конкуренции с IL1R1 за связывание с медиатором IL1 и с IL1RAcP [Lang et al. 1998]. Таким образом, при повышенном процентном содержании клеток, экспрессирующих рецепторы-«ловушки» IL1R2, можно предполагать о лимитировании эффектов IL1 на данных субпопуляциях.

Здоровые индивиды с генотипом СС в *IL1R2* -1780 Т/С и ТТ в *IL1R2* +6974 Т/Г имели пониженное число мембраносвязанных IL1R2 на CD14⁺ клетках в ЛПС-стимулированной культуре МНК. Известно, что ЛПС усиливает выработку цитокина IL1 β [Cavaillon et al. 1989]. Исходя из этого, можно предполагать, что индивиды, гомозиготные по аллелю С в *IL1R2* -1780 Т/С и аллелю Т в *IL1R2* +6974 Т/Г будут иметь более выраженные эффекты в ответ на стимуляцию с ЛПС за счет пониженного числа рецепторов-«ловушек» на поверхности CD14⁺ моноцитов. Также возможно,

что аллель Т в *IL1R2* -1780 Т/С обладает большим потенциалом стимуляции экспрессии рецепторов IL1 II типа. С помощью программ TRANSFAC и AliBaba2.1 была определена возможность связывания с транскрипционными факторами при наличии в последовательности определенного аллеля. Последовательность промотора, содержащая аллель С в полиморфном варианте -12075 С/Т может связаться с YY1, а Т-содержащая последовательность с AP-1. YY1 (Yin Yang 1) является убиквитарным и многофункциональным транскрипционным фактором (с доменами типа «цинковые пальцы»), взаимодействующим с гистоновыми ацетилтрансферазами и деацетилазами, и вовлеченным в процессы воспаления и туморогенеза [Gordon et al. 2006]. YY1 повышает уровень экспрессии циклооксигеназы-2 и уровень продукции простагландина D2 после введения ЛПС [Joo et al. 2007]. AP-1 (Activating protein 1) – димерный транскрипционный фактор, вовлеченный в регуляцию множества клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку, рост, воспаление, апоптоз, миграцию клеток и т.д.[Hess et al. 2004]. Наличие аллеля G в точке +6974 Т/G предполагает возможность образования сайта посадки транскрипционного фактора TAF-1. TAF1 (TATA box binding protein (TBP)-associated factor subunit 1) – регуляторный белок размером 250 кДа, участвующий в процессах клеточного цикла и апоптоза [Wassarman and Sauer, 2001], обладающий протеин-киназной [Dikstein et al. 1996], ацетилтрансферазной [Mizzen et al. 1996] и убиквитин-лигазной активностью (E1/E2) [Pham and Sauer, 2000]. TAF1 модулирует транскрипционную активность белков c-Jun [Lively et al. 2001], Mdm2 [Allende-Vega et al. 2007] и циклин D1 [Kloet et al. 2012], известных своим влиянием на опухолевую прогрессию. Вероятно, что разница в экспрессии рецепторов связана со связыванием с данными факторами транскрипции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований были определены оптимальные протоколы оценки уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1 с помощью калибровочных частиц BD QuantiBRITE PE. Проведение исследования среднего количества мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1 по данным протоколам позволяет получать точные воспроизводимые данные, необходимые для информативной оценки уровня их экспрессии.

С использованием данных протоколов было исследовано количество мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1 на субпопуляциях мононуклеарных клеток условно здоровых индивидов. Данные о числе рецепторов представляются важными при оценке уровня их экспрессии, поскольку от плотности соответствующих рецепторов на поверхности клеток может зависеть эффективность клеточного ответа на соответствующий медиатор.

Установлены количественные различия в уровне экспрессии мембраносвязанных рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток здоровых индивидов. Различия были выявлены как по проценту клеток, несущих данные рецепторы, так и по количеству рецепторов на клетках. При исследовании экспрессии рецепторов TNF α на интактных субпопуляциях мононуклеарных клеток условно здоровых индивидов было установлено, что в субпопуляции CD3⁺ Т-лимфоцитов отмечается наименьший уровень экспрессии рецепторов TNF α I и II типа. Наибольший уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α I и II типа выявлен в субпопуляциях CD19⁺ В-лимфоцитов и CD14⁺ моноцитов, соответственно. При сравнении анализируемых субпопуляций мононуклеарных клеток, статистически значимо наименьшее среднее количество рецепторов IL1 I и II типов было выявлено в субпопуляциях

CD14⁺ моноцитов и CD3⁺ Т-лимфоцитов, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о различиях не только по числу клеток, экспрессирующих рецепторы I и II типов для TNF α и IL1, но и по количественной экспрессии мембраносвязанных форм рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 на субпопуляциях мононуклеарных клеток условно здоровых индивидов. Разница в уровне экспрессии рецепторов может обуславливать различия в функциональном ответе клеток на действие данных медиаторов.

Показано, что повышенный процент клеток, экспрессирующих рецепторы I и II типов для TNF α и IL1, не во всех случаях сопряжен с повышенным числом рецепторов на клетках, что может иметь значение для интерпретации экспериментальных данных.

Кроме того, получены нормативные значения уровня экспрессии рецепторов и относительного числа клеток, экспрессирующих мембраносвязанные формы рецепторов I и II типов для TNF α и IL1, на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток условно здоровых индивидов, которые позволят произвести оценку изменений этих показателей при различных иммунопатологических состояниях.

Также были выявлены различия в уровне экспрессии мембраносвязанных рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 при культивировании клеток с поликлональным активатором ЛПС. Показано, что стимуляция ЛПС культуры МНК условно здоровых индивидов оказывает более выраженный эффект на экспрессию рецепторов TNF α II типа и менее выраженный на экспрессию рецепторов TNF α I типа. Установлено, что при культивировании с ЛПС на моноцитах отмечается повышение уровня экспрессии рецепторов IL1 I типа и понижение уровня экспрессии рецепторов-«ловушек» IL1 II типа. Данные результаты свидетельствуют о разном влиянии ЛПС на уровень экспрессии рецепторов TNF α и IL1.

Определена частота встречаемости аллельных вариантов промоторов генов рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 у здоровых индивидов Юго-Западной Сибири. Установлено, что различия в уровне экспрессии рецепторов TNF α и IL1 также могут быть обусловлены однонуклеотидными полиморфизмами в промоторной области генов рецепторов TNF α и IL1. Связь полиморфных вариантов точек SNP -609 G/T, -1207 G/C и -3609 C/T промоторов генов рецепторов TNF α I и II типов установлена как с уровнем экспрессии мембраносвязанных форм рецепторов на субпопуляциях мононуклеарных клеток, так и с сывороточным содержанием растворимых рецепторов TNF α I типа. Связь полиморфных вариантов точек SNP -1100 A/G, -12075 C/T, -1780 C/T и +6974 G/T промоторов генов рецепторов IL1 I и II типов установлена с уровнем экспрессии мембраносвязанных форм рецепторов как на субпопуляциях интактных мононуклеарных клеток, так и в культуре МНК при стимуляции ЛПС. Ассоциация полиморфизмов промоторных участков генов *TNFRSF1A* и *IL1R1* -1207 G/C и -1100 A/G была установлена с уровнем экспрессии соответствующих мембраносвязанных рецепторов, но при этом не было установлено ассоциации с содержаниями растворимых рецепторов, что подтверждает наличие разных механизмов регуляции экспрессии рецепторов. Была установлена ассоциация между полиморфными вариантами *TNFRSF1A* -1207 C/T, *TNFRSF1B* -3609 C/T и *IL1R1* -1100 A/G и уровнем экспрессии соответствующих рецепторов на клетках моноцитарной популяции, но при этом не было установлено ассоциации с экспрессией рецепторов на субпопуляциях Т- и В-лимфоцитов, что свидетельствует о значимости данных полиморфизмов для отдельных субпопуляций мононуклеарных клеток.

На основании проведенных исследований можно заключить, что аллельный полиморфизм генов рецепторов TNF α и IL1 является одним из механизмов, влияющих на системы TNF α и IL1, оказывая эффект через формирование индивидуальной варибельности в экспрессии

мембраносвязанных рецепторов иммуномодулирующих цитокинов $\text{TNF}\alpha$ и IL1 .

ВЫВОДЫ

1. Субпопуляции мононуклеарных клеток условно здоровых индивидов различаются в числе клеток, экспрессирующих рецепторы TNF α и IL1, и в количестве этих рецепторов на клетках, при этом повышенное количество клеток, экспрессирующих рецепторы не всегда сопряжено с повышенным числом рецепторов на клетках.
2. Установлена ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов в позициях -1207 С/Т, -3609 С/Т промоторов генов рецепторов TNF α I и II типов и -1100 А/Г промотора гена рецептора IL1 I типа с экспрессией рецепторов на CD14⁺ моноцитах при отсутствии связи с экспрессией на субпопуляциях Т- и В-лимфоцитов, что свидетельствует о различном вкладе полиморфных вариантов в экспрессию рецепторов для разных типов клеток.
3. При стимуляции липополисахаридом культуры мононуклеарных клеток условно здоровых индивидов отмечается повышение количества сигнальных мембраносвязанных рецепторов IL1 I типа и понижение числа рецепторов-«ловушек» IL1 II типа на CD14⁺ моноцитах, что может свидетельствовать об ожидаемом усилении эффектов лиганда IL1 на CD14⁺ моноциты.
4. Установлено, что однонуклеотидные полиморфизмы промоторов генов *TNFRSF1A* -1207 G/C, *TNFRSF1B* -3609 С/Т, *IL1R1* -1100 А/Г, -12075 С/Т и *IL1R2* -1780 С/Т, +6974 G/Т ассоциированы с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1, что указывает на функциональную значимость этих полиморфизмов.
5. Однонуклеотидные полиморфизмы в позициях -1207 G/C промотора гена *TNFRSF1A* и -1100 А/Г промотора гена *IL1R1* ассоциированы с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов, но не ассоциированы с уровнем растворимых рецепторов, что подтверждает

наличие разных механизмов регуляции экспрессии этих форм рецепторов.

6. Генетический полиморфизм является одним из факторов, влияющих на уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 на субпопуляциях мононуклеарных клеток.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИФА – иммуноферментный анализ
- кДа – килодальтон
- кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЛПААГ – линейный полиакриламидный гель
- ЛПС – липополисахарид
- МНК – моноклеарные клетки периферической крови человека
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- п.о. – пар оснований
- ПГЕ₂ – простогландин Е₂
- ПДРФ – анализ полиморфизма длин рестрицированных фрагментов
- ПК – периферическая кровь
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат
- ФЭУ – фотоэлектронный умножитель
- А – аденин
- АРС – аллофикоцианин
- BSA – бычий сывороточный альбумин
- С – цитозин
- CD – кластер дифференцировки
- cIAP1 – клеточные ингибиторы апоптозных белков
- DD – домен «смерти»
- EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота
- FCS – эмбриональная бычья сыворотка
- FITC – флуоресцеин изотиоцианат
- FSC – прямое светорассеяние
- G – гуанин

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
IFN – интерферон
Ig – иммуноглобулин
IL – интерлейкин
IL1R – рецептор интерлейкина 1
IL1RA – рецепторный антагонист интерлейкина 1
IL1RAsP – добавочный белок рецептора интерлейкина 1
MFI – среднее значение интенсивности флуоресценции
NOS – синтаза оксида азота
PBS – фосфатно-солевой буфер
PE – фикоэритрин
PE-Cy7 – фикоэритрин с цианином 7
PLAD – дистальный домен внеклеточного участка рецептора
RCLB – буфер, лизирующий эритроциты
SDS – додецилсульфат натрия
sIL1R – растворимые рецепторы интерлейкина-1
SNP – однонуклеотидный полиморфизм
SSC – боковое светорассеяние
sTNFR – растворимые рецепторы фактора некроза опухоли
T – тимин
TAE – трис-ацетатный буфер
TGF β – трансформирующий ростовой фактор бета
TIR – домен Толл/рецептор интерлейкина 1
TNF – фактор некроза опухоли
TNFR – рецептор фактор некроза опухоли
TNFRSF1A – ген рецептора фактора некроза опухоли I типа
TNFRSF1B – ген рецептора фактора некроза опухоли II типа
TRAF – фактор, связанный с рецептором фактора некроза опухоли

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранов В.С. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины // СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. – 528 с.
2. Калькулятор для расчета статистики в исследованиях "случай-контроль" [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://gen-exr.ru/calculator_or.php. – Заглавие с экрана. – 15.04.2014.
3. Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., Шевченко А.В. Прогностическая значимость полиморфизма генов-регуляторов лимфангиогенеза в оценке состояния здоровья человека // Бюллетень Сибирского Отделения Российской Академии Медицинских Наук. – 2013. – Т. 33. – N. 6. – С. 51-59.
4. Коненков В.И., Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф. [и др.] Комплекс генотипов цитокинов как генетический фактор риска развития инфаркта миокарда у мужчин европеоидного населения России // Кардиология. – 2012. – Т. 52. – N. 7. – С. 22-29.
5. Лимборская С.А., Хуснутдинова Э.К., Балановская Е.В. Этногеномика и геногеография народов Восточной Европы // М.: Наука, 2002. – 281 с.
6. Сенников С.В., Силков А.Н., Козлов В.А. Аллельные варианты и изоформы цитокинов в диагностике и патогенезе иммунопатологических состояний // Иммунология. – 2002. – N. 4. – С. 243-250.
7. Силков А.Н., Сенникова Н.С., Горева Е.П. [и др.] Продукция TNF- α и IL1 β мононуклеарными клетками периферической крови у носителей разных аллельных вариантов генов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – N. 153. - С.68-71.
8. Хрипко О.П., Сенникова Н.С., Лопатникова Ю.А. [и др.] Аллельный полиморфизм гена ИЛ-18 и уровень его продукция мононуклеарными клетками здоровых доноров Юго-Западной Сибири // Вестник

- Уральской медицинской академической науки. – 2006. – N. 3. – С. 266-269.
9. Шкаруба Н.С., Васильев Ф.Ф., Силков А.Н. [и др.] Частота встречаемости аллельных вариантов генов TNFR1 в позициях -609 и -1207 и TNFR2 типа в позициях -1709 и -3609 среди условно-здоровых доноров и у больных ревматоидным артритом // Бюллетень ВШЦ СО РАМН. – 2012. – N. 3. – С. 237-40.
 10. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A. [et al.] Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells // *Nat Immunol.* – 2007. – Vol. 8. – 942-949.
 11. Aderka D, Engelmann H, Maor Y. [et al.] Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors // *J Exp Med.* – 1992. – Vol. 175. – P. 323-329.
 12. Aderka D, Engelmann H, Shemer-Avni Y. [et al.] Variation in serum levels of the soluble TNF receptors among healthy individuals // *Lymphokine Cytokine Res.* – 1992. – Vol. 11. – P. 157-159.
 13. Aderka D, Englemann H, Wallach D. Soluble tumor necrosis factor receptors in health and disease // In: *Tumor Necrosis Factor: Molecular and Cellular Biology and Clinical Relevance* (Friers W, Buurman WA, eds.), Karger, Basel. – 1993. – P. 191-198.
 14. Aderka D, Sorkine P, Setton A. [et al.] Kinetics of TNF receptor (TNFR) shedding in vivo in response to TNF and other cytokines compared to their shedding in cancer patients treated with TNF by isolated limb perfusion // *Eur Cytokine Netw.* – 1994. – Vol. 5. – P. 191.
 15. Aderka D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 1996. – Vol. 7. – P. 231-240.

16. Aggarwal BB, Eessalu TE, Hass PE. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon // *Nature*. – 1985. – Vol. 318. – P. 665-667.
17. Aggarwal BB, Natarajan K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade // *Eur Cytokine Netw*. – 1996. – Vol. 7. – P. 93-124.
18. Aggarwal BB, Samanta A, Feldmann M. TNF- α . In: Oppenheim JJ, Feldmann M, editors. *Cytokine Reference*. – 2001. - Vol. 1. – P. 413–434.
19. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword // *Nat Rev Immunol*. – 2003. – Vol. 3. – P. 745-756.
20. Aggarwal S, Gollapudi S, Gupta S. Increased TNF-alpha-induced apoptosis in lymphocytes from aged humans: changes in TNF-alpha receptor expression and activation of caspases // *J Immunol*. – 1999. – Vol. 162. – P. 2154-2161.
21. Akassoglou K, Douni E, Bauer J. [et al.] Exclusive tumor necrosis factor (TNF) signaling by the p75TNF receptor triggers inflammatory ischemia in the CNS of transgenic mice // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2003. – Vol. 100. – P. 709-714.
22. AliBaba2.1 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>. – Заглавие с экрана. – 15.04.2014.
23. Allen RA, Lee EM, Roberts DH. [et al.] Polymorphisms in the TNF-alpha and TNF-receptor genes in patients with coronary artery disease // *Eur J Clin Invest*. – 2001. – Vol. 31. – P. 843-51.
24. Allende-Vega N, Saville MK, Meek DW. Transcription factor TAFII250 promotes Mdm2-dependent turnover of p53 // *Oncogene*. – 2007. – Vol. 26(29). – P. 4234-42.
25. Arend WP, Evans CH. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra). In: Thomson AW, Lotze MT, editors. *The Cytokine Handbook*. – 2003. Vol. 4. - P. 669-708.

26. Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ. [et al.] Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology // *Annu Rev Immunol.* – 1998. – Vol. 16. – P. 27-55.
27. Arend WP, Malyak M, Smith MF Jr. [et al.] Binding of IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist by soluble IL-1 receptors and levels of soluble IL-1 receptors in synovial fluids // *J Immunol.* – 1994. – Vol. 153. – P. 4766-4774.
28. Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines // *Immunol Rev.* – 2008. – Vol. 223. – P. 20-38.
29. Baker E, Chen LZ, Smith CA. [et al.] Chromosomal location of the human tumor necrosis factor receptor genes // *Cytogenet Cell Genet.* – 1991. – Vol. 57. – P. 117-118.
30. Banner DW, D'Arcy A, Janes W. [et al.] Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation // *Cell.* – 1993. – Vol. 73. – P. 431-445.
31. Bargetzi MJ, Lantz M, Smith CG. [et al.] Interleukin-1 beta induces interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein in humans // *Cancer Res.* – 1993. – Vol. 53. – P. 4010-4013.
32. Barton A, John S, Ollier WE. [et al.] Association between rheumatoid arthritis and polymorphism of tumor necrosis factor receptor II, but not tumor necrosis factor receptor I, in Caucasians // *Arthritis Rheum.* – 2001. – Vol. 44. – P. 61-65.
33. Bazan JF. Emerging families of cytokines and receptors // *Curr Biol.* – 1993. – Vol. 3. – P. 603-606.
34. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families // *N Engl J Med.* – 1996. – Vol. 334. – P. 1717-1725.
35. Belich MP, Salmerón A, Johnston LH. [et al.] TPL-2 kinase regulates the proteolysis of the NF-kappaB-inhibitory protein NF-kappaB1 p105 // *Nature.* – 1999. – Vol. 397. – P. 363-368.

36. Bellehumeur C, Blanchet J, Fontaine JY. [et al.] Interleukin 1 regulates its own receptors in human endometrial cells via distinct mechanisms // *Hum Reprod.* – 2009. – Vol. 24. – P. 2193-2204.
37. Beltinger CP, White PS, Maris JM. [et al.] Physical mapping and genomic structure of the human TNFR2 gene // *Genomics.* – 1996. – Vol. 35. – P. 94-100.
38. Bergholdt R, Karlsen AE, Johannesen J. [et al.] Characterization of polymorphisms of an interleukin 1 receptor type 1 gene (IL1RI) promoter region (P2) and their relation to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). The Danish Study Group of Diabetes in Childhood // *Cytokine.* – 1995. – Vol. 7. – P. 727-733.
39. Besschetnova TY, Montefusco DJ, Asinas AE. [et al.] Receptor density balances signal stimulation and attenuation in membrane-assembled complexes of bacterial chemotaxis signaling proteins // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – Vol. 105(34). – P. 12289-12294.
40. Beyaert R, Fiers W. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not // *FEBS Lett.* – 1994. – Vol. 340. – P. 9-16.
41. Bidwell J, Keen L, Gallagher G. [et al.] Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases // *Genes Immun.* – 1999. – Vol. 1. – P. 3-19.
42. Biragyn A, Coscia M, Nagashima K. [et al.] Murine beta-defensin 2 promotes TLR-4/MyD88-mediated and NF-kappaB-dependent atypical death of APCs via activation of TNFR2 // *J Leukoc Biol.* – 2008. – Vol. 83. – P. 998-1008.
43. Black RA, Kronheim SR, Cantrell M. [et al.] Generation of biologically active interleukin-1 β by proteolytic cleavage of the inactive precursor // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263. – P. 9437-9442.

44. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ. [et al.] A metalloprotease-disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells // *Nature*. – 1997. – Vol. 385. – P. 729-733.
45. Blackwell K, Zhang L, Thomas GS. [et al.] TRAF2 phosphorylation modulates tumor necrosis factor α -induced gene expression and cell resistance to apoptosis // *Mol Cell Biol*. – 2009. – Vol. 29. – P. 303-314.
46. Bland JM, Altman DG. Multiple significance tests: the Bonferroni method // *BMJ*. – 1995. – Vol. 310(6973). – P. 170.
47. Blüml S, Scheinecker C, Smolen JS. [et al.] Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis // *Int Immunol*. – 2012. – Vol. 24. – P. 275-281.
48. Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily // *Trends Biochem Sci*. – 2002. – Vol. 27. – P. 19-26.
49. Boin F, Zanardini R, Pioli R. [et al.] Association between -G308A tumor necrosis factor α gene polymorphism and schizophrenia // *Mol Psychiatry*. – 2001. – Vol. 6. – P. 79-82.
50. Boraschi D, Tagliabue A. The interleukin-1 receptor family // *Vitam Horm*. – 2006. – Vol. 74. – P. 229-254.
51. Bossù P, Visconti U, Ruggiero P. [et al.] Transfected type II interleukin-1 receptor impairs responsiveness of human keratinocytes to interleukin-1 // *Am J Pathol*. – 1995. – Vol. 147. – P. 1852-1861.
52. Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction // *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. – 1968. – Vol. 97. – P. 7.
53. Bradley JR, Johnson DR, Pober JS. Endothelial activation by hydrogen peroxide. Selective increases of intercellular adhesion molecule-1 and major histocompatibility complex class I // *Am J Pathol*. – 1993. – Vol. 142. – P. 1598-1609.
54. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease // *J Pathol*. – 2008. – Vol. 214. – P. 149-160.

55. Brikos C, Wait R, Begum S. [et al.] Mass spectrometric analysis of the endogenous type I interleukin-1 (IL-1) receptor signaling complex formed after IL-1 binding identifies IL-1RAcP, MyD88, and IRAK-4 as the stable components // *Mol Cell Proteomics*. – 2007. – Vol. 6. – P. 1551-1559.
56. Brockhaus M, Schoenfeld HJ, Schlaeger EJ. [et al.] Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1990. – Vol. 87. – P. 3127-31.
57. Brookes AJ. The essence of SNPs // *Gene*. – 1999. – Vol. 234. – P. 177-186.
58. Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors // *Cell Signal*. – 2012. – Vol. 24. – P. 1297-305.
59. Cao Z, Henzel WJ, Gao X. IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor // *Science*. – 1996. – Vol. 271. – P. 1128-1131.
60. Cao Z, Xiong J, Takeuchi M. [et al.] TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1 // *Nature*. – 1996. – Vol. 383. – P. 443-446.
61. Casadio R, Frigimelica E, Bossù P. [et al.] Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1beta/IL-1R(I) complex // *FEBS Lett*. – 2001. – Vol. 499. – P. 65-68.
62. Cavaillon JM, Fitting C, Caroff M. [et al.] Dissociation of cell-associated interleukin-1 (IL-1) and IL-1 release induced by lipopolysaccharide and lipid A // *Infect Immun*. – 1989. – Vol. 57. – P. 791-797.
63. Chambaut-Guérin AM, Martinez MC, Hamimi C. [et al.] Tumor necrosis factor receptors in neuroblastoma SKNBE cells and their regulation by retinoic acid // *J Neurochem*. – 1995. – Vol. 65. – P. 537-544.
64. Chan FK, Chun HJ, Zheng L. [et al.] A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling // *Science*. – 2000. – Vol. 288. – P. 2351-2354.
65. Chan FK, Lenardo MJ. A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes // *Eur J Immunol*. – 2000. – Vol. 30. – P. 652-660.

- 66.Chan FK, Shisler J, Bixby JG. [et al.] A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 51613-51621.
- 67.Chan FK, Siegel RM, Zacharias D. [et al.] Fluorescence resonance energy transfer analysis of cell surface receptor interactions and signaling using spectral variants of the green fluorescent protein // *Cytometry.* – 2001. – Vol. 44. – P. 361-368.
- 68.Chan FK. Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling // *Cytokine.* – 2007. – Vol. 37. – P. 101-107.
- 69.Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway // *Science.* – 2002. – Vol. 296. – P. 1634-1635.
- 70.Chen X, Oppenheim JJ. TNF-alpha: an activator of CD4+FoxP3+TNFR2+ regulatory T cells // *Curr Dir Autoimmun.* – 2010. – Vol. 11. – P. 119-134.
- 71.Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway // *Nat Cell Biol.* – 2005. – Vol. 7. – P. 758-765.
- 72.Chu S, Ferro TJ. Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation // *Gene.* – 2005. – Vol. 348. – P. 1-11.
- 73.Chu WM. Tumor necrosis factor // *Cancer Lett.* – 2013. – Vol. 328(2). – P. 222-225.
- 74.Chung Y, Chang SH, Martinez GJ. [et al.] Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling // *Immunity.* – 2009. – Vol. 30. – P. 576-587.
- 75.Cinek O, Vavrinová P, Striz I. [et al.] Association of single nucleotide polymorphisms within cytokine genes with juvenile idiopathic arthritis in the Czech population // *J Rheumatol.* – 2004. – Vol. 31. – P. 1206-1210.
- 76.Colotta F, Dower SK, Sims JE. [et al.] The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1 // *Immunol Today.* – 1994. – Vol. 15. – P. 562-566.

- 77.Colotta F, Re F, Muzio M. [et al.] Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that regulated by IL-4 // *Science*. – 1993. – Vol. 261. – P. 472-475.
- 78.Colotta F, Re F, Muzio M. [et al.] Interleukin-13 induces expression and release of interleukin-1 decoy receptor in human polymorphonuclear cells // *J Biol Chem*. – 1994. – Vol. 269. – P. 12403-12406.
- 79.Corredor J, Yan F, Shen CC. [et al.] Tumor necrosis factor regulates intestinal epithelial cell migration by receptor-dependent mechanisms // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2003. – Vol. 284. – P. C953-961.
- 80.Cui X, Rouhani FN, Hawari F. [et al.] Shedding of the type II IL-1 decoy receptor requires a multifunctional aminopeptidase, aminopeptidase regulator of TNF receptor type 1 shedding // *J Immunol*. – 2003. – Vol. 171. – P. 6814-6819.
- 81.Cullinan EB, Kwee L, Nunes P. [et al.] IL-1 receptor accessory protein is an essential component of the IL-1 receptor // *J Immunol*. – 1998. – Vol. 161. – P. 5614-5620.
- 82.Culpan D, Cornish A, Love S. [et al.] Protein and gene expression of tumour necrosis factor receptors I and II and their promoter gene polymorphisms in Alzheimer's disease // *Exp Gerontol*. - 2007. – Vol. 42. – P. 538-44.
- 83.D'hautcourt JL. Quantitative flow cytometric analysis of membrane antigen expression // *Curr Protoc Cytom*. – 2002. - Chapter 6:Unit 6.12.
- 84.Dale M, Nicklin MJ. Interleukin-1 receptor cluster: gene organization of IL1R2, IL1R1, IL1RL2 (IL-1Rrp2), IL1RL1 (T1/ST2), and IL18R1 (IL-1Rrp) on human chromosome 2q // *Genomics*. – 1999. – Vol. 57. – P. 177-179.
- 85.D'Amora P, Sato H, Girão MJ. [et al.] Polymorphisms in exons 1B and 1C of the type I interleukin-1 receptor gene in patients with endometriosis // *Am J Reprod Immunol*. – 2006. – Vol. 56. – P. 178-184.

86. Darnay BG, Reddy SA, Aggarwal BB. Physical and functional association of a serine-threonine protein kinase to the cytoplasmic domain of the p80 form of the human tumor necrosis factor receptor in human histiocytic lymphoma U-937 cells // *J Biol Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 19687-19690.
87. de la Concha EG, Fernández-Arquero M, Vigil P. [et al.] Celiac disease and TNF promoter polymorphisms // *Hum Immunol.* – 2000. – Vol. 61. – P. 513-517.
88. Declercq W, Denecker G, Fiers W. [et al.] Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75 // *J Immunol.* – 1998. – Vol. 161. – P. 390-399.
89. Depuydt B, van Loo G, Vandenameele P. [et al.] Induction of apoptosis by TNF receptor 2 in a T-cell hybridoma is FADD dependent and blocked by caspase-8 inhibitors // *J Cell Sci.* – 2005. – Vol. 118. – P. 497-504.
90. Devin A, Cook A, Lin Y. [et al.] The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation // *Immunity.* – 2000. – Vol. 12. – P. 419-429.
91. Devin A, Lin Y, Yamaoka S. [et al.] The alpha and beta subunits of I κ B kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF // *Mol Cell Biol.* – 2001. – Vol. 21. – P. 3986-3994.
92. Dickensheets HL, Donnelly RP. IFN-gamma and IL-10 inhibit induction of IL-1 receptor type I and type II gene expression by IL-4 and IL-13 in human monocytes // *J Immunol.* – 1997. – Vol. 159. – P. 6226-6233.
93. Dickensheets HL, Freeman SL, Smith MF. [et al.] Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type-II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes // *Blood.* – 1997. – Vol. 90. – P. 4162-4171.

94. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM. [et al.] A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B // *Nature*. – 1997. – Vol. 388. – P. 548-554.
95. Dieudé P, Petit E, Cailleau-Moindrault S. [et al.] Association between tumor necrosis factor receptor II and familial, but not sporadic, rheumatoid arthritis: evidence for genetic heterogeneity // *Arthritis Rheum*. – 2002. – Vol. 46. – P. 2039-2044.
96. Dikstein R, Ruppert S, Tjian R. TAFII250 is a bipartite protein kinase that phosphorylates the basal transcription factor TFIID // *Cell*. – 1996. – Vol. 84(5). – P. 781-90.
97. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease // *Blood*. – 1996. – Vol. 87. – P. 2095-2147.
98. Dinarello CA. IL-1 receptor type I. In: Oppenheim JJ, Feldmann M, Durum SK, Hirano T, Vilcek J, Nicola NA, editors. *Cytokine reference*. – 2001. – Vol. 2. – P. 1587-1600.
99. Dinarello CA. IL-1: discoveries, controversies and future directions // *Eur J Immunol*. – 2010. – Vol. 40. – P. 599-606.
100. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family // *Annu Rev Immunol*. – 2009. – Vol. 27. – P. 519-550.
101. Dinarello CA. Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors // *Semin Immunol*. – 2013. – Vol. 25(6). – P. 389-393.
102. Dinarello CA. The biological properties of interleukin-1 // *Eur Cyt Net*. – 1994. – Vol. 5. – P. 517-532.
103. Do H, Vasilescu A, Carpentier W. [et al.] Exhaustive genotyping of the interleukin-1 family genes and associations with AIDS progression in a French cohort // *J Infect Dis*. – 2006. – Vol. 194. – P. 1492-1504.
104. Dower SK, Kronheim SR, March CJ. [et al.] Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1. *J Exp Med*. – 1985. – 162:501-515.

105. Dower SK, Wignall JM, Schooley K. [et al.] Retention of ligand binding activity by the extracellular domain of the IL-1 receptor // *J Immunol.* – 1989. – Vol. 142. – P. 4314-4320.
106. Ebach DR, Riehl TE, Stenson WF. Opposing effects of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 in sepsis due to cecal ligation and puncture // *Shock.* – 2005. – Vol. 23. – P. 311-318.
107. Endres R, Luz A, Schulze H. [et al.] Listeriosis in p47(phox^{-/-}) and TRp55^{-/-} mice: protection despite absence of ROI and susceptibility despite presence of RNI // *Immunity.* – 1997. – Vol. 7. – P. 419-432.
108. Engelmann H, Aderka D, Rubinstein M. [et al.] A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity // *J Biol Chem.* – 1989. – Vol. 264. – P. 11974-80.
109. Engelmann H, Novick D, Wallach D. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis receptors // *J Biol Chem.* – 1990. – Vol. 265. – P. 1531-1536.
110. Fareed M, Afzal M. Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: A tool for broad spectrum service // *Egyptian Journal of Medical Human Genetics.* – 2013. – Vol. 14(2). – P. 123-134.
111. Fernández-Real JM, Botas-Cervero P, Lainez B. [et al.] An alternatively spliced soluble TNF-alpha receptor is associated with metabolic disorders: a replication study // *Clin Immunol.* – 2006. – Vol. 121. – P. 236-241.
112. Fiers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level // *FEBS Lett.* – 1991. – Vol. 285. – P. 199-212.

113. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J. [et al.] Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice // *Immunity*. – 1995. – Vol. 2. – P. 561-572.
114. Fontaine V, Mohand-Said S, Hanoteau N. [et al.] Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2 // *J Neurosci*. – 2002. – Vol. 22. – P. RC216.
115. Fotin-Mleczek M, Henkler F, Samel D. [et al.] Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8 // *J Cell Sci*. – 2002. – Vol. 115. – P. 2757-70.
116. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R. [et al.] The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis // *Nat Immunol*. – 2009. – Vol. 10. – P. 241-247.
117. Fuchs P, Strehl S, Dworzak M. [et al.] Structure of the human TNF receptor 1 (p60) gene (TNFR1) and localization to chromosome 12p13 // *Genomics*. – 1992. – Vol. 13. – P. 219-224.
118. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases // *Nat Rev Rheumatol*. – 2010. – Vol. 6. – P. 232-241.
119. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future // *Immunity*. – 2013. – Vol. 39(6). – P. 1003-1018.
120. Giri JG, Wells J, Dower SK. [et al.] Elevated levels of shed type II IL-1 receptor in sepsis. Potential role for type II receptor in regulation of IL-1 responses // *J Immunol*. – 1994. – Vol. 153. – P. 5802-5809.
121. Good M, Newell FM, Haupt LM. [et al.] TNF and TNF receptor expression and insulin sensitivity in human omental and subcutaneous adipose tissue--influence of BMI and adipose distribution // *Diab Vasc Dis Res*. – 2006. – Vol. 3. – P. 26-33.

122. Goto N, Tsurumi H, Takemura M. [et al.] Serum-soluble tumor necrosis factor receptor 2 (sTNF-R2) level determines clinical outcome in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma // *Eur J Haematol.* – 2006. – Vol. 77. – P. 217-225.
123. Graves BJ, Hatada MH, Hendrickson WA. [et al.] Structure of interleukin 1 alpha at 2.7-A resolution // *Biochemistry.* – 1990. – Vol. 29. – P. 2679-2684.
124. Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L. [et al.] Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex // *J Biol Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 13757-13765.
125. Gregory AP, Dendrou CA, Attfield KE. [et al.] TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis // *Nature.* – 2012. – Vol. 488. – P. 508-11.
126. Grell M, Douni E, Wajant H. [et al.] The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor // *Cell.* – 1995. – Vol. 83. – P. 793-802.
127. Grell M, Wajant H, Zimmermann G. [et al.] The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 570-575.
128. Grewal IS. Overview of TNF superfamily: a chest full of potential therapeutic targets // *Adv Med Exp Biol.* – 2009. – Vol. 647. – P. 1-7.
129. Guan X, Liao Z, Ma H. [et al.] TNFRSF1B +676 T>G polymorphism predicts survival of non-small cell lung cancer patients treated with chemoradiotherapy // *BMC Cancer.* – 2011. – Vol. 11. – P. 447.
130. Gudipaty L, Humphreys BD, Buell G. [et al.] Regulation of P2X(7) nucleotide receptor function in human monocytes by extracellular ions and receptor density // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2001. – Vol. 280. – P. 943-953.

131. Gupta R, Sharma SC, Das SN. Association of TNF-alpha and TNFR1 promoters and 3' UTR region of TNFR2 gene polymorphisms with genetic susceptibility to tobacco-related oral carcinoma in Asian Indians // *Oral Oncol.* – 2008. – Vol. 44. – P. 455-63.
132. Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases // *Sci STKE.* – 2006. – Vol. 2006. – P. re13.
133. Hardy-Weinberg equilibrium calculator including analysis for ascertainment bias [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>. – Заглавие с экрана. – 15.04.2014.
134. Haridas V, Darnay BG, Natarajan K. [et al.] Overexpression of the p80 TNF receptor leads to TNF-dependent apoptosis, nuclear factor-kappa B activation, and c-Jun kinase activation // *J Immunol.* – 1998. – Vol. 160. – P. 3152-3162.
135. Hart PH, Hunt EK, Bonder CS. [et al.] Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10 // *J Immunol.* – 1996. – Vol. 157. – P. 3672-3680.
136. Hartland S, Newton JL, Griffin SM. [et al.] A functional polymorphism in the interleukin-1 receptor-1 gene is associated with increased risk of *Helicobacter pylori* infection but not with gastric cancer // *Dig Dis Sci.* – 2004. – Vol. 49. – P. 1545-1550.
137. Hauer J, Püschner S, Ramakrishnan P. [et al.] TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 2874-2879.
138. Haukim N, Bidwell JL, Smith AJ. [et al.] Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 2 // *Genes Immun.* – Vol. 3. – P. 313-330.

139. Heemann C, Kreuz M, Stoller I. [et al.] Circulating levels of TNF receptor II are prognostic for patients with peripheral T-cell non-Hodgkin lymphoma // *Clin Cancer Res.* – 2012. – Vol. 18. – P. 3637-47.
140. Hehlhans T, Männel DN. The TNF-TNF receptor system // *Biol Chem.* – 2002. – Vol. 383. – P. 1581-1585.
141. Heller RA, Song K, Fan N. [et al.] The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity // *Cell.* – 1992. – Vol. 70. – P. 47-56.
142. Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings // *J Cell Sci.* – 2004. – Vol. 117(Pt 25). – P. 5965-73.
143. Hino T, Nakamura H, Abe S. [et al.] Hydrogen peroxide enhances shedding of type I soluble tumor necrosis factor receptor from pulmonary epithelial cells // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 1999. – Vol. 20. – P. 122-128.
144. Hohjoh H, Tokunaga K. Allele-specific binding of the ubiquitous transcription factor OCT-1 to the functional single nucleotide polymorphism (SNP) sites in the tumor necrosis factor-alpha gene (TNFA) promoter // *Genes Immun.* – 2001. – Vol. 2. – P. 105-109.
145. Hollegaard MV, Bidwell JL. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3 // *Genes Immun.* – 2006. – Vol. 7. – P. 269-276.
146. Holtmann H, Wallach D. Down regulation of the receptors for tumor necrosis factor by interleukin 1 and 4 beta-phorbol-12-myristate-13-acetate // *J Immunol.* – 1987. – Vol. 139. – P. 1161-1167.
147. Holtmann MH, Douni E, Schütz M. [et al.] Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo // *Eur J Immunol.* – 2002. – Vol. 32. – P. 3142-3151.

148. Housley WJ, Adams CO, Nichols FC [et al.] Natural but not inducible regulatory T cells require TNF-alpha signaling for in vivo function // *J Immunol.* – 2011. – Vol. 186. – P. 6779-6787.
149. Hsu H, Huang J, Shu HB. [et al.] TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex // *Immunity.* – 1996. – Vol. 4. – P. 387-396.
150. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation // *Cell.* – 1995. – Vol. 81. – P. 495-504.
151. Hube F, Birgel M, Lee YM. [et al.] Expression pattern of tumour necrosis factor receptors in subcutaneous and omental human adipose tissue: role of obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus // *Eur J Clin Invest.* – 1999. – Vol. 29. – P. 672-678.
152. Hwang C, Gatanaga M, Granger GA. [et al.] Mechanism of release of soluble forms of tumor necrosis factor/lymphotoxin receptors by phorbol myristate acetate-stimulated human THP-1 cells in vitro // *J Immunol.* – 1993. – Vol. 151. – P. 5631-8.
153. Ichijo H, Nishida E, Irie K. [et al.] Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways // *Science.* – 1997. – Vol. 275. – P. 90-94.
154. Irmeler M, Thome M, Hahne M. [et al.] Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP // *Nature.* – 1997. – Vol. 388. – P. 190-195.
155. Ishikawa Y, Kashiwase K, Akaza T. [et al.] Polymorphisms in TNFA and TNFR2 affect outcome of unrelated bone marrow transplantation // *Bone Marrow Transplant.* – 2002. – Vol. 27. – P. 569-575.
156. Jacobs M, Brown N, Allie N. [et al.] Tumor necrosis factor receptor 2 plays a minor role for mycobacterial immunity // *Pathobiology.* – 2000. – Vol. 68. – P. 68-75.

157. Jacques C, Gosset M, Berenbaum F. [et al.] The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation // *Vitam Horm.* – 2006. – Vol. 74. – P. 371-403.
158. Jang WH, Yang YI, Yea SS. [et al.] The -238 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with decreased susceptibility to cancers // *Cancer Lett.* – 2001. – Vol. 166. – P. 41-46.
159. Jasper GA, Arun I, Venzon D. [et al.] Variables affecting the quantitation of CD22 in neoplastic B cells // *Cytometry B Clin Cytom.* – 2011. - Vol. 80. – P. 83-90.
160. Jensen LE, Muzio M, Mantovani A. [et al.] IL-1 signaling cascade in liver cells and the involvement of a soluble form of the IL-1 receptor accessory protein // *J Immunol.* – 2000. – Vol. 164. – P. 5277-5286.
161. Jiang Y, Woronicz JD, Liu W. [et al.] Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains // *Science.* – 1999. – Vol. 283. – P. 543-546.
162. Jiang Z, Ninomiya-Tsuji J, Qian Y. [et al.] Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol // *Mol Cell Biol.* – 2002. – Vol. 22. – P. 7158-7167.
163. Johnson AD. SNP bioinformatics: a comprehensive review of resources // *Circ Cardiovasc Genet.* – 2009. – Vol. 2(5). – P. 530-536.
164. Joo M, Wright JG, Hu NN. [et al.] Yin Yang 1 enhances cyclooxygenase-2 gene expression in macrophages // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* – 2007. – Vol. 292(5). – P. L1219-26.
165. Kalthoff H, Roeder C, Brockhaus M. [et al.] Tumor necrosis factor (TNF) up-regulates the expression of p75 but not p55 TNF receptors, and both receptors mediate, independently of each other, up-regulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor mRNA // *J Biol Chem.* – 1993. – Vol. 268. – P. 2762-2766.

166. Kawagoe T, Sato S, Matsushita K. [et al.] Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2 // *Nat Immunol.* – 2008. – Vol. 9. – P. 684-691.
167. Kawasaki A, Tsuchiya N, Hagiwara K. [et al.] Independent contribution of HLA-DRB1 and TNF alpha promoter polymorphisms to the susceptibility to Crohn's disease // *Genes Immun.* – 2000. – Vol. 1. – P. 351-357.
168. Kemper O, Wallach D. Cloning and partial characterization of the promoter for the human p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor // *Gene.* – 1993. – Vol. 134. – P. 209-16.
169. Khalilzadeh O, Anvari M, Esteghamati A. [et al.] Graves ophthalmopathy and gene polymorphisms in interleukin-1alpha, interleukin-1beta, interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist // *Clin Experiment Ophthalmol.* – 2009. – Vol. 37. – P. 614-619. doi: 10.1111/j.1442-9071.2009.02093.x.
170. Khripko OP, Sennikova NS, Lopatnikova JA. [et al.] Association of single nucleotide polymorphisms in the IL-18 gene with production of IL-18 protein by mononuclear cells from healthy donors // *Mediators Inflamm.* – 2008. - doi: 10.1155/2008/309721.
171. Kim EY, Priatel JJ, Teh SJ. [et al.] TNF receptor type 2 (p75) functions as a costimulator for antigen-driven T cell responses in vivo // *J Immunol.* – 2006. – Vol. 176. – P. 1026-1035.
172. Kim EY, Teh HS. TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation // *J Immunol.* – 2001. – Vol. 167. – P. 6812-6820.
173. Kim JY, Moon SM, Ryu HJ. [et al.] Identification of regulatory polymorphisms in the TNF-TNF receptor superfamily // *Immunogenetics.* – 2005. – Vol. 57. – P. 297-303.

174. Kim S, Moon SM, Kim YS. [et al.] TNFR1 promoter -329G/T polymorphism results in allele-specific repression of TNFR1 expression // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2008. – Vol. 368. – P. 395-401.
175. Kloet SL, Whiting JL, Gafken P. [et al.] Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 and cyclin A gene transcription by TFIID subunits TAF1 and TAF7 // *Mol Cell Biol.* – 2012. – Vol. 32(16). – P. 3358-69.
176. Knight JC. Functional implications of genetic variation in non-coding DNA for disease susceptibility and gene regulation // *Clin Sci (Lond).* – 2003. – Vol. 104. – P. 493-501.
177. Koch KC, Ye K, Clark BD. [et al.] Interleukin 4 (IL) 4 up-regulates gene and surface IL 1 receptor type I in murine T helper type 2 cells // *Eur J Immunol.* – 1992. – Vol. 22. – P. 153-157.
178. Koga K, Osuga Y, Tsutsumi O. [et al.] Increased concentrations of soluble tumour necrosis factor receptor (sTNFR) I and II in peritoneal fluid from women with endometriosis // *Mol Hum Reprod.* – 2000. – Vol. 6. – P. 929-33.
179. Kollias G, Douni E, Kassiotis G. [et al.] The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease // *Ann Rheum Dis.* – 1999. – Vol. 58. – P. I32-39.
180. Komata T, Tsuchiya N, Matsushita M. [et al.] Association of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus // *Tissue Antigens.* – 1999. – Vol. 53. – P. 527-533.
181. Kontoyiannis D, Pazarakis M, Pizarro TT. [et al.] Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies // *Immunity.* – 1999. – Vol. 10. – P. 387-398.

182. Korherr C, Hofmeister R, Wesche H. [et al.] A critical role for interleukin-1 receptor accessory protein in interleukin-1 signaling // *Eur J Immunol.* – 1997. – Vol. 27. – P. 262-267.
183. Kriegler M, Perez C, DeFay K. [et al.] A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF // *Cell.* – 1988. – Vol. 53. – P. 45-53.
184. Krippner-Heidenreich A, Tübing F, Bryde S. [et al.] Control of receptor-induced signaling complex formation by the kinetics of ligand/receptor interaction // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277. – P. 44155-44163.
185. Kruppa G, Thoma B, Machleidt T. [et al.] Inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated NF-kappa B activation by selective blockade of the human 55-kDa TNF receptor // *J Immunol.* – 1992. – Vol. 148. – P. 3152-3157.
186. Kuhnert P, Kemper O, Wallach D. Cloning, sequencing and partial functional characterization of the 5' region of the human p75 tumor necrosis factor receptor-encoding gene (TNF-R) // *Gene.* – 1994. – Vol. 150. – P. 381-386.
187. Kull FC Jr, Jacobs S, Cuatrecasas P. Cellular receptor for 125I-labeled tumor necrosis factor: specific binding, affinity labeling, and relationship to sensitivity // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1985. – Vol. 82. – P. 5756-5760.
188. Lainez B, Fernandez-Real JM, Romero X. [et al.] Identification and characterization of a novel spliced variant that encodes human soluble tumor necrosis factor receptor 2 // *Int Immunol.* - 2004. – Vol. 16. P. 169-177.
189. Lang D, Knop J, Wesche H. [et al.] The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness // *J Immunol.* – 1998. – Vol. 161. – P. 6871-6877.

190. Lantz M, Gullberg U, Nilsson E. [et al.] Characterization in vitro of a human tumor necrosis factor-binding protein. A soluble form of a tumor necrosis factor receptor // *J Clin Invest.* – 1990. – Vol. 86. – P. 1396-1402.
191. Lantz M, Malik S, Slevin ML. [et al.] Infusion of tumor necrosis factor (TNF) causes an increase in circulating TNF-binding protein in humans // *Cytokine.* – 1990. – Vol. 2. – P. 402-406.
192. Lappalainen M, Halme L, Turunen U. [et al.] Association of IL23R, TNFRSF1A, and HLA-DRB1*0103 allele variants with inflammatory bowel disease phenotypes in the Finnish population // *Inflamm Bowel Dis.* – 2008. – Vol. 14(8). – P. 1118-24.
193. Laster SM, Wood JG, Gooding LR. Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis // *J Immunol.* – 1988. – Vol. 141. – P. 2629-2634.
194. Le Hir M, Bluethmann H, Kosco-Vilbois MH. [et al.] Differentiation of follicular dendritic cells and full antibody responses require tumor necrosis factor receptor-1 signaling // *J Exp Med.* – 1996. – Vol. 183. – P. 2367-2372.
195. Lee EB, Jeon HS, Yoo SS. [et al.] Polymorphisms in apoptosis-related genes and survival of patients with early-stage non-small-cell lung cancer // *Ann Surg Oncol.* – 2010. – Vol. 17. – P. 2608-18.
196. Leeuwenberg JF, Dentener MA, Buurman WA. Lipopolysaccharide LPS-mediated soluble TNF receptor release and TNF receptor expression by monocytes. Role of CD14, LPS binding protein, and bactericidal/permeability-increasing protein // *J Immunol.* - 1994. – Vol. 152. – P. 5070-6.
197. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system // *Nat Rev Immunol.* – 2002. – Vol. 2. – P. 725-734.

198. Liu C, Hart RP, Liu XJ. [et al.] Cloning and characterization of an alternatively processed human type II interleukin-1 receptor mRNA // *J Biol Chem.* – 1996. - Vol. 271. – P. 20965-20972.
199. Lively TN, Ferguson HA, Galasinski SK. [et al.] c-Jun binds the N terminus of human TAF(II)250 to derepress RNA polymerase II transcription in vitro // *J Biol Chem.* – 2001. – Vol. 276(27). – P. 25582-8.
200. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology // *Cell.* – 2001. – Vol. 104. – P. 487-501.
201. Loetscher H, Pan YC, Lahm HW. [et al.] Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor // *Cell.* – 1990. – Vol. 61. – P. 351-359.
202. Loetscher H, Stueber D, Banner D. [et al.] Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors // *J Biol Chem.* – 1993. – Vol. 268. – P. 26350-26357.
203. Lu LY, Keng HM, Chu JJ. [et al.] TNF receptor I polymorphism is associated with persistent palindromic rheumatism // *Scand J Rheumatol.* – 2007. – Vol. 36. - P. 278-284.
204. Luettiq B, Decker T, Lohmann-Matthes ML. Evidence for the existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: an integral protein and a molecule attached to its receptor // *J Immunol.* – 1989. – Vol. 143. – P. 4034–4038.
205. Luo D, Luo Y, He Y. [et al.] Differential functions of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 signaling in ischemia-mediated arteriogenesis and angiogenesis // *Am J Pathol.* – 2006. – Vol. 169. – P. 1886-1898.
206. MacEwan DJ. TNF ligands and receptors - a matter of life and death // *Br J Pharmacol.* – 2002. – Vol. 135. – P. 855-875.

207. Machado JC, Pharoah P, Sousa S. [et al.] Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma // *Gastroenterology*. – 2001. – Vol. 121. – P. 823-829.
208. Mackay F, Rothe J, Bluethmann H. [et al.] Differential responses of fibroblasts from wild-type and TNF-R55-deficient mice to mouse and human TNF-alpha activation // *J Immunol*. – 1994. – Vol. 153. – P. 5274-5284.
209. Madge LA, Sierra-Honigmann MR, Pober JS. Apoptosis-inducing agents cause rapid shedding of tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1). A nonpharmacological explanation for inhibition of TNF-mediated activation // *J Biol Chem*. – 1999. – Vol. 274. – P. 13643-13649.
210. Magis C, van der Sloot AM, Serrano L. [et al.] An improved understanding of TNFL/TNFR interactions using structure-based classifications // *Trends Biochem Sci*. – 2012. – Vol. 37. – P. 353-363.
211. Mahdavian SA, Rezaei N, Moradi B. [et al.] Proinflammatory cytokine gene polymorphisms among Iranian patients with asthma // *J Clin Immunol*. – 2009. – Vol. 29. – P. 57-62. doi: 10.1007/s10875-008-9232-1.
212. Mahmoudi M, Amirzargar AA, Jamshidi AR. [et al.] Association of IL1R polymorphism with HLA-B27 positive in Iranian patients with ankylosing spondylitis // *Eur Cytokine Netw*. – 2011. – Vol. 22(4). – P. 175-80.
213. Malik, S.T.A. The activity of TNF in experimental cancer models. In: Beutler B, editor. *Tumor Necrosis Factors*. – 1992. – P. 407-423.
214. Malinowsky D, Lundkvist J, Layé S. [et al.] Interleukin-1 receptor accessory protein interacts with the type II interleukin-1 receptor // *FEBS Lett*. – 1998. – Vol. 429. – P. 299-302.
215. Mallett S, Barclay AN. A new superfamily of cell surface proteins related to the nerve growth factor receptor // *Immunol Today*. – 1991. – Vol. 12. – P. 220-223.

216. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press (New York) - 1982. - P. 76-85.
217. Mantovani A, Locati M, Vecchi A. [et al.] Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines // *Trends Immunol.* – 2001. – Vol. 22. – P. 328-336.
218. Marchetti L, Klein M, Schlett K. [et al.] Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappa B pathway // *J Biol Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 32869-32881.
219. Matsukura H, Ikeda S, Yoshimura N. [et al.] Genetic polymorphisms of tumour necrosis factor receptor superfamily 1A and 1B affect responses to infliximab in Japanese patients with Crohn's disease // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2008. – Vol. 27. – P. 765-770.
220. Matsumoto M, Fu YX, Molina H. [et al.] Lymphotoxin-alpha-deficient and TNF receptor-I-deficient mice define developmental and functional characteristics of germinal centers // *Immunol Rev.* – 1997. – Vol. 156. – P. 137-144.
221. Matsushima K, Akahoshi T, Yamada M. [et al.] Properties of a specific interleukin 1 (IL1) receptor on human Epstein Barr virus-transformed B lymphocytes: identity of a receptor for IL 1-alpha and IL 1-beta // *J Immunol.* – 1986. – Vol. 136. – P. 4496-4502.
222. McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J. [et al.] Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes // *Cell.* – 1999. – Vol. 97. – P. 133-144.

223. McMahan CJ, Slack JL, Mosley B. [et al.] A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types // *EMBO J.* – 1991. – Vol. 10. – P. 2821-2832.
224. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity // *Nature.* – 1997. – Vol. 388. – P. 394-397.
225. Metcalfe KA, Hitman GA, Pociot F. [et al.] An association between type 1 diabetes and the interleukin-1 receptor type 1 gene. The DiMe Study Group. Childhood Diabetes in Finland // *Hum Immunol.* – 1996. – Vol. 51. – P. 41-48.
226. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes // *Cell.* – 2003. – Vol. 114. – P. 181-190.
227. Miles DW, Aderka D, Engelmann H. [et al.] Induction of soluble tumour necrosis factor receptors during treatment with interleukin-2 // *Br J Cancer.* – 1992. – Vol. 66. – P. 1195-1199.
228. Mitcham JL, Parnet P, Bonnert TP. [et al.] T1/ST2 signaling establishes it as a member of an expanding interleukin-1 receptor family // *J Biol Chem.* – 1996. – Vol. 271. – P. 5777-5783.
229. Miyagawa H, Yamai M, Sakaguchi D. [et al.] Association of polymorphisms in complement component C3 gene with susceptibility to systemic lupus erythematosus // *Rheumatology (Oxford).* – 2008. – Vol. 47. – P. 158-64.
230. Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T. [et al.] The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity // *Cell.* – 1996. – Vol. 87(7). – P. 1261-70.
231. Modi WS, Masuda A, Yamada M. [et al.] Chromosomal localization of the human interleukin 1 alpha (IL-1 alpha) gene // *Genomics.* – 1988. – Vol. 2. – P. 310-314.

232. Moghaddami N, Costabile M, Grover PK. [et al.] Unique effect of arachidonic acid on human neutrophil TNF receptor expression: up-regulation involving protein kinase C, extracellular signal-regulated kinase, and phospholipase A2 // *J Immunol.* – 2003. – Vol. 171. – P. 2616-2624.
233. Mohler KM, Torrance DS, Smith CA. [et al.] Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists // *J Immunol.* – 1993. – Vol. 151. – P. 1548-1561.
234. Monden Y, Kubota T, Inoue T. [et al.] Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2007. – Vol. 293. – P. H743-753.
235. Moraga I, Harari D, Schreiber G. [et al.] Receptor density is key to the alpha2/beta interferon differential activities // *Mol Cell Biol.* – 2009. – Vol. 29. – P. 4778-87. doi: 10.1128/MCB.01808-08.
236. Moss ML, Jin SL, Milla ME. [et al.] Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha // *Nature.* – 1997. – Vol. 385. – P. 733–736.
237. Mukai Y, Nakamura T, Yoshikawa M. [et al.] Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex // *Sci Signal.* – 2010. – Vol. 3. – P. 83.
238. Nakae S, Asano M, Horai R. [et al.] Interleukin-1 β , but not interleukin-1 α , is required for T-cell-dependent antibody production // *Immunology.* – 2001. – Vol. 104. – P. 402-409.
239. Nakae S, Komiyama Y, Yokoyama H. [et al.] IL-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response // *Int Immunol.* – 2003. – Vol. 15. – P. 483-490.
240. Näkki A, Kouhia ST, Saarela J. [et al.] Allelic variants of IL1R1 gene associate with severe hand osteoarthritis // *BMC Med Genet.* – 2010. – Vol. 11. – P. 50. doi: 10.1186/1471-2350-11-50.

241. Nambu A, Nakae S. IL-1 and Allergy // *Allergol Int.* – 2010. – Vol. 59. – P. 125-135.
242. Nashleanas M, Kanaly S, Scott P. Control of *Leishmania major* infection in mice lacking TNF receptors // *J Immunol.* – 1998. – Vol. 160. – P. 5506-5513.
243. NCBI dbSNP [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>. – Заглавие с экрана. – 11.04.2013.
244. NCBI/Primer-BLAST [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>. – Заглавие с экрана. – 11.04.2013.
245. Netea MG, Kullberg BJ, Boerman OC. [et al.] Soluble murine IL-1 receptor type I induces release of constitutive IL-1 alpha // *J Immunol.* – 1999. – Vol. 162. – P. 4876-4881.
246. Neumann D, Kollewe C, Martin MU. [et al.] The membrane form of the type II IL-1 receptor accounts for inhibitory function // *J Immunol.* – 2000. – Vol. 165. – P. 3350-3357.
247. Niki Y, Yamada H, Kikuchi T. [et al.] Membrane-associated IL-1 contributes to chronic synovitis and cartilage destruction in human IL-1 alpha transgenic mice // *J Immunol.* – 2004. – Vol. 172. – P. 577-584.
248. Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A. [et al.] The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway // *Nature.* – 1999. – Vol. 398. – P. 252-256.
249. Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y. [et al.] ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2 // *Mol Cell.* – 1998. – Vol. 2. – P. 389-395.
250. Nophar Y, Kemper O, Brakebusch C. [et al.] Soluble forms of tumor necrosis factor receptors (TNF-Rs). The cDNA for the type I TNF-R, cloned using amino acid sequence data of its soluble form, encodes both the cell

- surface and a soluble form of the receptor // *EMBO J.* – 1990. – Vol. 9. – P. 3269-3278.
251. O'Donnell MA, Ting AT. RIP1 comes back to life as a cell death regulator in TNFR1 signaling // *FEBS Lett.* – 2011. – Vol. 278. – P. 877-887.
252. Okamoto Y, Tanaka M, Miyahara N. [et al.] Age-dependent decreases in serum soluble interleukin-1 receptor type I (sIL-1RI) in healthy individuals: a population study of serum sIL-1RI levels in Japanese subjects // *J Clin Lab Anal.* – 2009. – Vol. 23. – P. 175-178.
253. O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress // *Immunol Rev.* – 2008. – Vol. 226. – P. 10-18.
254. OpenEpi Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.openepi.com>. – Заглавие с экрана. – 15.04.2014.
255. Orlando S, Matteucci C, Fadlon EJ. [et al.] TNF-alpha, unlike other pro- and anti-inflammatory cytokines, induces rapid release of the IL-1 type II decoy receptor in human myelomonocytic cells // *J Immunol.* – 1997. – Vol. 158. – P. 3861-3868.
256. Orlando S, Sironi M, Bianchi G. [et al.] Role of metalloproteases in the release of the IL-1 type II decoy receptor // *J Biol Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 31764-31769.
257. Orlova DY, Borisov VI, Kozhevnikov VS. [et al.] Distribution function approach to the study of the kinetics of IgM antibody binding to FcγRIIIb (CD16b) receptors on neutrophils by flow cytometry // *J Theor Biol.* – 2011. Vol. 290. – P. 1-6.
258. Owen-Schaub LB, Crump WL 3rd, Morin GI. [et al.] Regulation of lymphocyte tumor necrosis factor receptors by IL-2 // *J Immunol.* – 1989. – Vol. 143. – P. 2236-2241.

259. Pandita R, Pocsik E, Aggarwal BB. Interferon-gamma induces cell surface expression for both types of tumor necrosis factor receptors // *FEBS Lett.* – 1992. – Vol. 312. – 87-90.
260. Pannu KK, Joe ET, Iyer SB. Performance evaluation of QuantiBRITE phycoerythrin beads // *Cytometry.* – 2001. – Vol. 45. – P. 250-258.
261. Park SW, Kim MK, Kwon KH. [et al.] Association between a promoter polymorphism (rs2192752, -1028A/C) of interleukin 1 receptor, type I (IL1R1) and location of papillary thyroid carcinoma in a Korean population // *Int J Immunogenet.* – 2012. – Vol. 39. – P. 501-507.
262. Park TJ, Kim HJ, Kim JH. [et al.] Associations of CD6, TNFRSF1A and IRF8 polymorphisms with risk of inflammatory demyelinating diseases // *Neuropathol Appl Neurobiol.* – 2013. – Vol. 39(5). – P. 519-30.
263. Park YC, Ye H, Hsia C. [et al.] A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction // *Cell.* – 2000. – Vol. 101. – P. 777-787.
264. Pasparakis M, Alexopoulou L, Grell M. [et al.] Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1997. – Vol. 94. – P. 6319-6323.
265. Pasparakis M, Kousteni S, Peschon J. [et al.] Tumor necrosis factor and the p55TNF receptor are required for optimal development of the marginal sinus and for migration of follicular dendritic cell precursors into splenic follicles // *Cell Immunol.* – 2000. – Vol. 201. – P. 33-41.
266. Patiño JA, Ivanov VN, Lacy E. [et al.] TNF-alpha is the critical mediator of the cyclic AMP-induced apoptosis of CD8+4+ double-positive thymocytes // *J Immunol.* – 2000. – Vol. 164. – P. 1689-1694.
267. Penton-Rol G, Orlando S, Polentarutti N. [et al.] Bacterial lipopolysaccharide causes rapid shedding, followed by inhibition of mRNA

- expression, of the IL-1 type II receptor, with concomitant up-regulation of the type I receptor and induction of incompletely spliced transcripts // *J Immunol.* – 1999. – Vol. 162. – P. 2931-38.
268. Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL. [et al.] TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation // *J Immunol.* – 1998. – Vol. 160. – P. 943-952.
269. Pham AD, Sauer F. Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila* // *Science.* – 2000. – Vol. 289(5488). – P. 2357-60.
270. Pierik M, Vermeire S, Steen KV. [et al.] Tumour necrosis factor-alpha receptor 1 and 2 polymorphisms in inflammatory bowel disease and their association with response to infliximab // *Aliment Pharmac Ther.* – 2004. – Vol. 20. – P. 303-310.
271. Pobeziinskaya YL, Kim YS, Choksi S. [et al.] The function of TRADD in signaling through tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors // *Nat Immunol.* – 2008. – Vol. 9. – P. 1047-1054.
272. Potter C, Gibbons LJ, Bowes JD. [et al.] Polymorphisms spanning the TNFR2 and TACE genes do not contribute towards variable anti-TNF treatment response // *Pharmacogenet Genomics.* – 2010. – Vol.20. – P. 338-41.
273. Priestle JP, Schär HP, Grütter MG. Crystallographic refinement of interleukin 1 beta at 2.0 Å resolution // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1989. – Vol. 86. – P. 9667-9671.
274. Radons J, Dove S, Neumann D. [et al.] The interleukin 1 (IL-1) receptor accessory protein Toll/IL-1 receptor domain: analysis of putative interaction sites in vitro mutagenesis and molecular modeling // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 49145-49153.
275. Rae C, MacEwan DJ. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interleukin-3 increase expression of type II tumour necrosis factor

- receptor, increasing susceptibility to tumour necrosis factor-induced apoptosis. Control of leukaemia cell life/death switching // *Cell Death Differ.* – 2004. – Vol. 11. – P. S162-171.
276. Rauert H, Wicovsky A, Müller N. [et al.] Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2) // *J Biol Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 7394-7404.
277. Ravindran JS, Owen P, Lagan A. [et al.] Interleukin 1alpha, interleukin 1beta and interleukin 1 receptor gene polymorphisms in psoriatic arthritis // *Rheumatology (Oxford).* – 2004. – Vol. 43. – P. 22-26.
278. Re F, Muzio M, De Rossi M. [et al.] The type II "receptor" as a decoy target for interleukin 1 in polymorphonuclear leukocytes: characterization of induction by dexamethasone and ligand binding properties of the released decoy receptor // *J Exp Med.* – 1994. – Vol. 179. – P. 739-743.
279. Re F, Sironi M, Muzio M. [et al.] Inhibition of interleukin-1 responsiveness by type II receptor gene transfer: a surface "receptor" with anti-interleukin-1 function // *J Exp Med.* – 1996. – Vol. 183. – P. 1841-1850.
280. Read RC, Camp NJ, di Giovine FS. [et al.] An interleukin-1 genotype is associated with fatal outcome of meningococcal disease // *J Infect Dis.* – 2000. – Vol. 182. – P. 1557-1560.
281. Reddy J, Chastagner P, Fiette L. [et al.] IL-2-induced tumor necrosis factor (TNF)-beta expression: further analysis in the IL-2 knockout model, and comparison with TNF-alpha, lymphotoxin-beta, TNFR1 and TNFR2 modulation // *Int Immunol.* – 2001. – Vol. 13. – P. 135-147.
282. Reich K, Mössner R, König IR. [et al.] Promoter polymorphisms of the genes encoding tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta are associated with different subtypes of psoriasis characterized by early and late disease onset // *J Invest dermatol.* – 2002. – Vol. 118. – P. 155-163.

283. Reveille JD, Sims AM, Danoy P. [et al.] Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci // *Nat Genet.* – 2010. – Vol. 42. – P. 123–127.
284. Reynes J, Portales P, Segondy M. [et al.] CD4+ T cell surface CCR5 density as a determining factor of virus load in persons infected with human immunodeficiency virus type 1 // *J Infect Dis.* – 2000. – Vol. 181. – P. 927–933.
285. Rezaei N, Amirzargar AA, Shakiba Y. [et al.] Proinflammatory cytokine gene single nucleotide polymorphisms in common variable immunodeficiency // *Clin Exp Immunol.* – 2009. – Vol. 155. – P. 21–27. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03790.x.
286. Ribizzi G, Fiordoro S, Barocci S. [et al.] Cytokine polymorphisms and Alzheimer disease: possible associations // *Neurol Sci.* – 2010. – Vol. 31. – P. 321–325. doi: 10.1007/s10072-010-0221-9.
287. Rickert RC, Jellusova J, Miletic AV. Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease // *Immunol Rev.* – 2011. – Vol. 244. – P. 115–133.
288. Rodrigo E, Sánchez-Velasco P, Ruiz JC. [et al.] Cytokine polymorphisms and risk of infection after kidney transplantation // *Transplant Proc.* – 2007. – Vol. 39. – P. 2219–2221.
289. Rodríguez M, Cabal-Hierro L, Carcedo MT. [et al.] NF-kappaB signal triggering and termination by tumor necrosis factor receptor 2 // *J Biol Chem.* – 2011. – Vol. 286. – P. 22814–22824.
290. Rodriguez M, Zoecklein L, Papke L. [et al.] Tumor necrosis factor alpha is reparative via TNFR2 in the hippocampus and via TNFR1 in the striatum after virus-induced encephalitis // *Brain Pathol.* – 2009. – Vol. 19. – P. 12–26.

291. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies // *Am J Epidemiol.* – 2009. – Vol. 169. – P. 505-514.
292. Rossmann ED, Lenkei R, Lundin J. [et al.] Performance of calibration standarts for antigen quantitation with flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia // *Cytometry B Clin Cytom.* – 2007. – Vol. 72. – P. 450-457.
293. Rothe M, Pan MG, Henzel WJ. [et al.] The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins // *Cell.* – 1995. – Vol. 83. – P. 1243-1252.
294. Rothe M, Wong SC, Henzel WJ. [et al.] A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor // *Cell.* – 1994. – Vol. 78. – P. 681-692.
295. Rousseau S, Papoutsopoulou M, Symons A. [et al.] TPL2-mediated activation of ERK1 and ERK2 regulates the processing of pre-TNF alpha in LPS-stimulated macrophages // *J Cell Sci.* – 2008. – Vol. 121. – P. 149-154.
296. Sacconi S, Polentarutti N, Penton-Rol G. [et al.] Divergent effects of LPS on expression of IL-1 receptor family members in mononuclear phagocytes in vitro and in vivo // *Cytokine.* - 1998. – Vol. 10. P. 773-780.
297. Sainz J, Salas-Alvarado I, López-Fernández E. [et al.] TNFR1 mRNA expression level and TNFR1 gene polymorphisms are predictive markers for susceptibility to develop invasive pulmonary aspergillosis // *Int J Immunopathol Pharmacol.* – 2010. – Vol. 23. - P. 423-36.
298. Santee SM, Owen-Schaub LB. Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization // *J Biol Chem.* – 1996. – Vol. 271. – P. 21151-21159.
299. Schall TJ, Lewis M, Koller KJ. [et al.] Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor // *Cell.* – 1990. – Vol. 61. – P. 361-370.

300. Schlüter D, Deckert M. The divergent role of tumor necrosis factor receptors in infectious diseases // *Microbes Infect.* – 2000. – Vol. 2. – P. 1285-1292.
301. Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J. [et al.] Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles // *Immunity.* – 2004. – Vol. 21. – P. 415-428.
302. Schulz S, Stein JM, Altermann W. [et al.] Single nucleotide polymorphisms in interleukin-1 gene cluster and subgingival colonization with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with aggressive periodontitis // *Hum Immunol.* – 2011. – Vol. 72(10). – P. 940-6.
303. Shastry BS. SNPs: impact on gene function and phenotype // *Methods Mol Biol.* – 2009. – Vol. 578. – P. 3-22.
304. Shi D, Xie F, Zhang Y. [et al.] TFAP2A regulates nasopharyngeal carcinoma growth and survival by targeting HIF-1 α signaling pathway // *Cancer Prev Res (Phila).* – 2014. – Vol. 7(2). – P. 266-77.
305. Sims JE, Gayle MA, Slack JL. [et al.] Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1993. – Vol. 90. – P. 6155-59.
306. Sims JE, Giri JG, Dower SK. The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions // *Clin Immunol Immunopathol.* – 1994. – Vol. 72. – P. 9-14.
307. Sims JE, March CJ, Cosman D. [et al.] cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily // *Science.* – 1988. – Vol. 241. – P. 585-589.
308. Sims JE, Painter SL, Gow IR. Genomic organization of the type I and type II IL-1 receptors // *Cytokine.* – 1995. – Vol. 7. – P. 483-490.

309. Slattery ML, Lundgreen A, Bondurant KL. [et al.] Tumor necrosis factor-related genes and colon and rectal cancer // *Int J Mol Epidemiol Genet.* – 2011. – Vol. 2. – P. 328-38.
310. Smith AJ, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2009. – Vol. 20. – P. 43-59. doi: 10.1016/j.cytogfr.2008.11.006.
311. Smith CA, Davis T, Anderson D. [et al.] A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins // *Science.* – 1990. – Vol. 248. – P. 1019-1023.
312. Spies T, Morton CC, Nedospasov SA. [et al.] Genes for the tumor necrosis factors alpha and beta are linked to the human major histocompatibility complex // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1986. – Vol. 83. – P. 8699-8702.
313. Spinaz GA, Keller U, Brockhaus M. Release of soluble receptors for tumor necrosis factor (TNF) in relation to circulating TNF during experimental endotoxemia // *J Clin Invest.* – 1992. – Vol. 90. – P. 533-6.
314. Stark GL, Dickinson AM, Jackson GH. [et al.] Tumour necrosis factor receptor type II 196M/R genotype correlates with circulating soluble receptor levels in normal subjects and with graft-versus-host disease after sibling allogeneic bone marrow transplantation // *Transplantation.* – 2003. – Vol. 76. – P. 1742-1749.
315. Steenholdt C, Enevold C, Ainsworth MA. [et al.] Genetic polymorphisms of tumour necrosis factor receptor superfamily 1b and fas ligand are associated with clinical efficacy and/or acute severe infusion reactions to infliximab in Crohn's disease // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2012. – Vol. 36. – P. 650-9.
316. Stoelcker B, Hehlhans T, Weigl K. [et al.] Requirement for tumor necrosis factor receptor 2 expression on vascular cells to induce

- experimental cerebral malaria // *Infect Immun.* – 2002. – Vol. 70. – P. 5857-5859.
317. Stylianou E, O'Neill LA, Rawlinson L. [et al.] Interleukin 1 induces NF-kappa B through its type I but not its type II receptor in lymphocytes // *J Biol Chem.* - 1992. – Vol. 267. – P. 15836-841.
318. Sutton C, Brereton C, Keogh B. [et al.] A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis // *J Exp Med.* – 2006. – Vol. 203. – P. 1685-1691.
319. Suvannavejh GC, Lee HO, Padilla J. [et al.] Divergent roles for p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in the pathogenesis of MOG(35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis // *Cell Immunol.* – 2000. – Vol. 205. – P. 24-33.
320. Symons JA, Eastgate JA, Duff GW. Purification and characterization of a novel soluble receptor for interleukin 1 // *J Exp Med.* – 1991. – Vol. 174. – P. 1251-1254.
321. Symons JA, Young PR, Duff GW. Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 beta precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1995. – Vol. 92. – P. 1714-1718.
322. Tada Y, Ho A, Koarada S. [et al.] Collagen-induced arthritis in TNF receptor-1-deficient mice: TNF receptor-2 can modulate arthritis in the absence of TNF receptor-1 // *Clin Immunol.* – 2001. – Vol. 99. – P. 325-333.
323. Takasugi K, Yamamura M, Iwahashi M. [et al.] Induction of tumour necrosis factor receptor-expressing macrophages by interleukin-10 and macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis // *Arthritis Res Ther.* – 2006. – Vol. 8. – P. R126.
324. Takayama K, Yokozeki H, Ghoreishi M. [et al.] IL-4 inhibits the migration of human Langerhans cells through the downregulation of TNF receptor II expression // *J Invest Dermatol.* – 1999. – Vol. 113. – P. 541-546.

325. Takeuchi M, Rothe M, Goeddel DV. Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins // *J Biol Chem.* – 1996. – Vol. 271. – P. 19935-19942.
326. Tang P, Hung MC, Klostergaard J. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer // *Biochemistry.* – 1996. – Vol. 35. – P. 8216-8225.
327. Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH. [et al.] A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death // *Cell.* – 1993. – Vol. 74. – P. 845-853.
328. Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor // *J Biol Chem.* – 1993. – Vol. 268. – P. 18542-18548.
329. Taylor DJ. Interleukin-4 (IL-4) induces down-modulation and shedding of the p55 tumour necrosis factor receptor and inhibits TNF alpha's effect on rheumatoid synovial fibroblasts // *Rheumatol Int.* – 1994. – Vol. 14. – P. 21-25.
330. Theiss AL, Simmons JG, Jobin C. [et al.] Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2 // *J Biol Chem.* – 2005. – Vol. 280. – P. 36099-36109.
331. Tilg H, Trehu E, Atkins MB. [et al.] Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55 // *Blood.* – 1994. - Vol. 83. – P. 113-118.
332. Totpal K, Chaturvedi MM, LaPushin R. [et al.] Retinoids downregulate both p60 and p80 forms of tumor necrosis factor receptors in human histiocytic lymphoma U-937 cells // *Blood.* – 1995. – Vol. 85. – P. 3547-3555.

333. Trefzer U, Brockhaus M, Lötscher H. [et al.] The 55-kD tumor necrosis factor receptor on human keratinocytes is regulated by tumor necrosis factor-alpha and by ultraviolet B radiation // *J Clin Invest.* – 1993. – Vol. 92. – P. 462-470.
334. Trejaut JA, Tsai ZU, Lee HL. [et al.] Cytokine gene polymorphisms in Taiwan // *Tissue Antigens.* – 2004. – Vol. 64. – P. 492-9.
335. Tsujimoto M, Vilcek J. Tumor necrosis factor-induced downregulation of its receptors in HeLa cells // *J Biochem.* – 1987. – Vol. 102. – P. 1571-1577.
336. Tsujimoto M, Yip YK, Vilcek J. Tumor necrosis factor: specific binding and internalization in sensitive and resistant cells // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1985. – Vol. 82. – P. 7626-7630.
337. Tzanavari T, Giannogonas P, Karalis KP. TNF-alpha and obesity // *Curr Dir Autoimmun.* – 2010. – Vol. 11. – P. 145-156.
338. Ubaldi de Capei MU, Dametto E, Fasano ME. [et al.] Genotyping for cytokine polymorphisms: allele frequencies in the Italian population // *Eur J Immunogenet.* – 2003. – Vol. 30. – P. 5-10.
339. van Deuren M, van der Ven-Jongekrijg J, Vannier E. [et al.] The pattern of interleukin-1beta (IL-1beta) and its modulating agents IL-1 receptor antagonist and IL-1 soluble receptor type II in acute meningococcal infections // *Blood.* – 1997. – Vol. 90. – P. 1101-1118.
340. van Mierlo GJ, Scherer HU, Hameetman M. [et al.] Cutting edge: TNFR-shedding by CD4+CD25+ regulatory T cells inhibits the induction of inflammatory mediators // *J Immunol.* – 2008. – Vol. 180. – P. 2747-2751.
341. Van Ostade X, Vandenabeele P, Everaerd B. [et al.] Human TNF mutants with selective activity on the p55 receptor // *Nature.* – 1993. – Vol. 361. – P. 266-269.
342. Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V. [et al.] Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the

- TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally // *Immunity*. – 1998. – Vol. 9. – P. 267-276.
343. Vigers GP, Anderson LJ, Caffes P. [et al.] Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta // *Nature*. – 1997. – Vol. 386. – P. 190-194.
344. Vigers GP, Anderson LJ, Caffes P. [et al.] Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta // *Nature*. – 1997. – Vol. 386. – P. 190-194.
345. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* – 2003. – Vol. 10. – P. 45-65.
346. Wajant H, Scheurich P. TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B pathway // *FEBS J.* – 2011. – Vol. 278. – P. 862-987.
347. Wajant H. Increasing complexity in TNFR1 signaling // *FEBS J.* – 2011. – Vol. 278. – P. 861.
348. Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL. [et al.] Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms // *Annu Rev Immunol.* – 1999. – Vol. 17. – P. 331-367.
349. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG. [et al.] NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation // *Science*. – 1998. – Vol. 281. – P. 1680-1683.
350. Wang H, Iakova P, Wilde M. [et al.] C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4 // *Mol Cell*. – 2001. – Vol. 8(4). – P. 817-28.
351. Wang L, Abbasi F, Jasper GA. [et al.] Variables in the quantification of CD4 in normals and hairy cell leukemia patients // *Cytometry B Clin Cytom.* – 2011. – Vol. 80. – P. 51-56.
352. Wassarman DA, Sauer F. TAF(II)250: a transcription toolbox // *J Cell Sci.* – 2001. – Vol. 114(Pt 16). – P. 2895-902.

353. Waterer GW, Quasney MW, Cantor RM. [et al.] Septic shock and respiratory failure in community-acquired pneumonia have different TNF polymorphism associations // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2001. – Vol. 163. – P. 1599-1604.
354. Watts AD, Hunt NH, Madigan MC. [et al.] Soluble TNF-alpha receptors bind and neutralize over-expressed transmembrane TNF-alpha on macrophages, but do not inhibit its processing // *J Leukoc Biol.* – 1999. – Vol. 66. – P. 1005-1013.
355. Webb AC, Collins KL, Auron PE. [et al.] Interleukin-1 gene (IL1) assigned to long arm of human chromosome 2 // *Lymphokine Res.* – 1986. – Vol. 5. – P. 77-85.
356. Weiss T, Grell M, Hessabi B. [et al.] Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80: requirement of the TNF receptor-associated factor-2 binding site // *J Immunol.* – Vol. 158. – P. 2398-2404.
357. Weiss T, Grell M, Siemienski K. [et al.] TNFR80-dependent enhancement of TNFR60-induced cell death is mediated by TNFR-associated factor 2 and is specific for TNFR60 // *J Immunol.* – 1998. – Vol. 161. – P. 3136-3142.
358. Werth VP, Zhang W, Dortzbach K. [et al.] Association of a promoter polymorphism of tumor necrosis factor-alpha with subacute cutaneous lupus erythematosus and distinct photoregulation of transcription // *J Invest Dermatol.* – 2000. – Vol. 115. – P. 726-730.
359. Wiens GD, Glenney GW. Origin and evolution of TNF and TNF receptor superfamilies // *Dev Comp Immunol.* – 2011. – Vol. 35. – P. 1324-1335.
360. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL. [et al.] Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on

- transcriptional activation // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1997. – Vol. 94. – P. 3195-3199.
361. Wingender E. The TRANSFAC project as an example of framework technology that supports the analysis of genomic regulation // *Brief Bioinform.* – 2008. – Vol. 9(4). – P. 326-32.
362. Winzen R, Wallach D, Engelmann H. [et al.] Selective decrease in cell surface expression and mRNA level of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor during differentiation of HL-60 cells into macrophage-like but not granulocyte-like cells // *J Immunol.* – 1992. – Vol. 148. – P. 3454-3460.
363. Winzen R, Wallach D, Kemper O. [et al.] Selective up-regulation of the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor and its mRNA by TNF and IL-1 // *J Immunol.* – 1993. – Vol. 150. – P. 4346-53.
364. Wittebole X, Coyle SM, Kumar A. [et al.] Expression of tumour necrosis factor receptor and Toll-like receptor 2 and 4 on peripheral blood leucocytes of human volunteers after endotoxin challenge: a comparison of flow cytometric light scatter and immunofluorescence gating // *Clin Exp Immunol.* – 2005. – Vol. 141. – P. 99-106.
365. Yan P, Liu N, Kim GM. [et al.] Expression of the type 1 and type 2 receptors for tumor necrosis factor after traumatic spinal cord injury in adult rats // *Exp Neurol.* – 2003. – Vol. 183. – P. 286-297.
366. Ye K, Dinarello CA, Clark BD. Identification of the promoter region of human interleukin 1 type I receptor gene: multiple initiation sites, high G+C content, and constitutive expression // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1993. – Vol. 90. – P. 2295-2299.
367. Ye K, Vannier E, Clark BD. [et al.] Three distinct promoters direct transcription of different 5' untranslated regions of the human interleukin 1 type I receptor: a possible mechanism for control of translation // *Cytokine*. – 1996. – Vol. 8. – P. 421-429.

368. Yeh WC, Pompa JL, McCurrach ME. [et al.] FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis // *Science*. – 1998. – Vol. 279. – P. 1954-1958.
369. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M. [et al.] The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation // *Cell*. – 1997. – Vol. 91. – P. 243-252.
370. Zhang L, Higuchi M, Totpal K. [et al.] Staurosporine induces the cell surface expression of both forms of human tumor necrosis factor receptors on myeloid and epithelial cells and modulates ligand-induced cellular response // *J Biol Chem*. – 1994. – Vol. 269. – P. 10270-10279.
371. Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM. [et al.] Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways // *J Biol Chem*. – 2001. – Vol. 276. – P. 563-568.
372. Zhao Y, Conze DB, Hanover JA. [et al.] Tumor necrosis factor receptor 2 signaling induces selective c-IAP1-dependent ASK1 ubiquitination and terminates mitogen-activated protein kinase signaling // *J Biol Chem*. – 2007. – Vol. 282. – P. 7777-7782.
373. Zheng L, Bidere N, Staudt D. [et al.] Competitive control of independent programs of tumor necrosis factor receptor-induced cell death by TRADD and RIP1 // *Mol Cell Biol*. – 2006. – Vol. 26. – P. 3505-3513.