

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

На правах рукописи

АЛЬШЕВСКАЯ АЛИНА АНАТОЛЬЕВНА

**ЭКСПРЕССИЯ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ
К ФАКТОРУ НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА И ИНТЕРЛЕЙКИНУ 1 БЕТА
НА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТКАХ БОЛЬНЫХ
РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ**

14.03.09 – “Клиническая иммунология, аллергология”

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
д.м.н., профессор С. В. Сенников

Новосибирск

2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОКИНЫ TNF α И IL-1 β И ИХ РЕЦЕПТОРЫ.....	11
1.1. Провоспалительные цитокины TNF α и IL-1 β	11
1.2. Регуляция биологических эффектов к TNF α и IL-1 β	18
1.2.1. Мембраносвязанные рецепторы TNF α	18
1.2.2 Растворимые рецепторы TNF α	22
1.2.3. Мембраносвязанные рецепторы к IL-1 β	23
1.2.4 Растворимые рецепторы IL-1 β	25
1.2.5 Методы оценки экспрессии рецепторов к иммуномодулирующим цитокинам	26
1.3. Участие TNF α и IL-1 β в формировании и поддержании патологического процесса при ревматоидном артрите	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
2.1. Объект исследования	37
2.2. Определение уровня цитокинов TNF α , IL-1 β , рецепторного антагониста IL- 1 и растворимых рецепторов к TNF α и IL-1 β	39
2.3. Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови.....	40
2.4. Культивирование мононуклеарных клеток in vitro	41
2.5. Определение уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL- 1 β на субпопуляциях мононуклеарных клеток	41
2.6. Методы статистической обработки.....	45
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	48

3.1. Экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на клетках интактных субпопуляций МНК	48
3.2. Экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на моноцитах в спонтанных и LPS-стимулированных культурах МНК	52
3.3. Уровни TNF α и его растворимых рецепторов 1 и 2 типа в сыворотке периферической крови.....	58
3.4. Экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к IL-1 β на клетках интактных субпопуляций МНК	60
3.5. Экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к IL-1 β на моноцитах в спонтанных и LPS-стимулированных культурах МНК	64
3.6. Уровни IL-1 β , его растворимых рецепторов 1 и 2 типа и рецепторного антагониста IL-1 в сыворотке крови.....	69
3.7. Построение моделей множественной линейной регрессии для показателя активности ревматоидного артрита и параметров, характеризующих экспрессию рецепторов к TNF α и IL-1 β	72
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	99
ВЫВОДЫ	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	105

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Ревматоидный артрит (РА) характеризуется глубокими изменениями в иммунной системе аутоиммунной направленности с реализацией хронического воспаления соединительной ткани и преимущественного поражения периферических суставов с развитием в них эрозивно-деструктивных изменений и анкилозирования (Distler et al., 1999). В патогенезе РА задействован самый широкий спектр клеток от моноцитарно-макрофагального пула до Т- и В-клеточных звеньев. В связи с этим, система цитокинов, как важнейших медиаторов межклеточного взаимодействия, играет важнейшую роль на всех этапах развития иммунных реакций при данной нозологии (Насонов, 2000; Furst, 2010).

Фактор некроза опухоли альфа (TNF α) и интерлейкин 1 бета (IL-1 β) как провоспалительные цитокины с широким спектром действия принимают участие в развитии как местного, так и системного воспалительного процесса при РА (Симбирцев, 2002; Folmer et al., 2012; Rubartelli, 2014; Ярилин, 2014). Считается, что в дебюте заболевания превалирует синтез провоспалительных цитокинов, включая TNF α , который обладает способностью запускать целый каскад иммунопатологических реакций и стимулировать продукцию других провоспалительных субстанций (в том числе, IL-1 β), а при хронизации патологического процесса TNF α и IL-1 β способствуют развитию системного аутоиммунного процесса и прогрессирующих костных деструктивных изменений.

Однако, реализация провоспалительных свойств TNF α и IL-1 β возможна только после связывания со специфическими рецепторами. Для каждого из этих цитокинов показано существование двух типов мембраносвязанных и двух типов растворимых рецепторов.

Мембраносвязанные рецепторы TNF α 1 и 2 типа имеют как сходства, так и различия в строении и сигнальных путях. Рецепторы TNF α 1 типа экспрессируются почти всеми типами клеток и, помимо воспалительных

эффектов, способны обеспечивать TNF α -индуцированный апоптоз, в то время как рецепторы TNF α 2 типа экспрессируются преимущественно клетками крови, лимфоидными и эпителиальными клетками и участвуют в реализации пролиферативных процессов (Wajant et al., 2003; Mukai et al., 2010). Растворимые рецепторы 1 и 2 типа к TNF α могут выступать как нейтрализующий агент, ограничивающий эффекты медиатора, как своеобразный запасной пул, из которого цитокин может постепенно высвобождаться (Aderka, 1996; Mohler et al., 1993; Xanthoulea et al., 2004), а также могут участвовать в некоторых специфических способах проведения сигнала в клетку (так называемая «обратная сигнализация» (Eissner et al., 2000)). Кроме того, активность TNF α меняется в зависимости от формы взаимодействующего цитокина – растворимой и мембраносвязанной (Grell et al., 1999; Kirchner et al., 2004).

Биологические эффекты IL-1 β реализуются после связывания со специфическими мембраносвязанными рецепторами IL-1 β 1 типа (IL-1RI) (Stylianou et al., 1992), в то время как мембраносвязанные рецепторы IL-1 β 2 типа не способны к передаче сигнала в клетку, т.е. являются рецепторами-ловушками (Colotta et al., 1993; Mantovani et al., 2001). Растворимые рецепторы к IL-1 β за счет конкурентного связывания в основном выступают в роли ингибиторов его биологических функций (Symons et al., 1995; Arend et al., 2008).

В связи с важностью рецепторов для обеспечения их функций, в настоящее время исследователями ведется активная работа по изучению роли рецепторов к иммунорегуляторным цитокинам в норме и при различных патологиях (Klimiuk et al., 2003; Conti et al., 2008; Cañete et al., 2011; Vooy et al., 2014; Hu et al., 2014). Стандартно используемыми методами исследования экспрессии рецепторов являются оценка процента клеток, несущих рецепторы (Bebes et al., 2014; Müller et al., 2015), и определение уровней содержания растворимых рецепторов в биологических жидкостях (Waage et al., 1987; Klimiuk et al., 2003; Maier et al., 2006; Okamoto et al., 2009). Однако, данные показатели не отражают полной картины состояния системы регуляции биологических эффектов цитокинов. Исследования последних лет показывают, что как в норме, так и при

патологических состояниях интенсивность и вариабельность эффектов, оказываемых иммуномодуляторными цитокинами, в значительной мере зависят от количества экспрессируемых рецепторов на поверхности клеток (Booy et al., 2014). В частности, функциональный ответ клеток на медиатор с изменением числа рецепторов на них может меняться, и при достижении определенного уровня экспрессии рецепторов цитокины и факторы роста могут оказывать на клетки принципиально иные эффекты (Conti et al., 2008; Booy et al., 2014). Кроме того, показано, что при различных соотношениях количества экспрессируемых рецепторов разных типов возможна перекрестная активация их сигнальных путей с модуляцией действия цитокина (Fotin-Mleczeck et al., 2002). В связи с этим, представляется важным и актуальным изучение не только стандартно определяемого процента клеток, экспрессирующих соответствующий рецептор, в субпопуляции, но и числа экспрессируемых рецепторов каждого типа на иммунокомпетентных клетках с последующим сопоставлением с уровнями растворимых рецепторов и самих медиаторов.

Цель: Исследовать показатели экспрессии мембраносвязанных рецепторов к провоспалительным цитокинам TNF α и IL-1 β у больных ревматоидным артритом и оценить их ассоциированность с активностью заболевания.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Оценить уровень растворимых форм рецепторов к TNF α и цитокина в сыворотке крови и экспрессию мембраносвязанных форм рецепторов к TNF α по проценту клеток, экспрессирующих эти рецепторы, и количеству молекул рецепторов на клетках в субпопуляциях Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и моноцитов периферической крови больных ревматоидным артритом в состоянии обострения заболевания и после ответа на терапию.
- 2) Оценить уровень растворимых форм рецепторов к IL-1 β и цитокина в сыворотке крови и экспрессию мембраносвязанных форм рецепторов к IL-1 β по проценту клеток, экспрессирующих эти рецепторы, и количеству

молекул рецепторов на клетках в субпопуляциях Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и моноцитов периферической крови больных ревматоидным артритом в состоянии обострения заболевания и после ответа на терапию.

- 3) Исследовать уровень экспрессии мембраносвязанных форм рецепторов TNF α и IL-1 β на моноцитах в спонтанной и стимулированной культуре мононуклеарных клеток периферической крови больных ревматоидным артритом в состоянии обострения заболевания и после ответа на терапию.
- 4) Оценить ассоциации между показателями экспрессии мембраносвязанных и содержания растворимых рецепторов и медиаторов и интегральным показателем активности ревматоидного артрита DAS-28.

Научная новизна работы

Впервые у больных ревматоидным артритом проведена комплексная оценка экспрессии рецепторов к TNF α 1 и 2 типов и к IL-1 β 1 и 2 типов на Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах и моноцитах не только по проценту клеток, экспрессирующих рецепторы, но и по числу рецепторов на них. При этом установлено, что показатели экспрессии мембраносвязанных рецепторов к IL-1 β и к TNF α ассоциированы с показателями активности ревматоидного артрита.

Впервые показано, что моноциты больных с высокой активностью ревматоидного артрита и В-лимфоциты больных, ответивших на терапию, демонстрируют одновременное разнонаправленное изменение процента клеток, экспрессирующих рецептор к цитокинам TNF α и IL-1 β , и числа рецепторов на них.

Теоретическая и практическая значимость работы

Установленные особенности экспрессии мембраносвязанных рецепторов к TNF α и IL-1 у больных ревматоидным артритом позволяют расширить современные представления о функционировании системы рецепторов к иммуномодуляторным цитокинам при патологии. Показано, что у больных ревматоидным артритом изменения в уровне экспрессии рецепторов реализуются

как через изменение процента клеток, экспрессирующих эти рецепторы, так и через увеличение или уменьшение плотности экспрессии рецепторов к TNF α и IL-1, причем данные изменения могут быть разнонаправленными. В частности, у больных ревматоидным артритом с высокой активностью заболевания показано, что изменение экспрессии рецепторов 1 типа к TNF α и рецепторов 1 типа к IL-1 β на моноцитах происходит со снижением процента позитивных клеток и увеличением количества рецепторов на них, а у больных ревматоидным артритом, ответивших на терапию, разнонаправленные изменения процента клеток и числа рецепторов характерны для показателей IL-1R1 в субпопуляциях В-лимфоцитов и моноцитов.

Выявленные изменения в количестве мембраносвязанных рецепторов к TNF α и к IL-1 β на Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах и моноцитах как клетках, активно вовлеченных в патогенез ревматоидного артрита, в большей степени ассоциированы с показателем активности ревматоидного артрита DAS-28 по сравнению с показателями растворимых медиаторов, растворимых форм рецепторов и количеством клеток, экспрессирующих рецепторы. Полученные данные указывают на вовлеченность изменения количества экспрессируемых рецепторов к цитокинам в патологический процесс при заболевании и дают возможность рассматривать число рецепторов на клетках как перспективную мишень для разработки новых подходов диагностики и таргетной цитокиновой и антицитокиновой терапии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При ревматоидном артрите изменяется не только продукция цитокинов TNF α и IL-1 β и растворимых форм их рецепторов, но и уровень экспрессии мембраносвязанных форм рецепторов к TNF α и IL-1 β на клетках периферической крови.
2. Изменения в экспрессии мембраносвязанных рецепторов к TNF α и IL-1 β при ревматоидном артрите реализуются как через процент позитивных клеток, так и через увеличение или уменьшение плотности экспрессии

рецепторов на них, причем эти изменения могут быть разнонаправленными.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

1. Семинарах экспериментального отдела НИИФКИ (Новосибирск, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015).
2. Отчетных конференциях аспирантов и ординаторов НИИФКИ (Новосибирск, 2012, 2013, 2014).
3. XLIX международной научной конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2011).
4. IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» (Абакан, 2011).
5. X Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» (Иркутск, 2012).
6. Объединенном иммунологическом форуме – 2013 (Нижний Новгород, 2013).
7. 15-ом Международном конгрессе по иммунологии (15th International Congress of Immunology) (Милан, Италия, 2013).
8. Юбилейной научно-практической конференции «Современные проблемы иммунофармакологии биотехнологии и цитокиновой регуляции», посвященной 40-летию ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА РФ. (Санкт-Петербург, 2014).
9. Международном форуме университетской науки-2014 совместно с II Международным конгрессом по биоревматологии (BRIC-GARN 2014 EURASIA) «Достижения фундаментальных наук и персонифицированной медицины в решении проблем системного и аутовоспаления» (Москва, 2014).
10. XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» (Новосибирск, 2015).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 15 работ, в том числе 5 статей в изданиях, рекомендованных ВАК.

Самостоятельность выполненной работы

Результаты по больным ревматоидным артритом, представленные в данной работе, получены лично автором на базе лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ. Результаты по условно-здоровым донором получены Васильевым Ф.Ф. при участии автора и опубликованы ранее (Vasilyev et al., 2013, Lopatnikova et al., 2013).

Большую признательность автор выражает научному руководителю работы профессору, д.м.н. С. В. Сенникову за подробное конструктивное обсуждение полученных результатов, а также сотрудникам лаборатории вычислительной физики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт вычислительной математики и математической геофизики» В. Л. Лукинову, В. С. Гладких и А. В. Москалеву за консультирование по вопросам статистической обработки данных, сотрудникам лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ за ценные замечания и благожелательное отношение в ходе выполнения работы.

ГЛАВА 1. ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОКИНЫ TNF α И IL-1 β И ИХ РЕЦЕПТОРЫ

1.1. Провоспалительные цитокины TNF α и IL-1 β

Среди факторов, определяющих развитие и протекание воспалительных процессов различной этиологии, особое место занимают цитокины, представляющие собой универсальную полиморфную регуляторную сеть медиаторов, предназначенных для контроля процессов пролиферации, дифференцировки и функциональной активности клеточных элементов в кроветворной, иммунной и в других гомеостатических системах организма (Сенников и др., 2001). TNF α и IL-1 β – два ключевых провоспалительных цитокина с общими свойствами, тесно взаимодействующие при развитии как местных, так и системных воспалительных процессов. Однако, они имеют значительные отличия по преимущественно реализуемым биологическим функциям, главным таргетным клеткам и тканям, запускаемым сигнальным путям и организации системы контроля их эффектов в организме.

TNF α

Многофункциональный плейотропный цитокин фактор некроза опухоли альфа – TNF α – является одним из важнейших регуляторов иммуноопосредованных процессов в организме. Спектр его биологических эффектов крайне широк, благодаря чему показано его участие в формировании местного и системного воспаления и защитных реакций организма (Camussi et al., 1991), регуляции апоптоза и некроза (Beyaert, Fiers, 1994; Steller, 1995), а также пролиферации и дифференцировки, стимуляции фагоцитарной и цитотоксической активности клеток (Grell et al., 1999; Liu, 2005), индукции синтеза и усилении действия многих других провоспалительных субстанций (цитокинов – в том числе IL-1, простагландинов) (Hehlgans, Männel, 2002). TNF α участвует в развитии

иммунного ответа, обуславливая пролиферацию Т- и В-лимфоцитов и препятствует возникновению иммунологической толерантности. Также показано, что TNF α тормозит эритро-, миело- и лимфопоэз, но оказывает радиозащитный эффект. По спектру клеток-мишеней и биологических эффектов TNF α близок к IL-1 и IL-6 (Camussi et al., 1991) – на TNF α наиболее активно реагируют моноциты/макрофаги, Т-, В- и НК-клетки, кроветворные, тучные, хрящевые, костные клетки.

Многокомпонентное иммунологическое значение TNF α , помимо этого, включает в себя действие на трансформированные (опухолевые) клетки различной природы, иммуностимуляцию и формирование устойчивости к опухолям (Rosenblum, Donato, 1989; Vilcek, Lee, 1991; Аутеншлюс и др., 2005; Скворцова и др., 2008; Глякин и др., 2012; Соснина и др., 2013), а также формирование устойчивости к инфекционным агентам. С другой стороны, некоторые паразитарные, бактериальные, вирусные инфекции приобретают более патогенный характер или более тяжелое течение под действием циркулирующего TNF α (Waage et al., 1987). Тем не менее, одна из важнейших функций TNF α , по-видимому, – регуляция сопротивляемости против инфекций различной этиологии (Останин и др., 2002). Это связано с активацией разнообразных сигнальных путей (Idriss, Naismith, 2000). Развитие технологий создания и применения различных ингибиторов TNF α подтверждает важную роль этого цитокина и системы его регуляции в патогенезе иммуноопосредованных заболеваний (Бадюкин, 2005; Mukai et al., 2010).

Макрофаги и моноциты являются основными продуцентами TNF α (Tietz..., 2006), так же он синтезируется Т-хелперами, В-лимфоцитами, астроцитами, фибробластами, базофилами, дендритными клетками, НК-клетками, эозинофилами, тучными клетками, Купферовскими клетками, клетками гладкой мускулатуры, эпидермиса, клетками опухолей молочной железы, простаты, глиобластомами, меланомами, клетками опухолей поджелудочной железы (Aggarwal, Natarajan, 1996; Bradley, 2008; MacEwan, 2002; Wajant et al., 2003).

TNF α синтезируется как мембранный белок с молекулярной массой 26кДа, содержит 233 аминокислоты (Camussi et al., 1991). Его N-концевая часть находится в цитоплазме, тогда как С-концевая часть находится вне клетки. Кристаллографические исследования TNF α выявили, что структура белка является β -складчатой, с отсутствием в его нативной структуре α -спиралей, нековалентно самоассоциируется, формируя трехмерные структуры, имеющие форму груши/конуса, где каждая молекула контактирует с двумя другими (Idriss, Naismith, 2000). Каждая субъединица состоит из антипараллельных β -складок, а их С-концы находятся в основании тримера, тогда как N-концы остаются относительно свободными (Eck, Sprang, 1989). N-концевые участки не участвуют в формировании тримера, а также в биоактивности TNF α . Таким образом, активная форма белка представляет собой гомотример, теряющий активность при диссоциации субъединиц, так как только тример способен связываться с рецептором и олигомеризовать его, что необходимо для запуска сигнального пути (Smith, Baglioni, 1987).

Результаты мутационного анализа зрелой молекулы TNF α указывают, что каждый TNF α -тример имеет 3 сайта связывания рецептора, которые локализуются в межсубъединичной бороздке у основания тримера. Хотя TNF α является β -складчатым белком, он может приобрести спиральную форму при кислых pH: при относительно низких значениях pH и в отсутствие связывания с рецепторами с тримером TNF α происходят конформационные изменения, что позволяет ему формировать функциональный ионный канал (Baldwin et al., 1996; Kagan et al., 1992). Это свидетельствует о том, что молекула выполняет чрезвычайно разнообразные функции.

Вновь синтезированный мембранный TNF α располагается на поверхности цитоплазматической мембраны и сбрасывается с нее путем протеолитического расщепления во внеклеточном домене между аланином и валином, под действием специфической металлопротеазы – TNF-конвертирующего фермента (TACE – TNF α -converting enzyme, ADAM17) – мембраносвязанный фрагмент отщепляется и образуется зрелая растворимая молекула TNF α с массой 17кДа, содержащий 157

аминокислот (Glossop et al., 2005; Meyer, 2000). Кроме того, специфический фермент TACE участвует в процессировании TNF-рецепторов, которые высвобождаются из мембраны с образованием растворимых форм, которые могут нейтрализовать действие самого TNF α . Поэтому фермент TACE может способствовать как про-, так и противовоспалительным реакциям, в зависимости от того активируется ли он в клетках-эффекторах (например, макрофагах) или клетках-мишенях (например, эндотелиальных клетках), высвобождая лиганд или рецептор соответственно (Wang et al., 2003).

Обе формы TNF α (растворимая и мембраносвязанная) являются биологически активными (Shurety et al., 2001; Armstrong et al., 2000; Eissner et al., 2004; Lin et al., 2010), однако только в форме гомотримера (Tang et al., 1996). При этом каждая из двух форм цитокина может опосредовать различные эффекты (Ardestani et al., 2013; Zhang et al., 2008; Tarrats et al., 2011) и участвовать в специфических видах взаимодействия с рецепторами (Xin et al., 2006; Rossol et al., 2007; Kirchner, 2004). В сыворотке крови здоровых людей растворимый TNF α практически не определяется. Его уровень возрастает при инфицировании, поступлении в организм бактериальных эндотоксинов (Robak et al., 1998), а также при ряде патологических состояний (Lejeune et al., 1998; Tracey et al., 2001).

Изменение сывороточного уровня TNF α и экспрессии его рецепторов считаются одним из важных маркеров повреждения паренхимы печени (Tarrats et al., 2011) и наряду с другими цитокинами имеет диагностическое и прогностическое значение при лечении гепатита С. Изменение уровня TNF α в крови связывают с ответом на терапию при хронической сердечной недостаточности (Rordorf et al., 2014). Обострение бронхиальной астмы также связано с увеличением продукции TNF α (Berry et al., 2007). Величина и динамика изменений TNF α , в совокупности с IL-1 и IL-6, отражает тяжесть течения ожоговой болезни и характер заживления ожогов (Maass et al., 2002; Barber et al., 2004). TNF α участвует в регулировании сна (Krueger et al., 1998), влияет на эмбриональное развитие (Wride, Sanders, 1995; Yeh et al., 1998), участвует в патогенезе сахарного диабета (Прохоренко и др., 2011). Роль TNF α в

формирования и поддержания воспаления показана при заболеваниях различной этиологии, что, в том числе, подтверждается опытом применения специфических ингибиторов цитокина. Их эффективность показана при ревматоидном артрите (Beutler, Bazzoni, 1998; Kollias, 2005; Strand et al., 2011), язвенном колите (Chaparro et al., 2011), болезни Крона (Gouldthorpe et al., 2011), псориазе (Ferrandiz et al., 2012), кольцевидной гранулеме (Torres et al., 2011), саркоидозе (Milman et al., 2011), меланоме (Marasini et al., 2011), анкилозирующем спондилоартрите (Sieper et al., 2012), синдроме Фелти (Narvaez et al., 2012).

Биологические эффекты TNF α зависят от его концентрации (Ешану, 2004). В низких концентрациях он действует в месте своего синтеза как пара- и аутокринный регулятор воспалительной реакции и для стимуляции противоопухолевых механизмов. Он основной стимулятор для нейтрофилов и эндотелиальных клеток, для их адгезии и дальнейшей миграции лейкоцитов, пролиферации фибробластов и эндотелия при заживлении раны. В средних концентрациях TNF α , поступая в кровь, действует как гормон, оказывая пирогенный эффект, стимулируя образование фагоцитов, усиливает свёртывание крови, снижает аппетит, являясь важным фактором развития кахексии при таких хронических заболеваниях, как туберкулез и рак. Высокие концентрации, определяемые к примеру при грамм-отрицательном сепсисе, – важная причина возникновения септического шока вследствие снижения тканевой перфузии, снижения артериального давления, внутрисосудистого тромбоза, резкого, несовместимого с жизнью, падения концентрации глюкозы в крови (Tietz..., 2006).

IL-1 β

Интерлейкин-1 (IL-1) также относится к группе провоспалительных цитокинов, и является одним из ключевых медиаторов в этой системе (Dinarello, 2010). Благодаря широкому диапазону биологических эффектов, он принимает участие в обеспечении как местных острых воспалительных реакций, так и в поддержании и хронизации воспаления при патологических состояниях различной этиологии (Nambu, Nakae, 2010).

Существуют две формы цитокина – IL-1 α и IL-1 β , которые имеют схожую пространственную структуру (глобулы из 12 β -складок (Graves et al., 1990)), но гомология в аминокислотных последовательностях у них составляет 27%, и они контролируются самостоятельными, неаллельными близкосцепленными генами (Weuscher et al., 1988). При этом у людей доминирующей и активной в отщепленном от мембраны виде формой является IL-1 β . Обе формы цитокина синтезируются в виде 31 кДа предшественников и продуцируются в основном клетками моноцитарно-макрофагального ряда, гепатоцитами и эпителиальными клетками (Arend et al., 2008), а также НК-клетками, В-лимфоцитами, нейтрофилами и мезенхимальными клетками.

Предшественник IL-1 β является биологически неактивным и не обладает способностью связываться с рецепторами IL-1 (Arend et al., 2008). Он отщепляется от мембраны клетки ферментом каспаза-1 (также известен как ICE, IL-1 β -converting enzyme) (Black et al., 1988), активация которого регулируется белковым комплексом – инфламмасомой (Franchi et al., 2009).

IL-1 β имеет важное значение в процессах пролиферации и дифференцировки Т-клеток (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Chung et al., 2009) и В-клеток, способствует высвобождению факторов, стимулирующих дифференцировку миелоидных и лимфоидных клеток (Oppenheim et al., 1986). На местном уровне он стимулирует активацию Т-лимфоцитов и клеток моноцитарно-макрофагального ряда, на системном – способствует развитию гипертермии, потере аппетита, стимуляции гемопоэза, выработке других провоспалительных медиаторов (цитокинов, простагландинов, белков острой фазы) (Nakae et al., 2003; Громова, Симбирцев, 2005; Ешану, 2004). IL-1 β участвует в регуляции и протекании многих важных физиологических процессов, таких как формирование костной ткани, секреция инсулина, регулирование аппетита, рост и увеличение веса мышечной ткани (Amitani et al., 2013; Kotas et al., 2013; Shirazi et al., 2013).

Изменение уровня самого цитокина и его рецепторов связывают с развитием депрессивных расстройств (Young et al., 2014), аутоиммунных воспалительных (таких как гангренозная пиодермия и синдром Свита) (Marzano et al., 2014) и

контактных аллергических заболеваний кожи (Vennegaard et al., 2014), с защитой от некоторых инфекционных агентов (Sutterwala et al., 2007).

Специфические блокаторы к IL-1 β применяют для лечения заболеваний различной этиологии (Dinarello, Van der Meer, 2013), например, ювенильного идиопатического артрита (Zhao, Wallace, 2014), подагры (Sivera et al., 2014), ревматоидного артрита (Wang et al., 2014), других аутоиммунных заболеваний (Jesus, Goldbach-Mansky, 2014). Полиморфизм генов IL-1 β и его рецепторного антагониста связывают с развитием и тяжестью протекания хронического периодонтита (Amirisetty et al., 2015), диабета 2 типа (Achyut et al., 2007), ревматоидного артрита (Swellam et al., 2013; Allam et al., 2013), гастрита и риска развития рака желудка (Kamangar et al., 2006; Xue et al., 2010), хронической обструктивной болезни легких (Lee et al., 2008).

Таким образом, обуславливая широкий спектр биологических эффектов в развитии и протекании иммунных реакций, TNF и IL-1 во многих случаях действуют как синергисты. Оба цитокина являются важными кофакторами активации Т- и В- клеток, способствуют пролиферации и дифференцировке лимфоцитов, стимулируют активность макрофагов и гранулярных NK-клеток, усиливают метаболизм полиморфно-ядерных лейкоцитов. Стимулируя экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости, TNF α и IL-1 определяют презентацию антигенов антигенпрезентирующими клетками. TNF и IL-1 усиливают экспрессию рецепторов для ряда провоспалительных цитокинов и секрецию самих цитокинов, а также хемокинов и простагландинов. Усиление экспрессии молекул адгезии на эндотелиальных клетках при стимуляции их данными медиаторами способствует притоку лейкоцитов к местам воспаления. Также TNF α и IL-1 участвуют в развитии локального некроза тканей.

Провоспалительные цитокины TNF α и IL-1 β через свои рецепторы оказывают самый широкий спектр эффектов как на местном, так и на системном уровне при развитии и протекании различных иммуноопосредованных процессов. Однако эти эффекты на молекулярном уровне обеспечиваются не только продукцией самого медиатора, но и изменениями в системах блокирования и

проведения сигнала в иммунокомпетентные клетки, и, соответственно, в реализации их биологических функций.

1.2. Регуляция биологических эффектов к TNF α и IL-1 β

С учетом столь широких спектров действия TNF α и IL-1 β , существует достаточно сложная система регуляции их биологических эффектов. Помимо дозозависимых эффектов, обуславливаемых сывороточным содержанием растворимого медиатора, для каждого из исследуемых цитокинов она включает в себя 2 вида мембраносвязанных рецепторов, регулирующих различные функции в клетке, и 2 вида растворимых рецепторов, ограничивающих системные эффекты медиатора при выходе его в системную циркуляцию (Kohn et al., 1990; Colotta et al., 1994; Sims et al., 1994; Klimiuk et al., 2003). Кроме того, в систему цитокиновой модуляции включают аутоантитела, являющиеся специфическими регуляторами их функций (Golikova et al., 2013). За связывание с разными формами рецепторов в случае TNF α конкурируют растворимая и мембранная форма самого цитокина (Grell et al., 1999; Kirchner et al., 2004), а в случае IL-1 β – рецепторный антагонист IL-1, IL-1 α и растворимая форма IL-1 β (Liu et al., 2008; Schizas et al., 2014).

1.2.1. Мембраносвязанные рецепторы TNF α

Биологическая активность TNF α реализуется через 2 типа рецепторов – тип 1 (TNFR1, p55, CD120a) и тип 2 (TNFR2, p75, CD120b) с молекулярными массами 55 и 75кДа соответственно (Smith et al., 1990; Lotz et al., 1996).

Рецепторы к TNF α 1 и 2 типа имеют как сходства, так и различия в строении, сигнальных путях и преимущественно реализуемых эффектах. Поверхностные рецепторы к TNF α присутствуют на всех ядерных клетках человека, однако рецептор 1 типа более широко распространен и практически одинаково экспрессируется в клетках организма, тогда как рецептор 2 типа в основном

экспрессируется в эндотелиальных клетках и клетках гемопоэтического ряда (Wajant et al., 2003; Mukai et al., 2010). Оба являются трансмембранными гликопротеинами, имеющими в своем составе внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный домены (Camussi et al., 1991). Внеклеточный домен характеризуется наличием шести высококонсервативных участков, богатых цистеином (Smith et al., 1994). Внутриклеточные домены рецепторов существенно отличаются, их аминокислотные последовательности различны (Camussi et al., 1991) и лишены какой-либо ферментативной активности и активируют различные пути трансдукции сигнала путем привлечения цитолитических белков через специфические взаимодействия (Ledgerwood et al., 1999). Рецепторы 1 типа опосредуют главным образом воспалительные и цитотоксические эффекты TNF α , в то время как рецепторы 2 типа преимущественно участвуют в реализации пролиферативных процессов. Оба типа рецепторов к TNF α могут опосредовать передачу сигнала, ведущего к клеточной смерти, однако только TNFR1 (в отличие от рецептора 2 типа) способен передавать летальный сигнал внутрь клетки-мишени напрямую за счет «домена гибели» в цитоплазматической части молекулы данного рецептора. Такой домен, состоящий из 65-80 аминокислот, участвует в TNF α -опосредованном апоптозе. Он активирует каспазы (цистеиновые протеазы, которые расщепляют белки после определенных конкретных остатков аспарагиновой кислоты), что в свою очередь активирует рецептор (вместе с другими сигнальными молекулами) адапторным белком (например, TRADD или FADD) (Ashkenazi, Dixit, 1998).

Каждый тип рецептора кодируется одним геном. Ген рецептора TNF α 1 типа расположен на 13 участке короткого плеча 12-й хромосомы. Ген рецептора TNF α 2 типа расположен на 36 участке короткого плеча 1-й хромосомы.

С активацией различных сигнальных путей связано участие TNF α через разные типы рецепторов в процессах клеточной пролиферации и дифференцировки, выживания клеток, генерации тканей и тканевого микроокружения (Locksley et al., 2001; Pobezinskaya et al., 2008; Moh et al., 2013). Считают, что TNFR1 обеспечивает большинство биологических активностей

TNF α (Chen, Goeddel, 2002). Прямое проведение сигнала через TNFR2 осуществляется в основном клетками иммунной системы, однако, также известно участие TNFR2 в восстановлении тканей и ангиогенезе. Экспрессия рецепторов 1 типа позволяет клеткам участвовать в процессах координации адгезии лейкоцитов, индукции экспрессии генов МНС, усилении продукции других цитокинов, пролиферации и активации NK-клеток, а удаление TNFR1 приводит к выраженному иммунодефициту (в частности, проявляющемуся в повышении чувствительности мышей к *Listeria monocytogenes*) (Lotz et al., 1996). Эти функции не могут обеспечиваться непосредственно через TNFR2, однако, было показано, что рецептор 2 типа может играть потенцирующую роль в активности рецептора 1 типа (Carpentier et al., 2004). Провоспалительный путь и путь клеточной гибели, активируемые под действием TNF α , в большей степени запускаются через TNFR1; он активирует апоптоз, ядерный фактор транскрипции NF- κ B и c-jun N-терминальную киназу. Известно, что рецептор 1 типа, связывая TNF α и передавая сигнал для активации генов TNF α через MAP-киназы (JNK/p38), принимает участие в аутокринной регуляции продукции TNF α (Blüml et al., 2012). Выраженная экспрессия рецептора TNF α 2 типа может также вызывать активацию NF- κ B и JNK.

При связывании как растворимых, так и мембраносвязанных форм цитокинов с рецепторами, эффекты, оказываемые на клетку, моделируются различными способами: уровнем растворимых медиаторов; компонентами взаимодействия; процентом клеток, экспрессирующих рецепторы; плотностью экспрессии каждого из типов рецепторов; соотношением количества рецепторов 1 и 2 типа на клетке; соотношением между субпопуляциями (по проценту и плотности); внутриклеточными белками целевой клетки. При этом TNF α характерны несколько вариантов взаимодействий между различными формами медиатора и рецепторов (Kollias et al., 1999; Watts et al., 1999; Fotin-Mleczek et al., 2002; Chan et al., 2003; Kirchner et al., 2004;).

Клеточные эффекты, обеспечиваемые различными вариантами взаимодействия TNF α и его рецепторов, приводят к реализации двух основных

групп биологических функций медиатора TNF α : к активации клеточной гибели (проапоптотические пути) или активации «защитных» пролиферативных и воспалительных эффектов. Однако, эффекты, оказываемые на клетку, имеют сложную систему регуляции и обусловлены как минимум пятью вариантами подобных взаимодействий:

- 1) между растворимым TNF α и мембраносвязанным рецептором 1 типа (Fritsch et al., 2014). В этом случае возможен запуск различных сигнальных путей, характерных для TNFR1, и процесс будет регулироваться, в основном, NF- κ B-индуцирующими белками (сIAP1 и сIAP2) (Wajant, Scheurich, 2011);
- 2) между мембраносвязанным (преимущественно) TNF α и мембраносвязанным рецептором 2 типа – этот вариант приводит к активации стандартных для данного типа рецептора сигнальных путей (Marra et al., 2004; Hu et al., 2014). Кроме того, стимуляция мембраносвязанного TNF на Т-лимфоцитах может приводить к увеличению экспрессии интерферона- γ , интерлейкина-4, интерлейкина-2 и молекул адгезии, таких как E-селектин;
- 3) между растворимым TNF α и мембраносвязанным рецептором 2 типа – предполагается, что такое взаимодействие приводит либо к локальному увеличению концентрации TNF α на поверхности клеточной мембран, что позволяет «передать» его на рецепторы 1 типа и запускать его сигнальные и функциональные пути, либо к дезактивации как растворимого TNF α , так и рецепторов 2 типа, либо к непосредственной активации рецепторов 2 типа (Grell et al., 1999; Fotin-Mleczek et al., 2002);
- 4) взаимодействие растворимого TNF со смешанными рецепторными комплексами, которые могут как ограничивать проведение сигналов в клетку, так и, в некоторых ситуациях, облегчать проведение проапоптотических сигналов (Chan et al., 2003);

- 5) обратная сигнализация, при которой молекулой, обеспечивающей восприятие и проведение сигнала в клетку, является мембраносвязанный TNF, а лигандом-активатором – растворимые либо мембраносвязанные рецепторы как 1, так и 2 типа (Kirchner et al., 2004; Grell et al., 1999). При этом показано, что в такого рода контактах важную роль играют взаимодействия между мембраносвязанными рецепторами на клетках одних субпопуляций и мембраносвязанным TNF на клетках других субпопуляций иммунокомпетентных клеток. Обратная сигнализация вызывает снижение пролиферативного потенциала Th2 клеток и увеличение цитотоксичности CD8+ Т-клеток

1.2.2 Растворимые рецепторы TNF α

Осуществление функций цитокинов возможно после связывания медиаторов со специфичными мембраносвязанными и растворимыми рецепторами. Определено 2 типа растворимых рецепторов к TNF α : sTNFR1 (p55) и sTNFR2 (p75) (Idriss, Naismith, 2000), они отличаются одним из шести цистеин-богатых участков во внеклеточном домене рецептора. По своей структуре растворимые рецепторы представляет собой отщепленный ферментом внеклеточный домен соответствующего мембранного рецептора (Nophar et al., 1990; Aderka et al., 1998; Tietz..., 2006), а для рецептора 2 типа показано также образование путем альтернативного сплайсинга (Fernández-Real et al., 2006; Lainez et al., 2004). Известно, что растворимые рецепторы являются мощными регуляторами активности цитокинов. Показано, что они (особенно sTNFR1) могут нейтрализовать TNF α в системной циркуляции и ингибировать его биологическую активность, блокируя антипролиферативные эффекты цитокина и конкурируя с рецепторами TNF α на поверхности клеток, таким образом нарушая проведение сигнала, а также усиливать его паракринные эффекты. С другой стороны, они выступают в роли переносчиков, защищают цитокины от

разрушения протеазами, удлиняя время персистирования в системном кровообращении, и комплексы рецепторов с TNF α можно рассматривать в качестве своеобразного пула связанного рецептора из которого он постепенно высвобождается (Aderka, 1996; Mohler et al., 1993; Xanthoulea et al., 2004). Некоторые растворимые рецепторы образуют с цитокинами комплексы, которые могут связываться на поверхности клеток с другими сигнальными молекулами.

Рецепторы связывают TNF α с разной аффинностью, с константами диссоциации равными $2-5 \times 10^{-11}$ и $3-7 \times 10^{-11}$ для рецепторов 1 и 2 типа соответственно.

У здоровых людей стандартными методами определяется примерно 1-4 нг/мл sTNFR 1 и 2 типа, однако при различных патологических состояниях их содержание может повышаться на порядок и достигать 11-12 нг/мл (Maier et al., 2006). Например, уровень sTNFR1 повышен в сыворотке пациентов с онкологическими заболеваниями, хронической почечной недостаточностью и в бронхо-альвеолярном лаваже пациентов, страдающих респираторным дистресс-синдромом взрослых, коррелирует со степенью тяжести паразитемии и малярии у человека, а также изменяется при ряде других патологических состояний (Насонов и др., 2004; Кричевская и др., 2005). У больных ревматоидным артритом происходит преимущественное повышение растворимого рецептора 2 типа (Cañete et al., 2011).

1.2.3. Мембраносвязанные рецепторы к IL-1 β

Биологические эффекты IL-1 β реализуются после связывания со специфическими мембраносвязанными рецепторами. Существует 2 типа мембраносвязанных рецептора к IL-1 β (IL-1R1 и IL-1R2), однако у рецептора 2 типа отсутствует полноценный цитоплазматический домен, и потому IL-1R2 не способен к передаче сигнала в клетку, т.е. является ловушкой (Colotta et al., 1993; Mantovani et al., 2001). Таким образом, реализация биологических эффектов

цитокина на клетку осуществляется только через 1 тип рецептора (Stylianou et al., 1992; Sims et al., 1994), при этом запуск сигнальных путей через него возможен только при условии наличия в комплексе рецептор-цитокин акцепторного белка рецептора IL-1 (IL1 receptor accessory protein – IL1RAcP) – трансмембранного белка, позволяющего формировать вместе с цитокином и рецептором 1 типа устойчивый гетеротримерный комплекс (Radons et al., 2003). Кроме того, регуляция действия цитокина также осуществляется циркулирующим рецепторным антагонистом IL-1 (raIL-1), конкурирующим за связывание с рецепторами, и, таким образом, являющимся специфическим ингибитором IL-1 (O'Neill, 2008; Nambu, Nakaе, 2010), но не способным связываться с IL1RAcP (Greenfeder et al., 1995).

Мембраносвязанные рецепторы 1 и 2 типа различаются по экспрессии на разных типах клеток. IL-1R1 типа экспрессируются на более широком спектре клеток, различных по происхождению (эндотелиальных, гладкомышечных, эпителиальных, гепатоцитах, фибробластах, кератиноцитах, дендритных клетках и клетках крови) (Dower et al., 1985; Dinarello, 2001; Garlanda et al., 2013). Мембраносвязанные рецепторы IL-1 2 типа в большей степени экспрессируются на мононуклеарных клетках периферической крови (Mantovani et al., 2001).

Рецепторы IL-1 β 1 и 2 типа представляют собой трансмембранные гликопротеины с молекулярной массой 80 кДа и 60 кДа соответственно и имеют три иммуноглобулин-подобных домена во внеклеточном сегменте, трансмембранный и цитоплазматический домены, однако цитоплазматический домен у рецептора 2 типа значительно короче (29 аминокислот против 213 у рецептора 1 типа) (Dinarello, 2001) и не содержит TIR-доменов, что лишает его способности активации сигнальных путей (Sims et al., 1994; Boraschi, Tagliabue, 2006). Внеклеточные домены мембраносвязанных рецепторов IL-1 1 и 2 типа характеризуются высокой гомологичностью, но из-за значительных различий в строении внутриклеточных доменов выполняют принципиально разные функции.

Ген рецептора IL-1 β 1 типа расположен на 12 участке длинного плеча 2-й хромосомы, а ген рецептора 2 типа – на 13 участке длинного плеча 2-й хромосомы.

Запуск сигнальных путей IL-1 β осуществляется после формирования гетеротримерного комплекса (IL1/IL1RI/IL1AcP) (Casadio et al., 2001) через TIR-домены с привлечением ряда внутриклеточных адаптерных белков и киназ (Brikos et al., 2007; Kawagoe et al., 2008), что в итоге приводит к активации NF- κ B, p38 MAPK (mitogen-associated protein kinase), JNK и ERK1/2 (Ninomiya-Tsuji et al., 1999; Arend et al., 2008).

Экспрессия IL-1R1 связана с интенсивностью воспалительного ответа и гиперчувствительностью замедленного типа (Dinarello, 2009), кроме того она является необходимой для продукции IL-17 Т-клетками (Sutton et al., 2006) и эффективной защиты от инфекций, в частности от *Listeria monocytogenes* (Dinarello, 2009). Рецептор IL-1 2 типа конкурирует с рецептором 1 типа как за IL-1, так и за IL-1RAcP, обладая, таким образом, значительным потенциалом для подавления эффектов IL-1 β (Malinowsky et al., 1998; Neumann et al., 2000; Peters et al., 2013).

1.2.4 Растворимые рецепторы IL-1 β

Для IL-1 β показано также существование двух растворимых форм рецепторов (sIL-1R1 и sIL-1R2). Аналогично с растворимыми рецепторами к TNF α , растворимые рецепторы IL-1 представляют собой внеклеточные домены мембраносвязанных рецепторов IL-1 (Symons et al., 1991; Arend et al., 1994), образующиеся либо протеолитическим отщеплением специфическими металлопротеазами (Cui et al., 2003; Uchikawa et al., 2015) (представляет интерес тот факт, что этот процесс может индуцироваться под действием TNF), либо путем альтернативного сплайсинга (показано только для рецепторов 2 типа) (Vambutas et al., 2009). Основная функция растворимых рецепторов IL-1 –

специфическое блокирование цитокина за счет конкуренции с мембраносвязанными рецепторами за связывание с лигандом (Symons et al., 1995; Arend et al., 2008). Но для растворимых рецепторов 1 типа показана также и буферная функция для лигандов IL-1 (Dinarello, 1994).

По аффинности связывания с IL-1 β рецепторы sIL-1R1 и sIL-1R2 отличаются (для 1 типа рецептора она ниже), при этом на процесс связывания влияют конкурирующие молекулы и (в случае с 1 типом рецептора) IL-1RAcP. Кроме того, рецепторы 1 типа обладают большим сродством к IL1RA, чем к IL-1 β (Dinarello, 2001).

Для sIL-1R1 показано, что его уровень изменяется в зависимости от состояния здоровья и возраста – в частности, у здоровых детей до 14 лет его сывороточное содержание примерно в 1,5 раза выше, чем у взрослых (Okamoto et al., 2009). Уровень растворимых рецепторов 2 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 (Dinarello, 2001) и ряде других патологических состояний.

В качестве объекта применения в таргетной терапии иммуноопосредованных заболеваний, растворимый рецептор IL-1 2 типа подходит гораздо лучше, чем рецептор 1 типа, поскольку обладает высокой аффинностью к IL-1 β и низкой к IL-1RA, и связывание IL-1 β с sIL-1R2 практически необратимо (Jacques et al., 2006).

1.2.5 Методы оценки экспрессии рецепторов к иммуномодулирующим цитокинам

В связи с широким спектром эффектов TNF α и IL-1 β в обеспечении различных процессов функционирования организма, для иммунной системы важны как сами цитокины, так и состояние системы их регуляции, в том числе растворимых и мембраносвязанных рецепторов. Стандартно используемыми

методами оценки содержания иммуномодуляторов являются методы определения уровня растворимых форм цитокинов и растворимых рецепторов в физиологических жидкостях (Brockhaus, 1997; Klimiuk et al., 2003; Ikonomidis et al., 2011; Carlsson et al., 2014; Dekker et al., 2014), а также методы проточной цитофлуориметрии для определения относительного процента клеток, несущих тот или иной поверхностный маркер (Kieszko et al., 2007; Mercer et al., 2010; Bebes et al., 2014).

Однако, поскольку модуляция действия цитокинов и эффекты, оказываемые ими на клетку, зависят от многих параметров (уровней растворимых медиаторов, процента клеток, несущих рецепторы, соотношений между субпопуляциями по проценту и плотности, внутриклеточных белков целевой клетки, соотношения количества рецепторов 1 и 2 типа на одной клетке), то к настоящему моменту пристальное внимание как фундаментальной науки, так и клинической иммунологии уделяется такому важному механизму регуляции биологических свойств цитокинов как плотность экспрессии рецепторов на поверхности клеток. Это связано с тем, что, во-первых, для реагирования популяции клеток на медиатор необходим определенный пороговый уровень экспрессии рецепторов для этого медиатора, при этом пороговый уровень для разных субпопуляций клеток будет различаться. Во-вторых, непосредственно функциональный ответ клетки на медиатор зависит от уровня экспрессии рецепторов, а именно имеет определенную закономерность по уровню интенсивности реагирования в зависимости от количества рецепторов на мембране клеток, а также по типу реагирования, который с возрастанием экспрессии рецептора может меняться (Conti et al., 2008; Voou et al., 2014). Например, для рецептора GM-CSF показано, что только при наличии определенного порогового уровня рецепторов на моноцитах при добавлении в культуру самого цитокина происходит дифференцировка клеток предшественников в дендритные клетки, а при меньшем уровне экспрессии рецепторов, несмотря на определенные эффекты внесения в культуру медиатора, качественного изменения функционального состояния клеток не происходит (Conti et al., 2008). Однако данных по влиянию рецепторов

TNF α и IL-1 β на биологическую активность клеток в научной литературе не представлено. Также важно учитывать, что практически для каждого медиатора экспрессируется несколько специфических рецепторов с разной аффинностью, которые начинают работать при разных концентрациях медиатора и запускают разные сигнальные пути (Micheau, Tschopp, 2003; Chen, Goeddel, 2002; Cabal-Hierro, Lazo, 2012; Dinarello, 2001). О необходимости изучения количества экспрессируемых рецепторов на клетке говорят данные о том, что для некоторых цитокинов показаны различия в функциональной активности клеток с разным уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов (Booy et al., 2014; Lutz et al., 2002). В частности, для рецепторов к IFN γ было показано значимое влияние уровня экспрессии рецепторов на интенсивность ответа клеток при внесении в культуру медиатора, при этом корреляция наблюдалась как для белка, так и для мРНК рецептора (Booy et al., 2014). Также в научной литературе представлены данные, показывающие изменения экспрессии рецепторов к цитокинам при патологических состояниях, что свидетельствует о важности учета данных факторов в оценке течения и прогнозирования иммунопатологических процессов (Nagao et al., 2000; Martel-Pelletier et al., 1992; Alsalameh et al., 2003; Sennikov et al., 2014). Для достаточно большого количества рецепторов к цитокинам в настоящее время показаны корреляции с различными патогенетическими процессами. Так для рецепторов IFN γ было показано, что при минимальном уровне экспрессии этих молекул на гепатоцитах отмечается больший размер опухоли, более высокое содержание в сыворотке альфа-фетопротеина, более частые случаи появления внутripеченочных и внепеченочных метастазов (Nagao et al., 2000). Для рецептора TNF α 1 типа установлена значительная роль в проявлении эффектов цитокина в культуре синовиальных фибробластов больных ревматоидным артритом (Alsalameh et al., 2003), также были показаны значимые ассоциации экспрессии рецепторов обоих типов к TNF α и IL-1 β с различными показателями активности заболевания (Martel-Pelletier et al., 1992; Sadouk et al., 1995; Alaaeddine et al., 1997; Müller et al., 2015). Также с использованием современных методов и подходов было доказано участие рецепторов IL-1 β на

субпопуляциях Т-клеток в патогенезе псориаза (Vebes et al., 2014). Таким образом, современные исследования подтверждают участие рецепторного аппарата цитокинов в патогенезе иммуноопосредованных заболеваний. Однако данных, четко описывающих характеристики такого участия и возможности их модуляции, к настоящему моменту не представлено. Подробное исследование характеристик участия рецепторного аппарата цитокинов может быть актуальным и для практической медицины, так как изменение уровня экспрессии рецептора на клетке может рассматриваться как один из перспективных подходов модуляции действия цитокинов на клетку, а сами мембраносвязанные рецепторы – как мишени для таргетной терапии.

В некоторых случаях для оценки плотности экспрессии оценивают среднее значение интенсивности флуоресценции (MFI, mean fluorescence intensity). Однако, сами по себе эти значения являются относительными, и будут варьировать не только в разных лабораториях, но даже на одном и том же приборе в зависимости от текущих настроек, используемых флюорохромов, состояния лазеров и т.д. Для более информативной оценки уровня экспрессии необходимо проводить точный подсчет количества сайтов связывания на поверхности клеток. Существуют различные варианты определения уровня экспрессии мембраносвязанных структур на поверхности клеток. Наиболее часто применяемым является использование калибровочных частиц с известным содержанием флюорохромов (D'hautcourt, 2000; Rossmann et al., 2007), а также описан метод, основанный на кинетике реакции связывания антител с рецептором (Orlova et al., 2011). В настоящий момент, методы количественного определения поверхностных маркеров с помощью наборов калибровочных бус на проточном цитофлуориметре являются наиболее распространенными и простыми в применении. Одним из таких наборов является набор калибровочных бус фирмы BD Biosciences – QuantiBRITE PE, который позволяет определять абсолютное количество поверхностных рецепторов на клетках с использованием флюорохрома PE, связывающегося с антителами в соотношении 1:1 (Pannu et al., 2001; Wang et al., 2011; Jasper et al., 2011).

Таким образом, комплексный подход с определением количественной экспрессии мембраносвязанных рецепторов к TNF α и IL-1 β и с оценкой содержания самих цитокинов и их растворимых рецепторов в сыворотки крови позволит получить ряд новых данных для проведения статистического корреляционного анализа и получить более точную картину функционирования системы регуляции основных провоспалительных медиаторов.

1.3. Участие TNF α и IL-1 β в формировании и поддержании патологического процесса при ревматоидном артрите

Все многообразие функций и возможностей TNF α , IL-1 β и факторов, обеспечивающих их биологическую регуляцию, находит проявление в большинстве патологических состояний организма, в том числе крайне важную роль они играют в патогенезе ревматоидного артрита как заболевания, характеризующегося значительными нарушениями в функционировании иммунной системы (Вах et al., 2011).

Ревматоидный артрит (РА) – это системное воспалительное заболевание соединительной ткани с преимущественным поражением суставов по типу хронического прогрессирующего деструктивного полиартрита, с синовиальной гиперплазией (Distler et al., 1999) и поражением мелких сосудов.

Важную роль в развитии заболевания играют аутоиммунные реакции на некоторые инфекционные агенты с образованием иммунных комплексов (Fiers, 1991; Idriss, Naismith, 2000). В настоящее время выявлено несколько инфекционных агентов, которые могут претендовать на роль этиологического фактора при ревматоидном артрите. К ним в первую очередь относятся вирус Эпштейна-Барра, ретровирусы (включая Т-лимфотропный вирус типа I человека), а также вирусы краснухи, герпеса, парвовирус B19, цитомегаловирус, микоплазму и др. (Dieudé, 2009; Malysheva et al., 2010).

Инициальные воспалительные изменения происходят в синовиальной оболочке суставов, куда «рекрутируются» иммунокомпетентные клетки, продуцирующие провоспалительные цитокины (главным образом $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 и IL-17), а также антитела к компонентам синовии. Увеличение в полости сустава концентрации веществ с потенциально аутоантигенными свойствами еще больше усиливает иммуновоспалительную реакцию, вызывающую дальнейшее повреждение суставных тканей. При этом активация и агрессивная пролиферация синовиальных клеток, а также суставных макрофагов модулируется различными колониестимулирующими факторами (GM-CSF, G-CSF), цитокинами, продуктами метаболизма арахидоновой кислоты и другими медиаторными субстанциями (Distler et al., 1999; Bläss et al., 2001). В частности, антиген-специфическая активация CD4^+ -Т-лимфоцитов по Th-1 типу, характерная для РА, приводит к гиперпродукции IL-2 , $\text{IFN}\gamma$, IL-17 , а также к дисбалансу между провоспалительными ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 и др.) и противовоспалительными цитокинами (IL-4 , IL-10 и др.) с преобладанием продукции первых над вторыми (Dayer, 2004).

Таким образом, под влиянием пока не установленного этиологического фактора и при наличии предрасполагающих факторов в патологический процесс могут вовлекаться практически все компоненты иммунной системы, однако ведущее патогенетическое значение в развитии ревматоидного артрита придается нарушениям в Т- и В-клеточных звеньях (Оранский и др., 2011; Bugatti et al., 2014; Thomas, 2013; Lubberts, 2015; Weitzmann, 2014; Engelmann et al., 2015). Дифференцировка наивных Т-клеток в Th17 приводит к гиперпродукции IL-17 , а активированные Т-клетки пролиферируют и стимулируют продукцию провоспалительных цитокинов (включая $\text{TNF}\alpha$ и IL-6) (Rossi et al., 2015). В-клетки при РА способствуют усугублению патологического процесса через различные механизмы, включающие в себя гиперпродукцию цитокинов, абберантные процессы презентации антигенов, и, в целом, множественные нарушения нормального функционирования клеток с фенотипом В-лимфоцитов

(Marston et al., 2010). Кроме того, РА характеризуется наличием аутореактивных В-клеток в системном кровотоке (Eisenberg, Albert, 2006).

В развитии ревматоидного воспаления важная роль отводится моноцитам и макрофагам. В синовиальной жидкости и тканях суставов при ревматоидном артрите содержится избыточное количество цитокинов, в основном макрофагального происхождения (IL-1, TNF α , GM-CSF, IL-6) при минимальном содержании Т-клеточных цитокинов (IL-2, -3 и -4, IFN γ) (Kokkonen et al., 2010; Song, Kang, 2010). IL-1 β и TNF α могут усиливать экспрессию молекул адгезии на мембранах эндотелия сосудов синовиальной мембраны и их лейкоцитарных лигандов, индуцировать синтез хемотаксических факторов (IL-8 и моноцитарный активирующий фактор), а также стимулировать продукцию фактора роста фибробластов и медиаторов воспаления. IL-1 β и TNF α активно синтезируются в синовиальной мембране в основном клетками моноцитарно-макрофагального ряда (Saklatvala, 1986), являясь при этом мощными индукторами синтеза IL-6, который, воздействуя на гепатоциты, приводит к гиперпродукции острофазных белков (С-реактивного, амилоидного белков, фибриногена и др.) (Rho et al., 2009). Эрозия хрящей и костей при ревматоидном артрите обусловлена действием макрофагов и фибробластов, стимулированных цитокинами (их продуцируют активированные Т-клетки) – одним из главных среди них является TNF α – и иммунными комплексами, образующимися в результате сильной иммунологической реакции в синовиальной ткани. Активация агрессивного клеточного роста фибробластов, разрушающего синовиальную матрицу, является ключевым событием в патогенезе ревматоидного артрита. В результате клеточной активации происходит нарушение экспрессии молекул, регулирующих апоптоз, так же как и протоонкогенов (Distler et al., 1999). Целый ряд дефектов на различных уровнях и в разных клетках приводит к Т-клеточной и гиперпролиферации клеток синовиальной оболочки, дефектному апоптозу (Hsu et al., 2006) и к нарушениям процессов костного ремоделирования (Kmieć, Sokołowska, 2007; Nanki, 2007).

TNF α является одним из самых мощных цитокинов, продуцирующихся в процессе воспаления, он способствует остеокластогенезу и играет важнейшую роль в патогенезе РА (Romas et al., 2002). Вступая в сложные взаимоотношения с паратгормон-связанным белком (PTHrP), лигандом рецепторного активатора нуклеарного фактора карра- β (RANKL) и целевым рецептором, связывающим RANKL, – остеопротегерином (OPG), TNF α и IL-1 действуют согласованно с RANKL и могут мощно способствовать рекрутменту остеокластов, их активации и остеолizu в патогенезе РА (Nanki, 2007; Roux, Orcel, 2000; Новиков и др., 2010).

При ревматоидном артрите IL- β стимулирует активацию Т-клеток (Nakae et al., 2001); стимулирует пролиферацию и созревание В-клеток (Dinarello, 2009); индуцирует дифференцировку Т-хелперов 17 (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Chung et al., 2009). Медиатор IL-1 β стимулирует синтез цитокинов, простагландина E₂, белков острой фазы; индуцирует выработку циклооксигеназы-2, фосфолипазы A₂ и синтазы оксида азота (NO); оказывает стимулирующий эффект на созревание остеокластов, синтез коллагеназы синовиальными клетками, синтез остеокласт-активирующего фактора и гематопоэтина-1; индуцирует экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках и синтез хемокинов стромальными клетками (Dinarello, 1994; Gabay et al., 2010). Кроме того, IL-1 β участвует в формировании костной ткани (Lee et al., 2014).

Ведущая роль TNF α и IL-1 β при ревматоидном артрите подтверждена многочисленными *in vivo* и *in vitro* экспериментальными исследованиями, а также опытом применения анти-цитокиновых препаратов (Martel-Pelletier et al., 1992; Ounissi-Benkhalha et al., 1996; Sadouk et al., 1995; Niu et al., 2011; Matsuyama et al., 2012; Haas, Straub, 2012; Nie et al., 2013; van Schouwenburg et al., 2013; Umar et al., 2015). Показано что, продукция широкого спектра провоспалительных цитокинов в культуре клеток из суставов пациентов с ревматоидным артритом, может ингибироваться при использовании нейтрализующих антител к TNF α (Butler et al., 1995).

Таким образом, в патогенезе ревматоидного артрита провоспалительные цитокины TNF α и IL-1 β играют крайне важную роль, оказывая повреждающее действие за счет:

- прямого цитотоксического действия на клетки синовиальной оболочки и хрящевой ткани, серозных оболочек и эндотелия сосудов;
- стимулирования резорбции и ингибирования синтеза протеогликанов в эксплантатах хряща, что способствует разрушению ткани;
- непосредственного участия в регуляции остеокластогенеза и остеолизиса
- избыточная продукция цитокинов способствует резорбции костной ткани;
- опосредованного участия в стимуляции образования иммунных комплексов;
- стимулирования продукции фактора роста фибробластов и медиаторов воспаления, усугубляющего дисбаланс про- и противовоспалительных субстанций;
- усиления экспрессии молекул адгезии на мембранах эндотелия сосудов синовиальной мембраны и их лейкоцитарных лигандов;
- участия вместе с IFN γ в регуляции экспрессии иммунокомпетентными клетками RANKL, так же являющегося важным медиатором в процессах костного ремоделирования;
- регуляции апоптоза и провокации различных его нарушений: дефективному апоптозу, чрезмерному апоптозу;
- проявления своих общих провоспалительных функций, как в данной нозологии, так и в сопутствующих заболеваниях.

При этом эффекты этих провоспалительных медиаторов на молекулярном уровне обеспечиваются не только нарушением продукции самих цитокинов, но и изменениями факторов, способствующих реализации их биологических функций, и от ограничителей, связывающих и дезактивирующих. И в настоящее время исследователями ведется активная работа по изучению роли рецепторов к цитокинам как молекул, обеспечивающих проведение сигнала в клетку и, соответственно, регулирующих осуществление биологических функций

медиаторов. Многочисленными исследователями показаны изменения в системе растворимых рецепторов при данной патологии: значимо повышаются уровни растворимых рецепторов обоих типов, причем в большей степени – рецепторов 2 типа (Klimiuk et al., 2003; Cañete et al., 2011). Однако изменения в системе мембраносвязанных рецепторов охарактеризованы в значительно меньшей степени и, в основном, на экспериментальных моделях. В частности, в исследовании на трансгенных мышах с геном человеческого TNF α была продемонстрирована различная роль рецепторов 1 и 2 типа к TNF α в развитии гистологической и клинической картины воспаления при эрозивном артрите, и экспрессия рецепторов TNFR2 на гемопоэтических клетках при заблокированной экспрессии TNFR1 связана с меньшими эрозивными поражениями костной ткани (Blüml et al., 2010).

Ряд литературных данных подтверждает активное участие в патогенезе иммуноопосредованного заболевания РА не только самих цитокинов TNF α и IL-1 β и их растворимых рецепторов, но также и мембраносвязанных рецепторов. Изучение характера и типа реагирования клеток на медиаторы в зависимости от количества экспрессируемых специфических рецепторов на клетках имеет важное значения, как для фундаментальной науки, так и для клинической практики. В большинстве случаев оценивается лишь процентное содержание клеток, экспрессирующих рецепторы, в различных субпопуляциях, что не позволяет полностью охарактеризовать активность и вовлеченность клеток данных субпопуляций в цитокин-опосредованные процессы. Одновременное комплексное изучение и сопоставление всех компонентов системы TNF α – самого медиатора, растворимых и мембраносвязанных рецепторов к нему – при ревматоидном артрите и сравнение с показателями условно-здоровых доноров ранее не проводилось, в связи с чем настоящее исследование представляется весьма актуальным.

Таким образом, анализ разработанности проблемы показывает важность и актуальность более глубокого и детального изучения вопросов регуляции биологических эффектов TNF α и IL-1 β при патологии; необходимость

привлечения и изучения количественных показателей экспрессии мембраносвязанных и содержания растворимых форм рецепторов с целью интерпретации и обобщения качественных характеристик.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

Объектами исследования являлись мононуклеарные клетки периферической крови и сыворотка периферической крови больных ревматоидным артритом, находившихся на госпитализации в ревматологическом отделении клиники иммунопатологии НИИФКИ, г. Новосибирск.

Диагноз ревматоидного артрита верифицирован в соответствии с критериями ACR (2010 г.). Активность РА определялась согласно методике расчета индекса DAS-28 с использованием оценки пациентом общего состояния здоровья по визуальной аналоговой шкале, подсчета количества болезненных и припухших суставов (из 28), определения СОЭ. Все пациенты на момент поступления в отделение имели высокую активность заболевания ($DAS-28 > 5.1$). Кровь для исследования забиралась у пациентов в стадии обострения заболевания и после прохождения курса лечения на основе базисной терапии, включая биологический агент (ритуксимаб) или пульс-терапию метилпреднизолоном, при условии эффективности лечения по критерию EULAR (хороший или удовлетворительный ответ на терапию) и выявления положительной клинической и/или лабораторной динамики: изменение индекса $DAS-28 > 1.2$ при исходном значении > 5.1 (далее – больные, ответившие на терапию).

Группу больных в стадии обострения составили 40 человек в возрасте от 28 до 75 лет, 32 женщины и 8 мужчин. Группу больных, ответивших на терапию, составили 24 человека в возрасте от 28 до 75 лет, 21 женщина и 3 мужчин.

В качестве контрольной группы сравнения были использованы данные по условно-здоровым донорам, полученные в лаборатории молекулярной лаборатории Васильевым Ф.Ф. при участии автора и опубликованные ранее (Vasilyev et al., 2013, Lopatnikova et al., 2013). Образцы цельной крови были получены в пункте заготовки крови №1 ГБУЗ НСО «Новосибирский центр

крови», выборка сформирована из числа жителей г. Новосибирска (n=150) в возрасте от 19 до 55 лет, 83 мужчины и 67 женщин.

Исследование проводилось с добровольного информированного согласия всех больных и условно-здоровых доноров; одобрено локальным этическим комитетом (протокол НИИ КИ СО РАМН №52 от 23.06.2010 г. и протокол НИИФКИ №84 от 8.09.2014 г.).

Общая схема эксперимента представлена на схеме (рисунок 1).

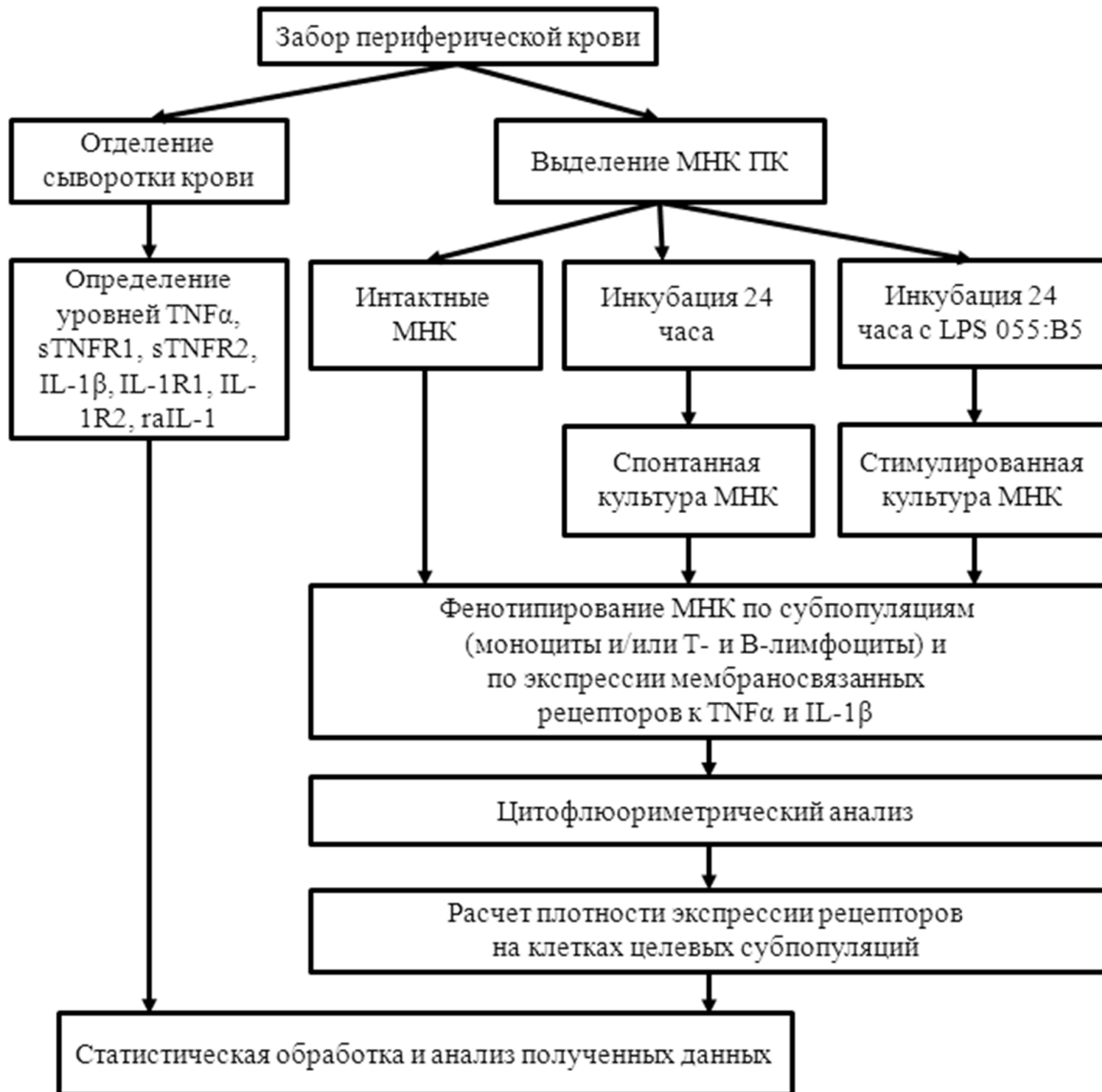


Рисунок 1. Общая схема экспериментальной части работы после забора крови у больных ревматоидным артритом в состоянии обострения и после ответа на терапию.

2.2. Определение уровня цитокинов TNF α , IL-1 β , рецепторного антагониста IL-1 и растворимых рецепторов к TNF α и IL-1 β .

Для получения образцов сыворотки, венозную кровь (4 мл) набирали в вакуумные пробирки с сывороточным активатором, (Vacuette Z Serum Clot Activator, Greiner Bio-One GmbH, Австрия), отстаивали в течение 1 часа, центрифугировали 20 минут при 3000 об/мин и забирали сыворотку с последующим хранением при -20°C до проведения анализов.

Уровень продукции медиаторов определяли в сыворотке крови иммуноферментным твердофазным анализом с использованием соответствующих наборов:

- Human sTNF RI ELISA Kit (RayBiotech, Inc., США).

Коэффициент вариации результатов $\leq 10\%$, чувствительность (минимально определяемая концентрация) менее 5 пг/мл, диапазон измеряемых концентраций 0-400 пг/мл (рекомендованное производителем разведение образцов - в 1-10 раз);

- Human sTNF RII ELISA Kit (RayBiotech, Inc., США).

Коэффициент вариации результатов $\leq 10\%$, чувствительность (минимально определяемая концентрация) менее 1 пг/мл, диапазон измеряемых концентраций 0-2000 пг/мл (рекомендованное производителем разведение образцов - в 5-10 раз);

- Human IL1 sRI ELISA Kit («RayBiotech, США).

Коэффициент вариации результатов $\leq 10\%$, чувствительность (минимально определяемая концентрация) менее 6 пг/мл, диапазон измеряемых концентраций 0-2000 пг/мл (рекомендованное производителем разведение образцов - в 2 раза);

- Human IL1 sRII ELISA Kit («RayBiotech, США).

Коэффициент вариации результатов $\leq 10\%$, чувствительность (минимально определяемая концентрация) менее 5 пг/мл, диапазон измеряемых

концентраций 0-3000 пг/мл (рекомендованное производителем разведение образцов - в 20-100 раз);

- Альфа-TNF-ИФА-БЕСТ (ЗАО "Вектор-Бест", Россия).

Коэффициент вариации результатов $\leq 8\%$, чувствительность (минимально определяемая концентрация) не превышает 1 пг/мл, диапазон измеряемых концентраций 0-250 пг/мл;

- Интерлейкин-1 бета-ИФА-БЕСТ (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Коэффициент вариации результатов $\leq 8\%$, чувствительность (минимально определяемая концентрация) не превышает 1 пг/мл, диапазон измеряемых концентраций 5-250 пг/мл;

- Рецепторный антагонист IL-1-ИФА-БЕСТ (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Коэффициент вариации результатов $\leq 8\%$, чувствительность (минимально определяемая концентрация) не превышает 10 пг/мл, диапазон измеряемых концентраций 0-3000 пг/мл;

согласно инструкциям 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) с референс-волной 620 нм.

2.3. Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови

Венозную кровь больных ревматоидным артритом забирали натошак из локтевой вены в стерильных условиях по 9 мл в вакуумные пробирки с антикоагулянтом К3-EDTA (3-х замещенной калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты, Vacuette K3-EDTA, Greiner Bio-One GmbH, Austria). МНК выделяли стандартно (Böyum, 1968) из венозной крови путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина: 4,5 мл крови, разведенной в два раза в культуральной среде RPMI-1640 (ООО «БиолоТ»,

Россия), наслаивали на 3 мл фиколл-урографина ($\rho=1,077$ г/л) (фиколл (Pharmacia Fine Chemical, Швеция), урографин (Шеринг АО, Германия)), центрифугировали при 1500 оборотах в минуту в течение 45 минут. МНК ПК собирали из интерфазы и отмывали в культуральной среде RPMI-1640 дважды путем ресуспензирования с дальнейшим центрифугированием на 1500 об/мин в течение 10 минут и удалением надосадочной жидкости. Осадок ресуспендировали и разбавляли в полной культуральной среде RPMI-1640, содержащей 10% FCS («HyClone», США), 2 mM L-глутамина (ООО «БиолоТ», Россия), 5×10^{-4} M 2-меркаптоэтанола («Sigma-Aldrich», США), 80 мкг/мл гентамицина («KRKA», Словения), 10 mM HEPES буфера («Sigma-Aldrich», США), 100 мкг/мл бензилпенициллина (ОАО «Биосинтез», Россия) до концентрации клеток 2 млн/мл.

2.4. Культивирование мононуклеарных клеток *in vitro*

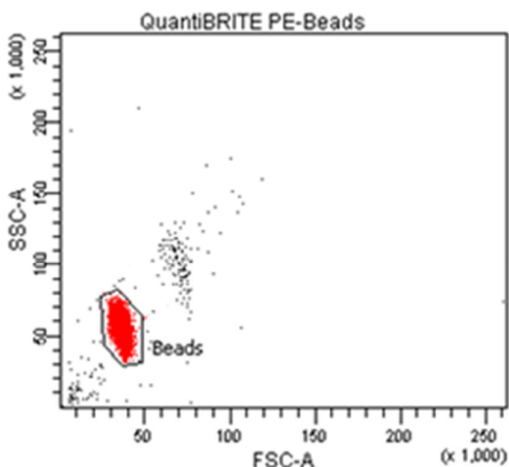
МНК культивировали в конечной концентрации 2 млн. клеток/мл в 96-луночном планшете (TPP, Швейцария) в течение 24 часов в инкубаторе во влажной атмосфере при температуре 37°C и концентрации CO₂ 5% в отсутствии и присутствии LPS *Escherichia coli* (серотип 055:B5, «Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 200 нг/мл.

2.5. Определение уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL-1 β на субпопуляциях мононуклеарных клеток

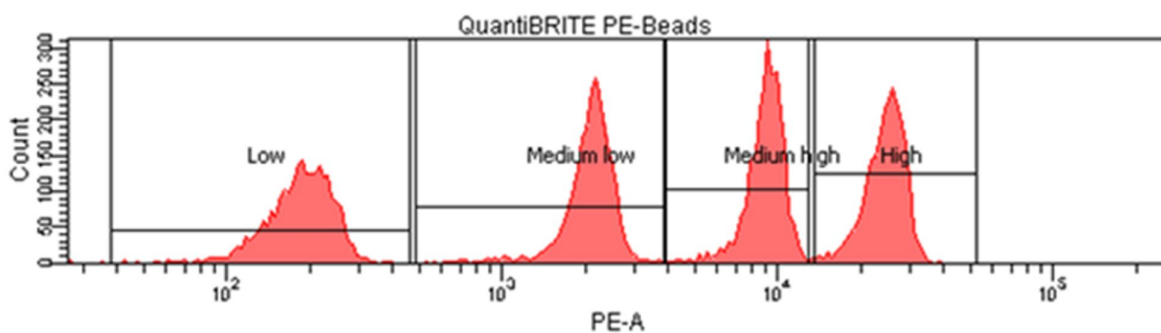
Оценка фенотипических характеристик проводилась методом проточной цитометрии (цитофлуориметры FACSAria и FACSVerse (BD, США)) с использованием моноклональных антител: APC-конъюгированных анти-CD3 (клон ОКТ3), FITC-конъюгированных анти-CD14 (клон 61D3) и PE-Cy7-конъюгированных анти-CD19 (клон H1B19) (eBioscience, San Diego, CA), а также

anti-humanTNFRI-PE, anti-humanTNFRII-PE, anti-human IL-1 RI и anti-human IL-1 RII PE (R&D Systems, Minneapolis, MN). Обработка данных и расчет показателей интенсивности флюоресценции производились с использованием программного обеспечения FacsDiva (BD, США).

Для создания калибровочной кривой и перевода значений интенсивности флуоресценции клеток, экспрессирующей 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 разводилась в 500 мкл PBS (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ x12H₂O, 1,47 mM KH₂PO₄, 0,53 mM EDTA и 0,1% NaN₃), перемешивалась в течение 1 минуты и анализировалась на проточном цитометре. На FSC-A/SSC-A дот-плоте гейтировали популяцию бус и записывали 10,000 событий. Далее на гистограмме PE флуоресценции выставляли маркеры по четырем пикам калибровочных частиц (Low, Medium Low, Medium High, High). (рисунок 2).



Гейт калибровочных частиц на дот-плоте прямого и бокового светорассеяния (FSC-A/SSC-A).



Гистограмма флуоресценции по каналу PE

Specimen Name: QuantiBRITE PE		Tube Name: Beads	
Population	#Events	%Parent	PE-A Mean
■ Beads	9,712	97.1	9,168
☒ Low	2,329	24.0	191
☒ Medium low	2,466	25.4	2,125
☒ Medium high	2,490	25.6	9,168
☒ High	2,416	24.9	25,029

Статистика

Рисунок 2. Анализ калибровочных частиц QuantiBRITE PE на цитофлуориметре: гейт калибровочных частиц на дот-плоте FSC-A/SSC-A; калибровочные частицы на гистограмме PE флуоресценции (маркеры выставлены по четырем пикам калибровочных частиц – Low, Medium Low, Medium High, High).; статистика.

Согласно инструкции фирмы-производителя, по результатам анализа бус был построен график зависимости логарифмических значений числа молекул фикоэритрина от логарифмических значений интенсивности флуоресценции и с помощью построения линии тренда была установлена математическая линейная зависимость (рисунок 3). Полученная зависимость использовалась для составления формулы перевода значений интенсивности флуоресценции по каналу PE в число молекул PE для каждой из субпопуляций, и были подсчитаны средние значения количества рецепторов на клетке в каждой из субпопуляций.

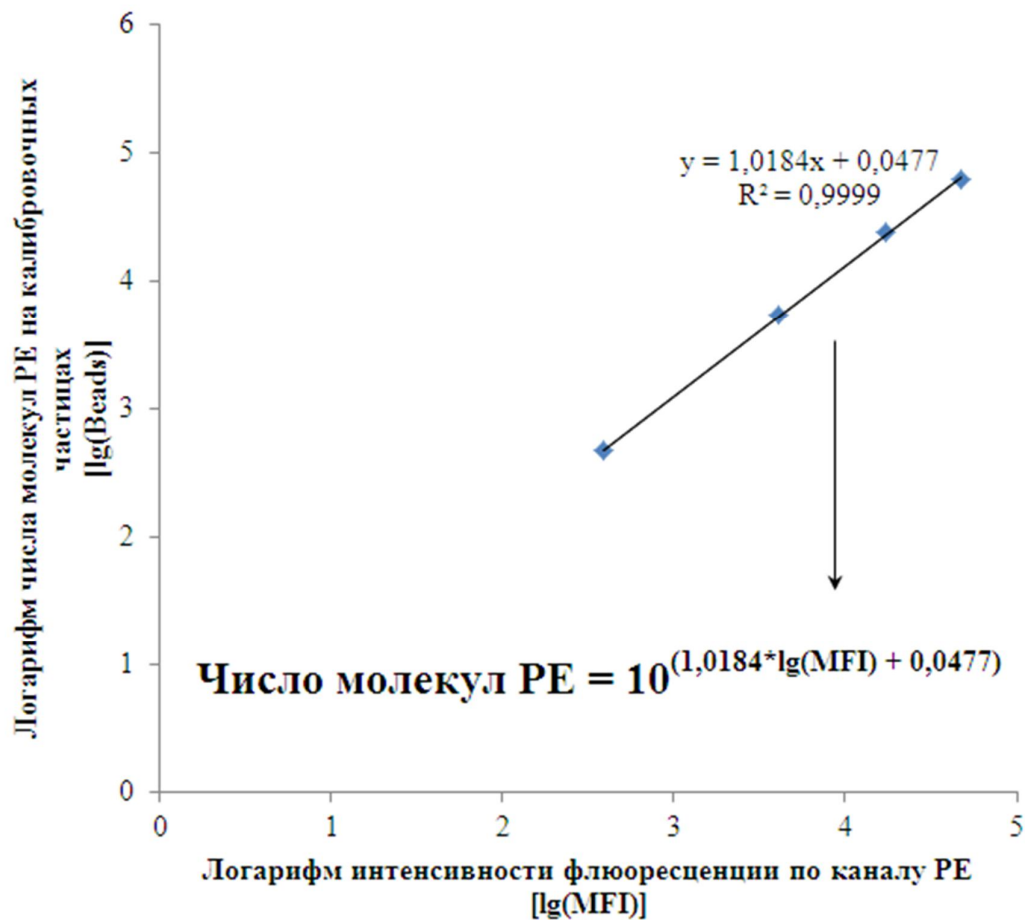


Рисунок 3. Калибровочная кривая BD QuantiBRITE PE. Зависимость логарифмических значений числа молекул PE от интенсивности флуоресценции.

Для наилучшей стабильности и воспроизводимости результатов были подобраны оптимальные условия протокола пробоподготовки и фенотипирования клеток, включающие в себя:

- суспензию свежевыделенных либо ресуспензированных культивированных МНК центрифугировали дважды при 1200 об/мин 10 минут с последующим ресуспензированием осадка в PBS с BSA 1%;
- проводилась инкубация в 12×75 мм пробирках для проточной цитометрии в PBS с человеческим IgG (ФГУП «НПО «Микроген», Россия) в конечной концентрации 3 мг/мл 20 минут в темноте при комнатной температуре для блокировки Fc-рецепторов и уменьшения неспецифического связывания антител с ними при фенотипировании;
- инкубация с субпопуляционными маркерами anti-hCD3-APC, anti-hCD19 PE-Cy7, anti-hCD14 FITC, а также с подобранной насыщающей концентрацией моноклональных антител к одному из типов рецепторов (10 мкл антител anti-hTNFR1-PE, anti-hTNFR2-PE, anti-human IL-1 RI или anti-human IL-1 RII PE на 100 тысяч клеток) производилась в течение 45 минут при температуре +4°C в темноте.

Далее клетки отмывались дважды в 2 мл PBS с 1% BSA и сразу анализировались на проточном цитометре в 100 мкл PBS без фиксации. Исследование экспрессии рецепторов TNF α и IL-1 β проводилось при тех же параметрах вольтажа фотоэлектронного умножителя по PE-детектору, что и при проведении анализа калибровочных бус, что позволило конвертировать значения интенсивности флуоресценции в число PE молекул на клетку. Далее, число PE молекул на клетку переводилось в число молекул антител на клетку с помощью известного соотношения молекул PE на антитело, равное 1:1. Проверка настроек цитометра проводилась еженедельно с помощью Cytometer Setup and Tracking (CS&T) beads (BD Biosciences, США).

2.6. Методы статистической обработки

Статистическая обработка данных производилась с использованием программного обеспечения STATISTICA 7.0 (StatSoft, США) и базовых пакетов

статистической среды R (<https://www.r-project.org>). Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, сравнение независимых выборок с определением статистической значимости отличий проводилось с использованием критерия Манна-Уитни (при сравнении показателей здоровых доноров и больных РА, число последовательных сравнений – 2) и непараметрического дисперсионного рангового критерия Краскела-Уоллиса с множественным сравнением медиан (при сравнении идентичных показателей для разных субпопуляций, число последовательных сравнений больше двух – 3). Корреляции между исследуемыми параметрами устанавливались с использованием коэффициента корреляции Спирмана (при $p \leq 0,05$). Статистическая значимость стимуляции в спонтанных и стимулированных культурах и изменений в зависимых выборках устанавливалась с помощью критерия Вилкоксона (отличия считались значимыми при $p \leq 0,05$).

Для выявления линейных связей между интегральным показателем активности ревматоидного артрита DAS-28 и исследуемыми параметрами экспрессии мембраносвязанных рецепторов к TNF α и IL-1 β и содержания растворимых рецепторов и растворимых форм цитокинов TNF α и IL-1 β использовались модели множественной линейной регрессии (ММЛР) со стандартной оценкой коэффициентов регрессии методом наименьших квадратов. Для показателей каждого из цитокинов строилась отдельная модель, которая модифицировалась с помощью последовательной редукции количества предикторов путем устранения статистически незначимых предикторов для улучшения качества ММЛР. Построение ММЛР проводилось с помощью базовых пакетов статистической среды R. Для моделей в отдельных группах (больные РА в стадии обострения; больные РА, ответившие на терапию) теоретически предполагалась гомоскедастичность остатков, что было подтверждено исследованием графиков распределения остатков во всех моделях. Для получения возможности количественного сравнения коэффициентов в ММЛР с учетом того, что исследуемые параметры (процент клеток в субпопуляциях, число рецепторов на клетках и содержание растворимых медиаторов в сыворотке) различались на 1-

4 порядка, в прилагаемых моделях проводилась нормировка исходных данных. Для этого учитывались распределения данных параметров в контрольной группе как величина в три интерквантильных интервала (25-75 квартили) соответствующего показателя здоровых доноров плюс один, которая влияла на значения коэффициентов модели и позволяла сопоставлять величины коэффициентов между показателями с разными шкалами, но не влияла на другие статистические показатели моделей.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на клетках интактных субпопуляций МНК

Для изучения регуляции биологической эффективности провоспалительного цитокина TNF α , играющего ключевую роль как в развитии, так и в хронизации патологического процесса при ревматоидном артрите, необходимо оценивать экспрессию рецепторов 1 и 2 типа к нему клетками, вовлеченными в патологический процесс. Для исследования нами были выбраны 3 основные субпопуляции иммунокомпетентных клеток периферической крови – Т-лимфоциты (CD3+), В-лимфоциты (CD19+) и моноциты (CD14+) больных в состоянии обострения и после ответа на терапию, поскольку они являются клетками, наиболее активно вовлеченными в системный воспалительный ответ, а также принимают участие в местных реакциях. Анализ фенотипических характеристик МНК ПК проводили методом проточной цитометрии. Оценивался процент клеток, несущих рецепторы 1 и 2 типа (рисунок 4), в каждой из субпопуляций и рассчитывалось количество самих экспрессируемых рецепторов на клетках (рисунок 5).

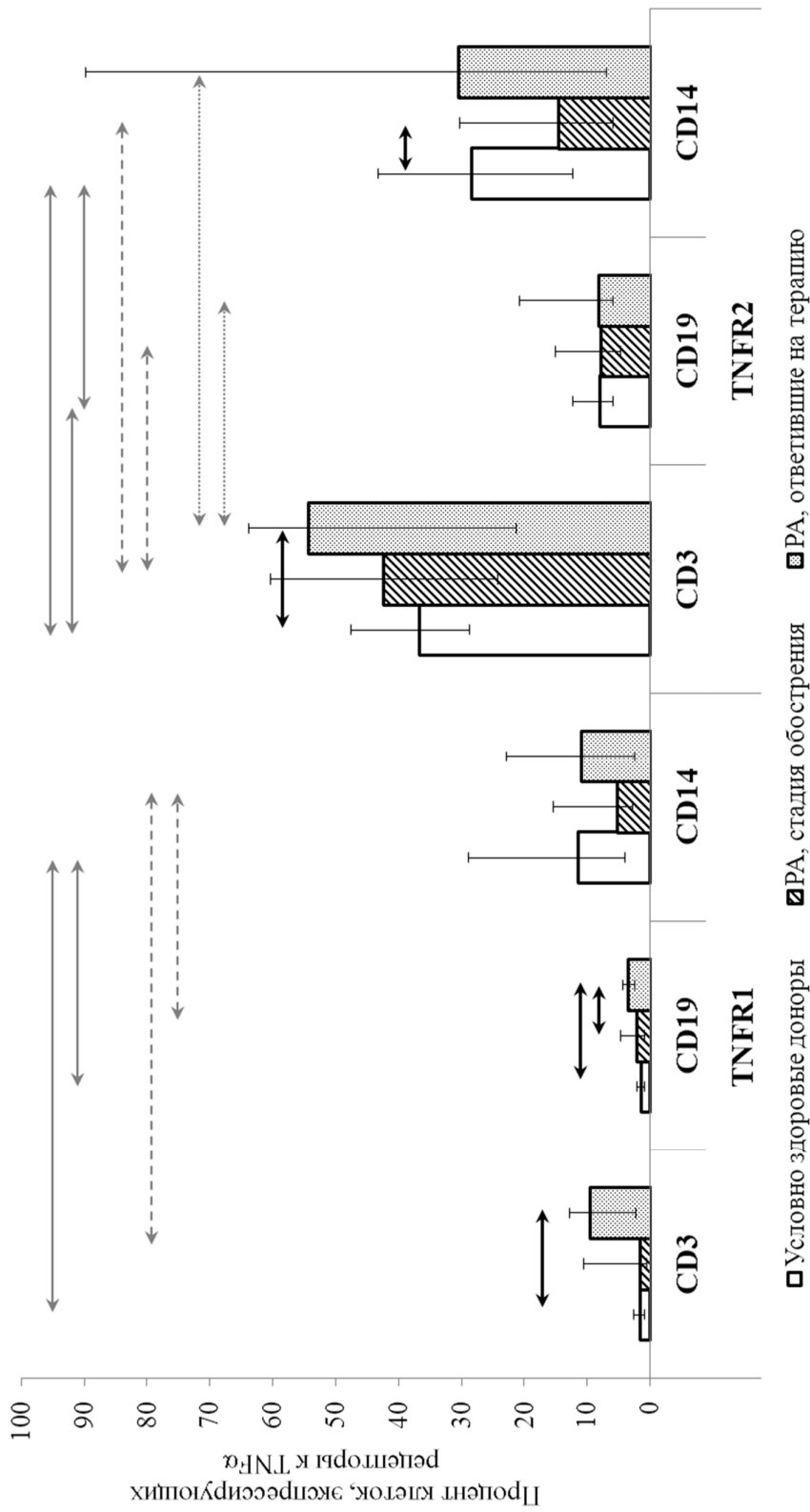


Рисунок 4. Процент клеток, экспрессирующих TNFR1 и TNFR2, в субпопуляциях МНК условно-здоровых доноров (n=150), больных РА в состоянии обострения (n=40) и после ответа на терапию (n=21). Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелками на рисунке указана статистическая значимость отличий между группами исследуемых, $p \leq 0,05$.

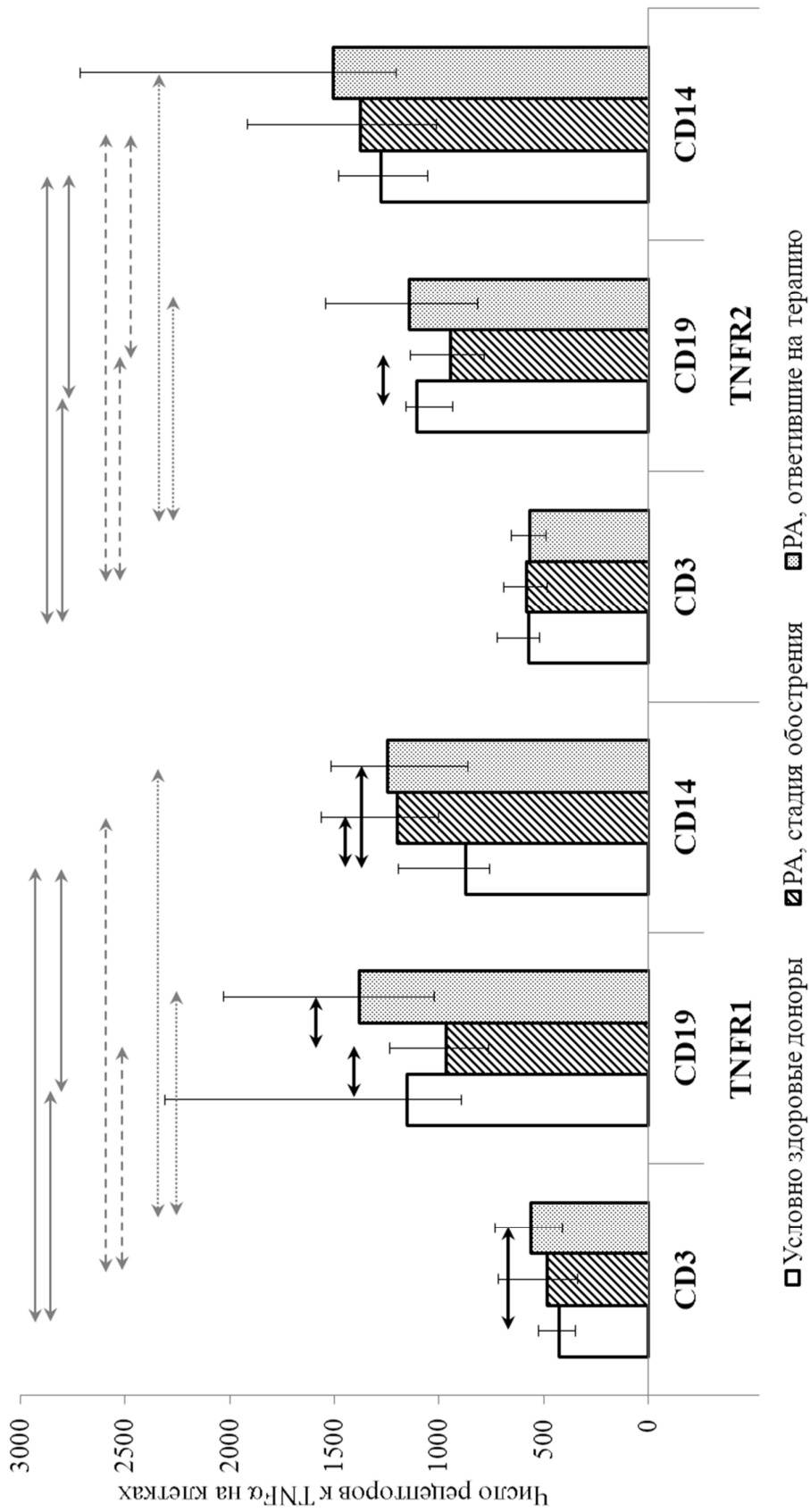


Рисунок 5. Плотность экспрессии TNFR1 и TNFR2 на клетках в субпопуляциях МНК условно-здоровых доноров (n=150), больных РА в состоянии обострения (n=41) и после ответа на терапию (n=20). Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелками на рисунке указана статистическая значимость отличий между группами исследуемых, $p \leq 0,05$.

Во всех исследуемых группах показано, что процент клеток, экспрессирующих рецепторы 1 типа, меньше варьирует от популяции к популяции, в то время как для процента TNFR2+ клеток характерна большая вариабельность показателей от популяции к популяции клеток. И у здоровых доноров, и у больных РА есть популяция как с наибольшим процентом клеток, экспрессирующих рецепторы 2 типа (Т-лимфоциты), так и с наименьшим процентом (В-лимфоциты). При этом во всех исследованных группах внутри каждой субпопуляции выше процент клеток, экспрессирующих рецепторы 2 типа, чем процент клеток, экспрессирующих рецепторы 1 типа.

Для всех групп исследованных установлено, что в каждой субпопуляции процентное содержание интактных клеток, экспрессирующих TNFR1 и процентное содержание клеток, экспрессирующих TNFR2, положительно коррелируют между собой. При этом процентное содержание клеток, несущих рецепторы 2 типа к TNF α значительно превышает процент клеток, несущих рецепторы 1 типа к TNF α , на Т- и В-лимфоцитов. Однако для моноцитов такое соотношение характерно только для здоровых и для больных РА в стадии обострения, в то время как больные РА, ответившие на терапию, не имеют статистически значимых отличий по проценту моноцитов, экспрессирующих рецепторы 1 и 2 типа. Кроме того, моноциты больных РА вне зависимости от активности заболевания имеют значительно более низкий процент клеток, несущих рецепторы как 1, так и 2 типа к TNF α по сравнению со здоровыми донорами.

При сравнении показателей между группами исследуемых установлено, что для больных, ответивших на терапию, характерным является значительно более высокие проценты Т- и В-лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы 1 типа к TNF α , по сравнению со здоровыми донорами. Кроме того, моноциты больных РА в состоянии обострения имеют значительно более низкий процент клеток, несущих рецепторы 2 типа по сравнению с нормой.

При изучении количества мембраносвязанных рецепторов показано, что Т-лимфоциты как здоровых, так и больных РА экспрессируют наименьшее число рецепторов обоих типов среди исследуемых субпопуляций. При этом среди В-

лимфоцитов как здоровых доноров, так и больных РА среднее число рецепторов 1 типа не отличается от числа рецепторов 2 типа, в то время как для Т-лимфоцитов и моноцитов показана более высокая плотность экспрессии рецепторов 2 типа для здоровых доноров, но не для больных РА.

При сравнении групп исследуемых установлено, что у больных РА, ответивших на терапию, по сравнению со здоровыми донорами, происходит усиление экспрессии рецепторов 1 типа либо по проценту позитивных клеток, либо по числу рецепторов на клетках во всех исследованных субпопуляциях. Для В-лимфоцитов больных РА характерно снижение плотности экспрессии рецепторов обоих типов к TNF α по сравнению со здоровыми донорами.

3.2. Экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на моноцитах в спонтанных и LPS-стимулированных культурах МНК

Клетки моноцитарно-макрофагального ряда играют центральную роль в хроническом воспалении при РА (Davignon et al., 2013), и показана высокая вовлеченность этих клеток в TNF α -опосредованные процессы (Kitaura et al., 2013), в связи с чем изменения в экспрессии рецепторов к TNF α на моноцитах имеют большое значение для развития иммунных реакций. Результаты наших исследований по интактным клеткам подтверждают это, поскольку было установлено, что моноцитарная субпопуляция имеет высокий уровень экспрессии рецепторов к TNF α по сравнению с другими субпопуляциями, а также значимо более высокую плотность экспрессии рецепторов 1 типа у больных РА по сравнению со здоровыми донорами. Поэтому для нас было важно оценить изменение в экспрессии рецепторов TNFR1 и TNFR2 на моноцитах под действием стимулятора. Был выбран поликлональный активатор LPS (штамм 055:B5), обладающий повышенной активностью в отношении клеток моноцитарно-макрофагального ряда. Оценивалось процентное содержание в субпопуляции клеток, экспрессирующих рецепторы 1 и 2 типа к TNF α (рисунок 6), а так же рассчитывалось абсолютное количество рецепторов на клетках (рисунок 7).

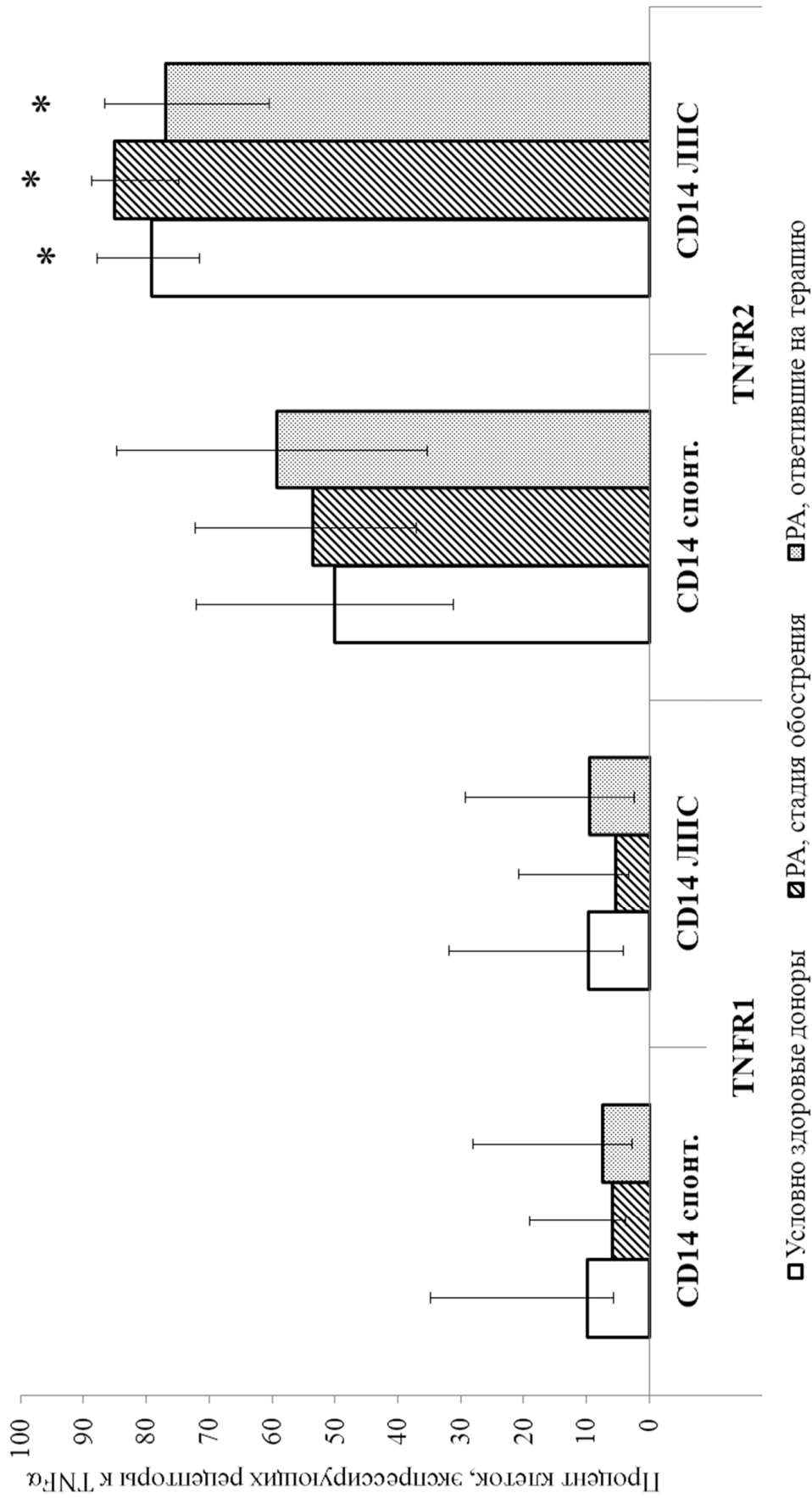


Рисунок 6. Процент клеток, экспрессирующих TNFR1 и TNFR2, среди моноцитов спонтанных и LPS-стимулированных 24-часовых культур МНК условно-здоровых доноров (n=150), больных РА в состоянии обострения (n=40) и после ответа на терапию (n=21) Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелками на рисунке указана статистическая значимость отличий между группами исследуемых, $p \leq 0,05$. * – статистическая значимость стимуляции под действием LPS.

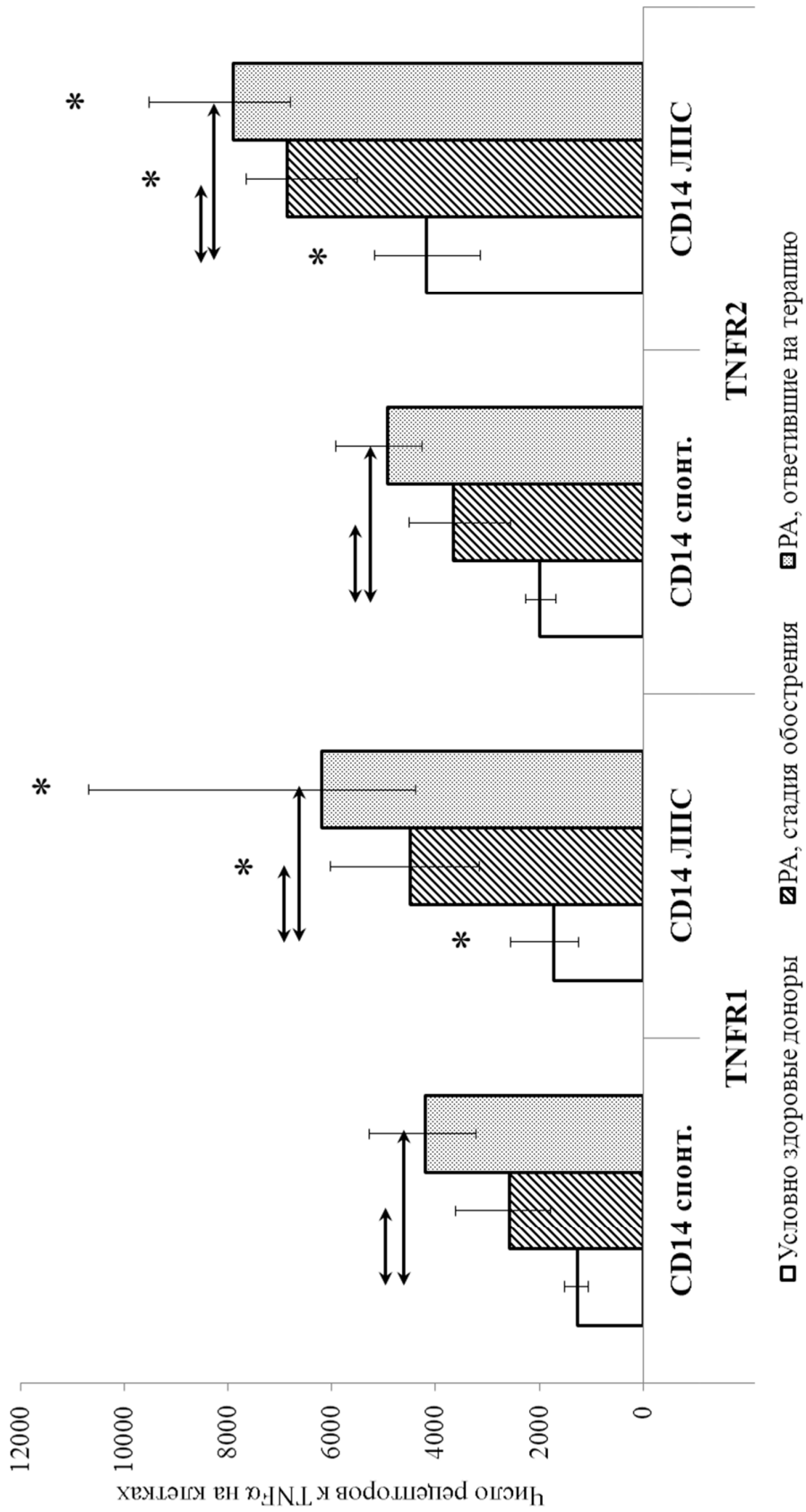


Рисунок 7. Плотность экспрессии TNFR1 и TNFR2 на моноцитах спонтанных и LPS-стимулированных 24-часовых культур МНК условно-здоровых доноров (n=150), больных РА в состоянии обострения (n=40) и после ответа на терапию (n=21). Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелками на рисунке указана статистическая значимость отличий между группами исследуемых, $p \leq 0,05$. * – статистическая значимость стимуляции под действием LPS.

При сравнении больных РА со здоровыми донорами было установлено, что большинство отличий проявляется по плотности экспрессии рецепторов, а не по стандартно определяемому проценту позитивных клеток. В частности, по проценту моноцитов, экспрессирующих рецепторы второго типа к TNF α , не наблюдается никаких статистически значимых отличий между группами исследуемых ни среди показателей спонтанных культур, ни среди LPS-стимулированных. При этом по плотности экспрессии рецепторов к TNF α на поверхности клеток были получены статистически значимые отличия между здоровыми донорами и больными РА как в состоянии обострения, так и после ответа на терапию для обоих типов рецепторов к TNF α и в присутствии, и в отсутствии стимулятора.

Установлено, что моноциты всех групп исследованных при переносе в культуру реагировали увеличением процента клеток, экспрессирующих рецепторы 2 типа к к TNF α , но не первого. Однако для культуры клеток от больных РА в стадии обострения это увеличение процента было значимо более значительным по сравнению со здоровыми донорами (процент TNFR2+моноцитов увеличивался в среднем в 3,7 раз у больных РА против увеличения в 1,7 раз у здоровых доноров), в то время как у больных, ответивших на терапию, показатель увеличения процента не отличался от такого у здоровых доноров. При этом по плотности экспрессии рецепторов к TNF α больные РА вне зависимости от фазы заболевания демонстрировали более резкое возрастание числа рецепторов на клетке по сравнению со здоровыми донорами.

Показатели экспрессии рецепторов различались по ответу клеток на стимуляцию. Под действием LPS для всех исследованных групп при 24-часовом культивировании по сравнению со спонтанными культурами было показано статистически значимое увеличение процента клеток, экспрессирующих рецепторы к TNF α 2 типа (но не первого). При оценке же количества экспрессируемых рецепторов на моноцитах было установлено, что стимуляция клеток липополисахаридом приводит к статистически значимому увеличению плотности экспрессии рецепторов к TNF α обоих типов во всех исследуемых группах.

Сравнивались индексы стимуляции, рассчитанные как отношение показателя процентного содержания TNFR+ моноцитов (рисунок 8) или числа рецепторов на них (рисунок 9) в LPS-стимулированной культуре к аналогичному показателю в спонтанной культуре.

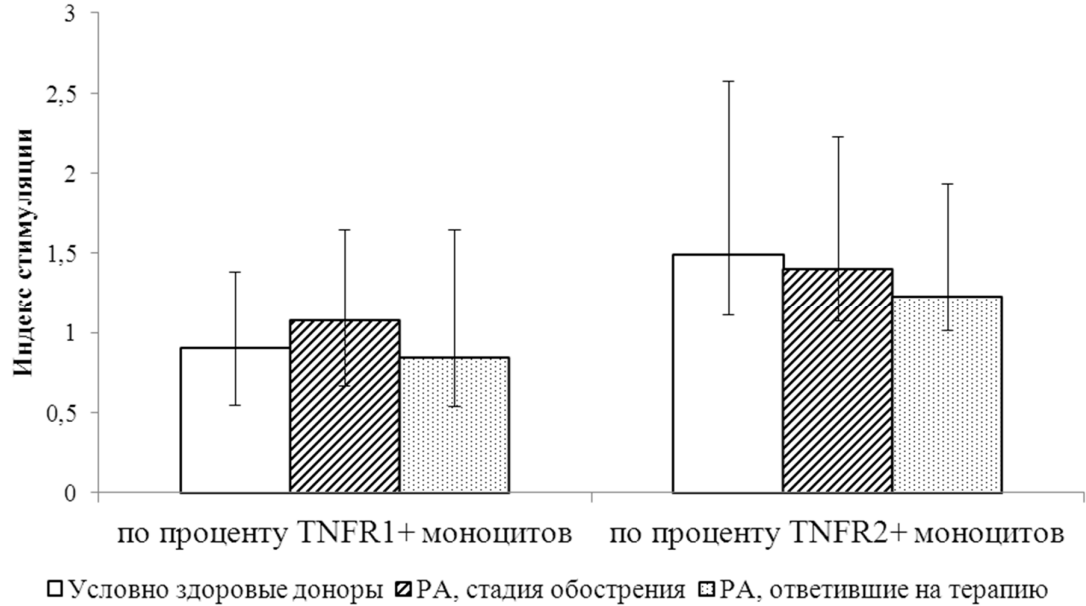


Рисунок 8. Индексы стимуляции экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF α по проценту моноцитов, экспрессирующих рецепторы, в 24-часовой культуре МНК условно-здоровых доноров (n=150), больных РА в состоянии обострения (n=40) и после ответа на терапию (n=21). Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелками на рисунке указана статистическая значимость отличий между группами исследуемых, $p \leq 0,05$.

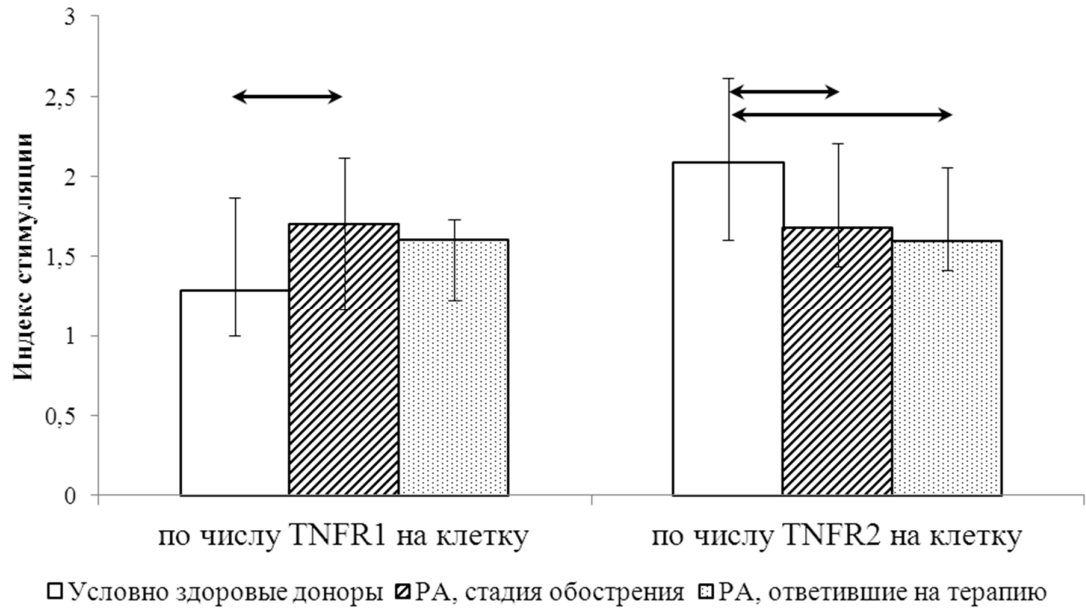


Рисунок 9. Индексы стимуляции экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF α по числу рецепторов на моноцитах в 24-часовой культуре МНК условно-здоровых доноров (n=150), больных РА в состоянии обострения (n=40) и после ответа на терапию (n=21). Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелками на рисунке указана статистическая значимость отличий между группами исследуемых, $p \leq 0,05$.

Для индексов по изменению числа рецепторов были установлены отличия по интенсивности реагирования на действие LPS моноцитов, экспрессирующих рецепторы разных типов. Если для рецепторов 1 типа к TNF α моноциты больных РА в стадии обострения имеют более высокий индекс стимуляции по сравнению с моноцитами здоровых доноров, то для рецепторов 2 типа, напротив, показано, что больные РА отвечают на стимуляцию меньшим, по сравнению с нормой, увеличением плотности экспрессии рецепторов (медианы индексов стимуляции: по числу TNFR2 на клетках для здоровых – 2,09, для больных в состоянии обострения – 1,68, после ответа на терапию – 1,6).

Таким образом, увеличение или уменьшение плотности экспрессии рецепторов на клетках при хронических воспалительных заболеваниях с различным иммунопатогенезом по сравнению с нормой не всегда происходит одновременно с изменением процента клеток, несущих данные рецепторы, и наоборот. Показателем, отражающим отличия состояния рецепторного аппарата

TNF α при ревматоидном артрите под действием поликлонального активатора, является плотность экспрессии рецепторов на поверхности клеток.

3.3. Уровни TNF α и его растворимых рецепторов 1 и 2 типа в сыворотке периферической крови

Исследователями было показано, что высокое сывороточное содержание TNF α может индуцировать изменение экспрессии мембраносвязанных форм рецепторов к TNF α (Tsujimoto, Vilcek, 1987; Faurschou, 2010; Winzen et al., 1993; Kalthoff et al., 1993), а растворимые формы рецепторов, с одной стороны, конкурируют с мембранными за связывание с цитокином, а с другой – могут образовываться протеолитическим отщеплением внеклеточного домена мембранных форм. Таким образом, содержание в периферической крови данных медиаторов оказывает большое влияние на состояние рецепторного аппарата TNF α . Поэтому на следующем этапе изучения системы регуляции TNF α у больных ревматоидным артритом в стадии обострения и после ответа на терапию при ревматоидном артрите исследовались показатели содержания растворимых форм цитокина и рецепторов. Уровень продукции TNF α (рисунок 10) и его растворимых рецепторов 1 и 2 типа (рисунок 11) в сыворотке крови определяли иммуноферментным твердофазным анализом с использованием соответствующих наборов.

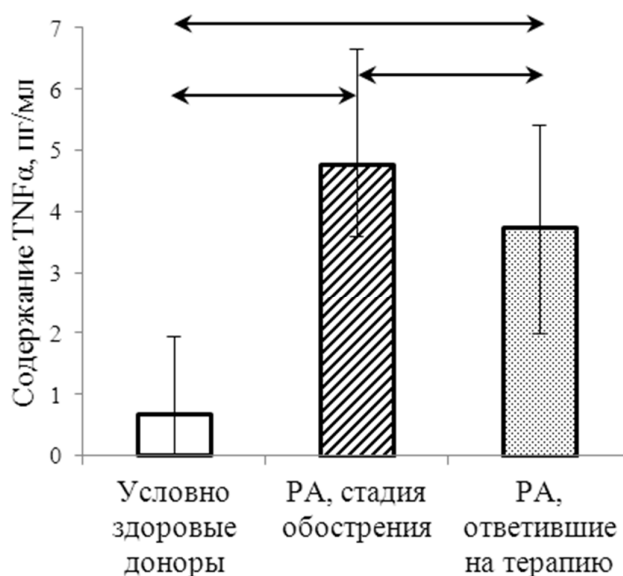


Рисунок 10. Содержание TNF α в сыворотке крови условно-здоровых доноров (n=150) и больных ревматоидным артритом в стадии обострения (n=32) и после ответа на терапию (n=21), пг/мл. Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелкой указана статистическая значимость отличий, $p \leq 0,05$

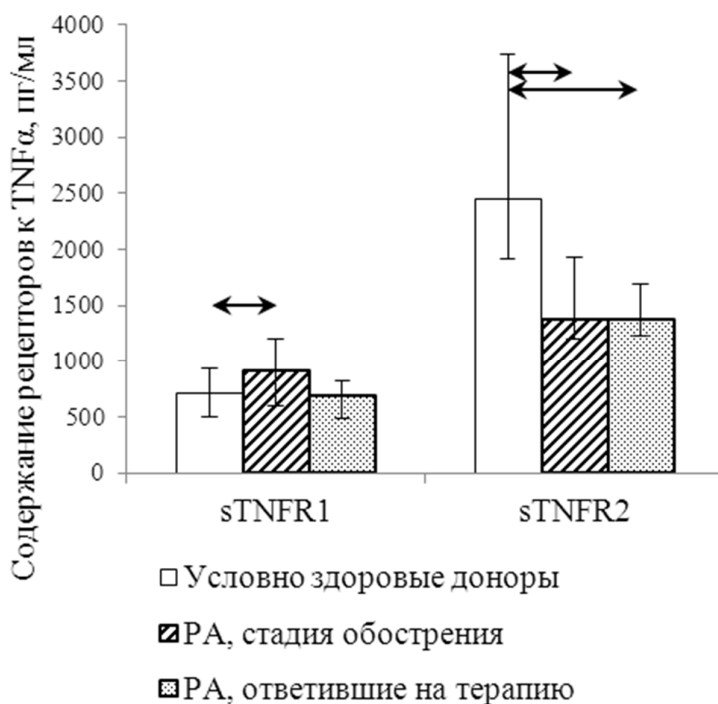


Рисунок 11. Уровни растворимых рецепторов к TNF α в сыворотке крови условно-здоровых доноров (n=150) и больных ревматоидным артритом в стадии обострения (n=33) и после ответа на терапию (n=26), пг/мл. Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелкой указана статистическая значимость отличий, $p \leq 0,05$

Показатели сывороточного содержания цитокина значительно различаются между группами исследуемых, при этом у больных, ответивших на терапию, уровень TNF α значительно снижается по сравнению с обострением заболевания. При этом содержание TNF α в обострение заболевания и после ответа на терапию положительно коррелирует между собой.

По результатам сравнения показателей содержания растворимых рецепторов к TNF α показан значимо более высокий уровень сывороточного содержания sTNFR2 по сравнению с sTNFR1 как у больных РА до и после лечения, так и у здоровых доноров. Больные РА в стадии обострения демонстрируют более высокое содержание рецепторов 1 типа по сравнению со здоровыми донорами и более низкое содержание рецепторов 2 типа, а после ответа на терапию сохраняется отличие только по рецепторам 2 типа.

3.4. Экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к IL-1 β на клетках интактных субпопуляций МНК

На следующем этапе проводилась оценка аналогичных параметров экспрессии мембраносвязанных рецепторов для другого провоспалительного цитокина – IL-1 β . Для характеристики экспрессии рецепторов 1 и 2 типов к IL-1 β больных РА в состоянии обострения и после ответа на терапию были выбраны субпопуляции интактных клеток – Т-лимфоциты (CD3+), В-лимфоциты (CD19+) и моноциты (CD14+). Для каждой из них оценивался процент позитивных клеток в субпопуляции (рисунок 12) и рассчитывалось число рецепторов на клетках (рисунок 13).

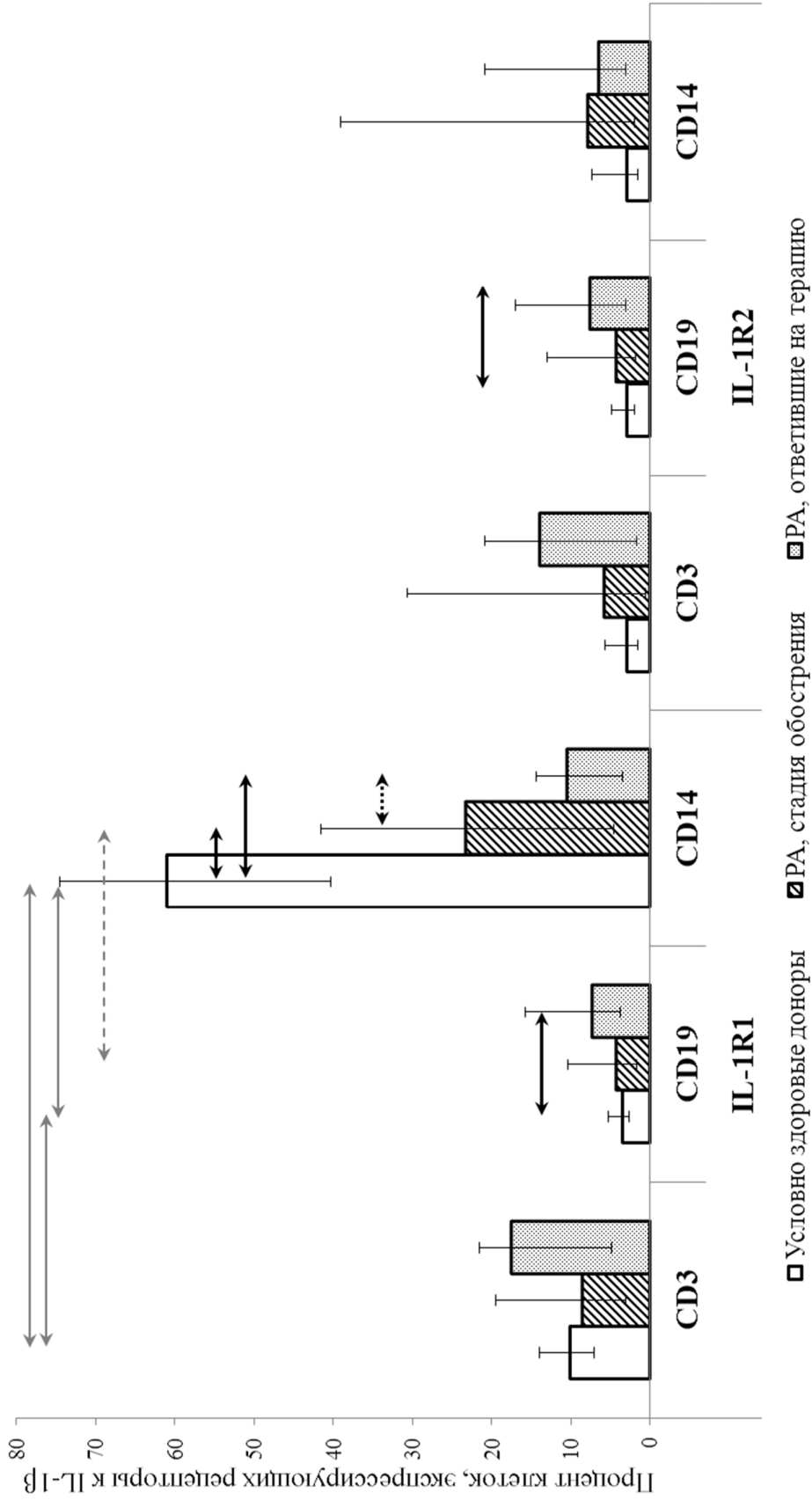


Рисунок 12. Процент клеток, экспрессирующих IL-1R1 и IL-1R2, в субпопуляциях МНК условно-здоровых доноров (n=150), больных РА в состоянии обострения (n=33) и после ответа на терапию (n=21). Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелками на рисунке указана статистическая значимость отличий между группами исследуемых, $p \leq 0,05$.

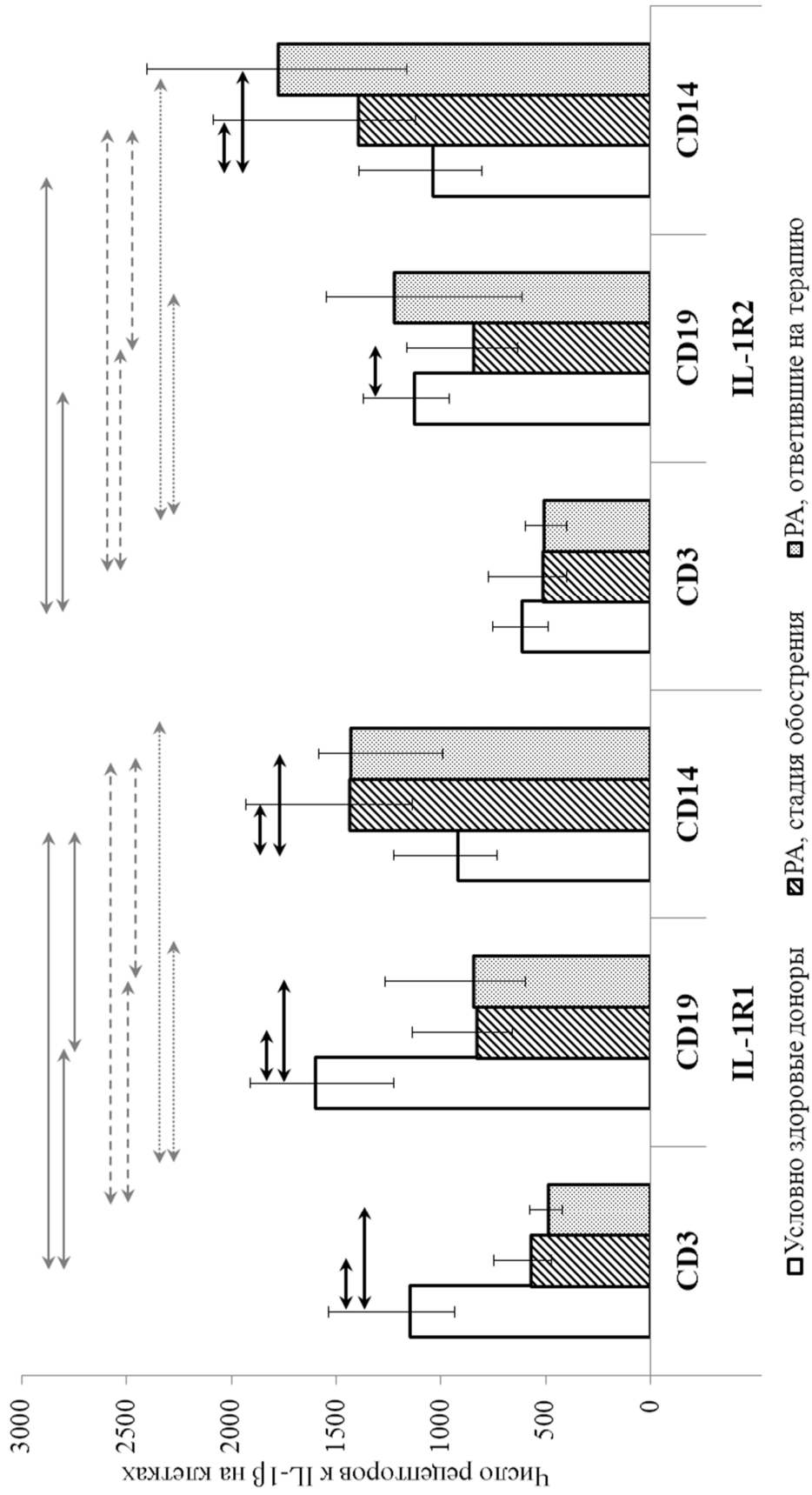


Рисунок 13. Плотность экспрессии IL-1R1 и IL-1R2 на клетках в субпопуляциях МНК условно-здоровых доноров (n=150), больных РА в состоянии обострения (n=33) и после ответа на терапию (n=21). Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелками на рисунке указана статистическая значимость отличий между группами исследуемых, $p \leq 0,05$.

Было установлено, что распределение рецепторов к IL-1 β на клетках субпопуляций различается между здоровыми и больными РА. Если у здоровых доноров среди моноцитов регистрируется самое большое количество клеток, экспрессирующих рецепторы 1 типа к IL-1 β , при наименьшей плотности экспрессии этих рецепторов на них, то у больных РА в стадии обострения этот процент значительно снижается, а плотность экспрессии, напротив, значимо выше как по сравнению с нормой, так и с остальными исследуемыми субпопуляциями. По экспрессии рецепторов к IL-1 2 типа между субпопуляциями Т-, В-лимфоцитов и моноцитов нет статистически значимых отличий по проценту позитивных клеток ни у здоровых, ни у больных вне зависимости от фазы заболевания. Однако по плотности экспрессии данных рецепторов Т-лимфоциты характеризуются наименьшим числом рецепторов у всех групп исследуемых, а наибольшее число рецепторов к IL-1 β регистрируется на моноцитах у больных РА как в обострение, так и при клиническом улучшении заболевания.

Показано, что у больных РА, вышедших в стадию клинического улучшения, значимо снижается процент моноцитов, экспрессирующих рецепторы 1 типа, при этом плотность экспрессии этих рецепторов на них остается неизменной.

Таким образом, было установлено, что В-лимфоциты и моноциты демонстрируют разнонаправленное изменение показателей процента IL-1R1-позитивных клеток и числа рецепторов на них у больных РА по сравнению с нормой, при этом увеличение соответствующего показателя на В-лимфоцитах сопряжено с уменьшением его у моноцитов. Это свидетельствует не только о двух возможных механизмах изменения общего пула мембраносвязанных рецепторов в субпопуляции, но и о взаимосвязях в показателях экспрессии рецепторов между разными субпопуляциями иммунокомпетентных клеток.

При сравнении показателей экспрессии между рецепторами разных типов было установлено, что для условно-здоровых доноров как процент позитивных клеток, так и количество рецепторов на клетках значимо отличается между IL-1R1 и IL-1R2 в каждой из исследуемых субпопуляций. У больных РА вне зависимости от фазы заболевания эти различия пропадают.

3.5. Экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к IL-1 β на моноцитах в спонтанных и LPS-стимулированных культурах МНК

Для более подробного изучения изменений в системе рецепторов к IL-1 β в условиях смоделированной ситуации активации провоспалительных реакций оценивалась экспрессия рецепторов на моноцитах (CD14+) в спонтанной и стимулированной культуре МНК человека. Для изучения способности клеток реагировать на действие стимулятора, оценивалась экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к IL-1 β на моноцитах 24-часовых культур в присутствии и отсутствии LPS (O55:B5). Определялся процент моноцитов, экспрессирующих рецепторы 1 и 2 типа к IL-1 β (рисунок 14) и рассчитывалось количество рецепторов на клетках (рисунок 15).

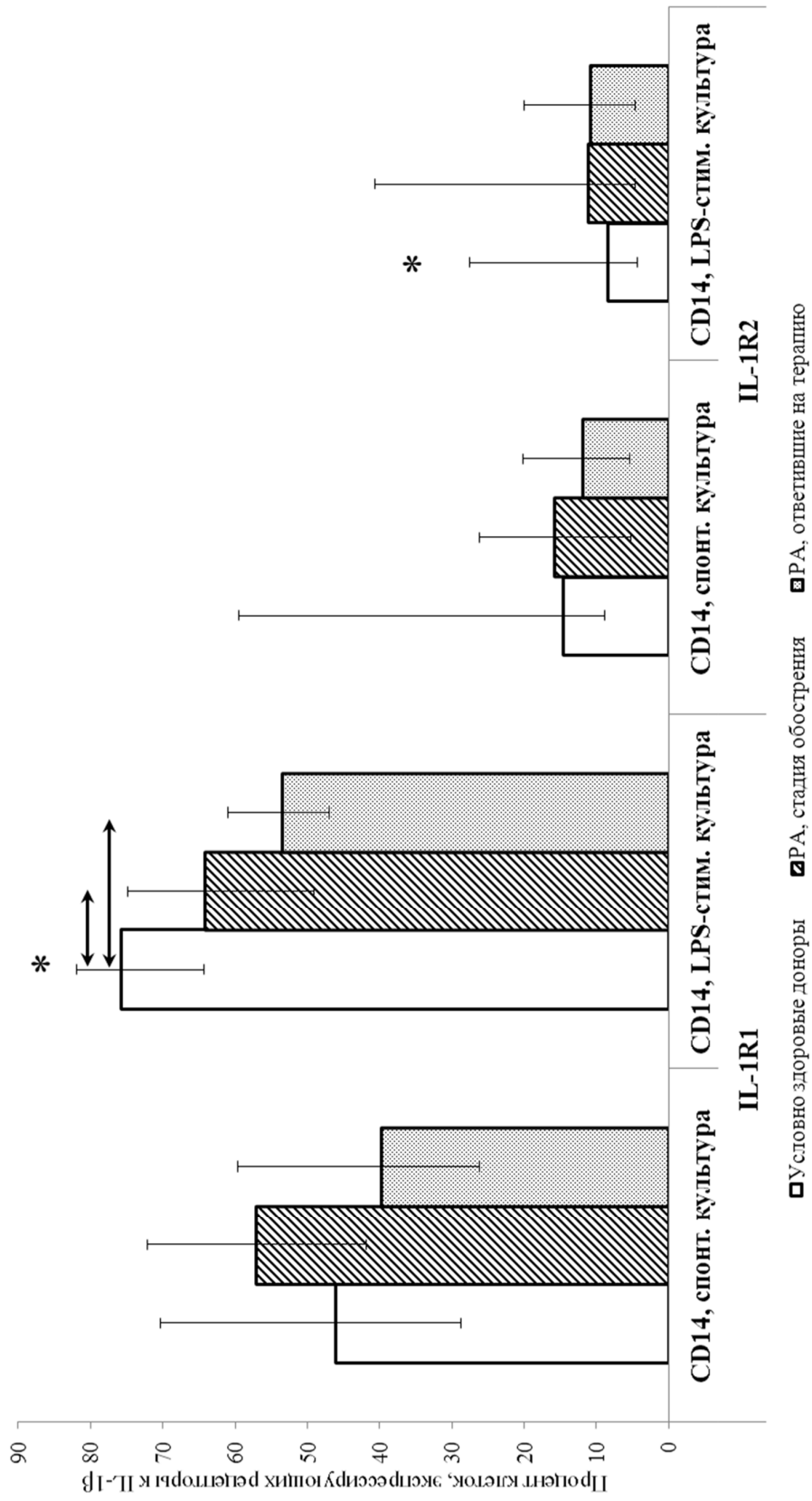


Рисунок 14. Процент клеток, экспрессирующих IL-1R1 и IL-1R2, среди моноцитов спонтанных и LPS-стимулированных 24-часовых культур МНК условно-здоровых доноров (n=150), больных РА в состоянии обострения (n=33) и после ответа на терапию (n=21). Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелками на рисунке указана статистическая значимость отличий между группами исследуемых, $p \leq 0,05$. * – статистическая значимость стимуляции под действием LPS.

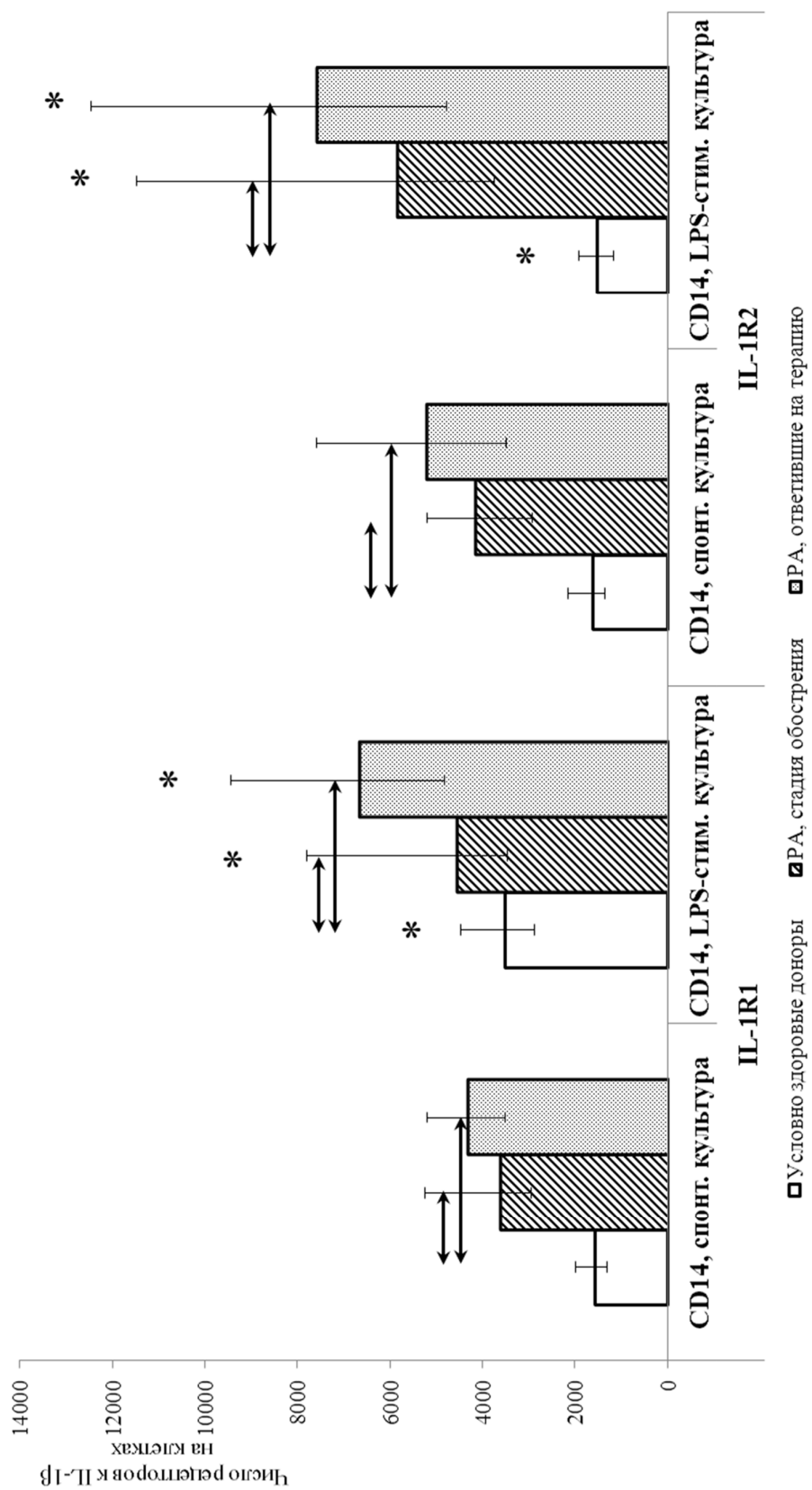


Рисунок 15. Плотность экспрессии IL-1R1 и IL-1R2 на моноцитах спонтанных и LPS-стимулированных 24-часовых культур МНК условно-здоровых доноров (n=150), больных РА в состоянии обострения (n=33) и после ответа на терапию (n=21). Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелками на рисунке указана статистическая значимость отличий между группами исследуемых, $p \leq 0,05$. * – статистическая значимость стимуляции под действием LPS.

Было показано, что 24-часовая культивация с LPS вызывает статистически значимую стимуляцию по показателям плотности экспрессии рецепторов к IL-1 β как у здоровых, так и у больных РА с значимо более высокими показателями для больных по сравнению с нормой. Однако по проценту позитивных клеток статистически значимые изменения регистрируются только для здоровых доноров – с увеличением по 1 типу рецептора к IL-1 β и уменьшением по второму, в то время как для больных не показан ответ на действие стимулятора по проценту позитивных клеток. Сравнивались индексы стимуляции, рассчитанные как отношение показателя процентного содержания IL-1R+ моноцитов (рисунок 16) или числа рецепторов на них (рисунок 17) в LPS-стимулированной культуре к аналогичному показателю в спонтанной культуре. При этом установлено, что у больных РА в стадии обострения и после ответа на терапию коэффициент стимуляции по числу рецепторов IL-1R1 был значимо ниже по сравнению со здоровыми донорами (1,29 и 1,49 против 2,21, соответственно), а по числу рецепторов IL-1R2 – напротив, значимо выше (1,52 и 1,43 против 0,92, соответственно).

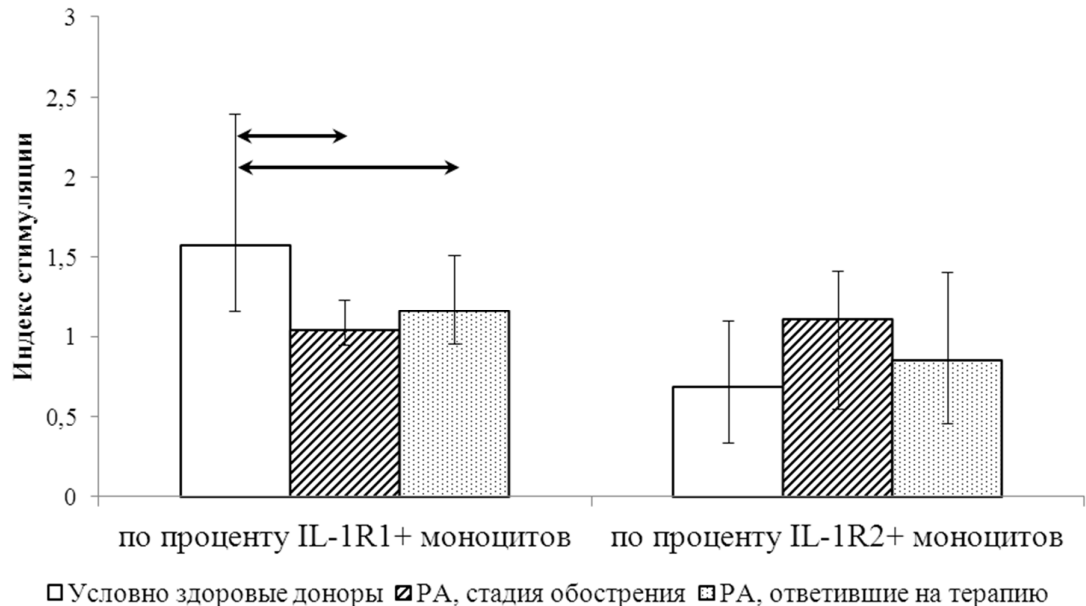


Рисунок 16. Индексы стимуляции экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к IL-1 β по проценту моноцитов, экспрессирующих рецепторы, в 24-часовой культуре МНК условно-здоровых доноров (n=150), больных РА в состоянии обострения (n=33) и после ответа на терапию (n=21). Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелками на рисунке указана статистическая значимость отличий между группами исследуемых, $p \leq 0,05$.

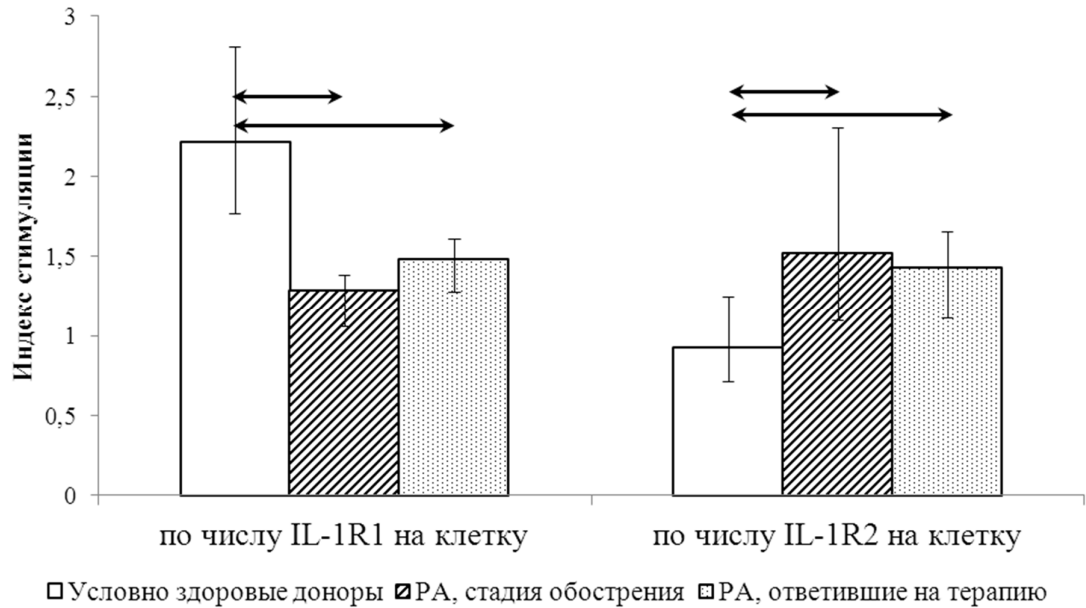


Рисунок 17. Индексы стимуляции экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к IL-1 β по числу рецепторов на моноцитах в 24-часовой культуре МНК условно-здоровых доноров (n=150), больных РА в состоянии обострения (n=33) и после ответа на терапию (n=21). Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелками на рисунке указана статистическая значимость отличий между группами исследуемых, $p < 0,05$.

При сравнении показателей между 1 и 2 типом рецепторов к IL-1 β было установлено, что, в отличие от интактных моноцитов, для которых различия показаны только у здоровых доноров, в спонтанных и LPS-стимулированных 24-часовых культурах происходит заметное изменение соотношения количества клеток, экспрессирующих рецепторы разных типов к IL-1, и процент IL-1R1+моноцитов значимо выше процента IL-1R2+ моноцитов во всех исследуемых группах. Однако по абсолютному количеству экспрессируемых рецепторов моноциты здоровых доноров в спонтанных культурах демонстрируют примерно одинаковую плотность экспрессии рецепторов 1 и 2 типа, а после стимуляции LPS происходит статистически значимое повышение плотности экспрессии рецепторов 1 типа и снижение плотности экспрессии рецепторов 2 типа. Клетки больных ревматоидным артритом демонстрируют примерно одинаковую плотность экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к IL-1 β .

3.6. Уровни IL-1 β , его растворимых рецепторов 1 и 2 типа и рецепторного антагониста IL-1 в сыворотке крови

Поскольку от содержания растворимых рецепторов к IL-1 β и уровня самого цитокина в сыворотке в значительной мере зависит эффективность действия медиатора на клетки, исследовалось сывороточное содержание IL-1 β (рисунок 18) и его растворимых рецепторов 1 и 2 типа (рисунки 19-20) у больных ревматоидным артритом в стадии обострения и после ответа на терапию иммуноферментным твердофазным анализом с использованием соответствующих наборов.

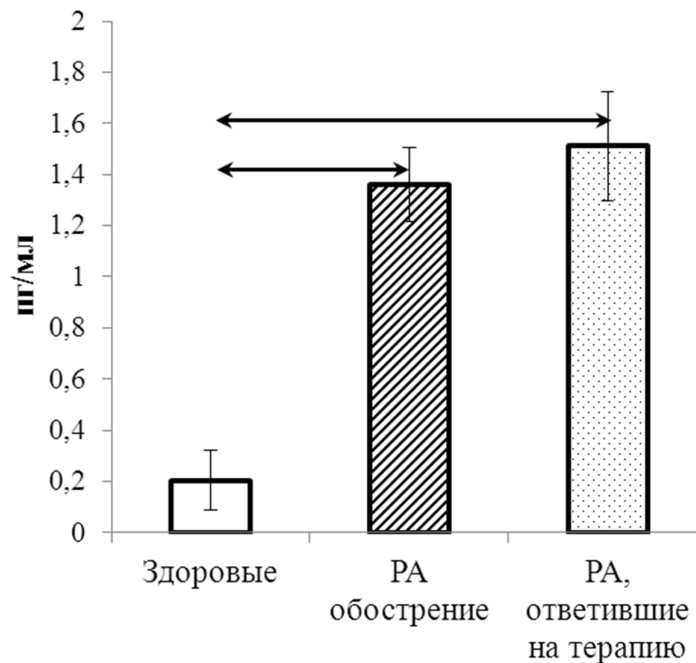


Рисунок 18. Содержание IL-1 β в сыворотке крови условно-здоровых доноров (n=150) и больных ревматоидным артритом в стадии обострения (n=28) и после ответа на терапию (n=25), пг/мл. Данные представлены как среднее и ошибка среднего. Стрелками указана статистическая значимость отличий, $p \leq 0,05$

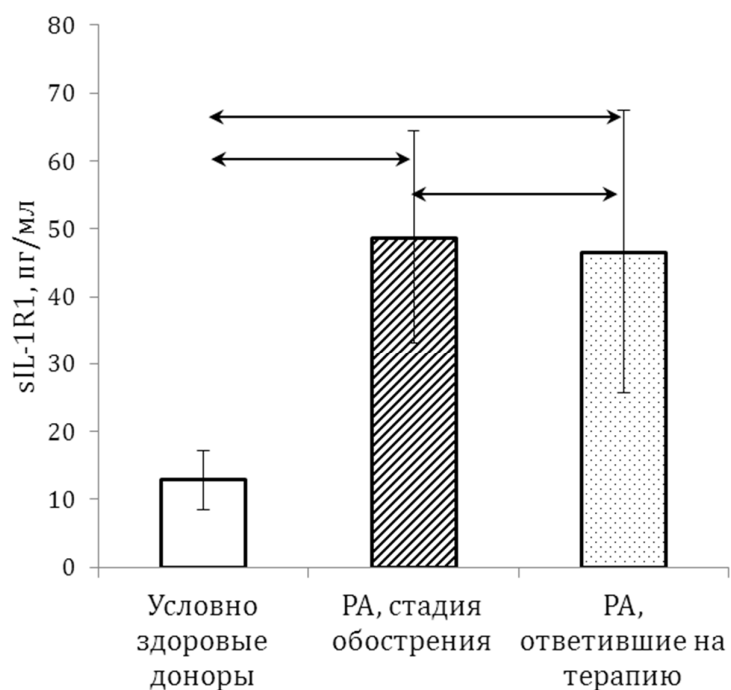


Рисунок 19. Уровни растворимого рецептора 1 типа IL-1 β в сыворотке крови условно-здоровых доноров (n=150) и больных ревматоидным артритом в стадии обострения (n=33) и после ответа на терапию (n=21), пг/мл. Данные представлены как среднее и ошибка среднего. Стрелками указана статистическая значимость отличий, $p \leq 0,05$

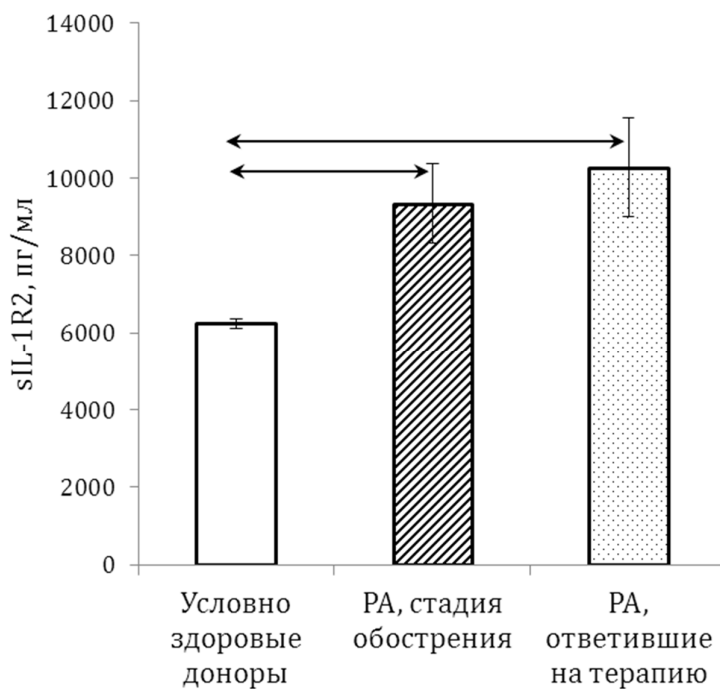


Рисунок 20. Уровни растворимого рецептора 2 типа IL-1 β в сыворотке крови условно-здоровых доноров (n=150) и больных ревматоидным артритом в стадии обострения (n=33) и после ответа на терапию (n=23), пг/мл. Данные представлены как среднее и ошибка среднего. Стрелками указана статистическая значимость отличий, $p \leq 0,05$

По уровню самого цитокина в сыворотке периферической крови регистрируется более высокий уровень растворимого медиатора у больных РА по сравнению со здоровыми донорами, но после ответа на терапию он не снижается.

Для больных РА показаны более высокие, по сравнению со здоровыми донорами, уровни растворимых рецепторов обоих типов. При этом после ответа на терапию снижается уровень рецепторов 1 типа, но не второго, что может быть связано с отсутствием у рецептора 2 типа буферной функции для IL-1.

В систему регуляции биологических эффектов IL-1 β также входит рецепторный антагонист IL-1, поскольку он конкурирует за связывание с рецепторами к цитокину, и, таким образом, модулирует действие IL-1 β на клетки. Поэтому было важным оценить сывороточное содержание gaIL-1 у больных в стадии обострения и после ответа на терапию по сравнению со здоровыми донорами (рисунок 21).

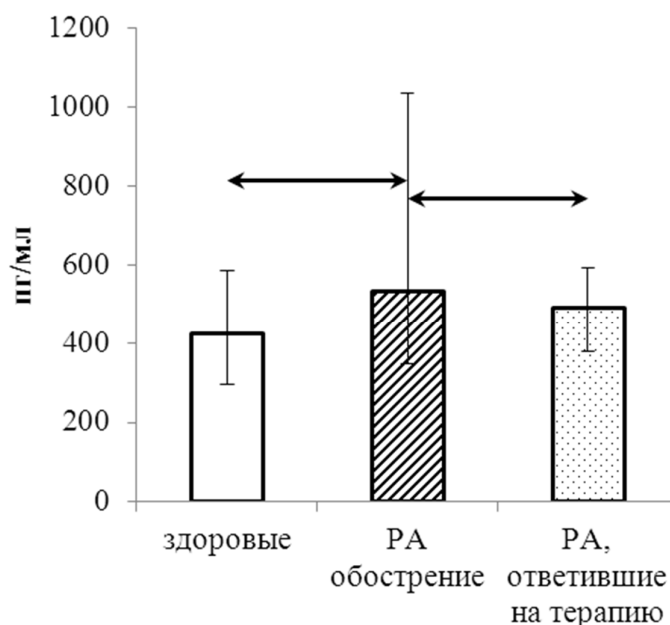


Рисунок 21. Уровни рецепторного антагониста IL-1 в сыворотке крови условно-здоровых доноров (n=74) и больных ревматоидным артритом в стадии обострения (n=28) и после ответа на терапию (n=23), пг/мл. Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелками указана статистическая значимость отличий, $p \leq 0,05$.

У больных РА в состоянии обострения показано статистически значимое повышение уровня рецепторного антагониста как по сравнению со здоровыми донорами, так и по сравнению с больными, ответившими на терапию. При этом

установлена положительная корреляция между содержанием медиатора в обострение заболевания и после эффективной терапии, что свидетельствует о возможности использования данного показателя в качестве маркера эффективного лечения.

3.7. Построение моделей множественной линейной регрессии для показателя активности ревматоидного артрита и параметров, характеризующих экспрессию рецепторов к TNF α и IL-1 β

Для проверки предположения о влиянии показателей экспрессии мембраносвязанных и содержания растворимых форм рецепторов на тяжесть патологического процесса и активность ревматоидного артрита, показатели, полученные для интактных клеток и сывороточных медиаторов больных РА (всего 31 показатель – 15 для TNF α и 16 для IL-1 β), были использованы в составлении нескольких вариантов ММЛР. В качестве зависимой переменной был выбран DAS-28, поскольку он является интегральным показателем, характеризующим активность РА как по клиническим, так и по лабораторным показателям:

$$DAS = 0,56 * \sqrt{ЧБС} + 0,28 * \sqrt{ЧПС} + 0,70 * \ln(COЭ) + 0,014 * OCЗ,$$

где ЧБС – число болезненных суставов, ЧПС – число припухших суставов, COЭ – скорость оседания эритроцитов (по Вестергрёну), OCЗ – оценка больным состояния здоровья по визуальной аналоговой шкале (Smolen et al., 2003).

Строились модели:

- общая (для 31 параметра),
- полные для цитокинов – для TNF α (из 15 показателей) и для IL-1 β (из 16 показателей),
- по показателям растворимых медиаторов – отдельно для TNF α и для IL-1 β , и по всем сывороточным показателям вместе (7 показателей),

- по показателям процентного содержания позитивных клеток в субпопуляциях – отдельно для каждого из цитокинов и для обоих,
- по показателям числа рецепторов на клетках исследуемых субпопуляций – отдельно для каждого из цитокинов и для обоих,
- комбинации растворимых параметров с параметрами, характеризующими экспрессию рецепторов к TNF α и к IL-1 β ,
- редуцированные (итоговые) для TNF α и для IL-1 β .

Из всех исследуемых моделей наилучшими характеристиками обладали полные для каждого из цитокинов (но не общая для всех параметров), а также модели с последовательной редукцией статистически незначимых показателей.

Модели для показателей TNF α в группе больных РА с обострением заболевания

ММЛР, построенная по всем показателям для группы с обострением РА, имеет среднее остатков между имеющимся DAS-28 и построенным по значениям параметров для каждого больного РА 0 ($<10^{-16}$) со стандартным отклонением 0,90, значение F-статистики дисперсионного отношения Фишера по 15 и 12 степеням свободы 1,65, соответствующее уровню значимости $p = 0,19$, коэффициент детерминации $R^2 = 0.67$, информационный критерий Акаике AIC = 84.12 (Дрейпер, Смит, 1987). Значение статистики критерия Шапиро-Уилка для проверки нормальности распределения остатков $W = 0.96$ с уровнем значимости $p = 0.39$ (важным условием для построения ММЛР является нормальное распределение остатков между имеющимся DAS-28 и построенным по значениям параметров для каждого больного РА с одинаковыми дисперсиями, т.е. значение p должно быть больше 0.05). В построенной ММЛР 9 предикторов статистически значимы - TNF, sTNFR1, sTNFR2, CD3.%.T1, CD3.N.T1, CD19.%.T1, CD19.%.T2, CD19.N.T2, CD14.N.T2 (у соответствующих коэффициентов t-статистики двустороннего критерия Стьюдента равенства нулю имеют уровни значимости $p < 0.05$) – и 6 предикторов (CD3.%.T2, CD3.N.T2, CD19.N.T1, CD14.%.T1, CD14.N.T1, CD14.%.T2) не являются статистически значимыми.

Для улучшения качества ММЛР по всем показателям использована процедура последовательной редукции количества исследуемых предикторов путем устранения статистически незначимых: CD3 % T2, CD19 N T1, CD14 % T1, CD14 N T1, CD14 % T2. Исключение предиктора CD3 N T2 приводит к существенному ухудшению качества получаемой модели, что может говорить о важности влияния CD3 N T2 на показатель DAS-28, но для обоснования статистической значимости с критическим уровнем $p = 0.1$ в полной модели требуется больше данных. В редуцированной ММЛР предиктор CD19 % T2 стал статистически незначимым из-за увеличения уровня значимости p с 0.09 в полной модели до 0.11, с учетом количества измерений это изменение не является важным для исключения предиктора CD19 % T2 из уменьшенной модели. Уменьшенная модель ММЛР имеет среднее остатков 0 ($< 10^{-17}$) со стандартным отклонением 0.85, значение F-статистики дисперсионного отношения Фишера по 11 и 16 степеням свободы 2.3, соответствующее уровню значимости $p = 0.06$, коэффициент детерминации $R^2 = 0.61$, информационный критерий Акаике AIC = 80.9. Значение статистики критерия Шапиро-Уилка для проверки нормальности распределения остатков $W = 0.97$ с уровнем значимости $p = 0.55$. Показатели качества редуцированной ММЛР говорят об улучшении по сравнению с полной ММЛР и хорошем качестве модели в целом. Результат построения данной модели представлен на рисунке 22.

```

## [1] "Модель для отобранных показателей"
## [1] "Медиана DAS28"
## [1] 5.925
## [1] "Среднее DAS28"
## [1] 6.162857
##
## Call:
## lm(formula = DAS28 ~ TNF + sT1 + sT2 + CD3.%.T1 + CD3.N.T1 +
##     CD3.N.T2 + CD19.%.T1 + CD19.N.T1 + CD19.%.T2 + CD19.N.T2 +
##     CD14.N.T2, data = Y)
##
## Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -1.15027 -0.37764 -0.07899  0.27055  1.40276
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)   4.4984     0.9669   4.653 0.000265 ***
## TNF           -0.5504     0.2272  -2.423 0.027644 *
## sT1            2.1935     0.8820   2.487 0.024307 *
## sT2           -7.9220     3.5717  -2.218 0.041377 *
## CD3...T1      -0.7665     0.4255  -1.801 0.090503 .
## CD3.N.T1       0.9946     0.4159   2.391 0.029418 *
## CD3.N.T2       1.7705     0.6709   2.639 0.017873 *
## CD19...T1     1.6059     0.7479   2.147 0.047450 *
## CD19.N.T1     -3.1896     1.2161  -2.623 0.018466 *
## CD19...T2    -1.1536     0.6772  -1.704 0.107810
## CD19.N.T2      2.6849     1.2423   2.161 0.046179 *
## CD14.N.T2    -1.2398     0.3649  -3.398 0.003676 **
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 0.8531 on 16 degrees of freedom
## Multiple R-squared:  0.6124, Adjusted R-squared:  0.3459
## F-statistic: 2.298 on 11 and 16 DF,  p-value: 0.06354
##
## [1] "Значение AIC:"
## [1] 80.89692
## [1] "Проверка нормальности остатков"
## [1] "среднее остатков"
## [1] 4.946672e-19
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  resid(M)
## W = 0.96883, p-value = 0.5495

```

Рисунок 22. Построение редуцированной ММЛР для показателя DAS-28 в качестве независимой переменной, выражаемой через уровни растворимого TNF α , содержание растворимых рецепторов 1 и 2 типа к TNF α и параметров, характеризующих экспрессию мембраносвязанных рецепторов к TNF α в субпопуляциях Т-, В-лимфоцитов и моноцитов. Редукция проводилась путем постепенного удаления статистически незначимых предикторов. Для возможности сопоставления коэффициентов величины независимых переменных нормировались.

Также для сравнения вклада отдельных групп показателей для цитокина TNF α (процента клеток, числа рецепторов и растворимых медиаторов) были построены ММЛР с комбинациями групп параметров. Показатели модели, содержащей только параметры растворимых медиаторов и процентного содержания клеток (среднее остатков 0 ($< 10^{-16}$) со стандартным отклонением 1.16, значение F-статистики дисперсионного отношения Фишера по 9 и 18 степеням свободы 0.49, соответствующее уровню значимости $p = 0.86$, коэффициент детерминации $R^2 = 0.2$, информационный критерий Акаике AIC = 97.31. Значение статистики критерия Шапиро-Уилка для проверки нормальности распределения остатков $W = 0.97$ с уровнем значимости $p = 0.64$, отсутствие статистически значимых предикторов, наименьший уровень t-статистики двустороннего критерия Стьюдента равенства нулю соответствующего коэффициента регрессии ($p = 0.58$) говорят о существенно плохом качестве данной ММЛР. В то же время модель с группами показателей растворимых медиаторов и числа рецепторов на поверхности клеток имеет высокие показатели качества (среднее остатков 0 ($< 10^{-17}$) со стандартным отклонением 0.9, значение F-статистики дисперсионного отношения Фишера по 9 и 18 степеням свободы 2.1, соответствующее уровню значимости $p = 0.08$, коэффициент детерминации $R^2 = 0.51$, информационный критерий Акаике AIC = 83.31. Значение статистики критерия Шапиро-Уилка для проверки нормальности распределения остатков $W = 0.98$ с уровнем значимости $p = 0.81$). Статистически незначимыми предикторами в данной ММЛР статистически являются sTNFR1, sTNFR2, CD3 N T2, CD14 N T1. Показатели качества модели говорят о хорошем качестве данной ММЛР и существовании статистически значимой линейной зависимости между TNF, sTNFR1, sTNFR2, N показателями и DAS-28. Это свидетельствует о том, что при РА происходят не только изменения в продукции цитокина и его растворимых рецепторов, но и существенно меняется экспрессия рецепторов на поверхности клеток, при этом отдельные измерения процента позитивных клеток в субпопуляции не являются достаточным для характеристики этих изменений.

При сравнении показателей коэффициентов детерминации R^2 в построенных моделях, было установлено, что в рамках линейной зависимости показатели процентного содержания клеток, экспрессирующих рецепторы к TNF α , обосновывают не более 20% вариации показателя DAS-28, в то время как показатели числа рецепторов на клетках обосновывают около 40-50% вариации DAS-28. При этом полная модель, построенная для всех измеренных показателей для TNF α (15 параметров) обосновывает около 70% вариации DAS-28, что указывает на существенное влияние уровня экспрессии рецепторов к TNF α на показатели тяжести патологического состояния и активности РА у больных с обострением заболевания.

Модели для показателей TNF α в группе больных РА, ответивших на терапию

ММЛР построенная по всем показателями для группы с больными РА, ответившими на терапию, имеет среднее остатков 0 ($< 10^{-16}$) со стандартным отклонением 1.53, значение F-статистики дисперсионного отношения Фишера по 15 и 4 степеням свободы 0.51, соответствующее уровню значимости $p = 0.85$, коэффициент детерминации $R^2 = 0.65$, информационный критерий Акаике AIC = 74.5. Значение статистики критерия Шапиро-Уилка для проверки нормальности распределения остатков $W = 0.96$ с уровнем значимости $p = 0.65$. В построенной ММЛР все предикторы статистически незначимы (t-статистики двустороннего критерия Стьюдента равенства нулю соответствующих коэффициентов имеют уровни значимости $p > 0.29$). Показатели качества модели говорят об отсутствии статистически значимой линейной связи между всеми показателями и откликом DAS-28. Высокие вероятности равенства нулю коэффициентов предикторов не позволяют улучшить модель с помощью последовательного выброса статистически незначимых предикторов.

Плохими показателями качества также обладают модели зависимости DAS-28 от показателей процента клеток и числа рецепторов. Можно отметить, что в модели с показателями числа рецепторов стали обладать статистически значимой

линейной связью с DAS-28 число TNFR1 рецепторов на Т-лимфоцитах и моноцитах.

Поскольку в группу ответивших на терапию входили пациенты как с хорошим, так и удовлетворительным эффектом (у всех больных наблюдалось снижение DAS-28 более, чем на 1,2, но при этом у многих даже после лечения показатель остался выше 5,1, т.е. у больных даже после ответа на терапию сохранялась высокая активность РА), то для стабилизации данных была выбрана группа пациентов, у которых в результате терапии активность заболевания снизилась до умеренной ($DAS-28 < 5.1$) и низкой ($DAS-28 < 3.2$) – 13 человек. В таких условиях построение полной модели с 15 предикторами невозможно из-за нехватки данных, поэтому были оставлены показатели, показавшие статистически значимый вклад в DAS-28 в ММЛР у больных в состоянии обострения. Улучшенная ММЛР модель с предикторами TNF, sTNFR1, sTNFR2, CD3 % T1, CD3 N T1, CD3 N T2, CD19 % T1, CD19 N T1, CD19 % T2, CD19 N T2, CD14 N T2 имеет среднее остатков 0 ($< 10^{-18}$) со стандартным отклонением 0.04, значение F-статистики дисперсионного отношения Фишера по 11 и 1 степеням свободы, соответствующее уровню значимости $p = 0.05$, коэффициент детерминации $R^2 = 0.99$, информационный критерий Акаике $AIC = -51.88$. Значение статистики критерия Шапиро-Уилка для проверки нормальности распределения остатков $W = 0.95$ с уровнем значимости $p = 0.6$. Статистически незначимыми предикторами являются CD 19 % T1, CD19 % T2, CD19 N T2, CD14 N T2 с уровнями значимости p от 12 до 13 %, что не позволяет не учитывать эти предикторы. Хорошие показатели качества данной модели могут быть обусловлены малым количеством специально выбранных измерений. На малое количество измерений указывают плохие показатели качества моделей только для показателей процента клеток (вероятность равенства всех коэффициентов в модели нулю 64%) и только для числа рецепторов (вероятность равенства всех коэффициентов в модели нулю 87%).

Модели для показателей IL-1 β в группе больных РА с обострением заболевания

ММЛР, построенная по всем показателям IL-1 β для группы с обострением РА имеет среднее остатков 0 ($< 10^{-16}$) со стандартным отклонением 0.80, значение F-статистики дисперсионного отношения Фишера по 16 и 9 степеням свободы 1.85, соответствующее уровню значимости $p = 0.17$, коэффициент детерминации $R^2 = 0.76$, информационный критерий Акаике AIC = 70.84. Значение статистики критерия Шапиро-Уилка для проверки нормальности распределения остатков $W = 0.95$ с уровнем значимости $p = 0.28$. В построенной ММЛР статистически значимы 2 предиктора – число рецепторов IL-1R1 на В-лимфоцитах и моноцитах.

Для улучшения качества ММЛР по всем показателям использована процедура последовательной редукции количества предикторов путем устранения статистически незначимых предикторов. Редуцированная ММЛР описывает зависимость DAS-28 от показателей: IL-1 β , процент IL-1R1 среди Т-лимфоцитов, CD3 N IL-1R1, CD3 % i2, CD3 N i2, CD19 N i1, CD19 N i2, CD14 N, i1CD14 N i2 и имеет среднее остатков 0 ($< 10^{-17}$) со стандартным отклонением 0.63, значение F-статистики дисперсионного отношения Фишера по 9 и 16 степеням свободы 5.13, соответствующее уровню значимости $p = 0.002$, коэффициент детерминации $R^2 = 0.74$, информационный критерий Акаике AIC = 59.42. Значение статистики критерия Шапиро-Уилка для проверки нормальности распределения остатков $W = 0.94$ с уровнем значимости $p = 0.17$. Показатели качества уменьшенной ММЛР говорят о улучшении по сравнению с полной ММЛР. В редуцированной модели статистически значимыми показателями являются CD3.%i1, CD3.%i2, CD19.N.i1, CD14.N.i1 и CD14.N.i2. Результат построения модели представлен на рисунке 23.

```

## [1] "Редуцированная модель"
## [1] "Медиана DAS28"
## [1] 5.915
## [1] "Среднее DAS28"
## [1] 6.055385
##
## Call:
## lm(formula = DAS28 ~ il.1 + CD3.%.i1 + CD3.N.i1 + CD3.%.i2 +
##     CD3.N.i2 + CD19.N.i1 + CD19.N.i2 + CD14.N.i1 + CD14.N.i2,
##     data = Y)
##
## Residuals:
##      Min       1Q   Median       3Q      Max
## -0.67833 -0.43635 -0.01172  0.24062  1.11100
##
## Coefficients:
##              Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
## (Intercept)   6.6415     0.6602  10.059 2.53e-08 ***
## il.1          -0.9355     0.7038  -1.329 0.202392
## CD3.%.i1      -2.3615     0.6631  -3.561 0.002605 **
## CD3.N.i1      -2.3280     1.4958  -1.556 0.139166
## CD3.%.i2       0.5359     0.1656   3.237 0.005166 **
## CD3.N.i2      -0.6464     0.4552  -1.420 0.174789
## CD19.N.i1     7.7851     1.8965   4.105 0.000828 ***
## CD19.N.i2     0.7561     0.5309   1.424 0.173642
## CD14.N.i1    -0.7957     0.2806  -2.835 0.011934 *
## CD14.N.i2    -0.3927     0.1567  -2.507 0.023354 *
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
##
## Residual standard error: 0.6334 on 16 degrees of freedom
## Multiple R-squared:  0.7426, Adjusted R-squared:  0.5978
## F-statistic: 5.128 on 9 and 16 DF,  p-value: 0.002277
##
## [1] "Значение AIC:"
## [1] 59.41682
## [1] "Проверка нормальности остатков"
## [1] "среднее остатков"
## [1] 5.606576e-18
##
## Shapiro-Wilk normality test
##
## data:  resid(M)
## W = 0.94439, p-value = 0.1709

```

Рисунок 23. Построение редуцированной ММЛР для показателя DAS-28 в качестве независимой переменной, выражаемой через уровни растворимого IL-1 β , содержание растворимых рецепторов 1 и 2 типа к IL-1 β и параметров, характеризующих экспрессию мембраносвязанных рецепторов к IL-1 β в субпопуляциях Т-, В-лимфоцитов и моноцитов. Редукция проводилась путем постепенного удаления статистически незначимых предикторов. Для возможности сопоставления коэффициентов величины независимых переменных нормировались.

С целью исследования зависимости показателя DAS-28 от процентного содержания клеток, экспрессирующих рецепторы IL-1 β , построена ММЛР с предикторами IL-1, gaIL 1, sIL-1R1 и показателями процента клеток в субпопуляциях. Данная ММЛР имеет среднее остатков 0 ($< 10^{-16}$) со стандартным отклонением 1.01, значение F-статистики дисперсионного отношения Фишера по 9 и 16 степеням свободы 0.93, соответствующее уровню значимости $p = 0.52$, коэффициент детерминации $R^2 = 0.34$, информационный критерий Акаике AIC = 83.7. Значение статистики критерия Шапиро-Уилка для проверки нормальности распределения остатков $W = 0.96$ с уровнем значимости $p = 0.42$. Все предикторы в данной ММЛР статистически незначимы, наименьший уровень t-статистики двустороннего критерия Стьюдента равенства нулю соответствующего коэффициента регрессии $p = 0.23$. Показатели качества модели говорят о плохом качестве данной ММЛР и не выявляют статистически значимую линейной зависимости между показателями процента IL-1R+ клеток и DAS-28.

С целью исследования зависимости показателя DAS-28 от числа рецепторов на клетках построена ММЛР с предикторами IL-1, gaIL 1, sIL-1R1 и показателями количества рецепторов. Данная ММЛР имеет среднее остатков 0 ($< 10^{-16}$) со стандартным отклонением 0.78, значение F-статистики дисперсионного отношения Фишера по 9 и 16 степеням свободы 2.71, соответствующее уровню значимости $p = 0.04$, коэффициент детерминации $R^2 = 0.60$, информационный критерий Акаике AIC = 70.60. Значение статистики критерия Шапиро-Уилка для проверки нормальности распределения остатков $W = 0.97$ с уровнем значимости $p = 0.69$. Статистически значимыми предикторами в данной ММЛР статистически являются CD19.N.i1, CD19.N.i2, CD14.N.i1 и CD14.N.i2. Показатели качества модели говорят о приемлимом качестве данной ММЛР и существовании статистически значимой линейной зависимости между IL-1 β , gaIL-1, sIL-1R1, показателями числа рецепторов на клетках и DAS-28.

Сравнивая показатели коэффициентов детерминации R^2 в построенных моделях можно сказать, что в рамках линейной зависимости показатели процентного содержания клеток, экспрессирующих рецепторы к IL-1 β ,

обосновывают 18% вариации показателя DAS-28, в то время как показатели числа рецепторов на клетках обосновывают 53% вариации DAS-28.

Модели для показателей IL-1 β в группе больных РА, ответивших на терапию

Модели, построенные по полным данным не обладают приемлимым качеством, вероятности отсутствия линейной связи равны 50%. Для стабилизации данных были отброшены записи с показаниями DAS-28 > 5.0, но данный прием не позволил получить модели с приемлимым качеством объяснения линейных связей.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Провоспалительные цитокины TNF α и IL-1 β через свои рецепторы оказывают самый широкий спектр эффектов как на местном, так и на системном уровне при развитии и протекании РА. Однако эти эффекты на молекулярном уровне обеспечиваются не только нарушением продукции самих медиаторов, но и изменениями в системах блокирования и проведения сигнала в иммунокомпетентные клетки, и, соответственно, в реализации их биологических функций. Многочисленными исследователями показаны изменения в системе растворимых рецепторов к TNF α и IL-1 β при данной патологии: значительно повышаются уровни растворимых рецепторов обоих типов, причем в большей степени – рецепторов 2 типа (Klimiuk et al., 2003; Cañete et al., 2011; Arend et al., 1994). Однако изменения в системе мембраносвязанных рецепторов охарактеризованы в значительно меньшей степени.

Для TNF α клеточные эффекты, обеспечиваемые различными вариантами взаимодействия рецепторов 1 и/или 2 типов и цитокина, приводят к реализации двух основных групп биологических функций медиатора: к активации клеточной гибели (проапоптотические пути) или активации «защитных» пролиферативных и воспалительных эффектов. В случае IL-1 β его провоспалительные эффекты реализуются после связывания только со специфическими мембраносвязанными рецепторами 1 типа, в то время как рецепторы 2 типа являются рецепторами-«ловушками». В связи с этим, для каждого из этих медиаторов баланс как растворимых, так и мембраносвязанных рецепторов разных типов будет определять не только факт ответа клетки на медиаторы, но и вариабельность внутриклеточных эффектов. Помимо этого, от содержания растворимых форм цитокинов также зависят их биологические эффекты как за счет связывания с мембранными формами рецепторов, так и за счет индукции экспрессии и/или шеддинга рецепторов к данному цитокину (Redl et al., 1995; Tietz..., 2006). Поэтому комплексная оценка и сопоставления уровней содержания растворимых факторов, регулирующих активность цитокина, и уровней экспрессии мембраносвязанных форм рецепторов позволяют установить более полное и

точное представление и системе регуляции биологических эффектов медиатора. При этом важно учитывать, что одним из важнейших механизмов регуляции биологических свойств цитокинов является изменение плотности экспрессии рецепторов на поверхности клеток (Moraga et al., 2009; Voou et al., 2014; Gudipaty et al., 2001). Кроме того, для некоторых иммунных медиаторов показано, что существуют определенный пороговый уровень плотности экспрессии, выполняющий роль переключателя сигнальных путей между принципиально различными функциями (Conti et al., 2008; Reynes et al., 2000). Таким образом, изучая показатели экспрессии мембранных форм рецепторов, недостаточно знать процент позитивных клеток в субпопуляции, но также необходимо устанавливать плотность экспрессии рецепторов на поверхности клеток в стандартизованных величинах, независимых от используемого оборудования либо его настроек (каковыми не являются наиболее часто используемые прямые показатели интенсивности флюоресценции, выражаемые в условных единицах). Поэтому нами использовались калибровочные частицы и методика, разработанные фирмой BD, предлагаемые для точного определения числа молекул рецепторов на поверхности клеток. Все полученные данные по отличиям, полученным для больных РА в состоянии обострения и после ответа на терапию, по сравнению со здоровыми донорами, а также между фазами заболевания обобщены и представлены в таблицах 1-2 (для $TNF\alpha$) и 3-4 (для $IL-1\beta$).

Таблица 1. Изменения параметров сывороточного содержания цитокина TNF α и растворимых рецепторов 1 и 2 типов и экспрессии мембраносвязанных форм рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на интактных клетках и моноцитах спонтанных и LPS-стимулированных 24-часовых культур у больных ревматоидным артритом в состоянии обострения (n=40) и после ответа на терапию (n=24) по сравнению со здоровыми донорами.

	РА обострение		РА, ответившие на терапию	
	TNFR1	TNFR2	TNFR1	TNFR2
Показатели экспрессии мембраносвязанных рецепторов				
Т-лимфоциты			↑ % и ↑ ρ	↑ %
В-лимфоциты	↓ ρ	↓ ρ	↑ % [#] и ρ [#]	
Моноциты	↓ % и ↑ ρ	↓ %	↑ ρ	
Моноциты спонт. культур	↑ ρ	↑ ρ	↑ ρ	↑ ρ
Моноциты LPS-стим. культур	↑ ρ	↑ ρ	↑ ρ	↑ ρ
Показатели растворимых рецепторов и цитокина				
TNF α	↑		↑*	
Растворимый рецептор	↑	↓		↓

Стрелками показаны изменения (↑ – увеличение, ↓ – снижение) по сравнению с показателями условно здоровых доноров.

% - изменение процента позитивных клеток, ρ – изменение плотности экспрессии рецепторов на клетке.

* – статистически значимое (p<0,05) снижение показателя в группе ответивших на терапию по сравнению с аналогичным показателем в группе обострения заболевания.

– статистически значимое (p<0,05) повышение показателя в группе ответивших на терапию по сравнению с аналогичным показателем в группе обострения заболевания.

	По проценту клеток			По числу рецепторов		
	Условно-здоровые доноры	РА обострение	РА, ответившие на терапию	Условно-здоровые доноры	РА обострение	РА, ответившие на терапию
Т-лимфоциты	TNFR2	TNFR2	TNFR2	TNFR2	=	=
В-лимфоциты	TNFR2	TNFR2	TNFR2	=	=	=
Моноциты	TNFR2	TNFR2	TNFR2	TNFR2	=	=
Моноциты спонт. культур	TNFR2	TNFR2	TNFR2	TNFR2	TNFR2	=
Моноциты LPS-стим. культур	TNFR2	TNFR2	TNFR2	TNFR2	TNFR2	=

В соответствующих ячейках обозначен значимо более высокий показатель. Отсутствие статистически значимых отличий отмечено знаком «=».

Таблица 3. Изменения параметров экспрессии мембраносвязанных форм рецепторов 1 и 2 типа к ИЛ-1 β на интактных клетках и моноцитах спонтанных и LPS-стимулированных 24-часовых культур и сывороточных уровней цитокина ИЛ-1 β и растворимых рецепторов 1 и 2 типов у больных ревматоидным артритом в состоянии обострения (n=40) и после ответа на терапию (n=24).

	РА обострение		РА, ответившие на терапию	
	ИЛ-1R1	ИЛ-1R2	ИЛ-1R1	ИЛ-1R2
Т-лимфоциты	↓ ρ		↓ ρ	↑%
В-лимфоциты	↓ ρ	↓ ρ	↑ % и ↓ ρ	↑%
Моноциты	↓ % и ↑ ρ	↑ % и ↑ ρ	↓ %* и ↑ ρ	↑ % и ↑ ρ
Моноциты спонт. культур	↑ ρ	↑ ρ	↑ ρ	↑ ρ
Моноциты LPS-стим. культур	↓ % и ↑ ρ	↑ ρ	↓ % и ↑ ρ	↑ ρ
ИЛ-1 β	↑		↑	
raIL-1	↑	↑	*	*
Растворимый рецептор	↑	↑	↑*	↑

Стрелками показаны изменения (↑ – увеличение, ↓ – снижение) по сравнению с показателями условно здоровых доноров.

% - изменение процента позитивных клеток, ρ – изменение плотности экспрессии рецепторов на клетке.

* – статистически значимое (p<0,05) снижение показателя в группе ответивших на терапию по сравнению с аналогичным показателем в группе обострения заболевания.

Таблица 4. Баланс между рецепторами 1 и 2 типа к IL-1 β по экспрессии мембраносвязанных форм рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на интактных клетках и моноцитах спонтанных и LPS-стимулированных 24-часовых культур у больных ревматоидным артритом в состоянии обострения (n=33) и после ответа на терапию (n=24) и у здоровых доноров.

	По проценту клеток		По числу рецепторов	
	Условно-здоровые доноры	РА обострение	РА обострение	РА, ответившие на терапию
Т-лимфоциты	IL-1R1	=	IL-1R1	=
В-лимфоциты	IL-1R1	=	IL-1R1	=
Моноциты	IL-1R1	=	IL-1R2	=
Моноциты спонт. культур	IL-1R1	IL-1R1	=	=
Моноциты LPS-стим. культур	IL-1R1	IL-1R1	IL-1R1	=

В соответствующих ячейках обозначен значимо более высокий показатель. Отсутствие статистически значимых отличий отмечено знаком «=».

Эффективность действия цитокина зависит от количества рецепторов на поверхности клеток, и может существовать определенное пороговое число рецепторов, при недостижении которого вероятность связывания цитокина с рецептором и проведения сигнала в клетку будет близка к нулю, и, соответственно, реализация свойств будет невозможна; при высокой плотности экспрессии рецепторов вероятность связывания и активации сигнальных путей гораздо выше, и эффективность действия цитокина увеличивается. Из полученных нами данных можно сделать вывод, что поскольку каждая популяция имеет определенный уровень экспрессии рецепторов к TNF α и IL-1 β , то и пороговое число рецепторов разное будет разным для разных субпопуляций и, в зависимости от вовлеченности клеток в патологический процесс, будет являться величиной стабильной, либо, напротив, вариабельной. Нами было показано, что интактные клетки субпопуляций МНК ПК различаются как по относительному проценту клеток, экспрессирующих рецепторы 1 и 2 типа к TNF α и рецепторы 1 и 2 типа к IL-1 β , так и по абсолютному числу рецепторов на них. При этом высокая плотность экспрессии рецепторов на клетке не обязательно связана с высоким процентом позитивных клеток, и наоборот. В частности, как у здоровых, так и у больных РА вне зависимости от активности воспалительного процесса для субпопуляции Т-лимфоцитов характерен наибольший процент клеток, экспрессирующих TNFR2, при наименьшей плотности экспрессии рецепторов обоих типов на них. Это может свидетельствовать о том, что для клеток данной субпопуляции предельно допустимая плотность рецепторов низкая, но при этом данная популяция клеток является более чувствительной к действию медиатора и имеющаяся плотность является достаточной для связывания рецепторов с цитокинов и реализации свойств TNF α на них. Кроме того, это свидетельствует о стабильности уровня отвечаемости этих Т-лимфоцитов на действие медиатора вне зависимости от наличия активного воспалительного процесса.

Кроме того, показано, что увеличение или уменьшение плотности экспрессии рецепторов на клетках при патологии по сравнению с нормой не всегда происходит однонаправленно с изменением процента клеток, несущих данные

рецепторы. По экспрессии рецепторов 1 типа к TNF α у больных РА регистрируется значимо более низкий процент позитивных клеток при более высокой плотности экспрессии на них. По экспрессии рецепторов к IL-1 β у больных РА в стадии обострения и после ответа на терапию наблюдается значимо более низкий процент IL-1R1⁺ моноцитов при одновременном повышении плотности экспрессии рецепторов данного типа на них, и обратное соотношение для В-лимфоцитов больных, ответивших на терапию. Таким образом, разнонаправленные изменения процента клеток и плотности экспрессии соответствующего рецептора в данных субпопуляциях иммунокомпетентных клеток может служить механизмом для направления связывания цитокина с целевыми рецепторами и, за счет этого, изменения конечного эффекта на конкретную субпопуляцию.

При сравнении показателей между группами исследуемых установлено, что во всех субпопуляциях клеток больных РА после ответа на терапию отмечается статистически значимое усиление экспрессии рецепторов TNFR1 по сравнению со здоровыми донорами, что, вероятно, обусловлено реакцией клеток данных субпопуляций на проводимое лечение. Это означает, что проводимая терапия в целом приводит к повышению экспрессии и плотности рецепторов 1 типа и их суммарное количество увеличивается. При этом обострение заболевания не связано с изменением уровня экспрессии рецепторов 1 типа на клетках в системном кровотоке, из чего можно предположить, что в состоянии обострения преимущественно происходят изменения по экспрессии рецепторов 1 типа на местном уровне (в очагах воспаления – в синовии, а при клиническом улучшении повышение экспрессии данного типа рецепторов на периферии необходимо либо для рецепции и «стягивания» лишнего, избыточного TNF α (уровень которого существенно повышается при обострении), в том числе из местных компартментов, либо для активации рецепторов многих клеток периферической крови, которые посредством этого оказывают позитивный эффект, необходимый при данном заболевании. Кроме того, есть вероятность изменения статуса клеток

при проводимой терапии и, как следствие, изменение их чувствительности и порогового уровня экспрессии рецепторов для взаимодействия с TNF α .

У больных ревматоидным артритом установлено одновременное снижение плотности экспрессии рецепторов обоих типов к TNF α на В-лимфоцитах. Поскольку при данном заболевании большое число клонов аутореактивных В-клеток активированы и пролиферируют (Bugatti et al., 2014), это свидетельствует о нарушениях в системе регуляции их нормальной функциональной активности, в том числе – о нарушениях процессов апоптоза, запускаемых TNF α . Подобное "уклонение" может обеспечиваться через наблюдаемое уменьшение числа мембраносвязанных рецепторов к этому цитокину.

Для показателей экспрессии рецепторов 1 типа к IL-1 β показано, что среди В-лимфоцитов больных, ответивших на терапию, происходит увеличение процента IL-1R1 $^{+}$ клеток с одновременным снижением плотности экспрессии этих рецепторов на них, а для моноцитов больных РА вне зависимости от стадии заболевания наблюдается обратное соотношение (снижение процента IL-1R1 $^{+}$ клеток с одновременным повышением плотности). Эта особенность сохраняется у моноцитов и после стимуляции LPS. Разнонаправленные изменение процента позитивных клеток и числа рецепторов отражают 2 разных механизма регуляции действия цитокина на клетки целевой субпопуляции, которые могут приводить к активации различных сигнальных путей или к более таргетному воздействию на конкретные иммунокомпетентные клетки.

Исходя из разных функций рецепторов разных типов и их конкуренции за связывание соответствующего цитокина, важным фактором, отражающим состояние системы регуляции биологических эффектов цитокинов является баланс между разными типами рецепторов. Различия в процентах клеток в субпопуляции, несущих рецепторы, и различия в средней плотности экспрессии рецепторов 1 и 2 типа (а также изменение этих соотношений при патологии по сравнению с нормой) могут модулировать действие цитокина для повышения шансов его связывания с конкретным типом рецепторов на клетках конкретной субпопуляции либо для запуска конкретных сигнальных путей.

В нашем исследовании показано, что для TNF α во всех исследованных группах и в каждой из субпопуляций процент клеток, экспрессирующих рецепторы 1 типа, значимо ниже процента клеток, экспрессирующих рецепторы 2 типа. По плотности экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF α аналогичное отличие есть только среди Т-лимфоцитов и моноцитов и только у здоровых доноров, в то время как у больных РА вне зависимости от фазы воспалительного процесса среднее число рецепторов 1 и 2 типа на клетках различных субпопуляций примерно одинаковое. Важно отметить, что при перенесении в культуру моноциты больных РА в стадии обострения реагируют более значительным увеличением плотности экспрессии именно 2 типа к TNF α как в присутствии, так и в отсутствии LPS, а для больных, ответивших на терапию, такой тенденции не выявляется. Таким образом, вне зависимости от состояния здоровья и стадии заболевания, средняя плотность экспрессии рецепторов 1 типа к TNF α и процент TNFR1+ клеток в субпопуляции никогда не превышает показатели рецептора 2 типа. Для рецепторов к IL-1 β процент клеток, экспрессирующих рецепторы 1 типа, выше процента IL-1R2+ клеток среди Т-, В-лимфоцитов и моноцитов только у здоровых доноров, а при переносе клеток в культуру – среди моноцитов всех исследуемых групп доноров. По числу рецепторов на клетках интактных субпопуляций для здоровых доноров устанавливается значимо более высокая плотность экспрессии рецепторов обоих типов, но у больных РА имеющееся соотношение нарушается и отличий между средним числом рецепторов 1 и 2 типа нет. Таким образом, при патологическом состоянии меняется баланс между цитокиновыми рецепторами разных типов, выполняющими разные функции, что отражает нарушения в регуляции эффектов провоспалительных медиаторов при данном заболевании.

Изменение процента клеток, экспрессирующих рецепторы, в субпопуляциях или изменение плотности экспрессии рецепторов при патологии по сравнению с нормой обуславливается различными механизмами. Для TNF α исследователями показано, что при большой плотности рецепторов 2 типа на поверхности клетки возможно локальное увеличение концентрации связанного либо эндогенного

цитокина, и опосредованная передача сигнала на рецепторы 1 типа (Grell, 1999; Haas, et al., 1999; Tartaglia et al., 1993; Fotin-Mleczek et al., 2002). Этот механизм служит для увеличения эффективности воздействия медиатора на клетку, а за счет различного соотношения плотности экспрессии рецепторов 1 и 2 типа будет проходить переключение с одних сигнальных путей на другие и, соответственно, реализация разных биологических функций TNF α . Среди исследованных нами субпопуляций значимо наибольшая плотность экспрессии рецепторов 2 типа наблюдалась на моноцитах всех исследуемых групп доноров, и при этом при РА наблюдалось снижение числа моноцитов, экспрессирующих рецепторы 2 типа. Возможно, именно за счет большой плотности рецепторов 2 типа при активации системного воспалительного процесса происходило осуществление передачи сигнала на рецепторы 1 типа, что реализовывалось в гибели клеток, экспрессирующих рецепторы 2 типа. Это свидетельствует о вовлеченности их в TNF-опосредованные процессы при РА. Снижение плотности экспрессии рецепторов 2 типа на В-лимфоцитах при РА может обеспечиваться их слущиванием с поверхности для инактивации системного действия TNF α , что приводит к уменьшению эффективности его воздействия на данные клетки. Повышение же плотности при одновременном снижении процента клеток, несущих рецепторы, может приводить к активной вовлеченности клеток отдельных минорных субпопуляций для достижения определенных эффектов именно на них (как в случае увеличения плотности экспрессии рецепторов 1 типа на моноцитах при РА).

Для IL-1 β показано, что повышенная экспрессия рецепторов IL-1 2 типа на клетках может приводить к отсутствию ответа клетки на IL-1 (Bossù et al., 1995; Re et al., 1996), либо к снижению эффективности действия цитокина на клетки. По экспрессии рецепторов-ловушек 2 типа при обострении заболевания отмечается снижение их количества на В-лимфоцитах, компенсируемое при клиническом улучшении заболевания статистически значимо более высоким, по сравнению со здоровыми донорами, процентом IL-1R2⁺ В-лимфоцитов. Кроме того, для Т-лимфоцитов больных, ответивших на терапию, показано статистически значимое

повышение процента IL-1R2⁺ клеток, а моноциты больных вне зависимости от фазы заболевания демонстрируют статистически значимое повышение плотности экспрессии этих рецепторов. Таким образом, установленные отличия свидетельствуют о важности и вовлеченности 1 типа рецепторов к TNF α и 2 типа рецепторов к IL-1 β для отвечаемости клеток на проводимое лечение и улучшение состояния больных РА, и можно сделать предположение о таргетности данного типа мембраносвязанных рецепторов для разработки терапевтических подходов при данной нозологии.

При исследовании изменения показателей экспрессии рецепторов к TNF α и IL-1 β на моноцитах в спонтанных культурах, было установлено, что вне зависимости от активности протекания патологического процесса, моноцитарная популяция не имеет никаких отличий по процентам позитивных клеток между группами исследуемых, но при этом по плотности экспрессии рецепторов моноциты больных РА несут значимо большее число всех исследуемых рецепторов (TNFR1, TNFR2, IL-1R1, IL-1R2) по сравнению со здоровыми донорами. Добавление LPS вызывает статистически значимую стимуляцию по проценту TNFR2⁺ моноцитов у всех исследованных, однако отличий по показателям больных РА со здоровыми донорами не выявляется. Процент клеток, экспрессирующих рецепторы обоих типов к IL-1, увеличивается под действием стимулятора только у здоровых доноров, при этом у больных РА вне зависимости от стадии заболевания, процент IL-1R1⁺ моноцитов значимо ниже. По плотности экспрессии рецепторов моноциты больных РА демонстрируют большее число рецепторов на поверхности клеток по сравнению со здоровыми донорами для всех типов рецепторов. Выявленные отличия по интактным клеткам и по реакции моноцитов на активацию поликлональным стимулятором свидетельствуют о том, что регуляция действия цитокинов моноцитами может осуществляться для TNF α преимущественно увеличением плотности экспрессии рецепторов обоих типов, а для IL-1 β – как отдельным изменением процента позитивных клеток либо числа рецепторов на клетках, так и одновременным разнонаправленным изменением обоих этих показателей. Установленные отличия, характерные для больных РА,

свидетельствуют о потенциале моноцитов отвечать на активацию клетки различным изменением показателей экспрессии рецепторов к разным иммуномодуляторным цитокинами, что может служить одним из механизмов регуляции переключения сигнальных путей.

Растворимые рецепторы являются мощными регуляторами активности цитокинов, выполняя двоякую функцию: с одной стороны, они могут нейтрализовать TNF α и IL-1 β в системной циркуляции (Aderka, 1996; Symons et al., 1995; Arend et al., 2008); с другой стороны, комплексы растворимых рецепторов с цитокином могут выполнять буферную функцию (Kollias et al., 1999; Watts et al., 1999; Kirchner et al., 2004; Dinarello, 1994). Однако для растворимых рецепторов разных типов показаны некоторые отличия в преимущественной реализации их функций. Для растворимых рецепторов 2 типа как к TNF α , так и к IL-1 β показана более высокая аффинность связывания по сравнению с соответствующими рецепторами 1 типа, т.е. они в большей степени являются ингибиторами активности цитокина. Для рецепторов 1 типа отличие заключается в том, что sTNFR1 в большей степени может участвовать в обратной сигнализации (при связывании с мембранной формой TNF), а для sIL-1R1 лучше охарактеризована буферная функция с одновременным более высоким сродством к рецепторному антагонисту и IL-1 α , а не IL-1 β . Кроме того, для IL-1 β показано существование специфического рецепторного антагониста, конкурирующего с цитокином за связывания с рецепторами. В нашем исследовании показано, что во всех исследованных группах сывороточные содержания рецепторов 2 типа к TNF α и рецепторов 2 типа IL-1 β значимо превышают содержания соответствующих рецепторов 1 типа, но при этом для больных РА в состоянии обострения по сравнению со здоровыми донорами показаны более высокие уровни рецепторов 1 типа к обоим цитокинам, что отражает снижение уровня приспособленности организма к протекающему активному воспалительному процессу. Также показано, что после ответа на терапию сохраняется значимо более высокий уровень растворимого рецептора 1 типа к TNF α , что может быть связано с шеддингом рецепторов данного типа с активно вовлеченных в

воспаление клеток (в частности, моноцитов) при ответе на терапию. Среди показателей растворимых медиаторов выявлен ряд корреляционных взаимосвязей между параметрами, измеряемыми у больных, ответивших на терапию, по сравнению с аналогичными у этих же больных при обострении заболевания (снижение сывороточных уровней TNF α , IL-1R1 и gaIL-1), которые могут служить показателями эффективной терапии.

Выявленные изменения в показателях экспрессии мембраносвязанных рецепторов к TNF α и к IL-1 β представляют значительный интерес, так как ранее не было показано, что у больных РА не на всех типах клеток происходят однонаправленные изменения процента клеток, экспрессирующих рецепторы, и числа рецепторов на клетках по сравнению со здоровыми донорами. Однако, было важно выяснить, как соотносятся эти отличия с ранее установленными в *in vitro* и *in vivo* экспериментах изменениями сывороточных показателей содержания цитокинов и растворимых форм рецепторов, и какой вклад установленные отличия вносят в активность патологического процесса, течение РА и ответ на терапию. Сравнение моделей с различными комбинациями показателей TNF α позволили выявить, что показатели числа рецепторов на поверхности клеток в целом вносят более значительный вклад в величину DAS-28 по сравнению с показателями процента клеток и содержанием растворимых sTNFR1, sTNFR2 и TNF α . Кроме того, исследование моделей с различными комбинациями групп показателей для цитокина TNF α (содержание в сыворотке цитокина и растворимых форм рецепторов, процентное содержание в субпопуляциях клеток, экспрессирующих рецепторы, число рецепторов на поверхности клеток) продемонстрировало, что измерение только процента позитивных клеток и содержания растворимых медиаторов не являются достаточными для объяснения уровня активности заболевания DAS-28, что также подтверждается отсутствием статистически значимых корреляций между показателем активности РА и исследуемыми величинами. В то же время введение в модель показателей плотности экспрессии рецепторов на поверхности клеток, даже при устранении показателей процентного содержания позитивных клеток,

позволяет получить модель высокого качества, хорошо объясняющую величину DAS-28 у больных в стадии обострения заболевания. Это свидетельствует о том, что измерение только процента позитивных клеток и уровней растворимых форм цитокина рецепторов не являются достаточными для оценки изменений в рецепторном аппарате цитокина при нозологии. Аналогичная закономерность была установлена и для моделей с показателями IL-1 β – показатели числа рецепторов на поверхности клеток вносят больший вклад в значение DAS-28 по сравнению с растворимыми медиаторами и процентным содержанием позитивных клеток.

Представляет интерес тот факт, что в ММЛР с показателями TNF α для Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов статистически значимый вклад в модель вносят как число TNFR1, так и TNFR2 рецепторов, а для моноцитов – только число рецепторов 2 типа. При этом коэффициенты в модели демонстрируют, что увеличение числа одних и тех же рецепторов на разных типах клеток может быть сопряжено как с более высокими, так и с более низкими показателями DAS-28, и наоборот. В частности, для TNFR1 более высокое число рецепторов на Т-лимфоцитах сопряжено с более высоким DAS-28, а на В-лимфоцитах – напротив, с более низким; для TNFR2 более высокое число рецепторов сопряжено с более высоким DAS-28 для Т- и В-лимфоцитов и более низким – для моноцитов.

При построении ММЛР для показателей экспрессии мембраносвязанных рецепторов к IL-1 β и содержания растворимого медиатора и рецепторов было установлено, что статистически значимый вклад в величину DAS-28 вносят только число рецепторов 1 и 2 типа к IL-1 β на поверхности В-лимфоцитов и моноцитов, что подтверждает высокую вовлеченность этих клеток в патологический процесс. При этом важно отметить, что не было выявлено статистически значимого влияния уровней растворимых рецепторов и цитокина на активность заболевания.

В целом, полученные данные свидетельствуют об отличиях в экспрессии рецепторов к TNF α и к IL-1 β различными субпопуляциями

иммунокомпетентных клеток в норме и при патологии, и о формирующихся при воспалительных заболеваниях изменениях не только в показателях продукции медиатора, но и изменениях в системе мембраносвязанных рецепторов на поверхности клеток. Показана важность определения не только относительного содержания клеток, экспрессирующих рецепторы к иммуномодуляторным цитокинам, но и количества самих мембраносвязанных рецепторов, так как для показателей плотности экспрессии при ревматоидном артрите характерны изменения, не устанавливаемые при стандартной оценке процента позитивных клеток. Показано, что изменение числа рецепторов к TNF α и к IL-1 β на поверхности иммунокомпетентных клеток в большей степени ассоциировано с показателем активности ревматоидного артрита DAS-28 по сравнению с показателями растворимых медиаторов, растворимых форм рецепторов и показателями процентного содержания в субпопуляциях клеток, экспрессирующих рецепторы, что указывает на вовлеченность изменения плотности экспрессии рецепторов к цитокинам в патологический процесс при заболевании. Установлено, что происходят разнонаправленные изменения показателей плотности экспрессии рецепторов и процента позитивных клеток в субпопуляции моноцитов для рецепторов 1 типа к TNF α и для рецепторов 1 типа к IL-1 β , что отражает различные возможные варианты регуляции клеточного ответа на цитокины за счет изменения показателей экспрессии рецепторов разных типов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований была произведена комплексная оценка экспрессии мембраносвязанных и содержания растворимых форм рецепторов к TNF α и IL-1 β и сопоставление с данными по сывороточному уровню цитокинов. Были установлены отличия в экспрессии рецепторов к иммуномодуляторным цитокинам различными субпопуляциями иммунокомпетентных клеток в норме и при патологии, что свидетельствует о формирующихся при воспалительных заболеваниях изменениях не только в показателях продукции медиаторов и растворимых форм рецепторов, но и в экспрессии мембраносвязанных рецепторов на поверхности иммунокомпетентных клеток.

У больных ревматоидным артритом установлено одновременное снижение плотности экспрессии рецепторов обоих типов к TNF α на В-лимфоцитах. При данном заболевании большое число клонов аутореактивных В-клеток активированы и пролиферируют, что свидетельствует о снижении их восприимчивости к проапоптотическому действию TNF α , которое обеспечивается в том числе через уменьшение числа мембраносвязанных рецепторов к этому цитокину.

Было показано, что у больных ревматоидным артритом снижение плотности экспрессии рецепторов к TNF α и IL-1 β на иммунокомпетентных клетках не сопряжено со снижением процента позитивных клеток в субпопуляции. Более того, изменение при патологии этих показателей может происходить разнонаправленно – в частности, снижение процента TNFR1 $^{+}$ и IL-1R1 $^{+}$ моноцитов сопровождается повышением плотности экспрессии на них данных рецепторов у больных ревматоидным артритом в состоянии обострения, а повышение процента IL-1R1 $^{+}$ В-лимфоцитов происходит со снижением числа рецепторов 1 типа к IL-1 β на них у больных, ответивших на терапию. Это подтверждает, что при ревматоидном артрите регуляция экспрессии рецепторов на иммунокомпетентных клетках может осуществляться различными механизмами (как отдельным изменением числа клеток или числа рецепторов, так

и одновременным разнонаправленным), и для определения способности клеточных субпопуляций отвечать на цитокины необходимо учитывать плотность экспрессии рецепторов. Кроме того, при ревматоидном артрите соотношение между субпопуляциями по одним и тем же показателям экспрессии рецепторов меняется по сравнению со здоровыми донорами, что свидетельствует об изменениях в распределении рецепторов на клетках при ревматоидном артрите, не устанавливаемых при стандартной оценке процента позитивных клеток, и может приводить к активации различных сигнальных путей.

Установлено, что изменение числа рецепторов к TNF α и к IL-1 β на поверхности иммунокомпетентных клеток вносит значительный вклад в значение показателя активности ревматоидного артрита DAS-28, что указывает на важность плотности экспрессии рецепторов к цитокинам для регуляции биологических эффектов цитокинов при патологическом процессе.

Для больных ревматоидным артритом установлены отличия по показателям экспрессии рецепторов к TNF α на моноцитах при культивировании с липополисахаридом, свидетельствующие о том, что моноциты при активации имеют значимо более высокий индекс стимуляции для величины плотности экспрессии рецепторов 1 типа по сравнению и более низкий – для 2 типа рецепторов по сравнению со здоровыми донорами.

В целом, полученные данные свидетельствуют о нарушениях в системе мембраносвязанных рецепторов к TNF α и IL-1 β при хроническом аутоиммунном воспалительном процессе и о важности комплексного изучения показателей экспрессии рецепторов к иммунорегуляторным цитокинам не только по проценту позитивных клеток в субпопуляциях, но и по числу рецепторов на клетках.

ВЫВОДЫ

1. У больных ревматоидным артритом в состоянии обострения снижается процент моноцитов, несущих рецепторы 1 типа к TNF α , с одновременным увеличением количества данных рецепторов на клетках по сравнению со здоровыми донорами, что свидетельствует об изменении свойств моноцитов при ревматоидном артрите.

2. Для В-лимфоцитов у больных ревматоидным артритом в состоянии обострения характерно снижение числа рецепторов 1 и 2 типа как к TNF α , так и к IL-1 β при неизменном проценте клеток с рецепторами по сравнению со здоровыми донорами, что говорит об измененной экспрессии рецепторов к цитокинам TNF α и IL-1 β при патологии.

3. У больных ревматоидным артритом в стадии обострения для Т- и В-лимфоцитов характерно снижение числа рецепторов 1 типа к IL-1 β на клетках, в то время как для моноцитов показано повышение числа этих рецепторов при сниженном проценте клеток по сравнению со здоровыми донорами, что свидетельствует о различных вариантах изменения экспрессии IL-1R1 при патологии.

4. При анализе моделей множественной линейной регрессии было установлено, что число рецепторов TNFR2 на всех исследуемых субпопуляциях (Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах и моноцитах), а также число рецепторов TNFR1 и процент TNFR1+ клеток в субпопуляциях Т- и В-лимфоцитов вносят вклад в величину DAS-28. Это подтверждает наличие связи между активностью заболевания и показателями экспрессии мембраносвязанных рецепторов к TNF α при ревматоидном артрите.

5. У больных ревматоидным артритом в отличие от здоровых доноров при стимуляции липополисахаридом отмечается изменение только числа рецепторов к IL-1 β , но не процента клеток с рецепторами, что свидетельствует о модификации реактивности моноцитов при патологии.

6. Экспрессия мембраносвязанных рецепторов к TNF α и IL-1 β на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток у больных ревматоидным артритом

имеет отличия по сравнению со здоровыми донорами как по проценту клеток с рецепторами в субпопуляциях, так и по числу рецепторов на них, причем эти изменения могут быть разнонаправленными, что свидетельствует об их участии в механизмах действия провоспалительных цитокинов при данной нозологии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

%T1 (%T2) – процент клеток в субпопуляции, экспрессирующих рецепторы TNFR1 (TNFR2)

%i1 (%i2) – процент клеток в субпопуляции, экспрессирующих рецепторы IL-1R1 (IL-1R2)

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

кДа – килодальтон

ММЛР – модель множественной линейной регрессии

МНК ПК – мононуклеарные клетки периферической крови

мРНК – матричная РНК

РА – ревматоидный артрит

РНК – рибонуклеиновая кислота

АПС – аллофикоцианин

CD – кластер дифференцировки

N.T1(N.T2) – среднее число рецепторов TNFR1 (TNFR2) на клетках в субпопуляции

N.i1 (N.i2) – среднее число рецепторов IL-1R1 (IL-1R2) на клетках в субпопуляции

EULAR – Европейская Антиревматическая Лига

FADD – белок, взаимодействующий с доменом смерти Fas-рецептора

FCS – эмбриональная бычья сыворотка

FITC – флуоресцеин изотиоцианат

FSC – прямое светорассеяние

G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ICE, каспаза-1 – IL1 β -превращающий фермент

IFN – интерферон

ИКК – ингибитор кВ-киназы

IL – интерлейкин

IL-1R1 (IL-1R2) – рецептор 1 типа (2 типа) интерлейкина-1
IL1RAcP – вспомогательный белок рецептора интерлейкина 1
JNK – c-jun N-терминальная киназа
LPS – липополисахарид
MAP-киназа – митоген-активируемая протеинкиназа
MFI – среднее значение интенсивности флуоресценции
NF- κ B – ядерный фактор транскрипции κ B
OPG – остеопротегерин
PE – фикоэритрин
PE-Cy7 – фикоэритрин с цианином 7
PTHrP – паратгормон-связанный белок
raIL-1, raIL.1 – рецепторный антагонист IL-1 β
RANKL – лиганд рецепторного активатора нуклеарного фактора κ B
sIL-1R1, sIL.1R1 – растворимый рецептор 1 типа интерлейкина-1
sIL-1R2 – растворимый рецептор 2 типа интерлейкина-1
SSC – боковое светорассеяние
sTNFR1 (sTNFR2) – растворимый рецептор к TNF 1 типа (2 типа)
TGF β – трансформирующий ростовой фактор бета
TIR домен – толл-подобный домен рецептора IL-1
TNFR1, p55, CD120a – мембраносвязанный рецептор 1 типа к TNF α
TNFR2, p75, CD120b – мембраносвязанный рецептор 2 типа к TNF α
TNF α – фактор некроза опухоли альфа
TRADD – белок, взаимодействующий с доменом смерти TNFR1-рецептора
TRAF – фактор, связанный с рецептором фактора некроза опухоли
TACE, ADAM17 – TNF-превращающий фермент

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аутеншлюс, А. И. Содержание цитокинов IL-1 β , TNF α и уровни антител к TNF α у больных с онкологическими и воспалительными заболеваниями / А. И. Аутеншлюс, А. Н. Шкунов, Г. Г. Иванова [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 11-15.
2. Бадочкин, В. В. Перспективы применения ингибиторов ФНО- α при псориазе и псориатическом артрите / В. В. Бадочкин // Клин. фармакология и терапия. – 2005. – № 14. – С. 76-80.
3. Глякин, Д. С. Провоспалительные цитокины у больных раком эндометрия / Д. С. Глякин, А. В. Самойлова, А. Г. Гунин // Проблемы репродукции. – 2012. – Т. 18, № 1. – С. 35-37.
4. Громова, А. Ю. Полиморфизм генов семейства IL-1 человека / А. Ю. Громова, А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 2. – С. 3-12.
5. Дрейпер, Н. Прикладной регрессионный анализ. Т.1-2. Изд. 2, перераб. и доп. / Н. Дрейпер, Г. Смит. М.: Финансы и статистика, 1987. 720 с.
6. Ешану, В. С. Цитокины и их биологические эффекты при болезнях печени / В. С. Ешану // Клин. перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2004. – № 5. – С. 11-16.
7. Кричевская, О. А. Фактор некроза опухоли α и его растворимые рецепторы при ревматических заболеваниях: клиническое и патогенетическое значение / О. А. Кричевская, Н. Г. Клюквина, Е. Н. Александрова [и др.] // Науч.-практ. ревматология. – 2005. – № 2. – С. 43-46.
8. Насонов, Е. Л. Уровень растворимого рецептора I типа фактора некроза опухоли у больных системной склеродермией / Е. Л. Насонов, Н. Г. Гусева, М. Ю. Самсонов [и др.] // Терапевт. архив. – 2004. – № 5. – С. 11-15.
9. Насонов, Е. Л. Фактор некроза опухоли- α – новая мишень для противовоспалительной терапии ревматоидного артрита / Е. Л. Насонов // Рус. мед. журн. – 2000. – № 8. – С. 718-722.

10. Новиков, А. А. Роль цитокинов в патогенезе ревматоидного артрита / А. А. Новиков, Е. Н. Александрова, М. Н. Диатроптова [и др.] // Науч.-практ. ревматология. – 2010. – № 2. – С. 71-82.

11. Оранский, С. П. Цитокиновый баланс и некоторые сывороточные биомаркеры метаболизма костно-суставной ткани у больных ревматоидным артритом на фоне курсовой терапии инфликсимабом / С. П. Оранский, Л. Н. Елисеева, Р. А. Ханферян [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2011. – Т. 10, № 1. – С. 65-69.

12. Останин, А. А. Цитокин-опосредованные механизмы развития системной иммуносупрессии у больных с гнойно-хирургической патологией / А. А. Останин, О. Ю. Леплина, М. А. Тихонова [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 1. – С. 38-45.

13. Прохоренко, Т. С. Система фактора некроза опухолей α в патогенезе аутоиммунного сахарного диабета/ Т. С. Прохоренко, Т. В. Саприна, Ф. Э. Лазаренко [и др.] // Бюл. сиб. медицины. – 2011. – № 1. – С. 64-69.

14. Сенников, С. В. Роль альтернативного сплайсинга генов цитокинов в формировании полиморфной структуры цитокиновой сети / С. В. Сенников, А. Н. Силков, В. А. Козлов // Мед. иммунология. – 2001. – Т. 3, № 3. – С. 389-400.

15. Симбирцев, А. С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма / А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 9-16.

16. Скворцова, Н. В. Клиническое значение некоторых цитокинов и их прогностическая роль у пациентов с неходжкинскими злокачественными лимфомами / Н. В. Скворцова, Т. И. Пospelова, И. Б. Ковынев [и др.] // Бюл. сиб. медицины. – 2008. – Прил. 3. – С. 63-70.

17. Соснина, А. В. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований : информ.-метод. пособие / А. В. Соснина, Н. В. Великая, А. И. Аутеншлюс. – Новосибирск : Вектор-Бест, 2013. – 80 с.

18. Ярилин, Д. А. Роль фактора некроза опухолей в регуляции воспалительного ответа моноцитов и макрофагов / Д. А. Ярилин // Иммунология. – 2014. – Т. 35, № 4. – С. 195-201.

19. Achyut, B. R. Genetic association of interleukin-1beta (-511C/T) and interleukin-1 receptor antagonist (86 bp repeat) polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in North Indians / B. R. Achyut, A. Srivastava, S. Bhattacharya, B. Mittal // Clinica Chimica Acta. – 2007. – Vol. 377, № 1/2. – P. 163-169.

20. Acosta-Rodriguez, E. V. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells / E. V. Acosta-Rodriguez, G. Napolitani, A. Lanzavecchia, F. Sallusto // Nature Immunology. – 2007. – Vol. 8, № 9. – P. 942-949.

21. Aderka, D. Shedding kinetics of soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors after systemic TNF leaking during isolated limb perfusion. Relevance to the pathophysiology of septic shock / D. Aderka, P. Sorkine, S. Abu-Abid [et al.] // J. of Clinic. Investigation. – 1998. – Vol. 101, № 3. – P. 650-659.

22. Aderka, D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors / D. Aderka // Cytokine Growth Factor Rev. – 1996. – Vol. 7, № 3. – P. 231-240.

23. Aggarwal, B. B. Tumor necrosis factors: developments during last decade / B. B. Aggarwal, K. Natarajan // Europ. Cytokine Network. – 1996. – Vol. 7, № 2. – P. 93-124.

24. Alaaeddine, N. Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha / N. Alaaeddine, J. A. DiBattista, J. P. Pelletier [et al.] // J. of Rheumatology. – 1997. – Vol. 24, № 10. – P. 985-994.

25. Allam, I. Interleukin-1 and the interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms study in patients with rheumatoid arthritis / I. Allam, R. Djidjik, N. Ouikhlef [et al.] // Pathologie Biologie. – 2013. – Vol. 61, № 6. – P. 264-268.

26. Alsalameh, S. Preferential induction of prodestructive matrix metalloproteinase-1 and proinflammatory interleukin 6 and prostaglandin E2 in

rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via tumor necrosis factor receptor-55 / S. Alsalameh, R. J. Amin, E. Kunisch [et al.] // *J. of Rheumatology*. – 2003. – Vol. 30, № 8. – P. 1680-1690.

27. Amirisetty, R. Interleukin 1 β (+3954, -511 and -31) polymorphism in chronic periodontitis patients from North India / R. Amirisetty, R. P. Patel, S. Das [et al.] // *Acta Odontologica Scandinavica*. – 2015. – Vol. 73, № 5. – P. 343-347.

28. Amitani, M. Control of food intake and muscle wasting in cachexia / M. Amitani, A. Asakawa, H. Amitani, A. Inui // *Intern. J. of Biochem. Cell Biology*. – 2013. – Vol. 45, № 10. – P. 2179-2185.

29. Ardestani, S. Membrane versus soluble isoforms of TNF- α exert opposing effects on tumor growth and survival of tumor-associated myeloid cells / S. Ardestani, B. Li, D. L. Deskins [et al.] // *Cancer Research*. – 2013. – Vol. 73, № 13. – P. 3938-3950.

30. Arend, W. P. 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 / W. P. Arend, M. Malyak, M. F. Smith (Jr.) [et al.] // *J. of Immunology*. – 1994. – Vol. 153, № 10. – P. 4766-4774.

31. Arend, W. P. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines / W. P. Arend, G. Palmer, C. Gabay // *Immunol. Rev.* – 2008. – Vol. 223. – P. 20-38.

32. Armstrong, L. Increased expression of functionally active membrane-associated tumor necrosis factor in acute respiratory distress syndrome / L. Armstrong, D. R. Thickett, S. J. Christie [et al.] // *Amer. J. of Respiratory Cell a. Molecular Biology*. – 2000. – Vol. 22, № 1. – P. 68-74.

33. Ashkenazi, A. Death receptors: signaling and modulation / A. Ashkenazi, V. M. Dixit // *Science*. – 1998. – Vol. 281, № 5381. – P. 1305-1308.

34. Baldwin, R. L. Structural changes of tumor necrosis factor alpha associated with membrane insertion and channel formation / R. L. Baldwin, M. L., M. L. Stolorowicz, L. Hood, B. J. Wisnieski // *Proc. of Nat. Acad. of Sciences of USA*. – 1996. – Vol. 93, № 3. – P. 1021-1026.

35. Barber, R. C. TLR4 and TNF- α polymorphisms are associated with an increased risk for severe sepsis following burn injury / R. C. Barber, C. C. Aragaki, F. A. Rivera-Chavez [et al.] // *J. of Med. Genetics*. – 2004. – Vol. 41, № 11. – P. 808-813.
36. Bax, M. Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? / M. Bax, J. van Heemst, T. W. Huizinga [et al.] // *Immunogenetics*. – 2011. – Vol. 63, № 8. – P. 459-466.
37. Bebes, A. Interleukin-1 receptors are differentially expressed in normal and psoriatic T cells / A. Bebes, F. Kovács-Sólyom, J. Prihoda [et al.] // *Mediators of Inflammation*. – 2014. – Vol. 2014, art. 472625. – P. 1-9.
38. Berry, M. TNF- α in asthma / M. Berry, C. Brightling, I. Pavord, A. J. Wardlaw [et al.] // *Current Opinion in Pharmacology*. – 2007. – Vol. 7, № 3. – P. 279-282.
39. Beuscher, H. U. The precursor of interleukin-1 alpha is phosphorylated at residue serine 90 / H. U. Beuscher, M. W. Nickells, H. R. Colten // *J. of Biol. Chemistry*. – 1988. – Vol. 263, № 8. – P. 4023-4028.
40. Beutler, B. TNF, apoptosis and autoimmunity: a common thread? / B. Beutler, F. Bazzoni // *Blood Cells, Molecules a. Diseases*. – 1998. – Vol. 24, № 2. – P. 216-230.
41. Beyaert, R. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not / R. Beyaert, W. Fiers // *FEBS Letters*. – 1994. – Vol. 340, № 1/2. – P. 9-16.
42. Black, R. A. Generation of biologically active interleukin-1 β by proteolytic cleavage of the inactive precursor / R. A. Black, S. R. Kronheim, M. Cantrell [et al.] // *J. of Biol. Chemistry*. – 1988. – Vol. 263, № 19. – P. 9437-9442.
43. Bläss, S. The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis. A new viewpoint of immunopathogenesis in rheumatoid arthritis and therapeutic consequences / S. Bläss, J. M. Engel, G. R. Burmester // *Ztschr. fur Rheumatologie*. – 2001. – Bd. 60, № 1. – S. 1-16.
44. Blüml, S. Antiinflammatory effects of tumor necrosis factor on hematopoietic cells in a murine model of erosive arthritis / S. Blüml, N. B. Binder, B. Niederreiter [et al.] // *Arthritis a. Rheumatology*. – 2010. – Vol. 62, № 6. – P. 1608-1619.

45. Blüml, S. Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis / S. Blüml, C. Scheinecker, J. S. Smolen [et al.] // *Intern. Immunology*. – 2012. – Vol. 24, № 5. – P. 275-281.
46. Booy, S. Influence of type-I Interferon receptor expression level on the response to type-I Interferons in human pancreatic cancer cells / S. Booy, C. H. Van Eijck, F. Dogan // *J. of Cellular a. Molecular Medicine*. – 2014. – Vol. 18, № 3. – P. 492-502.
47. Boraschi, D. The interleukin-1 receptor family / D. Boraschi, A. Tagliabue // *Vitamins a. Hormones*. – 2006. – Vol. 74. – P. 229-254.
48. Bossù, P. Transfected type II interleukin-1 receptor impairs responsiveness of human keratinocytes to interleukin-1 / P. Bossù, U. Visconti, P. Ruggiero [et al.] // *Amer. J. of Pathology*. – 1995. – Vol. 147, № 6. – P. 1852-1861.
49. Böyum, A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Introduction / A. Böyum // *Scand. J of Clinic. a. Lab. Investigation*. – 1968. – Vol. 97, suppl. 2. – P. 7.
50. Bradley, J. R. TNF-mediated inflammatory disease / J. R. Bradley // *J. of Pathology*. – 2008. – Vol. 214, № 2. – P. 149–160
51. Brikos, C. 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 / C. Brikos, R. Wait, S. Begum [et al.] // *Molecular a. Cellular Proteomics*. – 2007. – Vol. 6, № 9. – P. 1551-1559.
52. Brockhaus, M. Soluble TNF receptor: what is the significance? / M. Brockhaus // *Intensive Care Medicine*. – 1997. – Vol. 23, № 8. – P. 808-809.
53. Bugatti, S. B cells in rheumatoid arthritis: from pathogenic players to disease biomarkers / S. Bugatti, B. Vitolo, R. Caporali [et al.] // *Biomed. Research Intern*. – 2014. – Vol. 2014, art. 681678. – P. 1-14.
54. Butler, D. M. Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF α antibody with the interleukin-1 receptor antagonist / D. M. Butler, R. N. Maini, M. Feldmann, F. M. Brennan // *Europ. Cytokine Network*. – 1995. – Vol. 6, № 4. – P. 225-230.

55. Cabal-Hierro, L. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors / L. Cabal-Hierro, P. S. Lazo // *Cellular Signalling*. – 2012. – Vol. 24, № 6. – P. 1297-1305.
56. Camussi, G. The molecular action of tumor necrosis factor- α / G. Camussi, E. Albano, C. Tetta, F. Bussolin // *Europ. J. of Biochemistry*. – 1991. – Vol. 202, № 1. – P. 3-14.
57. Cañete, J. D. Clinical significance of high levels of soluble tumour necrosis factor- α receptor-2 produced by alternative splicing in rheumatoid arthritis: a longitudinal prospective cohort study / J. D. Cañete, C. Albaladejo, M. V. Hernández [et al.] // *Rheumatology*. – 2011. – Vol. 50, № 4. – P. 721-728.
58. Carlsson, A. C. Soluble tumor necrosis factor receptor 1 (sTNFR1) is associated with increased total mortality due to cancer and cardiovascular causes - Findings from two community based cohorts of elderly / A. C. Carlsson, C. C. Juhlin, T. E. Larsson [et al.] // *Atherosclerosis*. – 2014. – Vol. 237, № 1. – P. 236-242.
59. Carpentier, I. Function and regulation of tumor necrosis factor receptor type 2 / I. Carpentier, B. Coornaert, R. Beyaert // *Current Medicinal Chemistry*. – 2004. – Vol. 11, № 16. – P. 2205-2212.
60. Casadio, R. Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1 β /IL-1R(I) complex / R. Casadio, E. Frigimelica, P. Bossù [et al.] // *FEBS Letters*. – 2001. – Vol. 499, № 1/2. – P. 65-68.
61. Chan, F. K. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses / F. K. Chan, J. Shisler, J. G. Bixby [et al.] // *J. of Biol. Chemistry*. – 2003. – Vol. 278, № 51. – P. 51613-51621.
62. Chaparro, M. Infliximab salvage therapy after failure of ciclosporin in corticosteroid-refractory ulcerative colitis: a multicentre study / M. Chaparro, P. Burgueco, E. Iglesias [et al.] // *Alimentary Pharmacology a. Therapeutics*. – 2011. – Vol. 35, № 2. – P. 275-283.
63. Chen, G. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway / G. Chen, D. V. Goeddel // *Science*. – 2002. – Vol. 296, № 5573. – P. 1634-1635.

64. Chung, Y. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling / Y. Chung, S. H. Chang, G. J. Martinez [et al.] // *Immunity*. – 2009. – Vol. 30, № 4. – P. 576-587.
65. Colotta, F. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that regulated by IL-4 / F. Colotta, F. Re, M. Muzio [et al.] // *Science*. – 1993. – Vol. 261, № 5120. – P. 472-475.
66. Colotta, F. The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1 / F. Colotta, S. K. Dower, J. E. Sims [et al.] // *Immunology Today*. – 1994. – Vol. 15, № 12. – P. 562-566.
67. Conti, L. Role of the cytokine environment and cytokine receptor expression on the generation of functionally distinct dendritic cells from human monocytes / L. Conti, M. Cardone, B. Varano [et al.] // *Europ. J. of Immunology*. – 2008. – Vol. 38, № 3. – P. 750-762.
68. Cui, X. Shedding of the type II IL-1 decoy receptor requires a multifunctional aminopeptidase, aminopeptidase regulator of TNF receptor type 1 shedding / X. Cui, F. N. Rouhani, F. Hawari [et al.] // *J. of Immunology*. – 2003. – Vol. 171, № 12. – P. 6814-6819.
69. D'Hautcourt, J. L. Quantitative flow cytometric analysis of membrane antigen expression / J.-L. D'Hautcourt // *Current Protocols in Cytometry*. – 2002. – Suppl. 22. – P. 6.12.1-6.12.22
70. Davignon, J. L. Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis / J. L. Davignon, M. Hayder, M. Baron [et al.] // *Rheumatology*. – 2013. – Vol. 52, № 4. – P. 590-598.
71. Dayer, J. M. The process of identifying and understanding cytokines: from basic studies to treating rheumatic diseases / J. M. Dayer // *Best Practice a. Research: Clinic. Rheumatology*. – 2004. – Vol. 18, № 1. – P. 31–45.
72. Dekker, R. L. Depressive symptoms and inflammatory biomarkers in patients with heart failure / R. L. Dekker, D. K. Moser, E. G. Tovar [et al.] // *Europ. J. of Cardiovascular Nursing*. – 2014. – Vol. 13, № 5. – P. 444-450.

73. Dieudé, P. Rheumatic diseases: environment and genetics / P. Dieudé // *Jt. Bone Spine*. – 2009. – Vol. 76, № 6. – P. 602-607.
74. Dinarello CA. IL-1 receptor type I / C. A. Dinarello // *Cytokine reference*. – [S. l.], 2001. – Vol. 2. - P. 1587-1600
75. Dinarello, C. A. IL-1: discoveries, controversies and future directions / C. A. Dinarello // *Europ. J. of Immunology*. – 2010. – Vol. 40, № 3. – P. 599-606.
76. Dinarello, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family / C. A. Dinarello // *Annu. Rev. of Immunology*. – 2009. – Vol. 27. – P. 519-550.
77. Dinarello, C. A. The biological properties of interleukin-1 / C. A. Dinarello // *Europ. Cytokine Network*. – 1994. – Vol. 5, № 6. – P. 517-532.
78. Dinarello, C. A. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans / C. A. Dinarello, J. W. Van der Meer // *Seminars in Immunology*. – 2013. – Vol. 25, № 6. – P. 469-484.
79. Distler, O. Rheumatoid arthritis: new molecular and cellular aspects / O. Distler, U. Müller-Ladner, J. Schölerich // *Med. Klinik*. – 1999. – Bd. 94, № 12. – S. 673-680.
80. Dower, S. K. Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1 / S. K. Dower, S. R. Kronheim, C. J. March [et al.] // *J. of Experiment. Medicine*. – 1985. – Vol. 162, № 2. – P. 501-515.
81. Eck, M. J. The structure of tumor necrosis factor- α at 2.6 a resolution. Implications for receptor binding / M. J. Eck, S. R. Sprang // *J. of Biol. Chemistry*. – 1989. – Vol. 264, № 29. – P. 17595-17605.
82. Eisenberg, R. B-cell targeted therapies in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus / R. Eisenberg, D. Albert // *Nature Clinical Practice: Rheumatology*. – 2006. – Vol. 2, № 1. – P. 20-27.
83. Eissner, G. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system / G. Eissner, W. Kolch, P. Scheurich // *Cytokine Growth Factor Rev*. – 2004. – Vol. 15, № 5. – P. 353-366.

84. Eissner, G. Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages / G. Eissner, S. Kirchner, H. Lindner [et al.] // *J. of Immunology*. – 2000. – Vol. 164, № 12. – P. 6193-6198.

85. Engelmann, R. Bone resorption correlates with the frequency of CD5+ B cells in the blood of patients with rheumatoid arthritis / R. Engelmann, N. Wang, C. Kneitz, B. Müller-Hilke // *Rheumatology*. – 2015. – Vol. 54, № 3. – P. 545-553.

86. Faurschou, A. Role of tumor necrosis factor- α in the regulation of keratinocyte cell cycle and DNA repair after ultraviolet-B radiation / A. Faurschou // *Dan. Med. Bull.* – 2010. – Vol. 57, № 10. – P. B4179.

87. Fernández-Real, J. M. An alternatively spliced soluble TNF- α receptor is associated with metabolic disorders: a replication study / J. M. Fernández-Real, P. Botas-Cervero, B. Lainez [et al.] // *Clinic. Immunology*. – 2006. – Vol. 121, № 2. – P. 236-241.

88. Ferrandiz, C. Cost-efficacy of adalimumab, etanercept, infliximab and ustekinumab for moderate-to-severe plaque psoriasis / C. Ferrandiz, A. Garcia, A. J. Blasco, P. Lazaro // *J. of Europ. Acad. of Dermatology a. Venereology*. – 2012. – Vol. 26, № 6. – P. 768-777.

89. Fiers, W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level / W. Fiers // *FEBS Letters*. – 1991. – Vol. 285, № 2. – P. 199-212.

90. Folmer, F. From the deepest sea shelf to the uppermost kitchen cabinet shelf: the quest for novel TNF- α inhibitors / F. Folmer, M. Dicato, M. Diederich // *Current Topics in Med. Chemistry*. – 2012. – Vol. 12, № 13. – P. 1392-1407.

91. Fotin-Mleczek, M. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8 / M. Fotin-Mleczek, F. Henkler, D. Samel [et al.] // *J. Cell Science*. – 2002. – Vol. 115, pt. 13. – P. 2757-2770.

92. Franchi, L. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis / L. Franchi, T. Eigenbrod, R. Muñoz-Planillo, G. Nunez // *Nature Immunology*. – 2009. – Vol. 10, № 3. – P. 241-247.

93. Fritsch, J. Cell fate decisions regulated by k63 ubiquitination of tumor necrosis factor receptor 1 / J. Fritsch, M. Stephan, V. Tchikov [et al.] // *Molecular a. Cellular Biology*. – 2014. – Vol. 34, № 17. – P. 3214-3228.
94. Furst, D. E. Development of TNF inhibitor therapies for the treatment of rheumatoid arthritis / D. E. Furst // *Clinical. a. Experimental Immunology*. – 2010. – Vol. 28, № 3, suppl. 59. – P. S5-12.
95. Gabay, C. IL-1 pathways in inflammation and human diseases / C. Gabay, C. Lamacchia, G. Palmer // *Nature Rev. Rheumatology*. – 2010. – Vol. 6, № 4. – P. 232-241.
96. Garlanda, C. The interleukin-1 family: back to the future / C. Garlanda, C. A. Dinarello, A. Mantovani // *Immunity*. – 2013. – Vol. 39, № 6. – P. 1003-1018.
97. Giri, J. G. Elevated levels of shed type II IL-1 receptor in sepsis. Potential role for type II receptor in regulation of IL-1 responses / J. G. Giri, J. Wells, S. K. Dower [et al.] // *J. of Immunology*. – 1994. – Vol. 153, № 12. – P. 5802-5809.
98. Glossop, J. R. Polymorphism in the tumour necrosis factor receptor II gene is associated with circulating levels of soluble tumour necrosis factor receptors in rheumatoid arthritis / J. R. Glossop, P. T. Dawes, N. B Nixon, D. L. Matthey // *Arthritis Research a. Therapy*. – 2005. – Vol. 7, № 6. – P. R1227-R1234.
99. Golikova, E. A. Levels of TNF, TNF autoantibodies and soluble TNF receptors in patients with bronchial asthma / E. A. Golikova, J. A. Lopatnikova, T. V. Kovalevskaya-Kucheryavenko [et al.] // *J. of Asthma*. – 2013. – Vol. 50, № 7. – P. 705-711.
100. Gouldthorpe, O. Biologics in paediatric Crohn's disease / O. Gouldthorpe, A. G. Catto-Smith, G. Alex // *Gastroenterology Research a. Practice*. – 2011. – Vol. 2011, art. 287574. – P. 1-10.
101. Graves, B. J. Structure of interleukin 1 alpha at 2.7-A resolution / B. J. Graves, M. H. Hatada, W. A. Hendrickson [et al.] // *Biochemistry*. – 1990. – Vol. 29, № 11. – P. 2679-2684.

102. Greenfeder, S. A. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex / S. A. Greenfeder, P. Nunes, L. Kwee [et al.] // *J. of Biol. Chemistry.* – 1995. – Vol. 270, № 23. – P. 13757-13765.

103. Grell, M. Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF / M. Grell, G. Zimmermann, E. Gottfried [et al.] // *EMBO J.* – 1999. – Vol. 18, № 11. – P. 3034-3043.

104. Gudipaty, L. Regulation of P2X(7) nucleotide receptor function in human monocytes by extracellular ions and receptor density / L. Gudipaty, B. D. Humphreys, G. Buell, G. R. Dubyak // *Amer. J. of Physiology. Cell Physiology.* – 2001. – Vol. 280, № 4. – P. C943-C953.

105. Haas, E. Continuous autotropic signaling by membrane-expressed tumor necrosis factor / E. Haas, M. Grell, H. Wajant, P. Scheurich // *J. of Biol. Chemistry.* – 1999. – Vol. 274, № 25. – P. 18107-18112.

106. Haas, S. Disruption of rhythms of molecular clocks in primary synovial fibroblasts of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis, role of IL-1 β /TNF / S. Haas, R. H. Straub // *Arthritis Research a. Therapy.* – 2012. – Vol. 14, № 3. – P. R122.

107. Hehlhans, T. The TNF-TNF receptor system / T. Hehlhans, D. N. Männel // *Biol. Chemistry.* – 2002. – Vol. 383, № 10. – P. 1581-1585.

108. Hsu, H. C. Tumor necrosis factor ligand-receptor superfamily and arthritis / H. C. Hsu, Y. Wu, J. D. Mountz // *Current Directions in Autoimmunity.* – 2006. – Vol. 9. – P. 37-54.

109. Hu, X. Transmembrane TNF- α promotes suppressive activities of myeloid-derived suppressor cells via TNFR2 / X. Hu, B. Li, X. Li [et al.] // *J. of Immunology.* – 2014. – Vol. 192, № 3. – P. 1320-1331.

110. Idriss, H. T. TNF α and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s) / H. T. Idriss, J. H. Naismith // *Microscopy Research a. Technique.* – 2000. – Vol. 50, № 3. – P. 184-195.

111. Ikonomidis, I. Association of soluble apoptotic markers with impaired left ventricular deformation in patients with rheumatoid arthritis. Effects of inhibition of interleukin-1 activity by anakinra / I. Ikonomidis, S. Tzortzis, J. Lekakis [et al.] // *Thrombosis a. Haemostasis*. – 2011. – Vol. 106, № 5. – P. 959-967.
112. Jacques, C. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation / C. Jacques, M. Gosset, F. Berenbaum, C. Gabay // *Vitamins a. Hormones*. – 2006. – Vol. 74. – P. 371-403.
113. Jasper, G. A. Variables affecting the quantitation of CD22 in neoplastic B cells / G. A. Jasper, I. Arun, D. Venzon [et al.] // *Cytometry. Pt. B: Clinic. Cytometry*. – 2011. – Vol. 80, № 2. – P. 83-90.
114. Jesus, A. A. IL-1 blockade in autoinflammatory syndromes / A. A. Jesus, R. Goldbach-Mansky // *Annu. Rev. of Medicine*. – 2014. – Vol. 65. – P. 223-244.
115. Kagan, B. L. Formation of ion-permeable channels by tumor necrosis factor-alpha / B. L. Kagan, R. L. Baldwin, D. Munoz, B. J. Wisnieski // *Science*. – 1992. – Vol. 255, № 5050. – P. 1427-1430.
116. Kalthoff, H. 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 / H. Kalthoff, C. Roeder, M. Brockhaus [et al.] // *J. of Biol. Chemistry*. – 1993. – Vol. 268, № 4. – P. 2762-2766.
117. Kamangar, F. Interleukin-1B polymorphisms and gastric cancer risk: a meta-analysis / F. Kamangar, C. Cheng, C. C. Abnet, C. S. Rabkin // *Cancer Epidemiology, Biomarkers a. Prevention*. – 2006. – Vol. 15, № 10. – P. 1920-1928.
118. Kawagoe, T. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2 / T. Kawagoe, S. Sato, K. Matsushita [et al.] // *Nature Immunology*. – 2008. – Vol. 9, № 6. – P. 684-691.
119. Kieszko, R. Tumor necrosis factor receptors (TNFRs) on T lymphocytes and soluble TNFRs in different clinical courses of sarcoidosis / R. Kieszko, P. Krawczyk, S. Chocholska [et al.] // *Respiratory Medicine*. – 2007. – Vol. 101, № 3. – P. 645-654.

120. Kirchner, S. Effect of different tumor necrosis factor (TNF) reactive agents on reverse signaling of membrane integrated TNF in monocytes / S. Kirchner, E. Holler, S. Haffner [et al.] // *Cytokine*. – 2004. – Vol. 28, № 2. – P. 67-74.
121. Kirchner, S. Effect of different tumor necrosis factor (TNF) reactive agents on reverse signaling of membrane integrated TNF in monocytes / S. Kirchner, E. Holler, S. Haffner [et al.] // *Cytokine*. – 2004. – Vol. 28, № 2. – P. 67-74.
122. Kitaura, H. Immunological reaction in TNF- α -mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo / H. Kitaura, K. Kimura, M. Ishida [et al.] // *Clinic. a. Development. Immunology*. – 2013. – Vol. 2013, art. 181849. – P. 1-8.
123. Klimiuk, P. A. Circulating tumour necrosis factor alpha and soluble tumour necrosis factor receptors in patients with different patterns of rheumatoid synovitis / P. A. Klimiuk, S. Sierakowski, R. Latosiewicz [et al.] // *Annals of Rheumatic Diseases*. – 2003. – Vol. 62, № 5. – P. 472-475.
124. Kmieć, Z. Role of tumor necrosis factor family ligands in the pathogenesis of rheumatoid arthritis--new therapeutical opportunities / Z. Kmieć, I. Sokołowska // *Pol. Merkuriusz Lekarski*. – 2007. – T. 22, № 130. – S. 300-304.
125. Kohno, T. A second tumor necrosis factor receptor gene product can shed a naturally occurring tumor necrosis factor inhibitor / T. Kohno, M. T. Brewer, S. L. Baker [et al.] // *Proc. of Nat. Acad. of Sciences of USA*. – 1990. – Vol. 87, № 21. – P. 8331-8335.
126. Kokkonen, H. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis / H. Kokkonen, I. Söderström, J. Rocklöv [et al.] // *Arthritis a. Rheumatology*. – 2010. – Vol. 62, № 2. – P. 383-391.
127. Kollias, G. On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease / G. Kollias, E. Douni, G. Kassiotis, D. Kontoyiannis // *Immunol. Rev.* – 1999. – Vol. 169. – P. 175-194.

128. Kollias, G. TNF pathophysiology in murine models of chronic inflammation and autoimmunity / G. Kollias // *Seminars in Arthritis a. Rheumatism*. – 2005. – Vol. 34. – P. 3-6.
129. Kotas, M. E. Role of caspase-1 in regulation of triglyceride metabolism / M.E. Kotas, M. J. Jurczak, C. Annicelli [et al.] // *Proc. of Nat. Acad. of Sciences of USA*. – 2013. – Vol. 110, № 12. – P. 4810-4815.
130. Krueger, J. M. A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha / J. M. Krueger, J. Fang, P. Taishi [et al.] // *Annals of New York Acad. of Sciences*. – 1998. – № 856. – P. 148-159.
131. Lainez, B. Identification and characterization of a novel spliced variant that encodes human soluble tumor necrosis factor receptor 2 / B. Lainez, J. M. Fernandez-Real, X. Romero [et al.] // *Intern. Immunology*. – 2004. – Vol. 16, № 1. – P. 169-177.
132. Ledgerwood, E. C. Recent advances in the molecular basis of TNF signal transduction / E. C. Ledgerwood, J. S. Pober, J. R. Bradley // *Lab. Investigation*. – 1999. – Vol. 79, № 9. – P. 1041-1050.
133. Lee, E. G. Increased RANKL-mediated osteoclastogenesis by interleukin-1 β and endoplasmic reticulum stress / E. G. Lee, M. S. Sung, H. G. Yoo [et al.] // *Jt. Bone Spine*. – 2014. – Vol. 81, № 6. – P. 520-526.
134. Lee, J. M. Polymorphisms in interleukin-1B and its receptor antagonist genes and the risk of chronic obstructive pulmonary disease in a Korean population: a case-control study / J. M. Lee, Y. R. Kang, S. H. Park [et al.] // *Respiratory Medicine*. 2008. Vol. 102, № 9. P. 1311-1320.
135. Lejeune, F. J. Clinical applications of TNF-alpha in cancer / F. J. Lejeune, C. Ruegg, D. Lienard // *Current Opinion in Immunology*. – 1998. – Vol. 10. – P. 573-580.
136. Lin, C.H. Circulating apoptotic factors in patients with acute cerebral infarction / C. H. Lin, M. Chen, M. C. Sun // *Clinical Biochemistry*. – 2010. – Vol. 43, № 9. – P. 761-763.

137. Liu, S. Regulation of interleukin-1beta by the interleukin-1 receptor antagonist in the glutamate-injured spinal cord: endogenous neuroprotection / S. Liu, G. Y. Xu, K. M. Johnson [et al.] // *Brain Research*. – 2008. – № 1231. – P. 63-74.
138. Liu, Z. G. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond / Z.G. Liu // *Cell Research*. – 2005. – Vol. 15, № 1. – P. 24-27.
139. Locksley, R. M. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology / R. M. Locksley, N. Killeen, M. J. Lenardo // *Cell*. – 2001. – Vol. 104, № 4. – P. 487-501.
140. Lopatnikova, J. A. Quantitative flow cytometric analysis of expression of tumor necrosis factor receptor types I and II on mononuclear cells / J. A. Lopatnikova, F. F. Vasilyev, A. A. Alshevskaya, S. V. Sennikov // *J. of Receptors a. Signal Transduction Research*. – 2013. – Vol. 33, № 1. – P. 49-55.
141. Lotz, M. The nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family / M. Lotz, M. Setareh, J. Von Kempis, H. Schwarz // *J. of Leukocyte Biology*. – 1996. – Vol. 60, № 1. – P. 1-7.
142. Lubberts, E. Role of T lymphocytes in the development of rheumatoid arthritis. Implications for treatment / E. Lubberts // *Current Pharm. Design*. – 2015. – Vol. 21, № 2. – P. 142-146.
143. Lutz, M. B. Differential functions of IL-4 receptor types I and II for dendritic cell maturation and IL-12 production and their dependency on GM-CSF / M. B. Lutz, M. Schnare, M. Menges [et al.] // *J. of Immunology*. – 2002. – Vol. 169, № 7. – P. 3574-3580.
144. Maass, D. L. IL-1beta and IL-6 act synergistically with TNF-alpha to alter cardiac contractile function after burn trauma / D. L. Maass, J. White, J. W. Horton // *Shock*. – 2002. – Vol. 18, № 4. – P. 360-366.
145. MacEwan, D. J. TNF ligands and receptors - a matter of life and death / D. J. MacEwan // *Brit. J. of Pharmacology*. – 2002. – Vol. 135, № 4. – P. 855-875.
146. Maier, B. Delayed elevation of soluble tumor necrosis factor receptors p75 and p55 in cerebrospinal fluid and plasma after traumatic brain injury / B. Maier, M. Lehnert, H. L. Laurer [et al.] // *Shock*. – 2006. – Vol. 26, № 2. – P. 122-127.

147. Malinowsky, D. Interleukin-1 receptor accessory protein interacts with the type II interleukin-1 receptor / D. Malinowsky, J. Lundkvist, S. Layé, T. Bartfai // *FEBS Letters*. – 1998. – Vol. 429, № 3. – P. 299-302.
148. Malysheva, O. Stress and rheumatoid arthritis / O. Malysheva, M. Pierer, U. Wagner, C. G. Baerwald // *Ztschr. fur Rheumatologie*. – 2010. – Bd. 69, № 6. – S. 539-543.
149. Mantovani, A. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines / A. Mantovani, M. Locati, A. Vecchi [et al.] // *Trends in Immunology*. – 2001. – Vol. 22, № 6. – P. 328-336.
150. Marasini, B. Metastatic melanoma in a young woman treated with TNF-alpha inhibitor for psoriatic arthritis: a case report / B. Marasini, L. Cozzaglio, L. Belloli [et al.] // *Current Drug Safety*. – 2011. – Vol. 6, № 4. – P. 275-276.
151. Marra, L. E. IL-10 induces regulatory T cell apoptosis by up-regulation of the membrane form of TNF-alpha / L. E. Marra, Z. X. Zhang, B. Joe [et al.] // *J. of Immunology*. – 2004. – Vol. 172, № 2. – P. 1028-1035.
152. Marston, B. B cells in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis / B. Marston, A. Palanichamy, J. H. Anolik // *Current Opinion in Rheumatology*. – 2010. – Vol. 22, № 3. – P. 307-315.
153. Martel-Pelletier, J. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function / J. Martel-Pelletier, R. McCollum, J. DiBattista [et al.] // *Arthritis a. Rheumatology*. – 1992. – Vol. 35, № 5. – P. 530-540.
154. Marzano, A. V. Expression of cytokines, chemokines and other effector molecules in two prototypic autoinflammatory skin diseases, pyoderma gangrenosum and Sweet's syndrome / A. V. Marzano, D. Fanoni, E. Antiga [et al.] // *Clinical. a. Experimental Immunology*. – 2014. – Vol. 178, № 1. – P. 48-56.
155. Matsuyama, Y. Sustained elevation of interleukin-33 in sera and synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis non-responsive to anti-tumor necrosis factor: possible association with persistent IL-1 β signaling and a poor clinical response /

Y. Matsuyama, H. Okazaki, M. Hoshino [et al.] // *Rheumatology Intern.* – 2012. – Vol. 32, № 5. – P. 1397-1401.

156. Mercer, F. Expression and function of TNF and IL-1 receptors on human regulatory T cells / F. Mercer, L. Kozhaya, D. Unutmaz // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5, № 1. – P. e8639.

157. Meyer, O. Role of anti-TNF therapy in rheumatoid arthritis / O. Meyer // *La Presse Med.* – 2000. – Vol. 29, № 9. – P. 463-468.

158. Micheau, O. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes / O. Micheau, J. Tschopp // *Cell.* – 2003. – Vol. 114, № 2. – P. 181-190.

159. Milman, N. Effect of the TNF α inhibitor adalimumab in patients with recalcitrant sarcoidosis: a prospective observational study using FDG-PET / N. Milman, N. Graudal, A. Loft [et al.] // *Clinical Respiratory J.* – 2011. – Vol. 6, № 4. – P. 238-247.

160. Moh, M. C. Tumor necrosis factor receptor 1 associates with CD137 ligand and mediates its reverse signaling / M. C. Moh, P. A. Lorezini, C. Gullo, H. Schwarz // *FASEB J.* – 2013. – Vol. 27, № 8. – P. 2957-2966.

161. Mohler, K. M. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists / K. M. Mohler, D. S. Torrance, C. A. Smith [et al.] // *J. of Immunology.* – 1993. – Vol. 151, № 3. – P. 1548-1561.

162. Moraga, I. Receptor density is key to the alpha2/beta interferon differential activities / I. Moraga, D. Harari, G. Schreiber [et al.] // *Molecular a. Cellular Biology.* – 2009. – Vol. 29, № 17. – P. 4778-4787.

163. Mukai, Y. Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex / Y. Mukai, T. Nakamura, M. Yoshikawa [et al.] // *Science Signaling.* – 2010. Vol. 3, № 148. – P. RA83.

164. Müller, M. IL-1R1 is expressed on both Helios(+) and Helios(-) FoxP3(+) CD4(+) T cells in the rheumatic joint / M. Müller, J. Herrath, V. Malmström // *Clinical. a. Experimental Immunology.* – 2015. – Vol. 182, №1. – P. 90-100.

165. Nagao, M. The impact of interferon gamma receptor expression on the mechanism of escape from host immune surveillance in hepatocellular carcinoma / M. Nagao, Y. Nakajima, H. Kanehiro [et al.] // *Hepatology*. – 2000. – Vol. 32, № 3. – P. 491-500.
166. Nakae, S. IL-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response / S. Nakae, Y. Komiyama, H. Yokoyama [et al.] // *Intern. Immunology*. – 2003. – Vol. 15, № 4. – P. 483-490.
167. Nakae, S. Interleukin-1 β , but not interleukin-1 α , is required for T-cell-dependent antibody production / S. Nakae, M. Asano, R. Horai, Y. Iwakura // *Immunology*. – 2001. – Vol. 104, № 4. – P. 402-409.
168. Nambu, A. IL-1 and allergy / A. Nambu, S. Nakae // *Allergology Intern.* – 2010. – Vol. 59, № 2. – P. 125-135.
169. Nanki, T. Molecular mechanisms of bone destruction in rheumatoid arthritis / T. Nanki // *Clinical Calcium*. – 2007. – Vol. 17, № 4. – P. 510-516.
170. Narvaez J. Biological agents in the management of felty's syndrome: a systematic review / J. Narvaez, E. Domingo-Domenech, C. Gymez-Vaquero [et al.] // *Seminars in Arthritis a. Rheumism*. – 2012. – Vol. 41, № 5. – P. 658-668.
171. Neumann, D. The membrane form of the type II IL-1 receptor accounts for inhibitory function / D. Neumann, C. Kollwe, M. U. Martin, D. Boraschi // *J. of Immunology*. – 2000. – Vol. 165, № 6. – P. 3350-3357.
172. Nie, H. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- α in rheumatoid arthritis / H. Nie, Y. Zheng, R. Li [et al.] // *Nature Medicine*. – 2013. – Vol. 19, № 3. – P. 322-328.
173. Ninomiya-Tsuji, J. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway / J. Ninomiya-Tsuji, K. Kishimoto, A. Hiyama [et al.] // *Nature*. – 1999. – Vol. 398, № 6724. – P. 252-256.
174. Niu, X. Regulatory immune responses induced by IL-1 receptor antagonist in rheumatoid arthritis / X. Niu, D. He, S. Deng [et al.] // *Molecular immunology*. – 2011. – Vol. 49, № 1-2. – P. 290-296.

175. Nophar, Y. 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 / Y. Nophar, O. Kemper, C. Brakebusch [et al.] // *EMBO J.* – 1990. – Vol. 9, № 10. – P. 3269-3278.

176. Okamoto, Y. 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 / Y. Okamoto, M. Tanaka, N. Miyahara [et al.] // *J. of Clin. Lab. Analysis.* – 2009. – Vol. 23, № 3. – P. 175-178.

177. O'Neill, L. A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress / L. A. O'Neill // *Immunol. Rev.* – 2008. – Vol. 226. – P. 10-18.

178. Oppenheim, J. J. There is more than one interleukin 1 / J. J. Oppenheim, E. J. Kovacs, K. Matsushima, S. K. Durum // *Immunology Today.* – 1986. – Vol. 7, № 2. – P. 45-56.

179. Orlova, D. Y. Distribution function approach to the study of the kinetics of IgM antibody binding to Fc γ RIIIb (CD16b) receptors on neutrophils by flow cytometry / D. Y. Orlova, V. I. Borisov, V. S. Kozhevnikov [et al.] // *J. of Theoretical Biology.* – 2011. – Vol. 290. – P. 1-6.

180. Ounissi-Benkhalha, H. In vitro effects of 2 antirheumatic drugs on the synthesis and expression of proinflammatory cytokines in synovial membranes from patients with rheumatoid arthritis / H. Ounissi-Benkhalha, J. P. Pelletier, G. Tardif [et al.] // *J. of Rheumatol.* – 1996. – Vol. 23, № 1. – P. 16-23.

181. Pannu, K. K. Performance evaluation of QuantiBRITE phycoerythrin beads / K. K. Pannu, E. T. Joe, S. B. Iyer // *Cytometry.* – 2001. – Vol. 45, № 4. – P. 250-258.

182. Peters, VA. IL-1 receptor 2 (IL-1R2) and its role in immune regulation / V. A. Peters, J. J. Joesting, G. G. Freund // *Brain, Behavior, a. Immunity.* – 2013. – Vol. 32. – P. 1-8.

183. Pobeziinskaya, Y. L. The function of TRADD in signaling through tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors / Y. L. Pobeziinskaya, Y. S. Kim, S. Choksi [et al.] // *Nature Immunology.* – 2008. – Vol. 9, № 9. – P. 1047-1054.

184. Radons, J. 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. Radons, S. Dove, D. Neumann [et al.] // *J. of Biol. Chemistry.* – 2003. – Vol. 278, № 49. – P. 49145-49153.
185. Re, F. Inhibition of interleukin-1 responsiveness by type II receptor gene transfer: a surface "receptor" with anti-interleukin-1 function / F. Re, M. Sironi, M. Muzio [et al.] // *J. of Experimental Medicine.* – 1996. – Vol. 183, № 4. – P. 1841-1850.
186. Redl, H. Tumor necrosis factor (TNF)-dependent shedding of the p55 TNF receptor in a baboon model of bacteremia / H. Redl, G. Schlag, G. R. Adolf [et al.] // *Infection a. Immunity.* – 1995. – Vol. 63, № 1. – P. 297-300.
187. Reynes, J. CD4+ T cell surface CCR5 density as a determining factor of virus load in persons infected with human immunodeficiency virus type 1 / J. Reynes, P. Portales, M. Segondy [et al.] // *J. of Infectious Diseases.* – 2000. – Vol. 181, № 3. – P. 927-933.
188. Rho, Y. H. Inflammatory mediators and premature coronary atherosclerosis in rheumatoid arthritis / Y. H. Rho, C. P. Chung, A. Oeser [et al.] // *Arthritis a. Rheumism.* – 2009. – Vol. 61, № 11. – P. 1580-1585.
189. Robak, T. The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis / T. Robak, A. Gladalska, H. Stepiec // *Europ. Cytokine Network.* – 1998. – Vol. 9, № 2. – P. 145-154.
190. Romas, E. Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis / E. Romas, M. T. Gillespie, T. J. Martin // *Bone.* – 2002. – Vol. 30, № 2. – P. 340-346.
191. Rordorf, R. Tumor necrosis factor- α predicts response to cardiac resynchronization therapy in patients with chronic heart failure / R. Rordorf, S. Savastano, A. Sanzo [et al.] // *Circulation J.* – 2014. – Vol. 78, № 9. – P. 2232-2239.
192. Rosenblum, M. G. Tumor necrosis factor alpha: a multifaceted peptide hormone / M. G. Rosenblum, N. J. Donato // *Critical Rev. in Immunology.* – 1989. – Vol. 9, № 1. – P. 21-44.

193. Rossi, D. Rheumatoid arthritis: Biological therapy other than anti-TNF / D. Rossi, V. Modena, S. Sciascia [et al.] // *Int Immunopharmacol.* – 2015. – Vol. 27, № 2. – P. 185-188.
194. Rossmann, E. D. Performance of calibration standarts for antigen quantitation with flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia / E. D. Rossmann, R. Lenkei, J. Lundin [et al.] // *Cytometry. Pt. B: Clinic. Cytometry.* – 2007. – Vol. 72, № 6. – P. 450-457.
195. Rossol, M. Interaction between transmembrane TNF and TNFR1/2 mediates the activation of monocytes by contact with T cells / M. Rossol, U. Meusch, M. Pierer [et al.] // *J. of Immunology.* – 2007. – Vol. 179, № 6. – P. 4239-4248.
196. Roux, S. Bone loss. Factors that regulate osteoclast differentiation: an update / S. Roux, P. Orcel // *Arthritis Research.* – 2000. – Vol. 2, № 6. – P. 451-456.
197. Rubartelli, A. Autoinflammatory diseases / A. Rubartelli // *Immunol. Letters.* – 2014. – Vol. 161, № 2. – P. 226-230.
198. Sadouk, M. B. Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA. The increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor / M. B. Sadouk, J. P. Pelletier, G. Tardif [et al.] // *Lab. Investigation.* – 1995. – Vol. 73, № 3. – P. 347-355.
199. Saklatvala, J. Tumor necrosis factor α stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage / J. Saklatvala // *Nature.* – 1986. – Vol. 322, № 6079. – P. 547-549.
200. Schizas, N. Interleukin-1 receptor antagonist promotes survival of ventral horn neurons and suppresses microglial activation in mouse spinal cord slice cultures / N. Schizas, B. Andersson, J. Hilborn, N. P. Hailer // *J. of Neuroscience Research.* – 2014. – Vol. 92, № 11. – P. 1457-1465.
201. Sennikov, S. V. Polymorphisms in the tumor necrosis factor receptor genes affect the expression levels of membrane-bound type I and type II receptors / S. V. Sennikov, F. F. Vasilyev, J. A. Lopatnikova [et al.] // *Mediators of Inflammation.* – 2014. – Vol. 2014, art. 745909. – P. 1-11.

202. Shirazi, R. Glucagon-like peptide 1 receptor induced suppression of food intake, and body weight is mediated by central IL-1 and IL-6 / R. Shirazi, V. Palsdottir, J. Collander [et al.] // Proc. of Nat. Acad. of Sciences of USA. –2013. – Vol. 110, № 40. – P. 16199-16204.

203. Shurety, W. Endocytosis of uncleaved tumor necrosis factor-alpha in macrophages / W. Shurety, J. K. Pagan, J. B. Prins, J. L. Stow // Lab. Investigation. – 2001. – Vol. 81, № 1. – P. 107-117.

204. Sieper, J. Early response to adalimumab predicts long-term remission through 5 years of treatment in patients with ankylosing spondylitis / J. Sieper, D. Van der Heijde, M. Dougados [et al.] // Annals of Rheumatic Diseases. – 2012. – Vol. 71, № 5. – P. 700-706.

205. Sims, J. E. The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions / J. E. Sims, J. G. Giri, S. K. Dower // Clinic. Immunology a. Immunopathology. – 1994. – Vol. 72, № 1. – P. 9-14.

206. Sivera, F. Interleukin-1 inhibitors for acute gout / F. Sivera, M. D. Wechalekar, M. Andrés [et al.] // Cochrane Libr. – 2014. – Iss. 9, CD009993. – P. 1-49.

207. Smith, C. A. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins / C. A. Smith, T. Davis, D. Anderson [et al.] // Science. – 1990. – Vol. 248, № 4958. – P. 1019-1023.

208. Smith, C. A. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death / C. A. Smith, T. Farrah, R. G. Goodwin // Cell. – 1994. – Vol. 76, № 6. – P. 959-962.

209. Smith, R. A. The active form of tumor necrosis factor is a trimer / R. A. Smith, C. Baglioni // J. of Biol. Chemistry. – 1987. – Vol. 262, № 15. – P. 6951-6954.

210. Smolen, J. S. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice / J. S. Smolen, F. C. Breedveld, M. H. Schiff [et al.] // Rheumatology (Oxford). – 2003. – Vol. 42, № 2. – P. 244-257.

211. Song, Y. W. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies / Y. W. Song, E. H. Kang // *QJM: Intern. J. of Medicine*. – 2010. – Vol. 103, № 3. – P. 139-146.
212. Steller, H. Mechanisms and genes of cellular suicide / H. Steller // *Science*. – 1995. – Vol. 267, № 5203. – P. 1445-1449.
213. Strand, V. Health-related quality of life outcomes of adalimumab for patients with early rheumatoid arthritis: results from a randomized multicenter study / V. Strand, A. M. Rentz, M. A. Cifaldi [et al.] // *J. of Rheumatology*. – 2011. – Vol. 39, № 1. – P. 63-72.
214. Stylianou, E. Interleukin 1 induces NF-kappa B through its type I but not its type II receptor in lymphocytes / E. Stylianou, L. A. O'Neill, L. Rawlinson [et al.] // *J. of Biol. Chemistry*. – 1992. – Vol. 267, № 22. – P. 15836-15841.
215. Sutterwala, F. S. Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome / F. S. Sutterwala, L. A. Mijares, L. Li [et al.] // *J. of Experimental Medicine*. – 2007. – Vol. 204, № 13. – P. 3235-3245.
216. Sutton, C. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis / C. Sutton, C. Brereton, B. Keogh [et al.] // *J. of Experiment. Medicine*. – 2006. – Vol. 203, № 7. – P. 1685-1691.
217. Swellam, M. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and hepcidin in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity / M. Swellam, K. M. Gabal, S. S. Youssef // *IUBMB Life*. – 2013. – Vol. 65, № 10. – P. 883-888.
218. Symons, J. A. 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 / J. A. Symons, P. R. Young, G. W. Duff // *Proc. of Nat. Acad. of Sciences of USA*. – 1995. – Vol. 92, № 5. – P. 1714-1718.
219. Tang, P. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer / P. Tang, M. C. Hung, J. Klostergaard // *Biochemistry*. – 1996. – Vol. 35, № 25. – P. 8216-8225.

220. Tarrats, N. Critical role of tumor necrosis factor receptor 1, but not 2, in hepatic stellate cell proliferation, extracellular matrix remodeling, and liver fibrogenesis / N. Tarrats, A. Moles, A. Morales [et al.] // *Hepatology*. – 2011. – Vol. 54, № 1. – P. 319-327.

221. Tartaglia, L. A. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death / L. A. Tartaglia, T. M. Ayres, G. H. Wong, D. V. Goeddel // *Cell*. – 1993. – Vol. 74, № 5. – P. 845-853.

222. Thomas, R. Dendritic cells and the promise of antigen-specific therapy in rheumatoid arthritis / R. Thomas // *Arthritis Research a. Therapy*. – 2013. – Vol. 15, № 1, art. 204. – P. 1-10.

223. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics / ed.: C. Burtis, E. Ashwood, D. Bruns. – 4th ed. – St. Louis : Elsevir, 2006. – 2237 p.

224. Torres T. Treatment of recalcitrant generalized granuloma annulare with adalimumab / T. Torres, T. Pinto Almeida, R. Alves // *J. of. Drugs in Dermatology*. – 2011. – Vol. 10, № 12. – P. 1466-1468.

225. Tracey K. J., Czura C., Ivanova S. Mind over immunity / K. J. Tracey, C. Czura, S. Ivanova // *FASEB J*. – 2001. – Vol. 15, № 9. – P. 1575-1576.

226. Tsujimoto, M. Tumor necrosis factor-induced downregulation of its receptors in HeLa cells / M. Tsujimoto, J. Vilcek // *J. of Biochemistry*. – 1987. – Vol. 102, № 6. – P. 1571-1577.

227. Uchikawa, S. ADAM17 regulates IL-1 signaling by selectively releasing IL-1 receptor type 2 from the cell surface / S. Uchikawa, M. Yoda, T. Tohmonda [et al.] // *Cytokine*. – 2015. – Vol. 71, № 2. – P. 238-245.

228. Umar, S. Thymoquinone inhibits TNF- α -induced inflammation and cell adhesion in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by ASK1 regulation / S. Umar, O. Hedaya, A. K. Singh [et al.] // *Toxicology a. Applied Pharmacology*. – 2015. – Vol. 287, № 3. – P. 299-305.

229. Vambutas, A. Alternate splicing of interleukin-1 receptor type II (IL1R2) in vitro correlates with clinical glucocorticoid responsiveness in patients with AIED / A.

Vambutas, J. DeVoti, E. Goldofsky [et al.] // PLoS One. – 2009. – Vol. 4, № 4. – P. e5293.

230. Van Deuren, M. 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 / M. Van Deuren, J. Van der Ven-Jongekrijg, E. Vannier [et al.] // Blood. – 1997. – Vol. 90, № 3. – P. 1101-1118.

231. Van Schouwenburg, P. A. Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis / P. A. Van Schouwenburg, T. Rispens, G. J. Wolbink // Nature Rev. Rheumatology. – 2013. – Vol. 9, № 3. – P. 164-172.

232. Vasilyev, F. F. Optimized flow cytometry protocol for analysis of surface expression of interleukin-1 receptor types I and II / F. F. Vasilyev, J. A. Lopatnikova, S. V. Sennikov // Cytotechnology. – 2013. – Vol. 65, № 5. – P. 795-802.

233. Vennegaard, M. T. Epicutaneous exposure to nickel induces nickel allergy in mice via a MyD88-dependent and interleukin-1-dependent pathway / M. T. Vennegaard, B. Dyring-Andersen, L. Skov [et al.] // Contact Dermatitis. – 2014. – Vol. 71, № 4. – P. 224-232.

234. Vilcek, J. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions / J. Vilcek, T. H. Lee // J. of Biol. Chemistry. – 1991. – Vol. 266, № 12. – P. 7313-7316.

235. Waage, A. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease / A. Waage, A. Halstensen, T. Espevik // Lancet. – 1987. – V. 329, № 8529. – P. 355-357.

236. Wajant, H. Tumor necrosis factor signaling / H. Wajant, K. Pfizenmaier, P. Scheurich // Cell Death Differ. – 2003. – Vol. 10, № 1. – P. 45-65.

237. Wajant, H. TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B pathway / H. Wajant, P. Scheurich // FEBS J. – 2011. – Vol. 278, № 6. – P. 862-876.

238. Wang, D. The use of biologic therapies in the treatment of rheumatoid arthritis / D. Wang, Y. Li, Y. Liu, G. Shi // Current Pharm. Biotechnology. – 2014. – Vol. 15, № 6. – P. 542-548.

239. Wang, J. Histamine antagonizes tumor necrosis factor (TNF) signalling by stimulating TNF receptor shedding from the cell surface and Golgi storage pool / J. Wang, R. S. Al-Lamki, H. Zhang [et al.] // *J. of Biol. Chemistry.* – 2003. – Vol. 278, № 24. – P. 21751-21760.
240. Wang, L. Variables in the quantification of CD4 in normals and hairy cell leukemia patients / L. Wang, F. Abbasi, G. A. Jasper [et al.] // *Cytometry. Pt. B: Clinic. Cytometry.* – 2011. – Vol. 80, № 1. – P. 51-56.
241. Watts, A. D. A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signaling' / A. D. Watts, N. H. Hunt, Y. Wanigasekara [et al.] // *EMBO J.* – 1999. – Vol. 18, № 8. – P. 2119-2126.
242. Weitzmann, M. N. T-cells and B-cells in osteoporosis / M. N. Weitzmann // *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes a. Obesity.* – 2014. – Vol. 21, № 6. – P. 461-467.
243. Winzen, R. Selective up-regulation of the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor and its mRNA by TNF and IL-1 / R. Winzen, D. Wallach, O. Kemper [et al.] // *J. of Immunology.* – 1993. – Vol. 150, № 10. – P. 4346-4353.
244. Wride, M. A. Potential roles for tumour necrosis factor alpha during embryonic development / M. A. Wride, E. J. Sanders // *Anatomy a. Embryology.* – 1995. – Vol. 191, № 1. – P. 1-10.
245. Xanthoulea, S. Tumor necrosis factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infectious and inflammatory diseases / S. Xanthoulea, M. Pasparakis, S. Kousteni [et al.] // *J. of Experimental Medicine.* – 2004. – Vol. 200, № 3. – P. 367-376.
246. Xin, L. Dual regulation of soluble tumor necrosis factor-alpha induced activation of human monocytic cells via modulating transmembrane TNF-alpha-mediated 'reverse signaling' / L. Xin, J. Wang, H. Zhang [et al.] // *Intern. J. of Molecular Medicine.* – 2006. – Vol. 18, № 5. – P. 885-892.

247. Xue, H. Interleukin-1B and interleukin-1 RN polymorphisms and gastric carcinoma risk: a meta-analysis / H. Xue, B. Lin, P. Ni [et al.] // J. of Gastroenterology a. Hepatology. – 2010. – Vol. 25, № 10. – P. 1604-1617.

248. Yeh, W. C. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis / W. C. Yeh, J. L. Pompa, M. E. McCurrach [et al.] // Science. – 1998. – Vol. 279, № 5358. – P. 1954-1958.

249. Young, J. J. A review of the relationship between proinflammatory cytokines and major depressive disorder / J. J. Young, D. Bruno, N. Pomara // J. of Affective Disorders. – 2014. – Vol. 169. – P. 15-20.

250. Zhang, H. Transmembrane TNF-alpha mediates "forward" and "reverse" signaling, inducing cell death or survival via the NF-kappaB pathway in Raji Burkitt lymphoma cells / H. Zhang, D. Yan, X. Shi [et al.] // J. of Leukocyte Biology. – 2008. – Vol. 84, № 3. – P. 789-797.

251. Zhao, Y. Judicious use of biologicals in juvenile idiopathic arthritis / Y. Zhao, C. Wallace // Current Rheumatology Rep. – 2014. – Vol. 16, № 11. – P. 454.