

На правах рукописи

Васильев Филипп Филиппович

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

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск 2015 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Сергей Витальевич Сенников**

Официальные оппоненты:

Гуляева Людмила Федоровна, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики»

Воронина Елена Николаевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории фармакогеномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, г. Москва

Защита состоится «15» октября 2015 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 в ФГБНУ «НИИ фундаментальной и клинической иммунологии» по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» и на сайте организации <http://www.niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат медицинских наук

Белгородцев Сергей Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

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

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

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

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

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

Генетический полиморфизм имеет большое значение в формировании полиморфной структуры системы цитокинов и их рецепторов, и вносит значимый

вклад в индивидуальные особенности иммунного ответа [Сенников с соавт. 2002]. SNP (single nucleotide polymorphism) – это однонуклеотидные вариации в геномной ДНК с частотой редкого аллеля не менее 1% [Fareed and Afzal 2013]. Однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в промоторных областях генов могут оказывать влияние на скорость транскрипции генов, структуру сайтов связывания транскрипционных факторов, контролирующих активность промотора, стабильность и уровень мРНК [Shastri 2009; Fareed and Afzal 2013], и тем самым обуславливать разницу в уровне продукции белка. Полиморфизм генов цитокинов находится в фокусе интенсивных исследований в течение последних 15 лет. При этом были установлены ассоциации полиморфизмов с предрасположенностью к заболеваниям, характеру течения заболевания, его исходом и подбором терапии [Khripko et al. 2008; Коненков с соавт. 2012; Силков с соавт. 2012; Шкаруба с соавт. 2012; Коненков с соавт. 2013]. Наличие взаимосвязи отдельных аллельных вариантов с уровнем продукции соответствующего цитокина может оказывать влияние на характер и тяжесть течения заболеваний.

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

Цель работы:

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

Задачи исследования:

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

Научная новизна работы. Впервые исследовано число мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1 на субпопуляциях мононуклеарных клеток (МНК) условно здоровых индивидов. Установлены количественные различия в уровне экспрессии

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

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

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

Оптимизирован протокол пробоподготовки для оценки уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α I и II типов методом проточной цитофлуориметрии с помощью калибровочных частиц BD QuantiBRITE PE. Оптимизирован протокол оценки уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов IL1 I и II типов методом проточной цитофлуориметрии с помощью калибровочных частиц BD QuantiBRITE PE. Оптимизированные протоколы пробоподготовки дают возможность получать точные, воспроизводимые данные по уровню экспрессии рецепторов TNF α и IL1. Полученные нормативные значения уровня экспрессии рецепторов и относительного числа клеток, экспрессирующих мембраносвязанные формы рецепторов TNF α и IL1 в субпопуляциях иммунокомпетентных клеток условно здоровых индивидов позволят произвести оценку изменений этих показателей при различных иммунопатологических состояниях.

Основные положения, выносимые на защиту:

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

Апробация материалов диссертации. Материалы диссертации доложены и обсуждены на: 1) Семинарах экспериментального отдела ФГБНУ «НИИФКИ» (г. Новосибирск, 2012, 2013 гг.); 2) Семинарах лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «НИИФКИ» (г. Новосибирск, 2012, 2013 гг.); 3) VIII отчетной конференции ФГБНУ «НИИФКИ» «Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике» (г. Новосибирск, 21-23 июня 2011 года); 4) Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири» (г. Иркутск, 2-3 июля 2012 года); 5) Форуме «Объединенный иммунологический форум – 2013» (г. Нижний Новгород, 30 июня – 5 июля 2013 года); 6) Всероссийской научно-практической конференции «ЭРЭЛ – 2013» (г. Якутск, 3-6 декабря 2013 года); 7) IV Конгрессе с международным участием «Экология и здоровье человека на Севере» (г. Якутск, 4-7 декабря 2013 года); 8) Молодежной научной конференции с международным участием «Генетика и здоровье: актуальные вопросы и современные технологии» (г. Якутск, 11 июня 2014 года); 9) V Конгрессе с международным участием «Экология и здоровье человека на Севере» (г. Якутск, 24-29 ноября 2014 года).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, в том числе 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертационных работ.

Личный вклад автора в проведение исследования. Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором на базе лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «НИИФКИ».

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 147 страницах машинописного текста, состоит из обзора литературы, описание материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов. Библиографический указатель включает 373 источника, из них 364 зарубежных. Работа иллюстрирована 18 рисунками и 8 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови человека. МНК периферической крови условно здоровых индивидов были выделены

стандартным методом на градиенте плотности фиколла («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция) – урографина («Schering AG», Германия) (1,077 г/см³) [Böyum 1968].

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

Определение уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNFα и IL1 на субпопуляциях мононуклеарных клеток. Определение процентного содержания клеток, экспрессирующих мембраносвязанные рецепторы I и II типов для TNFα и IL1, проводилось методом проточной цитофлуориметрии. При проведении метода были использованы антитела, меченные фикоэритрином (PE), фирмы «R&D systems» (США): anti-human TNFR1 PE, anti-human TNFR2 PE, anti-human IL1R1 и anti-human IL1R2 PE. Для иммунофенотипирования субпопуляций МНК использовались антитела фирмы «eBioscience» (США): anti-CD3 APC, anti-CD14 FITC и anti-CD19 PE-Cy7. Для создания калибровочной кривой и перевода значений интенсивности флуоресценции клеток, экспрессирующих соответствующий маркер, в абсолютные показатели количества рецепторов, использовался набор BD QuantiBRITE PE («BD Biosciences», США), содержащий 4 фракции лиофилизированных бус, каждая из которых несет различный уровень PE.

Определение уровня цитокинов TNFα, IL1β и растворимых рецепторов к TNFα и IL1. Определение сывороточного уровня цитокинов TNFα, IL1β и растворимых рецепторов I и II типов для TNFα и IL1 проводили методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих диагностических наборов фирм ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) и «RayBiotech» (США).

Выделение ДНК. Геномную ДНК выделяли из МНК периферической крови условно здоровых индивидов методом фенол-хлороформной экстракции [Maniatis 1982].

Генотипирование рецепторов I и II типов для TNFα и IL1. Генотипирование полиморфных вариантов промоторных участков генов *TNFRSF1A*, *TNFRSF1B*, *IL1R1* и *IL1R2* проводили методом полимеразной цепной реакции с последующей рестрикцией продукта амплификации.

Методы статистической обработки. Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 7.0 («StatSoft», США). Полученные данные были подвергнуты проверке на нормальность распределения (критерий Колмогорова-Смирнова), которая показала, что распределение большинства показателей является ненормальным. Корреляции между исследуемыми параметрами устанавливались с использованием коэффициента корреляции Спирмана. Соответствие распределения частот генотипов Равновесию Харди-Вайнберга устанавливалось с помощью online калькулятора [<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>]. Уравнение Харди-Вайнберга: $p^2+2pq+q^2=1$, где p – частота доминантного аллеля, q – частота рецессивного аллеля [Rodriguez et al. 2009]. Достоверность различий частот генотипов оценивалась с помощью критерия χ^2 (df=1) с поправкой Йетса и точного критерия Фишера. Расчёт проводился с использованием статистических калькуляторов OpenEpi [<http://www.openepi.com>] и GenExpert [[7](http://gen-</p></div><div data-bbox=)

exp.ru/calculator_or.php]. Для статистического анализа независимых переменных применялся непараметрический критерий Манн-Уитни, для сравнения зависимых переменных – критерий Вилкоксона. Связь генотипов с уровнем экспрессии рецепторов тестировали, применяя непараметрический дисперсионный критерий Крускала-Уоллиса и критерий Манн-Уитни. Все выявленные различия считались достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$. При множественных сравнениях расчет уровня значимости проводился с использованием поправки Бонферрони [Bland et al. 1995]. С учетом отсутствия нормального распределения данных по большинству показателей, результаты в иллюстрациях приведены в виде медианы и диапазона значений квартилей (25% и 75%). В пояснениях к иллюстрациям количество индивидов в группе обозначено n.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов I и II типов для TNF α и IL1 на субпопуляциях мононуклеарных клеток. На первом этапе работы нами было проведено определение уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1. Определение количества рецепторов TNF α и IL1 проводилось методом проточной цитофлуориметрии с использованием калибровочных частиц BD QuantiBRITE PE. Для получения наилучших показателей стабильности и воспроизводимости эксперимента нами был оптимизирован протокол пробоподготовки для изучения количества рецепторов TNF α и IL1, а именно были подобраны оптимальные условия температурного режима, подобрано время инкубации, количество отмывок. Путем титрования была определена концентрация антител, необходимая для насыщения. Для снижения неспецифического связывания с Fc-фрагментами на поверхности клеток были подобраны условия блокировки: температура инкубации, условия инкубации, концентрация IgG.

Данный метод позволил провести количественную оценку экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α и IL1 на различных субпопуляциях МНК условно здоровых индивидов. При исследовании экспрессии рецепторов TNF α на интактных субпопуляциях МНК условно здоровых индивидов было установлено, что в популяции CD14⁺ моноцитов процент клеток, экспрессирующих рецепторы TNF α I типа, был значимо выше, чем в субпопуляциях CD3⁺ Т-лимфоцитов и CD19⁺ В-лимфоцитов ($p < 0,001$). При сравнении анализируемых субпопуляций МНК статистически значимый наименьший процент клеток, несущих рецепторы TNF α II типа, был выявлен в субпопуляции CD19⁺ В-лимфоцитов ($p < 0,001$). При сравнении анализируемых субпопуляций МНК статистически значимый наименьший уровень экспрессии рецепторов TNF α I и II типа установлен в субпопуляции CD3⁺ Т-лимфоцитов ($p < 0,001$). Наибольший уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α I и II типа выявлен в субпопуляциях CD19⁺ В-лимфоцитов и CD14⁺ моноцитов, соответственно ($p < 0,001$). Результаты представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов TNF α I и II типов на субпопуляциях интактных CD3⁺, CD19⁺, CD14⁺ клеток и CD14⁺ клеток в спонтанной и ЛПС-стимулированной культуре мононуклеарных клеток условно здоровых доноров (n=150)

	Процент клеток, экспрессирующих рецепторы		Число рецепторов на клетку	
	TNFR1	TNFR2	TNFR1	TNFR2
Интактные CD19 ⁺ клетки	1,3 (0,9-2,1)*	7,9 (5,8-12,3)*	1153,7 (891,9-1490,8)*	1102,5 (933,4-1309,2)*
Интактные CD3 ⁺ клетки	1,5 (0,9-2,6)*	36,6 (28,4-47,6)**	427,3 (349,2-524,7)**	570,3 (516,8-627,1)**
Интактные CD14 ⁺ клетки	11,4 (4,0-28,8)	28,3 (12,2-43,3)***	869,4 (756,9-1017,9)***	1273,9 (1053,0-1450,6)***
CD14 ⁺ клетки в спонтанной культуре МНК	9,8 (5,8-35,0)	50,0 (31,2-72,1) [†]	1267,5 (1053,0-1521,1) [†]	1983,4 (1677,9-2268,9) [†]
CD14 ⁺ клетки в стимулированной культуре МНК	9,6 (4,0-32,3)	79,2 (71,6-87,8)	1718,2 (1245,0-2559,1)	4177,0 (3133,1-5173,5)

Примечание: Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала; *Статистически значимо отличается от CD14⁺ клеток ($p<0,001$); **Статистически значимо отличается от CD19⁺ и CD14⁺ клеток ($p<0,001$); ***Статистически значимо отличается от CD14⁺ клеток спонтанной культуры МНК ($p<0,001$); [†]Статистически значимо отличается от CD14⁺ клеток стимулированной культуры МНК ($p<0,001$).

При исследовании экспрессии рецепторов IL1 на интактных субпопуляциях МНК условно здоровых индивидов было установлено, что в субпопуляциях CD3⁺ Т-лимфоцитов, CD19⁺ В-лимфоцитов и CD14⁺ моноцитов, отмечается статистически значимое различие между процентным содержанием клеток, экспрессирующих IL1R1 и IL1R2 ($p<0,05$). В популяции CD14⁺ моноцитов было выявлено большее процентное содержание IL1R1⁺ позитивных клеток, чем в субпопуляциях CD3⁺ Т-лимфоцитов и CD19⁺ В-лимфоцитов ($p<0,001$). При сравнении анализируемых субпопуляций МНК статистически значимое наименьшее среднее число рецепторов IL1 I и II типов было установлено в субпопуляциях CD14⁺ моноцитов и CD3⁺ Т-лимфоцитов, соответственно ($p<0,001$). Во всех исследованных субпопуляциях МНК наблюдалась значимая разница по числу IL1R1 и IL1R2 на клетках ($p<0,05$). Результаты представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Уровень экспрессии мембраносвязанных рецепторов IL1 I и II типов на субпопуляциях интактных CD3⁺, CD19⁺, CD14⁺ клеток и CD14⁺ клеток в спонтанной и ЛПС-стимулированной культуре мононуклеарных клеток условно здоровых доноров (n=150)

	Процент клеток, экспрессирующих рецепторы		Число рецепторов на клетку	
	IL1R1	IL1R2	IL1R1	IL1R2
Интактные CD3 ⁺ клетки	10,1 (7,1-13,9)*	2,9 (1,5-5,7)	1148,9 (931,8-1537,5)*	611,3 (485,4-750,6)***
Интактные CD19 ⁺ клетки	3,4 (2,6-5,2)**	2,8 (2,0-4,8)	1597,0 (1222,6-1908,9)**	1128,1 (960,4-1369,4)

Интактные CD14 ⁺ клетки	61,0 (40,0-74,6) [†]	2,9 (1,5-7,4) [†]	920,6 (731,5-1226,9) [†]	1035,4 (801,3-1389,5) [†]
CD14 ⁺ клетки в спонтанной культуре МНК	46,1 (28,6-70,3) ^a	14,5 (8,9-59,4) ^a	1568,7 (1306,0-1981,8) ^a	1621,3 (1341,3-2155,2) ^a
CD14 ⁺ клетки в стимулированной культуре МНК	75,7 (64,2-82,0)	8,4 (4,3-28,7)	3519,9 (2865,0-4473,6)	1507,0 (1155,3-1915,4)

Примечание: Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала; *Статистически значимо отличается от CD14⁺ клеток ($p<0,001$); **Статистически значимо отличается от CD3⁺ и CD14⁺ клеток ($p<0,001$); ***Статистически значимо отличается от CD19⁺ и CD14⁺ клеток ($p<0,001$); [†]Статистически значимо отличается от CD14⁺ клеток спонтанной культуры МНК ($p<0,001$); ^aСтатистически значимо отличается от CD14⁺ клеток стимулированной культуры МНК ($p<0,05$).

При анализе экспрессии рецепторов TNF α и IL1 в субпопуляциях CD3⁺ Т-лимфоцитов, CD19⁺ В-лимфоцитов и CD14⁺ моноцитов, были выявлены количественные различия как в проценте клеток, несущих данные рецепторы, так и в числе рецепторов на клетках. Можно предположить, что в зависимости от данных значений, различные субпопуляции клеток будут иметь разную степень реагирования на цитокины TNF α и IL1. Вероятно, что при большей плотности рецепторов и большем проценте клеток, экспрессирующих данные рецепторы, эффекты TNF α и IL1 на данные клетки будут более выраженными.

На основании полученных результатов по изучению уровня экспрессии рецепторов TNF α и IL1 на различных субпопуляциях иммунокомпетентных клеток условно здоровых индивидов можно прийти к заключению, что повышение процентного содержания клеток, экспрессирующих данные рецепторы не во всех случаях сопряжено с повышением числа рецепторов на клетках. Так, например, субпопуляция CD19⁺ В-лимфоцитов с наименьшим процентом клеток, несущих рецепторы TNF α I типа характеризовалась наибольшим количеством экспрессируемых рецепторов, а на субпопуляции CD3⁺ Т-лимфоцитов, наоборот, обнаруживался наибольший процент клеток, экспрессирующих рецепторы TNF α II типа, и при этом наименьшая плотность данных рецепторов. Сравнение анализируемых субпопуляций моноклеарных клеток показало, что в популяции CD14⁺ моноцитов наблюдается наибольший процент IL1R1⁺ позитивных клеток, но при этом наименьшее число IL1R1 на клетку. А в субпопуляции CD3⁺ Т-лимфоцитов выявлена наименьшая плотность IL1R2, но при этом не наблюдается различия по проценту клеток, экспрессирующих IL1R2 в CD14⁺, CD3⁺ и CD19⁺ субпопуляциях.

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

IL1R2 в проценте клеток, экспрессирующих рецепторы и в количестве рецепторов на клетках, соответственно.

На следующем этапе исследования оценивалась экспрессия рецепторов на CD14⁺ моноцитах в культуре МНК человека, для более подробного изучения изменений в системе рецепторов TNF α и IL1 в условиях смоделированной ситуации активации провоспалительных реакций. Выбор для исследования популяции моноцитов обусловлен тем, что на CD14⁺ клетках отмечался меньший разброс значений, наибольший процент TNFR⁺ и IL1R⁺ позитивных клеток, и наибольшее количество рецепторов, в сравнении с субпопуляциями Т- и В-лимфоцитов. Ранее, были проведены исследования, в которых было установлено, что при культивировании с ЛПС через 24 часа отмечается значительное усиление экспрессии рецепторов TNF α I и II типов, определяемое по MFI, в популяциях CD14⁺ моноцитов [Leeuwenberg et al. 1994]. В нашем исследовании установлено, что при стимуляции ЛПС в популяции моноцитов происходит значительное повышение процента клеток, экспрессирующих рецепторы TNF α II типа и количества данных рецепторов на одну клетку, тогда как для рецептора TNF α I типа показано только значимое повышение числа рецепторов (Таблица 1). Таким образом, стимуляция ЛПС культуры МНК условно здоровых индивидов оказывает более выраженный эффект на экспрессию рецепторов TNF α II типа. В работе Saccani с соавт. [1998] и Penton-Rol с соавт. [1999] было установлено, что при культивировании с ЛПС в моноцитах отмечается увеличение уровня мРНК IL1R1 и снижение уровня мРНК IL1R2. В настоящей работе получены данные согласующиеся с этими исследованиями. При сравнении экспрессии IL1R1 на CD14⁺ моноцитах спонтанной и ЛПС-стимулированной культуры МНК выявлено увеличение в популяции CD14⁺ моноцитов процента IL1R1⁺ позитивных клеток и числа IL1R1 на CD14⁺ моноцитах. При изучении экспрессии рецептора IL1 II типа при стимуляции ЛПС выявлено значимое снижение процента IL1R2⁺ позитивных CD14⁺ моноцитов и среднего числа IL1R2 на CD14⁺ клетках (Таблица 2).

Сывороточные уровни цитокинов TNF α , IL1 β и растворимых рецепторов I и II типов для TNF α и IL1. На втором этапе работы нами было определено содержание медиаторов TNF α и IL1 β в сыворотке крови 150 условно здоровых индивидов. Уровень TNF α в сыворотке крови условно здоровых индивидов составил 2,64 \pm 0,6 пг/мл, уровень IL1 β – 0,2 \pm 0,11 пг/мл. Далее нами было определено сывороточное содержание растворимых рецепторов I и II типов для TNF α и IL1. Установлено, что сывороточный уровень растворимых рецепторов TNF α II типа (3051,44 \pm 131,01 пг/мл) достоверно выше уровня растворимых рецепторов TNF α I типа (718,41 \pm 21,62 пг/мл) (p <0,001). Уровень растворимых рецепторов IL1 II типа (6242,17 \pm 128,22 пг/мл) был достоверно выше уровня рецепторов IL1 I типа (12,88 \pm 4,33 пг/мл) (p <0,001).

Корреляционные взаимосвязи в системах рецепторов TNF α и IL1. Полученные данные по экспрессии мембраносвязанных рецепторов и содержанию растворимых рецепторов анализировали для выявления корреляционных связей. Результаты корреляционного анализа представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Корреляционные взаимосвязи в системах рецепторов TNF α и IL1 (n=150, Spearman Rank, p <0,05)

<i>Рецепторы TNFα</i>

Сывороточный уровень TNF α	+0,32	Сывороточный уровень растворимых рецепторов sTNFR1
Сывороточный уровень TNF α	-0,38	Количество TNFR1 на интактных В-лимфоцитах
Процентное содержание интактных моноцитов, экспрессирующих TNFR2	+0,43	Количество TNFR2 на интактных моноцитах
Процентное содержание моноцитов, экспрессирующих TNFR1 в спонтанной культуре МНК	+0,74	Процентное содержание моноцитов, экспрессирующих TNFR1 в стимулированной культуре МНК
Количество TNFR1 на моноцитах в спонтанной культуре МНК	+0,37	Количество TNFR1 на моноцитах в стимулированной культуре МНК
Процентное содержание моноцитов, экспрессирующих TNFR2 в спонтанной культуре МНК	+0,31	Процентное содержание моноцитов, экспрессирующих TNFR2 в стимулированной культуре МНК
<i>Рецепторы IL1</i>		
Сывороточный уровень растворимых рецепторов sIL1R2	-0,34	Количество IL1R2 на интактных Т-лимфоцитах
Процентное содержание моноцитов, экспрессирующих IL1R1 в спонтанной культуре МНК	+0,50	Процентное содержание моноцитов, экспрессирующих IL1R1 в стимулированной культуре МНК
Количество IL1R1 на моноцитах в спонтанной культуре МНК	+0,48	Количество IL1R1 на моноцитах в стимулированной культуре МНК
Процентное содержание моноцитов, экспрессирующих IL1R2 в спонтанной культуре МНК	+0,64	Процентное содержание моноцитов, экспрессирующих IL1R2 в стимулированной культуре МНК

В литературных данных имеются достаточно противоречивые сведения по корреляции TNF α с его растворимыми рецепторами. Так, в исследовании Spinas с соавт. [1992] была установлена корреляция между уровнями TNF α и sTNFR1, но не выявлено корреляции с sTNFR2. А в работе Koga с соавт. [2000] была установлена корреляция между TNF α и sTNFR2, но не выявлено корреляции TNF α с sTNFR1. В нашем исследовании установлено, что сывороточный уровень TNF α положительно коррелировал с уровнем sTNFR1 в сыворотке крови здоровых индивидов. Уровень TNF α также был связан отрицательной корреляцией с уровнем мембраносвязанных TNFR1 на клетках, что согласуется с имеющимися литературными данными о том, что TNF α понижает число мРНК рецепторов TNF α I типа [Winzen et al. 1993].

Сывороточный уровень sIL1R2 отрицательно коррелировал с количеством мембраносвязанных рецепторов IL1 II типа на интактных Т-лимфоцитах. По-видимому, данная корреляция связана с протеолитическим слущиванием мембраносвязанных рецепторов от мембраны клетки. Наличие отрицательной корреляции между содержанием растворимых рецепторов IL1 II типа с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов данного типа на Т-лимфоцитах, может свидетельствовать о различном вкладе субпопуляций в образование растворимых форм рецепторов.

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

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

Полиморфные точки – SNP были выбраны из базы данных NCBI dbSNP. Критерием выбора SNP являлись расположение в промоторных участках генов рецепторов и высокая частота минорного аллеля. Частоты аллелей и генотипов исследованных полиморфных вариантов промоторных участков генов рецепторов TNF α и IL1 условно здоровых жителей г. Новосибирска приведены в Таблице 4. Распределение частот генотипов и аллелей всех исследуемых полиморфных вариантов соответствовало равновесию Харди-Вайнберга ($p>0,05$).

Таблица 4 – Частоты генотипов и аллелей полиморфных вариантов генов рецепторов TNF α и IL1 I и II типов у здоровых жителей г. Новосибирска (Юго-Западная Сибирь, Россия), n=150

SNP	Генотип	Частота генотипа			χ^2	$\chi^2 p$
		наблюдаемая		ожидаемая		
		%	n	n		
<i>TNFRSF1A</i> G/T -609, rs4149570 (n=149)	GG	30,9	46	48,5	0,693	0,405
	GT	52,3	78	73,0		
	TT	16,8	25	27,5		
	G	57,0	–	–		
	T	43,0	–	–		
<i>TNFRSF1A</i> G/C -1207, rs4149569 (n=150)	GG	34,7	52	52,2	0,005	0,942
	GC	48,7	73	72,6		
	CC	16,6	25	25,2		
	G	59,0	–	–		
	C	41,0	–	–		
<i>TNFRSF1B</i> A/T -1709, rs652625 (n=150)	AA	90,7	136	136,3	0,359	0,548
	AT	9,3	14	13,3		
	TT	0	0	0,3		
	A	95,0	–	–		
	T	5,0	–	–		
<i>TNFRSF1B</i> C/T -3609, rs590368 (n=150)	CC	35,3	53	55,2	0,570	0,450
	CT	50,7	76	71,6		
	TT	14,0	21	23,3		
	C	61,0	–	–		
	T	39,0	–	–		
<i>IL1R1</i> A/G -1100, rs3917225 (n=147)	AA	38,1	56	55,7	0,009	0,921
	AG	46,9	69	69,6		
	GG	15,0	22	21,7		
	A	62,0	–	–		
	G	38,0	–	–		
<i>IL1R1</i> C/T -12075, rs2234650 (n=125)	CC	21,6	27	31,8	2,890	0,089
	CT	57,6	72	62,5		
	TT	20,8	26	30,8		
	C	50,0	–	–		
	T	50,0	–	–		
<i>IL1R2</i> T/C -1780, rs4141134 (n=149)	TT	38,9	58	61,9	1,896	0,168
	TC	51,0	76	68,3		
	CC	10,1	15	18,9		
	T	64,0	–	–		

	C	36,0	–	–		
<i>IL1R2</i> T/G +6974, rs2071008 (n=145)	TT	78,6	114	113,0	0,652	0,419
	TG	19,3	28	30,0		
	GG	2,1	3	2,0		
	T	88,0	–	–		
	G	12,0	–	–		

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

При сравнении распределения частот аллелей и генотипов исследованных SNP с другими популяциями из базы данных NCBI dbSNP, было установлено, что частоты аллелей и генотипов для полиморфных точек *TNFRSF1A* -609 G/T и *IL1R1* -12075 C/T больше характерны для азиатских популяций. Данные распространенности аллелей и генотипов полиморфных вариантов *TNFRSF1B* -1709 A/T, *TNFRSF1B* -3609 C/T, *IL1R2* -1780 T/C и *IL1R2* +6974 T/G соответствовали данным, полученным в европейских популяциях. В исследуемой нами выборке частота минорных аллелей однонуклеотидных полиморфизмов *TNFRSF1A* -1207 G/C и *IL1R1* -1100 A/G оказалась выше, чем в европейских популяциях, и ниже, чем в популяциях Азии.

Ассоциация аллельных вариантов генов рецепторов TNF α с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов и сывороточным уровнем растворимых рецепторов. В промоторной области генов семейства TNFR располагается значительное количество регуляторных полиморфизмов, которые могут оказывать влияние на уровень экспрессии [Kim et al. 2005]. В литературе представлен ряд работ по изучению связи полиморфного варианта гена *TNFRSF1A* -609 G/T с различной патологией. Так, аллель T был ассоциирован с риском развития системной красной волчанки [Miyagawa et al. 2008] и ухудшал прогноз течения заболевания у больных раком легких [Lee et al. 2010] и неходжскинской лимфомой [Heemann et al. 2012], но при этом играл защитную роль при раке ротовой полости [Gupta et al. 2008], снижал риски развития рака кишечника [Slattery et al. 2011] и инвазивного легочного аспергиллёза [Sainz et al. 2010]. В работе Kim с соавт. [2008] было установлено, что однонуклеотидный полиморфизм *TNFRSF1A* -609 G/T ассоциирован с гепатоцеллюлярной карциномой и что аллель T ответственен за пониженную экспрессию рецепторов TNF α I типа. В нашей работе установлено, что гомозиготные носители аллеля T в точке -609 G/T промотора гена рецептора *TNFRSF1A* характеризуются пониженным сывороточным уровнем растворимых рецепторов TNF α I типа в сравнении с гомозиготными носителями аллеля G (Mann-Whitney *U* test, TT vs GG, $p=0,006$) (Рисунок 1). Известно, что растворимые рецепторы являются ингибиторами биологических эффектов TNF α [Engelmann et al. 1989]. Соответственно, чем их меньше, тем ниже конкуренция за связывание медиатора с мембраносвязанными рецепторами для передачи сигналов в клетку. Также у индивидов с генотипом TT была выявлена тенденция к снижению количества мембраносвязанных рецепторов TNFR1 на интактных CD19⁺ В-клетках (Mann-Whitney *U* test, TT vs GT, $p=0,099$). Учитывая, что растворимые рецепторы TNF α I типа образуются путем протеолитического отщепления от мембраносвязанных рецепторов TNF α [Lantz et al. 1990; Hwang et al. 1993], можно сделать заключение, что меньшее количество растворимых рецепторов TNFR1 у индивидов с генотипом TT определено меньшей экспрессией рецепторов TNF α I типа на клетках. А меньшая экспрессия рецепторов TNF α в свою очередь, вероятно, вызвана тем, что G аллель участвует в образовании

сайта связывания транскрипционного фактора IRF8 (interferon regulatory factor 8), вовлеченного в TNFR1-обусловленную активацию NF κ B сигнального пути [Sainz et al. 2010].

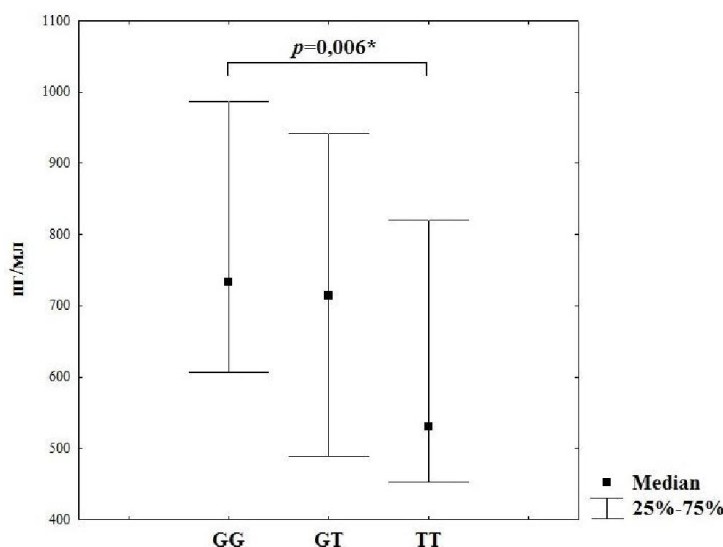


Рисунок 1 – Сывороточный уровень растворимых форм рецепторов TNF α I типа у носителей разных генотипов в точке -609 G/T гена *TNFRSF1A* (n=149).

Примечание: Здесь и на Рисунках 2-6. * – статистически значимо после применения поправки Бонферрони. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

В исследовании, проведенном Miyagawa с соавт. [2008] было показано, что частоты аллеля С в точке SNP гена *TNFRSF1A* -1207 G/C у больных системной красной волчанкой статистически значимо выше, чем у здоровых индивидов. В нашем исследовании, установлено, что носители генотипа CC в точке гена *TNFRSF1A* -1207 G/C, характеризуются меньшей плотностью рецепторов TNF α I типа на интактных CD14⁺ моноцитах (Mann-Whitney *U* test, CC vs GC, $p=0,012$) (Рисунок 2А). С помощью программ TRANSFAC («BIOBASE Biological Database», Германия) [Wingender 2008] и AliBaba2.1 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>) было обнаружено, что в данном SNP при наличии аллеля С предполагается отсутствие сайтов связывания с факторами транскрипции, а при наличии аллеля G в последовательности, возможно связывание с факторами транскрипции – C/EBP α , AP-2 α и Sp1. C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein alpha) понижает способность к пролиферации посредством ингибирования циклин-зависимых киназ 2 и 4 (CDK2, CDK4) [Wang et al. 2001]. AP-2 alpha (Activating enhancer binding Protein 2 alpha) и Sp1 (Specificity protein 1) – белки с молекулярными массами 52 кДа и 81 кДа соответственно, участвующие в регуляции многих клеточных процессов, включая рост, дифференцировку, апоптоз и др. [Shi et al. 2014; Chu and Ferro 2005]. Возможно, что разница в экспрессии поверхностных TNFR1 на клетках у индивидов с разными генотипами связана с одним из этих факторов транскрипции.

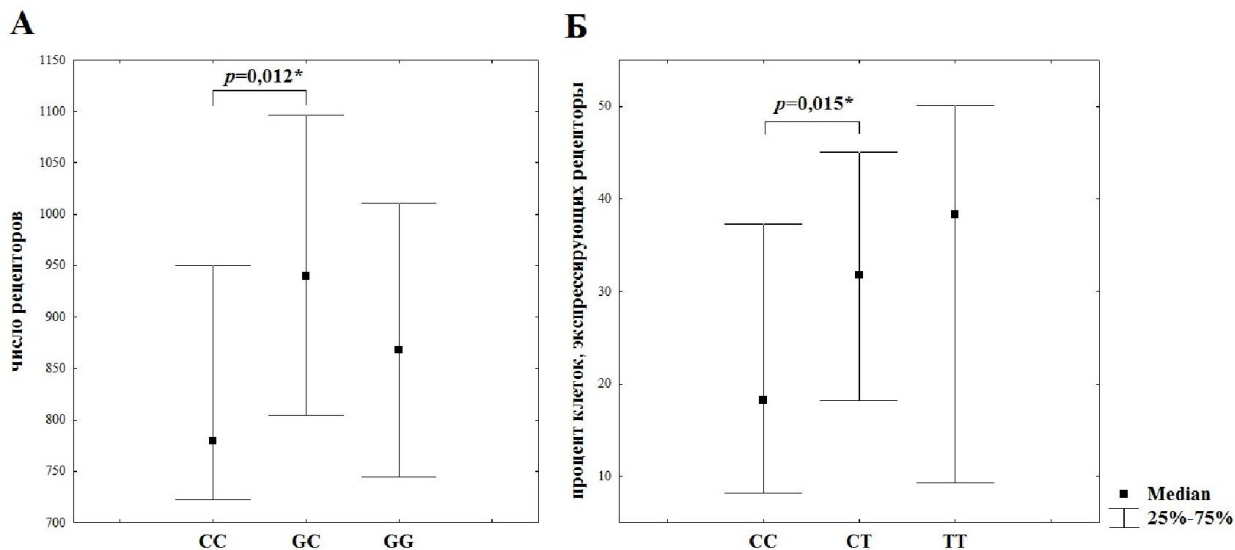


Рисунок 2 – (А) Уровень мембраносвязанных форм рецепторов TNF α I типа на интактных CD14⁺ моноцитах у носителей разных генотипов в точке -1207 G/C гена *TNFRSF1A* (n=150). (Б) Процентное содержание интактных CD14⁺ клеток, экспрессирующих TNFR2 у носителей разных генотипов в точке -3609 C/T гена *TNFRSF1B* (n=150).

В литературных данных встречается ряд работ по изучению связи полиморфного варианта -1709 гена промотора *TNFRSF1B* с определенной патологией [Potter et al. 2010; Guan et al. 2011]. В работе Steenholdt с соавт. [2012], было установлено, что носительство аллеля А в позиции -1709 А/Т гена *TNFRSF1B* повышает риск развития осложнений при инъекции инфликсимабом. В исследовании Шкаруба с соавт. [2012] было показано, что комбинация генотипов *TNFRSF1A* -609 GT + *TNFRSF1B* -3609 CC у больных ревматоидным артритом встречается статистически значимо меньше, чем у здоровых индивидов. В настоящей работе не обнаружено ассоциации между исследуемым однонуклеотидным полиморфизмом в позиции -1709 А/Т (rs652625) промотора гена *TNFRSF1B* с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов и сывороточным уровнем растворимых рецепторов sTNFR2. Индивиды, гомозиготные по аллелю С в позиции -3609 C/T промотора гена рецептора TNF α II типа, имели наименьшее процентное содержание CD14⁺ клеток, экспрессирующих рецепторы TNFR2 (Mann-Whitney *U* test, CC vs CT, $p=0,015$) (Рисунок 2Б).

Биологические эффекты TNF реализуются путем взаимодействия с двумя типами мембраносвязанных рецепторов – TNFR1 и TNFR2. Известно, что TNFR2 при одновременной экспрессии с TNFR1 способен индуцировать деградацию адаптерного белка TRAF2 и тем самым приводить к усилению цитотоксичности TNFR1 [Fotin-Mleczek et al. 2002; Cabal-Hierro and Lazo 2012]. Таким образом, можно предполагать, что от баланса рецепторов TNFR1 и TNFR2 в конечном счете будет зависеть дальнейшая судьба клетки. Вероятно, что на субпопуляциях с большим процентным содержанием клеток, экспрессирующих TNFR2, анти-апоптотические сигналы будут находиться на меньшем уровне, и, следовательно, клетки будут больше предрасположены к гибели.

Ассоциация аллельных вариантов генов рецепторов II1 с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов и сывороточным уровнем

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

В настоящей работе установлено, что индивиды с генотипом GG в -1100 A/G (Mann-Whitney *U* test, GG vs AA, $p=0,039$) и CC в -12075 C/T (Mann-Whitney *U* test, CC vs CT, $p=0,023$) гена *IL1R1* характеризуются повышенным числом мембраносвязанных IL1R1 на интактных CD14⁺ клетках (Рисунок 3).

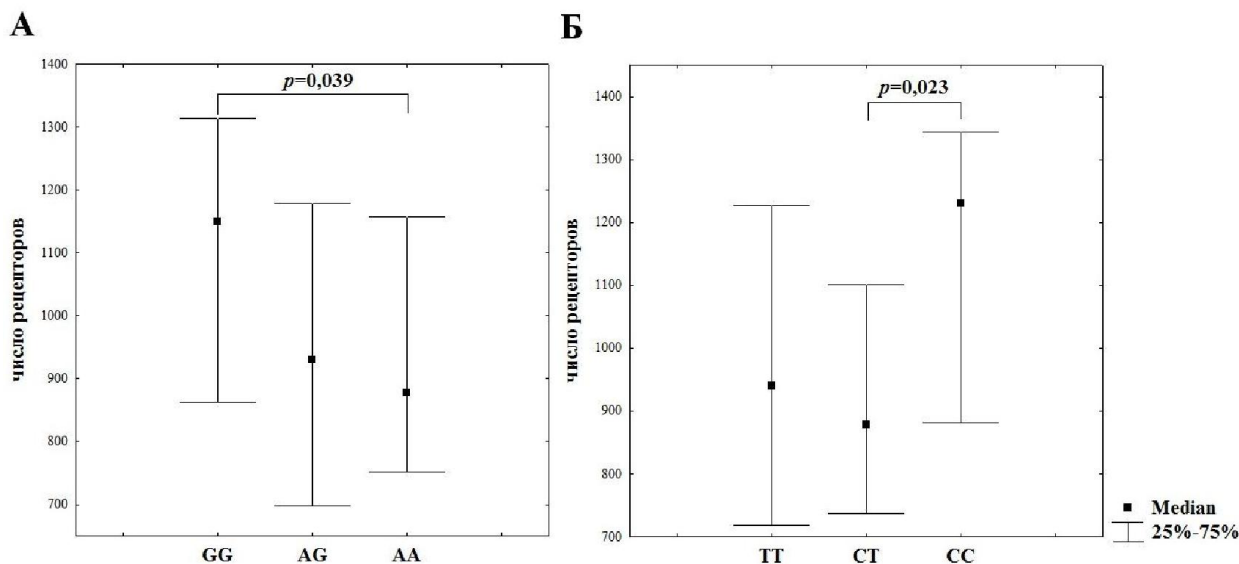


Рисунок 3 – (А) Число мембраносвязанных рецепторов IL1 I типа на интактных CD14⁺ моноцитах у носителей разных генотипов в точке -1100 A/G гена *IL1R1* (n=147). (Б) Число мембраносвязанных IL1R1 на интактных CD14⁺ моноцитах у носителей разных генотипов в точке -12075 C/T гена *IL1R1* (n=125).

Известно что, активность медиаторов может зависеть от плотности рецепторов на клетках [Reynes et al. 2000; Gudypati et al. 2001; Moraga et al. 2009]. Таким образом, можно предполагать, что индивиды с данными генотипами будут более подвержены действию медиатора IL1, в виду повышенной экспрессии сигнального рецептора IL1 I типа. Кроме того, здоровые индивиды с гомозиготным вариантом генотипа TT в SNP гена *IL1R1* C/T -12075 имели пониженный процент клеток, экспрессирующих IL1R1 как на интактной популяции CD14⁺ моноцитов (Mann-Whitney *U* test, TT vs CT, $p=0,002$; Kruskal-Wallis, $p=0,017$), так и в популяции CD14⁺ моноцитов спонтанной культуры МНК (Mann-Whitney *U* test, TT vs CT, $p=0,019$). Полученные данные свидетельствуют о том, что аллель Т

ассоциирован с низкой экспрессией мембраносвязанных IL1R1 на популяции CD14⁺ клеток. В связи с этим, можно предполагать, что индивиды с генотипом ТТ будут характеризоваться пониженным функциональным ответом моноцитов на медиатор IL1.

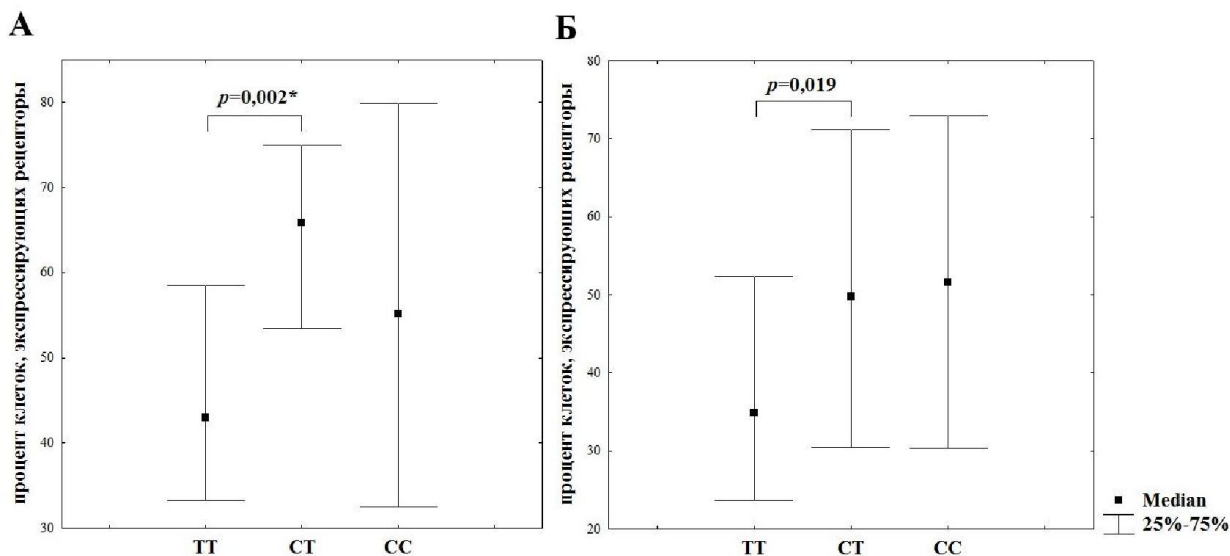


Рисунок 4 – (А) Процентное содержание интактных CD14⁺ клеток, экспрессирующих IL1R1 у носителей разных генотипов в точке -12075 С/Т гена *IL1R1* (n=125). (Б) Процентное содержание CD14⁺ моноцитов, экспрессирующих мембраносвязанные рецепторы IL1R1 в спонтанной культуре МНК у носителей разных генотипов в точке -12075 С/Т гена *IL1R1* (n=125).

Полиморфизмы гена *IL1R2* до сих пор остаются менее изученными. В нашей работе были исследованы два полиморфных варианта промоторной области гена *IL1R2* -1780 Т/С и +6974 Т/Г (локализуется в альтернативном промоторе). Индивиды с генотипом СС в -1780 Т/С характеризовались повышенным процентным содержанием CD3⁺ (Mann-Whitney *U* test, СС vs ТТ, $p=0,0005$; СС vs ТС, $p=0,035$; Kruskal-Wallis test, $p=0,006$) и CD14⁺ (Mann-Whitney *U* test, СС vs ТТ, $p=0,022$) клеток, экспрессирующих мембраносвязанные IL1R2 (Рисунок 5). Процентное содержание клеток, несущих на своей поверхности специфичные рецепторы может предопределять степень реализации эффектов медиатора. Вероятно, что при повышенном проценте клеток, экспрессирующих рецепторы, клеточные популяции будут более чувствительны к действию медиатора. Но, в данном случае, повышенный процент IL1R2⁺ позитивных клеток будет оказывать обратный эффект, т.е блокировать передачу сигнала в клетку, путем повышения конкуренции с IL1R1 за связывание с медиатором IL1 и с IL1RAcP [Lang et al. 1998]. Таким образом, при повышенном процентном содержании клеток, экспрессирующих рецепторы-«ловушки» IL1R2, можно предполагать о лимитировании эффектов IL1 на данных субпопуляциях.

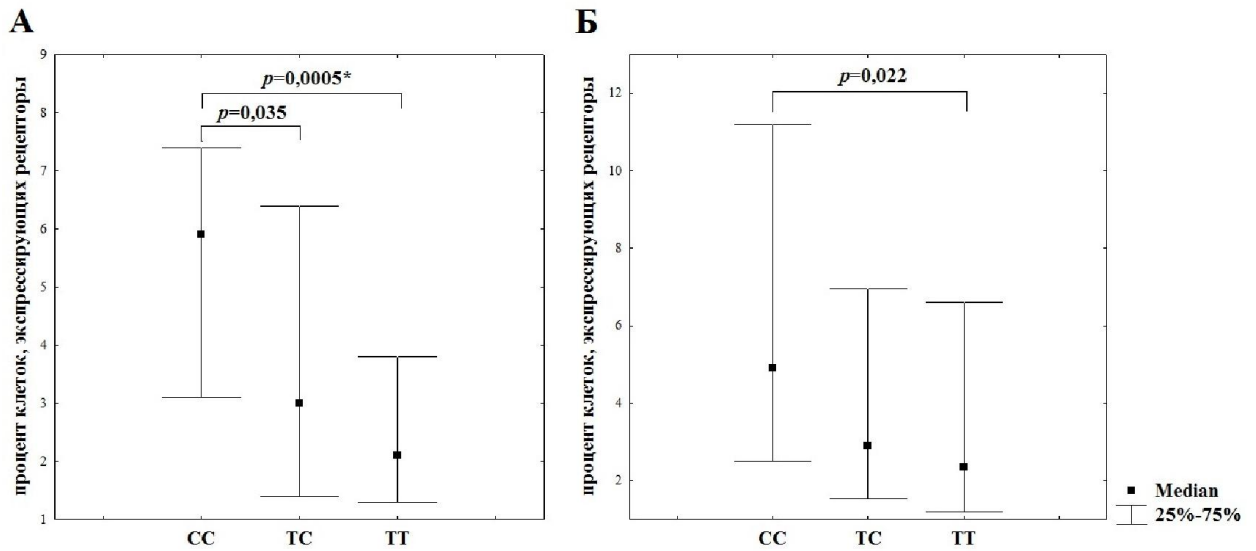


Рисунок 5 – (А) Процентное содержание интактных CD3⁺ клеток, экспрессирующих IL1R2 у носителей разных генотипов в точке -1780 T/C гена *IL1R2* (n=149). (Б) Процентное содержание интактных CD14⁺ клеток, экспрессирующих IL1R2 у носителей разных генотипов в точке -1780 T/C гена *IL1R2* (n=149).

Здоровые индивиды с генотипом CC в *IL1R2* -1780 T/C (Mann-Whitney *U* test, CC vs TT, $p=0,008$; CC vs TC, $p=0,0002$; Kruskal-Wallis test, $p=0,001$) и TT в *IL1R2* +6974 T/G (Mann-Whitney *U* test, TT vs TG, $p=0,007$; Kruskal-Wallis test, $p=0,032$) имели пониженное число мембраносвязанных IL1R2 на CD14⁺ клетках в ЛПС-стимулированной культуре МНК (Рисунок 6).

Известно, что ЛПС усиливает выработку цитокина IL1 β [Cavaillon et al. 1989]. Исходя из этого, можно предполагать, что индивиды, гомозиготные по аллелю С в *IL1R2* -1780 T/C и аллелю Т в *IL1R2* +6974 T/G будут иметь более выраженные эффекты в ответ на стимуляцию с ЛПС за счет пониженного числа рецепторов-«ловушек» на поверхности CD14⁺ моноцитов. Также возможно, что аллель Т в *IL1R2* -1780 T/C обладает большим потенциалом стимуляции экспрессии рецепторов IL1 II типа.

С помощью программ TRANSFAC и AliBaba2.1 была определена возможность связывания с транскрипционными факторами при наличии в последовательности определенного аллеля. Последовательность промотора, содержащая аллель С в полиморфном варианте -12075 C/T может связаться с YY1, а Т-содержащая последовательность с AP-1. YY1 (Yin Yang 1) является убиквитарным и многофункциональным транскрипционным фактором (с доменами типа «цинковые пальцы»), взаимодействующим с гистоновыми ацетилтрансферазами и деацетилазами, и вовлеченным в процессы воспаления и туморогенеза [Gordon et al. 2006]. YY1 повышает уровень экспрессии циклооксигеназы-2 и уровень продукции простагландина D2 после введения ЛПС [Joo et al. 2007]. AP-1 (Activating protein 1) – димерный транскрипционный фактор, вовлеченный в регуляцию множества клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку, рост, воспаление, апоптоз, миграцию клеток и т.д. [Hess et al. 2004].

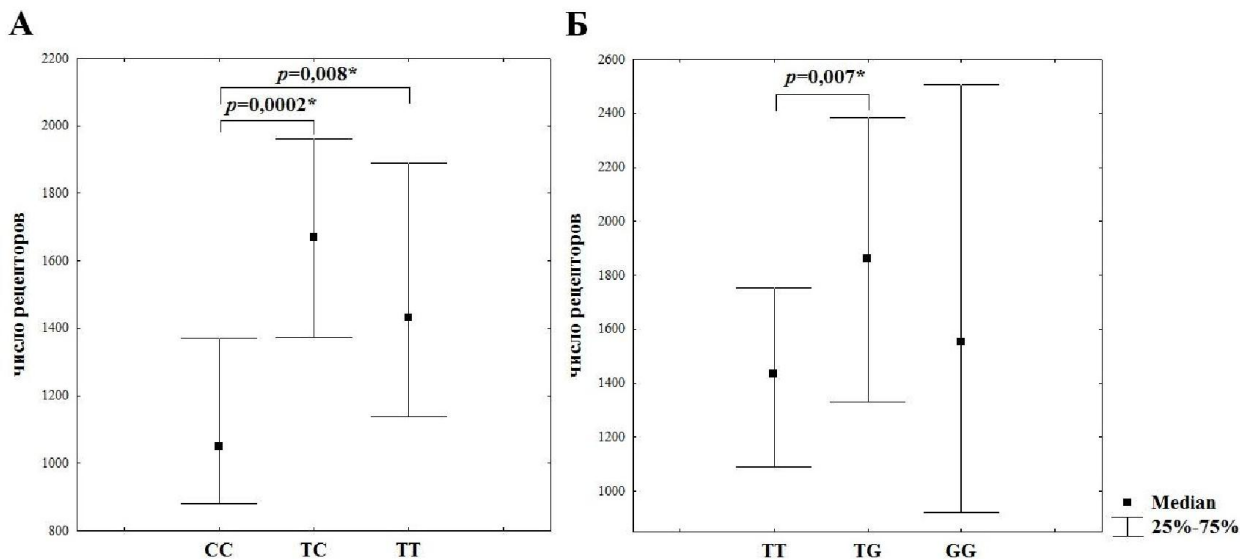


Рисунок 6. (А) Число мембраносвязанных рецепторов IL1 II типа на CD14⁺ моноцитах в ЛПС-стимулированной культуре МНК у носителей разных генотипов в точке -1780 Т/С гена *IL1R2* (n=149). (Б) Число мембраносвязанных рецепторов IL1 II типа на CD14⁺ моноцитах в ЛПС-стимулированной культуре МНК у носителей разных генотипов в точке +6974 Т/Г гена *IL1R2* (n=145).

Наличие аллеля G в точке +6974 Т/Г предполагает возможность образования сайта посадки транскрипционного фактора TAF-1. TAF1 (TATA box binding protein (TBP)-associated factor subunit 1) – регуляторный белок размером 250 кДа, участвующий в процессах клеточного цикла и апоптоза [Wassarman and Sauer, 2001], обладающий протеин-киназной [Dikstein et al. 1996], ацетилтрансферазной [Mizzen et al. 1996] и убиквитин-лигазной активностью (E1/E2) [Pham and Sauer, 2000]. TAF1 модулирует транскрипционную активность белков c-Jun [Lively et al. 2001], Mdm2 [Allende-Vega et al. 2007] и циклин D1 [Kloet et al. 2012], известных своим влиянием на опухолевую прогрессию. Вероятно, что разница в экспрессии рецепторов связана со связыванием с данными факторами транскрипции.

ВЫВОДЫ

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

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Васильев Ф.Ф., Альшевская А.А., Лопатникова Ю.А., Сенников С.В. Экспрессия рецепторов к ФНО-альфа на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2011. – №2/2(35). – С. 18-19.
2. Васильев Ф.Ф., Альшевская А.А., Лопатникова Ю.А., Сенников С.В. Изменения экспрессии рецепторов к ФНО-альфа в культуре МНК человека // Дни иммунологии в Сибири: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием под ред. В.А. Козлова, С.В. Смирновой, В.Т. Манчук. – Абакан. – Издательство ГОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Каганова». – 2011. – С. 44-45.
3. Васильев Ф.Ф., Лопатникова Ю.А., Сенников С.В. Экспрессия рецепторов к ИЛ-1 на субпопуляциях мононуклеарных клеток // Материалы XIV Всероссийского

Научного Форума «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге». – 2011. – Медицинская иммунология. – Т.13. – №4-5. – С. 375-376.

4. Альшевская А.А., Васильев Ф.Ф., Лопатникова Ю.А., Сенников С.В. Мембраносвязанные и растворимые рецепторы к фактору некроза опухоли- α в норме и при ревматоидном артрите // **Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН.** – 2012. – №3-2. – С. 237-240.

5. Шкаруба Н.С., Васильев Ф.Ф., Силков А.Н., Сенникова Ю.А., Лопатникова Ю.А., Сизиков А.Э., Калашникова Т.А., Сизякина Л.П., Шульман Ю.Б., Долгих С.В., Мазуров В.И., Сенников С.В. Частота встречаемости аллельных вариантов генов TNFR1 в позициях -609 и -1207 и TNFR2 в позициях -1709 и -3609 среди условно здоровых доноров и у больных ревматоидным артритом // **Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН.** – 2012. – №3-2. – С. 23-28.

6. Lopatnikova JA, Vasilyev FF, Alshevskaya AA, Sennikov SV. Quantitative flow cytometric analysis of expression of tumor necrosis factor receptor types I and II on mononuclear cells // **J Recept Signal Transduct Res.** – 2013. – Vol. 33(1). – P. 49-55.

7. Vasilyev FF, Lopatnikova JA, Sennikov SV. Optimized flow cytometry protocol for analysis of surface expression of interleukin-1 receptor types I and II // **Cytotechnology.** – 2013. – Vol. 65(5). – P. 795-802.

8. Sennikov SV, Vasilyev FF, Lopatnikova JA, Shkaruba NS, Silkov AN. Polymorphisms in the tumor necrosis factor receptor genes affect the expression levels of membrane-bound type I and type II receptors // **Mediators Inflamm.** – 2014. – 2014:745909. doi: 10.1155/2014/745909.

9. Vasilyev F, Silkov A, Sennikov S. Relationship between interleukin-1 type 1 and 2 receptor gene polymorphisms and the expression level of membrane-bound receptors // **Cell Mol Immunol.** – 2015. – Vol. 12(2). – P. 222-230. doi: 10.1038/cmi.2014.43.

10. Vasilyev FF, Sennikov SV, Lopatnikova JA, Silkov AN. Association of polymorphism of TNF-alpha receptors genes with expression levels of membrane-bound receptors and serum levels of soluble receptors // Book of abstracts, Co-Editors: Luciano Adorini, Massimo Locati, 15th International Congress of Immunology – ICI 2013, Milan, Italy, August 22-27. – 2013. – P. 355.

11. Alshevskaya A, Vasiliev F, Lopatnikova J, Shkaruba N, Chumasova O, Sizikov A., Sennikov S. IL-1 β membrane-bound receptors in health and in rheumatoid arthritis // Book of abstracts, Co-Editors: Luciano Adorini, Massimo Locati, 15th International Congress of Immunology – ICI 2013, Milan, Italy, August 22-27. – 2013. – P. 775.

12. Vasilyev F.F., Silkov A.N., Sennikov S.V. Association between interleukin-1 type I receptor gene polymorphisms and the expression level of membrane-bound receptors // European journal of human genetics. – 2014. – Vol. 22 (Suppl.1). – P. 420.

13. Васильев Ф.Ф., Сенников С.В., Силков А.Н. Ассоциация аллельных вариантов генов рецепторов ИЛ-1 I и II типа с уровнем экспрессии мембраносвязанных рецепторов // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Генетика и здоровье: актуальные вопросы и современные технологии», Якутск, 11 июня. – 2014. – С. 19-27.