



На правах рукописи

ЖУКОВА Юлия Владимировна

**КО-ЭКСПРЕССИЯ И СРЕДНЕЕ КОЛИЧЕСТВО РЕЦЕПТОРОВ К
ФАКТОРУ НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА НА СУБПОПУЛЯЦИЯХ
ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК В НОРМЕ И У ПАЦИЕНТОВ С
РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ**

14.03.09 – Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2021

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

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Сенников Сергей Витальевич

Официальные оппоненты:

Щелкунов Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела геномных исследований. Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (г. Новосибирск).

Королев Максим Александрович, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией патологии соединительной ткани, заместитель руководителя по научной и клинической работе Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии филиала Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (г. Томск).

Защита состоится «9» декабря 2021 года в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте <https://niikim.ru/ru/>

Автореферат разослан _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Облеухова Ирина Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Фактор некроза опухоли- α (TNF α) считается провоспалительным цитокином, однако обладает различным, зачастую противоположным действием, модулирует множество сигнальных путей с широким диапазоном последующих эффектов [Holbrook 2019]. При таком широком спектре клеточных эффектов и сложных сигнальных путей, TNF α участвует в патогенезе многих заболеваний, таких как ревматоидный артрит [Guo2018], анкилозирующий спондилит, болезнь Крона [Kollias 1999, Baumgart 2007] и многих других.

TNF α выполняет клеточные функции, опосредованные одним из двух своих рецепторов [Grell 1995, 1998]. В исследованиях для различных типов рецепторов установлено, что дифференциальная активность некоторых цитокинов может быть продиктована не только кинетикой связывания лиганда с рецептором, но также плотностью рецептора на клеточной поверхности, которая может влиять на оказываемые эффекты [Moraga 2009, Voou 2014, Manfred 2002]. Также показано, что при достижении «порогового» количества рецептора может изменяться реакция клеток на действие цитокина [Conti et al., 2008], а при различных соотношениях количества экспрессируемых рецепторов, возможна и перекрёстная активация сигнальных путей [Fotin-Mieczek et al., 2002].

Применяемые в большинстве случаев стандартные методы, которые используются для определения процента клеток, несущих рецепторы не дают информации о среднем количестве мембраносвязанных молекул на поверхности клетки. Для таких исследований необходимо использовать калибровочные частицы, позволяющие определить среднее число молекул на клетках.

Таким образом, для понимания регуляции функционального ответа важно учитывать не только тип рецептора, с которым связывается TNF α , но и плотность этого рецептора на поверхности клетки-мишени [Moraga 2009; Gudipaty 2001].

Учитывая, что TNFR1 и TNFR2 связываются с одним и тем же цитокином и имеют частично перекрестные сигнальные пути, следует предположить, что совместная экспрессия (ко-экспрессия) тоже может определять степень и характер ответа клетки на лиганд. Представляется важным оценить ко-экспрессию рецепторов TNF α для иммунокомпетентных клеток, которая позволит выявить распределение рецепторов на клетках внутри основных субпопуляций иммунных клеток для более детальной оценки функциональных возможностей каждой из них. При этом оценка ко-экспрессии и среднего количества мембраносвязанных форм рецепторов на клетках позволят составить наиболее полное и точное представление о системе регуляции биологических эффектов медиатора.

Неоднородность популяционного состава иммунокомпетентных клеток и наличие субпопуляций внутри одного пула клеток, выполняющих различные

функции, создает предпосылки для изучения ко-экспрессии, а также среднего количества рецепторов не только на основных популяциях моноцитов, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов, но также на субпопуляциях хелперных, цитотоксических Т-лимфоцитов и регуляторных Т клетках в норме.

В настоящее время имеется множество доказательств того, что TNF α играет центральную роль в патогенезе различных аутоиммунных заболеваний [Erickson1994, Farrugia 2016]. Одним из наиболее ярких примеров таких заболеваний является ревматоидный артрит (РА). При ревматоидном артрите отмечается нарушение баланса в экспрессии рецепторов, что приводит к усугублению течения заболевания и наоборот, блокада сверхэкспрессии рецепторов приводит к стабилизации [Askermann 2007, Воронина 2018].

Таким образом, показатели процента клеток, экспрессирующих рецепторы и ко-экспрессии в сочетании с определением среднего количества рецепторов на клетках могут наиболее полно отражать возможность клеток реализовывать различный ответ на действие цитокина. Оценка данных параметров может являться перспективной для понимания механизмов регуляции иммунного ответа клеток в норме и при развитии патологии, а также стать дополнительным критерием диагностики иммуноопосредованных заболеваний и терапевтической мишенью для создания новых подходов в лечении. Вышеизложенное определило цель и задачи настоящего исследования.

Цель работы: провести сравнительный анализ ко-экспрессии и среднего числа рецепторов 1 и 2 типа к TNF α у здоровых доноров и пациентов с РА на субпопуляциях иммунных клеток, охарактеризовать значимость указанных показателей для диагностики РА.

Задачи:

1. Исследовать ко-экспрессию и среднее число мембраносвязанных рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на клетках у здоровых доноров для популяций моноцитов, Т и В-лимфоцитов, субпопуляций хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов и регуляторных Т клеток.

2. Исследовать ко-экспрессию и среднее число мембраносвязанных рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на клетках моноцитов, Т и В-лимфоцитов, субпопуляций хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов и регуляторных Т клеток у пациентов с различной активностью РА как между собой, так и по сравнению со здоровыми донорами.

3. Оценить изменение ко-экспрессии рецепторов к TNF α 1 и 2 типов на иммунокомпетентных клетках у пациентов с обострением РА и после проведения курса терапии ритуксимабом.

4. Провести поиск ассоциаций между клинико-лабораторными показателями активности заболевания, ко-экспрессии и среднего числа рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на иммунокомпетентных клетках при помощи однофакторного и многофакторного регрессионного анализа и математического моделирования наиболее значимо отличающихся параметров.

Научная новизна

В работе впервые проведена оценка среднего числа рецепторов и ко-

экспрессии рецепторов к TNF α 1 и 2 типов на 12 субпопуляциях иммунокомпетентных клеток у здоровых доноров и пациентов с РА. Полученные данные показали, что плотность экспрессии рецепторов как первого, так и второго типа на дубль-позитивных клетках у здоровых доноров выше по сравнению с экспрессией соответствующих рецепторов на клетках, несущих только один из типов рецепторов. Также было установлено, что у здоровых доноров для всех популяций Т клеток характерен высокий процент клеток, несущих рецептор 2 типа, наибольший показатель наблюдался среди клеток памяти (как CD 8+, так и CD 4+).

При проведении сравнительной оценки ко-экспрессии рецепторов к TNF α 1 и 2 типов у пациентов с различной активностью РА на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток, связанных с патогенезом данного заболевания, для пациентов с РА характерны различные соотношения типов экспрессии рецепторов по большинству субпопуляций. Среди субпопуляций Т клеток наблюдается сочетание изменений количества как первого, так и второго типа рецепторов, при этом наиболее значимые отличия у больных с РА, установлены для клеток памяти как среди Т-хелперных, так и среди цитотоксических Т клеток: количество рецепторов 2 типа на данных субпопуляциях у пациентов с РА превышало таковое у здоровых. При этом наблюдается тенденция к снижению количества рецепторов 2 типа и увеличению рецептора 1 типа по большинству субпопуляций. Сравнение ко-экспрессии рецепторов к TNF α 1 и 2 типов у пациентов с обострением РА и после прохождения курса терапии, позволило оценить влияние проводимой терапии на ко-экспрессию рецепторов, которое характеризовалось повышением процента дубль-отрицательных клеток. Проведение математического анализа полученных данных показало, что экспрессия рецепторов, которые значимо различаются у пациентов с РА коррелирует с высокой активностью заболевания по сравнению со здоровыми донорами.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные в ходе работы данные позволяют оценить особенности экспрессии мембраносвязанных рецепторов к TNF α на различных субпопуляциях иммунокомпетентных клеток, что способствует расширению современных представлений о возможном влиянии рецепторов на функциональный ответ клетки в норме и при ревматоидном артрите, а как же обосновывают перспективы их исследования в качестве маркеров прогноза или для разработки терапевтических подходов.

Показано, что основные исследованные популяции (Т клетки, В клетки и моноциты) у здоровых доноров значимо различаются по ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF α . При этом субпопуляции Т клеток варьируют по сочетанной экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF α , что может приводить к различному уровню и типу ответа клеток на цитокин. Наличие рецепторов обоих типов на поверхности клеток ассоциировано с повышением плотности экспрессии рецепторов обоих типов на них.

При проведении сравнительной оценки параметров экспрессии рецепторов к TNF α у здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом

было показано, что основные исследованные популяции (моноциты, В клетки, общий пул Т клеток и 2 основных субкласса (Т-хелперы и цитотоксические Т-клетки)) значимо различаются по ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF α как между собой, так и по сравнению с показателями здоровых доноров. Установлено, что моноциты, активированные Т-хелперные клетки и Т-регуляторные клетки экспрессируют наибольшее количество рецепторов обоих типов среди всех исследованных субпопуляций у пациентов с РА. Кроме того, для пациентов с РА среди Т-регуляторных клеток и Т-хелперных клеток памяти подавляющее большинство клеток (более 95%) экспрессирует хотя бы один из типов рецепторов к TNF, а наибольший процент дубль-позитивных клеток характерен для активированных цитотоксических Т-лимфоцитов.

При сравнении показателей ко-экспрессии между пациентами с обострением РА и после коррекции терапии выявлено, что для популяции моноцитов, субпопуляций активированных хелперных и цитотоксических Т лимфоцитов, а также цитотоксических клеток памяти характерно увеличение процента дубль-отрицательных клеток. Это свидетельствует о влиянии проводимой терапии на ко-экспрессию рецепторов.

Практическая значимость работы заключается в построении диагностической модели для ревматоидного артрита. Модель включает в себя процент TNFR1+TNFR2- клеток среди наивных Т-хелперных клеток, количество рецепторов 1 типа на Т-хелперных клетках памяти и количество рецепторов 2 типа на CD3+ Т клетках позволяет дифференцировать пациентов с РА с чувствительностью 93% и специфичностью 90%. Получен патент [RU2735738C1](#) от 06.11.2020

Методология и методы исследования

В работе использован дизайн проспективного когортного обсервационного исследования, в которое были включены 64 пациента с РА и 46 условно-здоровых доноров. При поступлении у пациентов оценивали анамнестические данные, базисную терапию, клинические и лабораторные показатели, проводили оценку ко-экспрессии и количества рецепторов 1 и 2 типа на 12 субпопуляциях моноклеарных клеток методом проточной цитометрии. Далее в процессе наблюдения у всех пациентов оценивалась проводимая терапия в стационаре, клинические и лабораторные показатели и проводилось определение ко-экспрессии и количества рецепторов 1 и 2 типа на 12 субпопуляциях моноклеарных клеток методом проточной цитометрии на 7 сутки от поступления пациента в стационар. Для исследования взаимосвязи ко-экспрессии и количества рецепторов 1 и 2 типа с клиническими проявлениями РА были выполнены однофакторный и многофакторный регрессионный анализ и математическое моделирование.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Основные субпопуляции иммунокомпетентных клеток различаются по ко-экспрессии и среднему числу рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на клетках, что показывает различия механизмов экспрессии рецепторов в зависимости от субпопуляции.

2. При ревматоидном артрите происходит изменение соотношения

экспрессируемых рецепторов 1 и 2 типа к TNF α среди субпопуляций иммунокомпетентных клеток по сравнению со здоровыми донорами. Показатели экспрессии и ко-экспрессии ассоциированы с клиническими и лабораторными данными, а также изменяются при проведении патогенетической терапии РА, что показывает вовлеченность рецепторов в патогенез РА.

Степень достоверности, апробация результатов и личное участие автора

Достоверность полученных результатов подтверждается репрезентативной выборкой, использованием современных иммунологических методов исследования и методов статистической обработки полученных данных. Основные положения работы доложены и обсуждены на международных и российских конгрессах. Автор лично участвовал в проведении иммунологических исследований и обработке полученных данных. Результаты исследований, представленных в работе, получены при непосредственном участии автора на базе лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ и ревматологического отделения клиники иммунопатологии НИИФКИ.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 6 статей в изданиях, рекомендованных ВАК, индексируемых в базах данных Web of Science/Scopus. Получен 1 патент.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, восьми глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Материал изложен на 155 страницах машинописного текста, включающего 20 таблиц и 28 рисунков. Работа выполнена на базе лаборатории молекулярной иммунологии и отделения ревматологии клиники иммунопатологии НИИФКИ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлась периферическая кровь здоровых доноров и больных ревматоидным артритом (РА), находившихся на госпитализации в ревматологическом отделении клиники иммунопатологии НИИФКИ, г. Новосибирск.

В исследование были включены 64 пациента с ревматоидным артритом в возрасте 22-83 год (медиана (ИКР) 55 (45: 65) лет), среди которых большинство женщин – 54 (85.4%). Группу пациентов, у которых оценивали влияние патогенетической терапии составили 15 человек с РА после проведения курса терапии ритуксимабом в возрасте 22-72 лет (медиана(ИКР) 55(44:63,5) года), среди которых 3 мужчин (20%) и 12 женщин (80%). В контрольную группу вошли 46 условно-здоровых доноров в возрасте 18-77 лет (медиана (ИКР) 36.5 (30: 54) года), среди которых 16 мужчин (34.8%) и 30 (65.2%) женщин.

Кровь для исследования забиралась у пациентов в стадии обострения заболевания и после проведенного лечения ритуксимабом на 7 сутки от

госпитализации.

Исследование проводилось с добровольного информированного согласия всех больных и условно-здоровых доноров; одобрено локальным этическим комитетом (протокол ФГБНУ НИИФКИ 287 от 16.08.2016.).



21

Определение ко –экспрессии рецепторов

Для оценки ко-экспрессии осуществлялось определение процента дубль-отрицательных клеток, дубль-положительных клеток, TNFR1 положительных клеток и TNFR2 положительных клеток среди субпопуляции при помощи программного обеспечения BDFACSDiva™ Software для каждой из 12 исследуемых субпопуляций.

Определение среднего числа рецепторов на клетках различных субпопуляций

Определение среднего числа TNFR1 и TNFR2 осуществляется путем проведения анализа частиц BD QuantiBRITE PE (фикоэритрина) (BD, кат. номер 340495) для перевода значений интенсивности флуоресценции по каналу PE в число молекул PE. Оценка среднего количества рецепторов TNFR1 на клетках субпопуляции и среднего количества рецепторов TNFR2 на клетках субпопуляции проводится при тех же параметрах вольтажа ФЭУ по PE-детектору, что и при проведении анализа калибровочных бус, это позволяет нам конвертировать значения интенсивности флуоресценции в число PE молекул на клетку. Далее, число PE молекул на клетку можно перевести в число молекул антител на клетку с помощью известного соотношения молекул PE на антитело, равное 1:1, согласно инструкции производителя [Lopatnikova 2013].

По результатам анализа бус строился график зависимости значений логарифма числа молекул PE от значений логарифма интенсивности флуоресценции и устанавливалась математическая линейная зависимость логарифмических значений. Количество молекул PE на частицах было взято из инструкции производителя. По полученной формуле с использованием

значений интенсивности флюоресценции для каждой из клеточных линий была определена количественная экспрессия рецепторов TNFR1 и TNFR2.

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 – 4). Для сравнения показателей пациентов до и после проведения терапии использовался критерий Вилкоксона. Корреляции между исследуемыми параметрами устанавливались с использованием коэффициента корреляции Спирмана (при $p \leq 0,05$).

Параметрическая логистическая регрессионная модель построена на основании различий в показателях экспрессии между здоровыми донорами и пациентами с РА, и определены параметры модели [Kuhn 2013] с использованием свободно распространяемого программного инструментария с R-пакетами версии 3.3.1 с алгоритмами построения регрессионных моделей и формул расчета вероятности прогнозируемого события [McCullagh 1989].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку провоспалительный цитокин TNF α реализует через свои рецепторы самый широкий спектр эффектов как на местном, так и на системном уровне, которые проявляются в норме и при развитии патологии, представляется перспективным изучение совместной экспрессии и количества рецепторов на иммунокомпетентных клетках в норме и при РА.

Ко-экспрессия и среднее количество рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на клетках основных популяций МНК у здоровых доноров

Для основных популяций иммунных клеток (рисунок 1) выявлены статистически значимые отличия по ко-экспрессии рецепторов. По проценту дубль-негативных клеток различались Т-лимфоциты (57,3%) по сравнению с В-лимфоцитами (28,9% ($p=0,0027$)) и моноцитами (15,6% ($p < 0,0001$)). По проценту дубль-позитивных клеток различались Т-лимфоциты (3,4%) и моноциты (21,2% ($p=0,002$)). По проценту клеток экспрессирующих только TNFR2 различались Т-лимфоциты (35,8%) по сравнению с моноцитами (57,3% ($p=0,003$)) и В-лимфоцитами (57,8% ($p=0,0014$)).

Для всех исследованных популяций характерен очень малый процент клеток, экспрессирующих только рецептор 1 типа. Наибольший процент дубль-позитивных клеток характерен для В-лимфоцитов (21,7 %). Наибольший процент дубль-негативных клеток наблюдался среди общего пула Т лимфоцитов (57,3 %). Процент клеток, экспрессирующих только рецепторы 2

типа, во всех исследуемых популяциях был высоким и наибольшее значение отмечалось для моноцитов (57,8%).

Исследованные популяции различались и по количеству рецепторов 1 и 2 типа на клетках (рисунок 2). Отличия по TNFR1 были выявлены между популяциями Т лимфоцитов и моноцитов (743 и 4107 $p < 0.05$). Все популяции статистически значимо различались по TNFR2.

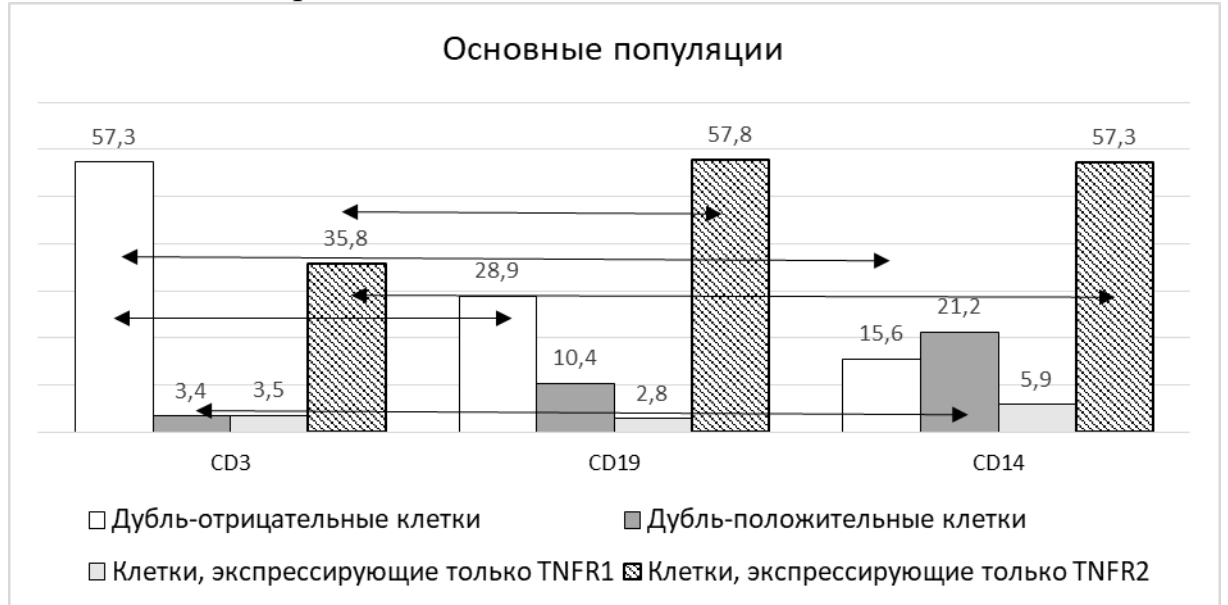


Рисунок 1. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на основных популяциях иммунных клеток у здоровых доноров (n= 43). Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан. Стрелками указана статистическая значимость отличий между группами ($p < 0,05$).

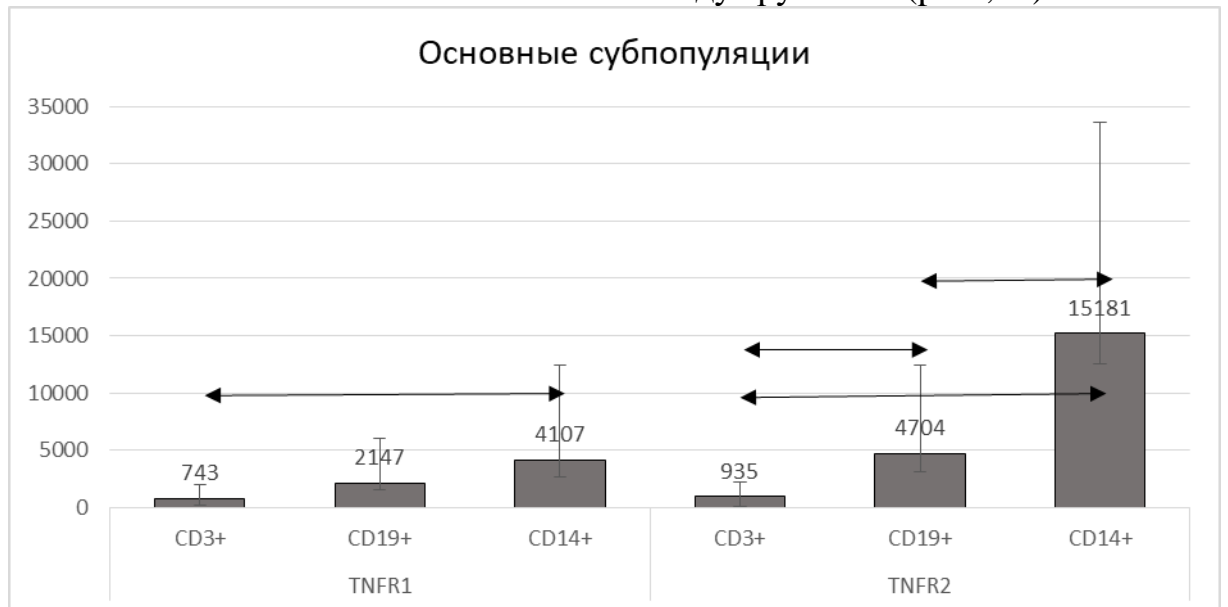


Рисунок 2. Среднее количество рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на основных популяциях иммунных клеток у здоровых доноров (n=43). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Стрелками указана статистическая значимость отличий между группами ($p < 0,05$).

При изучении ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа на основных популяциях иммунокомпетентных клеток было выявлено, что для всех

исследованных популяций характерен очень малый процент клеток, экспрессирующих только рецептор 1 типа. Наибольший процент дубль-позитивных клеток характерен для В-лимфоцитов. Наибольший процент дубль-негативных клеток наблюдался среди общего пула Т лимфоцитов. Процент клеток, экспрессирующих только рецепторы 2 типа, во всех исследуемых популяциях был высоким и наибольшее значение отмечалось для моноцитов. А при оценке среднего количества рецепторов на клетках каждой из субпопуляции было выявлено, что все исследованные популяции значительно различались и по количеству рецепторов 1 и 2 типа на клетках. Отличия по TNFR1 были выявлены между популяциями Т лимфоцитов и моноцитов. Все популяции достоверно различались по TNFR2.

Для моноцитов и В лимфоцитов характерно сочетание высокого уровня экспрессии рецептора 2 типа с высоким процентом клеток, несущих только рецептор 2 типа, а также высокий уровень экспрессии рецепторов 1 типа сочетался с большим процентом TNFR1+ клеток.

Поскольку, эффективность действия цитокина зависит от количества рецепторов на поверхности клеток, и теоретически может существовать определенное пороговое число рецепторов, влияющее на вероятность связывания цитокина с рецептором и проведения сигнала в клетку полученные нами данные свидетельствуют о том, что основные популяции могут иметь различный пороговый уровень плотности экспрессии рецепторов.

Изученные популяции характеризуются значительной гетерогенностью по экспрессии рецепторов, а входящие в их состав субпопуляции различаются по функциям, выполняемым в организме, что должно иметь отражение в уровнях экспрессии и ко-экспрессии рецепторов. В связи с этим, было решено исследовать субпопуляции CD4+ и CD8+ лимфоцитов по ко-экспрессии рецепторов к TNF α , а также рассчитать среднее количество рецепторов на клетках у здоровых доноров, что позволило оценить вариабельность отдельных субпопуляций клеток и их потенциальную возможность данных клеток по-разному отвечать на связывание лиганда.

Ко-экспрессия и среднее количество рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на клетках хелперных и регуляторных субпопуляций у здоровых доноров

Субпопуляции CD4+ клеток различались по сочетанной экспрессии рецепторов к TNF α (рисунок 3). По проценту дубль-негативных клеток достоверно различалась общая популяция CD4+ (38,9%) клеток по сравнению с активированными Т-хелперными клетками (9,6% ($p=0,0066$)), Т хелперными клетками памяти (1,4% ($p < 0,0001$)) и регуляторными Т-клетками (3,2% ($p < 0,0001$)). Активированные Т-хелперные клетки (9,6%) отличались от наивных Т-хелперных клеток (63,3% ($p < 0,0001$)), а наивные (63,3%) от Т-хелперных клеток памяти (1,4% ($p < 0,0001$)) и регуляторных Т-клеток (3,2% ($p < 0,0001$)).

По проценту TNFR2+ клеток отличалась общая CD4+ субпопуляция (52,5%) по сравнению с наивными Т-хелперными клетками (30,7% ($p= 0,0194$)), Т-хелперными клетками памяти (93,3% ($p < 0,0001$)) и регуляторными Т-

клетками (85,1% ($p < 0,0001$)). Наивные Т-хелперные клетки (30,7%) отличались от активированных (76,4% ($p < 0,0001$)), Т-хелперных клеток памяти (93,3% ($p < 0,0001$)) и регуляторных Т-клеток (85,1% ($p < 0,0001$)).

По количеству рецепторов (рисунок 4) на клетках статистически значимые отличия были выявлены для первого типа рецептора в субпопуляции Т хелперных клеток памяти (5575), по сравнению с регуляторными Т –клетками (1253 $p = 0,036$) и наивными Т-хелперными клетками (918 ($p = 0,019$)). По количеству рецептора 2 типа отличия были между Т хелперных клеток памяти (4601) и регуляторными Т –клетками 1460 ($p = 0,002$)).

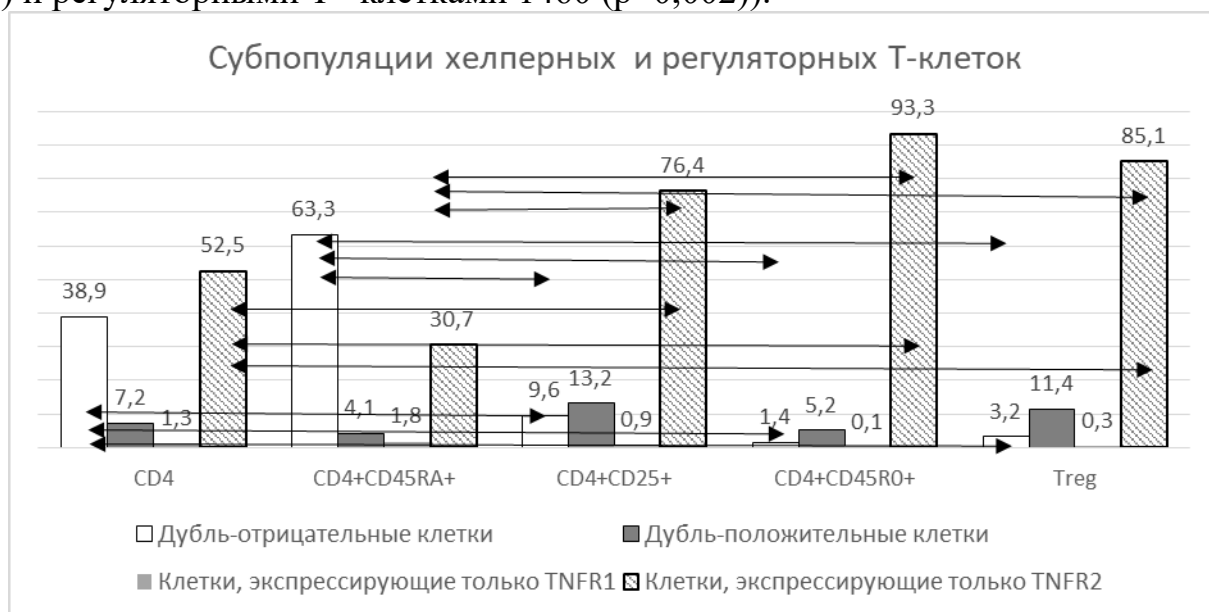


Рисунок 3. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на субпопуляциях хелперных и регуляторных Т-клеток здоровых доноров ($n = 43$). Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан. Стрелками указана статистическая значимость отличий между группами ($p < 0,05$).

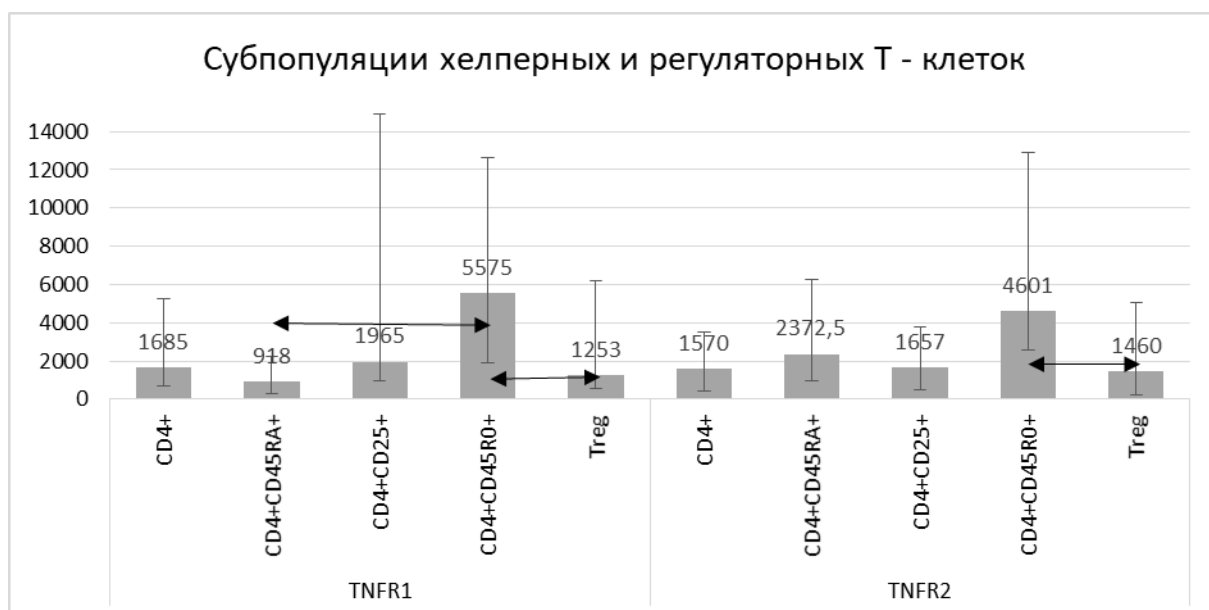


Рисунок 4. Среднее количество рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на субпопуляциях хелперных и регуляторных Т-клеток здоровых доноров ($n = 43$). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха.

Стрелками указана статистическая значимость отличий между группами ($p < 0,05$).

Для всех исследованных популяций был характерен очень малый процент клеток, экспрессирующих только рецептор 1 типа. Практически полное отсутствие клеток, экспрессирующих только рецепторы первого типа, характерно для Т-регуляторных клеток, цитотоксических и Т-регуляторных клеток памяти. Процент дубль-негативных клеток был высоким для субпопуляции наивных Т-хелперных клеток, более низким для субпопуляции активированных Т-хелперных клеток и еще более низким для субпопуляций Т-хелперных клеток памяти и регуляторных Т-клеток. Низкий процент клеток экспрессирующих TNFR2 отмечался для субпопуляции наивных Т-хелперных клеток и высокий для Т-хелперных клеток памяти и регуляторных Т-клеток. Полученные результаты могут подтверждать имеющиеся в литературе данные о роли TNFR2 для дифференцировки субпопуляций CD4⁺ клеток.

По количеству рецепторов как первого, так и второго типа наибольшими значениями отличалась субпопуляция Т-хелперных клеток памяти, что может свидетельствовать о высоком потенциале данной субпопуляции для реализации различных типов ответа на действие цитокина.

Ко-экспрессия и среднее количество рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на клетках цитотоксических субпопуляций у здоровых доноров

Для субпопуляций CD8⁺ (рисунок 5) были характерны статистически значимые отличия по проценту дубль-отрицательных клеток для общей субпопуляции CD8⁺ клеток (34,1%) по сравнению с активированными цитотоксическими клетками (13,7% ($p=0,0002$)) и цитотоксическими клетками памяти (5,2% ($p<0,0001$)). Субпопуляция активированных цитотоксических клеток (13,7%) отличалась от наивных цитотоксических клеток (27,7% ($p=0,0102$)), а субпопуляция наивных цитотоксических клеток (27,7%) отличалась от цитотоксических клеток памяти (5,2% ($p<0,0001$)).

Субпопуляция активированных цитотоксических клеток (27,9%) отличалась по проценту дубль-позитивных клеток по сравнению с общим пулом CD8⁺ клеток (5,7% ($p=0,0004$)) и наивных цитотоксических клеток (7,0% ($p=0,0061$)).

По проценту TNFR2⁺клеток отличалась субпопуляция цитотоксических Т-клеток памяти (80,0%) по сравнению с общим CD8⁺пулом (58,6% ($p<0,0001$)), с активированными цитотоксическими клетками (54,9% ($p<0,0001$)) и наивными цитотоксическими клетками (64,2% ($p=0,0047$)).

Значимые отличия по количеству рецептора 1 типа (рисунок 6) наблюдались между субпопуляциями цитотоксических клеток памяти (1336), наивных (667 ($p=0,0025$)) и активированных цитотоксических клеток (703 ($p=0,016$)).

По количеству рецептора 2 типа также различалась субпопуляция цитотоксических клеток памяти (2543,5) по сравнению с общей популяцией CD8⁺клеток (1092 ($p=0,0011$)).

Для субпопуляции цитотоксических клеток памяти характерно сочетание

самого высокого процента клеток экспрессирующих только TNFR2 и высокого количества рецептора 2 типа на клетках по сравнению с остальными CD8+ субпопуляциями

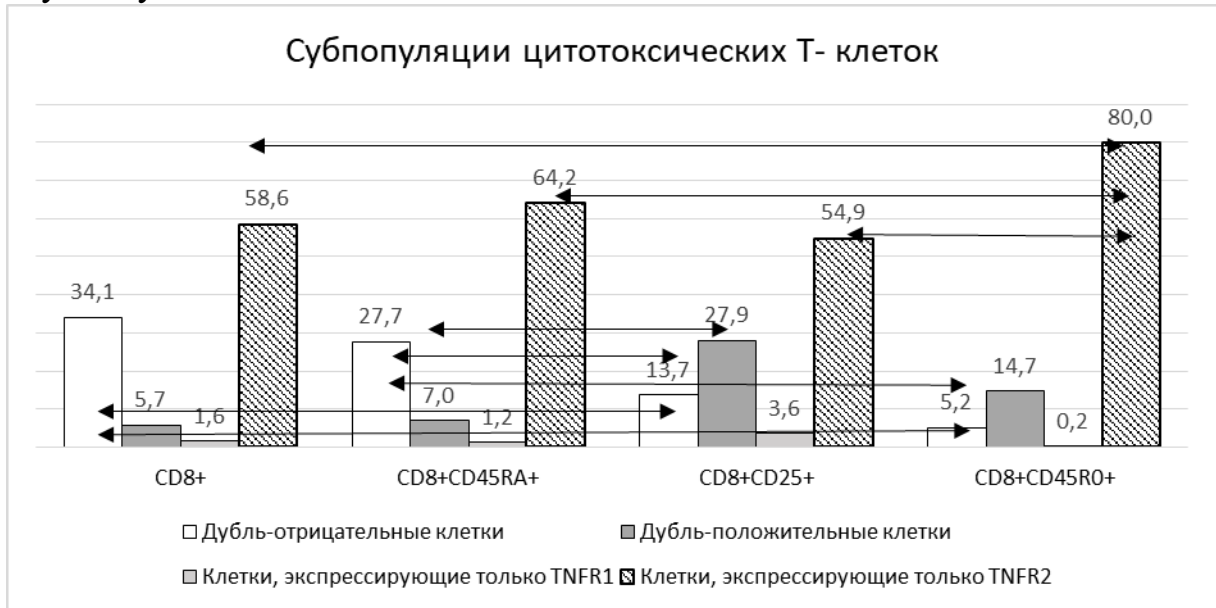


Рисунок 5. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на субпопуляциях цитотоксических Т-клеток здоровых доноров (n=43). Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан. Стрелками указана статистическая значимость отличий между группами (p < 0,05).

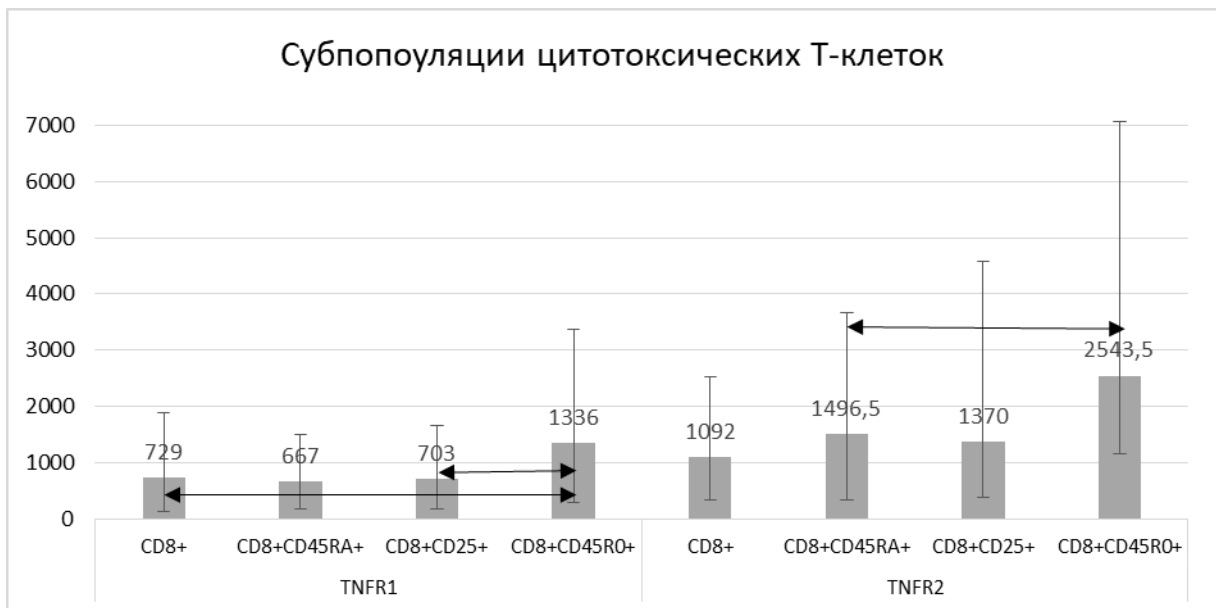


Рисунок 6. Среднее количество рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на субпопуляциях цитотоксических Т-клеток здоровых доноров (n=43). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Стрелками указана статистическая значимость отличий между группами (p < 0,05).

При анализе ко-экспрессии рецепторов среди субпопуляций CD8+ лимфоцитов, наблюдалась сходная картина по дубль-негативным клеткам, процент которых снижался в зависимости от степени дифференцировки и был самым высоким для субпопуляции наивных цитотоксических клеток и самым

низким для цитотоксических клеток памяти. Наблюдаемый для всех субпопуляций высокий уровень экспрессии TNFR2, подтверждает принимаемое активное участие этого рецептора в регуляции дифференцировки и функциональной активности CD8+ лимфоцитов. Активация CD8 + Т-клеток приводит к щеддингу и альтернативному сплайсингу TNFR2 с сопутствующим снижением экспрессии мембраносвязанного TNFR2 и увеличением уровня растворимого TNFR2, что приводит к снижению чувствительности активированных CD8 +Т-клеток к действию TNF-а. Кроме того, растворимый TNFR2 может связывать TNF-а для регулирования действия цитокина, что является важным как в норме, так и при развитии различных патологических процессов.

В исследованиях показано, что передача сигналов TNF через TNFR2, а не TNFR1, непосредственно костимулирует TCR-опосредованную активацию Т-клеток, а также было обнаружено, что сигналы TNFR2, снижают пороговый уровень передачи сигналов TCR, необходимый для активации Т-клеток. В соответствии с этим, TNFR2 рассматривается в качестве ко-стимулятора.

При проведенном нами сравнении хелперной и цитотоксической субпопуляций Т лимфоцитов, обе субпопуляции характеризовались высокой плотностью рецепторов 1 и 2 типа. Наличие рецепторов обоих типов на поверхности клеток ассоциировано с повышением плотности экспрессии рецепторов обоих типов на них. Высокая плотность экспрессии рецепторов может определять тип и интенсивность клеточных эффектов, а поскольку для данного типа клеток характерен большой процент клеток экспрессирующих рецепторы и большое количество рецепторов на клетках, то можно ожидать, что данные субпопуляции будут реализовывать различный ответ на действие TNF α .

Сравнение ко-экспрессии и среднего количества рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на клетках основных популяций и субпопуляций МНК у здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом.

Патогенез РА тесно связан с различными иммунными клетками, и каждый тип клеток вносит свой вклад в развитие данного заболевания. Продукция цитокинов, происходящая из многочисленных популяций синовиальных клеток, играет центральную роль в патогенезе РА. TNF- α является одним из таких цитокинов и играет фундаментальную роль через активацию экспрессии цитокинов и хемокинов, экспрессию молекул адгезии эндотелиальных клеток, защиту синовиальных фибробластов, стимуляцию ангиогенеза, подавление регуляторных Т-клеток и индукцию боли. Центральная роль этого цитокина неоднократно подтверждалась успешной терапевтической блокадой мембраны и растворимого TNF- α у пациентов с РА. Эти данные послужили предпосылкой для оценки экспрессии и ко-экспрессии рецепторов TNF на различных субпопуляциях иммунных клеток, которые активно вовлечены в патогенез ревматоидного артрита (таблица 1).

В результате проведенного нами исследования было установлено, что у пациентов с РА картина распределения рецепторов к TNF на

иммунокомпетентных клетках отличается от здоровых доноров. При оценке ко-экспрессии рецепторов на основных популяциях иммунных клеток было выявлено, что наиболее выраженные различия по проценту клеток с различными типами экспрессии рецепторов были выявлены для популяции В-лимфоцитов.

Таблица 1. Сравнение ко-экспрессии и среднего количества рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на клетках основных популяций и субпопуляций МНК у пациентов с ревматоидным артритом (n=64) по сравнению со здоровыми донорами (n=43)

Стрелками указана статистическая значимость отличий между популяциями (p < 0,05).

	% Дубль- негативные	% Дубль- позитивные	% TNFR1	% TNFR2	N TNFR1	N TNFR2
В-лимфоциты	p=0,0045 \uparrow 17,6/41,2% \uparrow	p>0,05 2,2/12,5%	p<0,0001 \uparrow 11,5/18,7% \uparrow	p<0,0001 \downarrow 68,7/27,7% \downarrow	p>0,05 2142/820	p<0,033 \downarrow 4704/2056 \downarrow
Т-лимфоциты	p>0,05 52,8/45%	p>0,05 1,2/8,6%	p=0,0042 \uparrow 3,5/9,1% \uparrow	p>0,05 42,5/37,3	p>0,05 743/754	p<0,02 \uparrow 935/1404 \uparrow
Регуляторные Т-клетки	p>0,05 3,2/7,7%	p=0,018 \uparrow 0,3/24,4% \uparrow	p<0,002 11,4/2%	p<0,001 \downarrow 85,1/65,9% \downarrow	p<0,001 1253/764	p>0,05 1460/2885
Хелперные клетки памяти	p=0,0018 \uparrow 1,4/52,3% \uparrow	p<0,005 \uparrow 0,1/22,2% \uparrow	p=0,0012 \uparrow 5,2/17,6% \uparrow	p<0,0001 \downarrow 93,3/7,9% \downarrow	p<0,001 \downarrow 5575/818 \downarrow	p=0,047 \uparrow 4601/23392 \uparrow
Активированные хелперные клетки	p>0,05 9,6/13,3%	p<0,001 \uparrow 0,8/28,5% \uparrow	p<0,001 \downarrow 13,2/2,9% \downarrow	p<0,0021 \downarrow 76,4/55,3% \downarrow	p=0,005 \downarrow 1965/730 \downarrow	p>0,05 1657/3238
Наивные хелперные клетки	p=0,003 \uparrow 63,3/41,9% \uparrow	p=0,011 \downarrow 1,8/13,4% \downarrow	p>0,05 4,2/10,3%	p>0,05 30,7/34,4%	p=0,005 \downarrow 918/469 \downarrow	p=0,009 \downarrow 2372/1209 \downarrow
Цитотоксические клетки памяти	p>0,05 5,2/4,8%	p<0,001 \uparrow 0,2/29,9% \uparrow	p=0,002 \downarrow 14,7/0,4% \downarrow	p<0,001 \downarrow 64,9/80% \downarrow	p=0,048 \downarrow 667/443 \downarrow	p=0,008 2543/11915
Активированные цитотоксические клетки	p>0,05 27,6/13,9%	p<0,001 \uparrow 1,2/28,2% \uparrow	p>0,05 7/11,6%	p>0,05 64,2/46,3%	p>0,05 703/523	p>0,05 1370/1628
Наивные цитотоксические клетки	p>0,05 13,7/21,2%	p>0,05 3,6/13,4%	p<0,001 \uparrow 27,9/54,4% \uparrow	p<0,001 \downarrow 54,8/11% \downarrow	p>0,05 1336/787	p>0,05 1496/1220

Для В-лимфоцитов было выявлено, что процент дубль-негативных клеток был выше у здоровых доноров по сравнению с пациентами с РА. Процент TNFR1+ клеток у здоровых доноров был ниже по сравнению с больными РА. Процент клеток, экспрессирующих только TNFR2 был выше у здоровых доноров по сравнению с больными РА. Снижение экспрессии рецепторов 2 типа на В клетках у пациентов с РА может быть ассоциировано с повышением их супрессорной активности. Данные изменения в случае В клеток приводят к снижению чувствительности В клеток к TNF и эффектам, опосредуемым рецепторами 2 типа

Популяция Т-лимфоцитов значимо различалась по проценту TNFR1+ клеток, который был выше у пациентов с РА. При оценке количества рецепторов 1 и 2 типа на клетках основных популяций иммунных клеток значимые различия по уровню экспрессии рецептора 2 типа выявлены для общего пула Т лимфоцитов и В лимфоцитов. Популяции моноцитов, Т и В

лимфоцитов играют основную роль в патогенезе РА, полученные различия по ко-экспрессии рецепторов между больными РА и здоровыми донорами подтверждают этот факт, поскольку связаны непосредственно с влиянием на дифференцировку, пролиферацию и функциональный ответ этих клеток.

При сравнении ко-экспрессии хелперных и цитотоксических клеток пациентов с РА и здоровых доноров было выявлено различное соотношение по типам ко-экспрессии для разных субпопуляций. Для субпопуляций Т-хелперных клеток памяти и регуляторных Т-клеток были характерно различное соотношение практически по всем типам экспрессии рецепторов. Данный показатель отражает общую чувствительность клеток к воздействию цитокина, и, соответственно, способность клеток реагировать при изменении концентрации TNF.

Функциональная активность Т-регуляторных клеток и их участие в воспалительных процессах скомпрометированы при РА [Ehrenstein 2004]. Ряд авторов связывает данные изменения с действием TNF, в результате которого ингибируется супрессорная функция Т регуляторных клеток, и данный процесс ассоциирован с экспрессией рецепторов к TNF 2 типа. Мы наблюдаем, что при РА происходит изменение соотношения данных рецепторов в субпопуляции: увеличение процента TNFR2+ клеток при снижении процента дубль-позитивных клеток. При этом среднее количество рецепторов 2 типа на клетках почти в 2 раза выше, чем у здоровых доноров.

У Т-хелперных клеток памяти больных РА процент TNFR2-позитивных клеток (и вообще клеток с рецепторами к TNF) резко снижен по сравнению со здоровыми донорами. При этом, из всех исследованных субпопуляций они имеют самую высокую количественную экспрессию рецепторов 2 типа. Такое резкое повышение плотности экспрессии рецепторов на субпопуляции Т-хелперных клеток памяти у больных РА связано с ролью данного типа рецептора в дифференцировке субпопуляций Т клеток.

При оценке количества рецепторов на субпопуляциях CD4+ клеток у пациентов с РА были выявлены более низкие уровни экспрессии рецепторов 1 типа по всем субпопуляциям и более низкие уровни экспрессии рецепторов 2 типа для субпопуляций наивных Т хелперных клеток и Т хелперных клеток памяти.

В случае же субпопуляций цитотоксических Т клеток снижается процент позитивных клеток, в то время как количество рецепторов на них не меняется или даже несколько возрастает; в случае цитотоксических Т клеток, можно предположить, что изменение соотношения рецепторов и увеличение их количества является компенсаторным механизмом.

Для наивных цитотоксических Т клеток продемонстрирован интересный вариант изменения соотношения рецепторов по сравнению со здоровыми донорами: процент клеток с рецепторами 1 типа увеличен, с процентом клеток с рецепторами 2 типа – напротив, снижен. Поскольку рецепторы 1 и 2 типа преимущественно реализуют различные функции, данные изменения могут свидетельствовать об изменении характера реагирования данных клеток на

цитокин, и, как следствие, изменение их функциональной активности при ревматоидной артрите.

По количественной экспрессии рецепторов наиболее выраженные отличия были установлены для клеток памяти среди цитотоксических Т клеток: количество рецепторов 2 типа на данных субпопуляциях у пациентов с РА превышало таковое у здоровых в 4.7 раз. Для рецептора 1 типа значимые различия отмечались среди общего пула CD8⁺ клеток у здоровых по сравнению с больными РА.

Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на иммунокомпетентных клетках у пациентов с обострением РА, имеющих различную степень активности, и здоровых доноров

Для более детальной оценки ко-экспрессии рецепторов пациенты с ревматоидным артритом в стадии обострения были разделены на группы по степени активности заболевания.

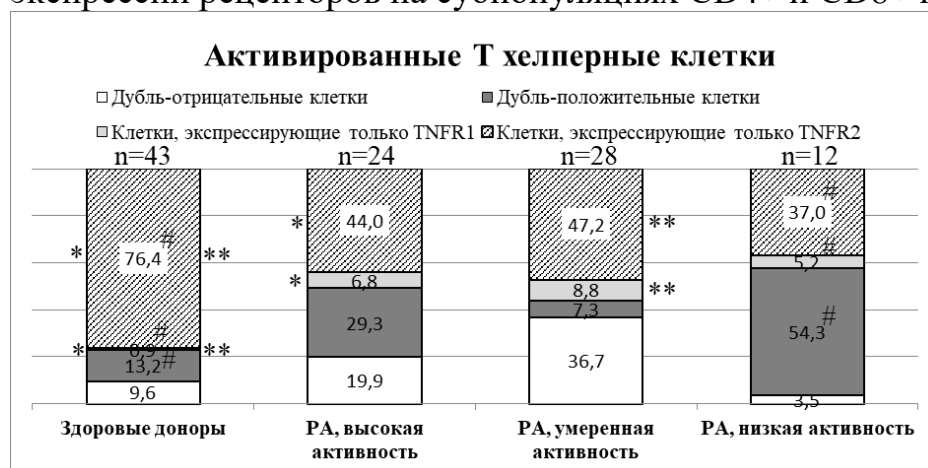
При оценке ко-экспрессии рецепторов для популяции моноцитов для группы пациентов с низкой активностью РА характерен более высокий процент TNFR1⁺ клеток по сравнению со здоровыми донорами.

Для популяции В-лимфоцитов был характерен низкий процент клеток экспрессирующих рецепторы 1 и высокий процент TNFR2 клеток во всех группах пациентов с РА по сравнению со здоровыми донорами.

Популяция Т-лимфоцитов характеризовалась более высоким процентом TNFR1⁺ клеток, по сравнению со здоровыми донорами.

В целом, при оценке показателей ко-экспрессии у больных РА с обострением, имеющих различную степень активности заболевания, и здоровых доноров были выявлены отличия для всех основных популяций, при этом изменения носили разный характер для каждой популяции, что говорит о взаимосвязи ко-экспрессии рецепторов со степенью активности РА, при этом предполагая разные возможности данных клеток реагировать на действие цитокина.

Однако, основные популяции недостаточно полно отражают картины изменения соотношения рецепторов у больных РА по сравнению со здоровыми донорами, поэтому нами были исследованы показатели экспрессии и ко-экспрессии рецепторов на субпопуляциях CD4⁺ и CD8⁺ клеток.



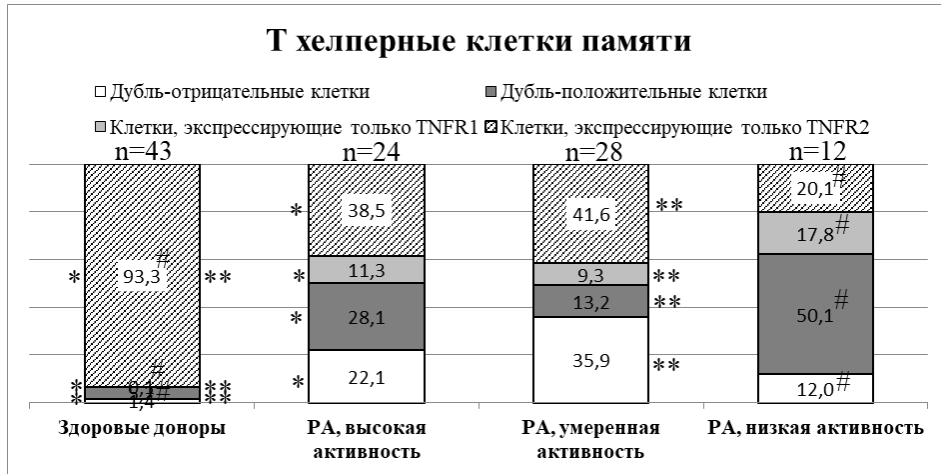


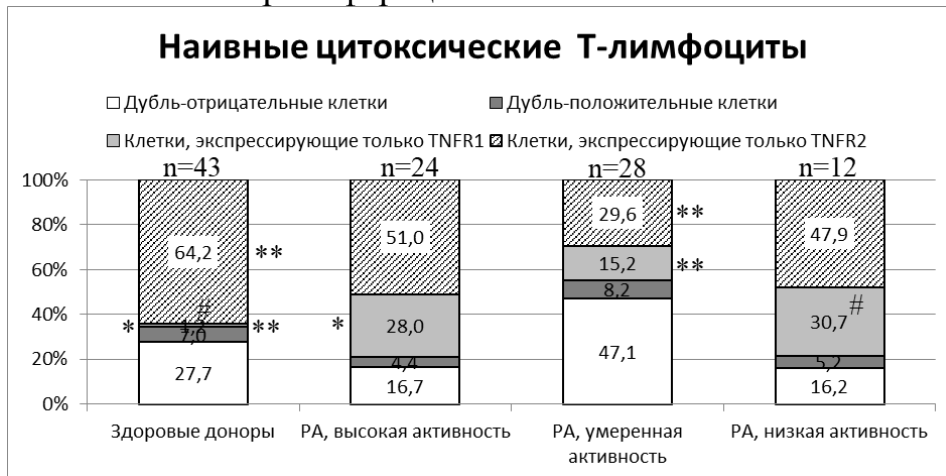
Рисунок 7. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на субпопуляциях хелперных и регуляторных клеток пациентов с обострением РА, имеющих различную степень активности, и здоровых доноров.

*- указана статистическая значимость отличий между группой пациентов с высокой активностью РА и здоровыми донорами ($p < 0,05$).

** - указана статистическая значимость отличий между группой пациентов с умеренной активностью РА и здоровыми донорами ($p < 0,05$).

- указана статистическая значимость отличий между группой с низкой активностью РА и здоровыми донорами ($p < 0,05$).

Для субпопуляции хелперных клеток (рисунок 7) наибольшей степенью изменения соотношения рецепторов характеризовались пациенты с низкой степенью активности по сравнению со здоровыми донорами и пациентами с высокой и умеренной степенью активности, при этом отмечался почти вдвое ниже процент клеток экспрессирующих только 2 тип рецептора и более высокий процент дубль-позитивных клеток. Эти изменения наблюдались для субпопуляций активированных Т-хелперных клеток, Т-хелперных клеток памяти и регуляторных Т-клеток. Таким образом, можно предположить, что данные клетки у пациентов с низкой степенью активности имеют сниженную способность к пролиферации.



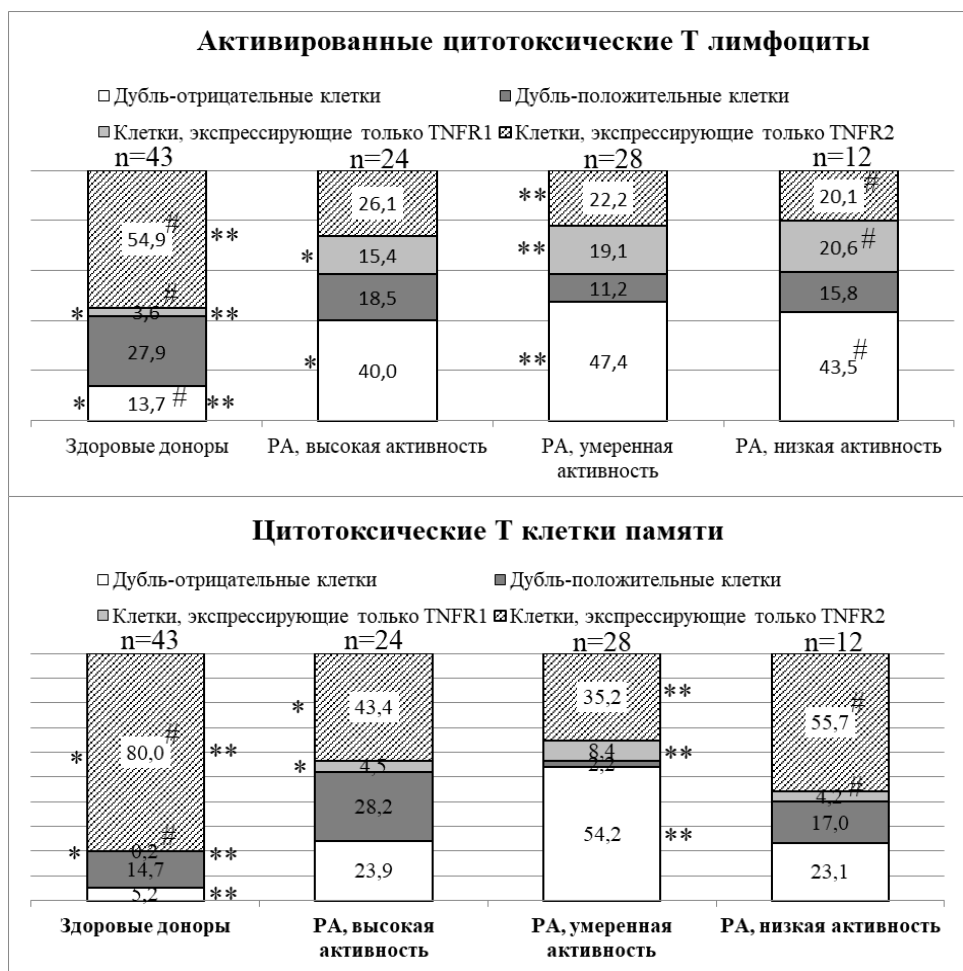


Рисунок 8. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF α на субпопуляциях цитотоксических Т -клеток у пациентов с обострением РА, имеющих различную степень активности, и здоровых доноров.

*- указана статистическая значимость отличий между группой пациентов с высокой активностью РА и здоровыми донорами ($p < 0,05$).

** - указана статистическая значимость отличий между группой пациентов с умеренной активностью РА и здоровыми донорами ($p < 0,05$).

- указана статистическая значимость отличий между группой с низкой активностью РА и здоровыми донорами ($p < 0,05$).

При оценке показателей ко-экспрессии у больных РА с обострением, имеющих различную степень активности заболевания, и здоровых доноров для субпопуляций цитотоксических клеток (рисунок 8) было выявлено, что субпопуляция цитотоксических клеток памяти характеризовалась наиболее выраженным изменением соотношения процента клеток в обследованных группах. Процент дубль-отрицательных клеток был выше в группе пациентов с умеренной активностью РА по сравнению со здоровыми донорами. Во всех группах больных РА наблюдался высокий процент клеток экспрессирующих только рецептор 1 типа по сравнению со здоровыми донорами, где процент клеток был минимальным. Во всех группах с РА отмечался более низкий процент TNFR2+ клеток.

Сравнение ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF α среди на иммунокомпетентных клетках у пациентов с обострением РА и

пациентов, прошедших терапию ритуксимабом

При сравнении показателей ко-экспрессии между пациентами с обострением РА и после терапии ритуксимабом выявлено, что для популяции моноцитов, субпопуляций активированных хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов, а также цитотоксических клеток памяти характерно увеличение процента дубль отрицательных клеток. Это свидетельствует о влиянии проводимой терапии на ко-экспрессию рецепторов

Корреляционный анализ основных популяций иммунных клеток

В работе были исследованы ассоциации между показателями тяжести и активности заболевания (индекс DAS-28, давность заболевания, рентгенологическая стадия, стадия активности, уровни РФ, АЦЦП и С-РБ, наличие системных проявлений и эрозивного артрита) и параметрами экспрессии рецепторов к TNF α на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток. Выявлен ряд корреляционных взаимосвязей: ревматоидный фактор положительно коррелировал с процентом дубль-позитивных TNFR1+TNFR2+клеток, количеством рецепторов 2 типа среди Т-хелперных клеток памяти, уровень С-реактивного белка положительно коррелировал с процентом клеток, несущих только рецептор 1 типа, среди субпопуляций памяти как хелперных, так и цитотоксических; наличие системных проявлений коррелирует с количеством рецепторов как 1, так и 2 типа на цитотоксических клетках памяти и моноцитах, длительность течения ревматоидного артрита коррелировала с процентом клеток экспрессирующих только TNFR1 среди В-лимфоцитов, цитотоксических клеток. По количеству рецепторов как 1, так и 2 типа наблюдалась корреляция среди всех цитотоксических клеток и регуляторных Т-клеток (уровни корреляции от 0,77 до 0,94). Данные показатели могут иметь диагностическое значение для оценки выраженности воспалительного процесса при РА.

Однофакторный и многофакторный

регрессионный анализ и математическая диагностическая модель

В результате проведенного исследования было получено большое количество различных данных, оценка которых требовала проведения регрессионного анализа для определения их ассоциированности с ревматоидным артритом. Суть регрессионного анализа состоит в нахождении наиболее важных факторов, которые влияют на зависимую переменную. Логистическая регрессия — полезный классический инструмент, который активно используются для построения моделей в медицине и проведения клинических исследований [Дрейпер 1987].

В результате применения данных методов анализа в итоговую многофакторную модель вошли 3 показателя: количество рецепторов TNFR2 на CD3+ Т-лимфоцитах, количество TNFR1 на Т-хелперных клетках памяти (CD4+CD45R0+) и процент TNFR1+клеток среди наивных Т-хелперных клеток (CD4+CD45RA+). Полученная модель имела R²=0.68 (коэффициент детерминации).

Далее были вычислены стандартные коэффициенты регрессии,

необходимые для формулы расчета вероятности РА. В результате полученная модель позволяет дифференцировать пациентов с РА с чувствительностью 93% и специфичностью 90%.

Заключение

Проведенные исследования показали, что плотность экспрессии рецепторов как первого, так и второго типа на дубль-позитивных клетках у здоровых доноров выше по сравнению с экспрессией соответствующих рецепторов на клетках, несущих только один из типов рецепторов. Эти отличия могут свидетельствовать о том, что совместная экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF α обладает взаимоусиливающим эффектом.

Так же было установлено, что у здоровых доноров для всех популяций Т клеток характерен высокий процент клеток несущих рецептор 2 типа, наибольший показатель наблюдался среди клеток памяти (как CD 8+, так и CD 4+).

Для пациентов с ревматоидным артритом характерно изменение соотношения рецепторов по большинству субпопуляций. При этом наблюдается тенденция к снижению количества рецепторов 2 типа и увеличению рецептора 1 типа по большинству субпопуляций. Это может быть обусловлено наличием аутоиммунного процесса. Среди всех популяций наблюдается тенденция к повышению процента дубль-отрицательных клеток.

Среди субпопуляций Т клеток наблюдается сочетание изменений количества как первого, так и второго типа рецепторов, при этом, наиболее значимые отличия у больных с РА, установлены для клеток памяти как среди Т-хелперных, так и среди цитотоксических Т клеток: количество рецепторов 2 типа на данных субпопуляциях у пациентов с РА превышало таковое у здоровых. Полученные результаты отражают роль рецептора 2 типа в дифференцировке Т клеточного звена.

Проведение математического анализа полученных данных показало, что экспрессия рецепторов, которые значимо различаются у пациентов с РА коррелирует с высокой активностью заболевания по сравнению со здоровыми донорами. Проведение однофакторного и многофакторный регрессионного анализа позволило построить диагностическую математическую модель, позволяющую различать показатели здоровых доноров и больных РА с чувствительностью 93% и специфичностью 90%.

ВЫВОДЫ

1. У здоровых доноров среди субпопуляций Т-лимфоцитов наибольшее процентное содержание клеток, экспрессирующих рецептор 2 типа для TNF α наблюдалось среди цитотоксических и хелперных клеток памяти, что сочеталось с высоким средним количеством второго типа рецептора на клетках данных субпопуляций. Процентное содержание клеток, экспрессирующих только 1 тип рецептора было минимальным для этих субпопуляций, но сочеталось с высоким средним количеством рецепторов 1 типа на клетках, что указывает на различия в регуляции экспрессии рецепторов на данных клетках.

2. Среднее число рецепторов как первого, так и второго типа для TNF α на дубль-позитивных клетках всех исследованных субпопуляций выше по сравнению с экспрессией соответствующих рецепторов на клетках, несущих только один из типов рецепторов у здоровых доноров.

3. Для пациентов с ревматоидным артритом характерно более низкое среднее количество рецепторов 1 типа и более высокое - рецептора TNF α 2 типа на всех исследованных субпопуляциях по сравнению с соответствующими показателями здоровых доноров, при этом, наиболее значимые отличия у больных с РА установлены для клеток памяти как среди хелперных, так и среди цитотоксических Т клеток. Это показывает, что при РА на хелперных и цитотоксических клетках памяти изменения экспрессии рецепторов имеют разнонаправленный характер.

4. При сравнении показателей ко-экспрессии рецепторов для TNF α на клетках между пациентами с обострением РА и после прохождения курса терапии выявлено, что для популяции моноцитов, субпопуляций активированных, хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов, а также цитотоксических клеток памяти характерно увеличение процента дубль-негативных клеток. Это свидетельствует о влиянии проводимой терапии на ко-экспрессию рецепторов.

5. Установлено, что показатели экспрессии и ко-экспрессии рецепторов для TNF α , значимо различающиеся у пациентов с РА, коррелируют с клиническими и лабораторными данными, что позволило построить математическую модель диагностики РА на основе объективных лабораторных данных, с чувствительностью 93% и специфичностью 90%.

6. Ко-экспрессия и среднее число рецепторов 1 и 2 типа к TNF α различаются между популяциями моноцитов, Т и В-лимфоцитов и субпопуляциями хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов и регуляторных Т клеток как в норме, так и у пациентов с РА, что указывает на различия в регуляции экспрессии и ко-экспрессии рецепторов для различных субпопуляций.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сенников С.В., Альшевская А.А., Жукова Ю.В., Беломестнова И.А., Караулов А.В., Лопатникова Ю.А. Плотность экспрессии рецепторов к иммунорегуляторным медиаторам как модулирующий компонент биологических эффектов медиаторов на клетку. Часть 1 // Медицинская иммунология. - 2019 – Т.21 - №2 - С. 209-220
2. Сенников С.В., Альшевская А.А., Жукова Ю.В., Беломестнова И.А., Караулов А.В., Лопатникова Ю.А. Плотность экспрессии рецепторов к иммунорегуляторным медиаторам как модулирующий компонент биологических эффектов медиаторов на клетку (ЧАСТЬ 2). // Медицинская иммунология - 2019; - Т.21 - №3 – С.379-396.
3. Альшевская А.А., Беломестнова И.А., Жукова Ю.В., Чумасова О.А., Шкаруба Н.С., Сизиков А.Э., Сенникова Ю.А., Воробьева О.П. Ко-экспрессия рецепторов к фактору некроза опухоли альфа в субпопуляциях т-клеток при ревматоидном артрите // Российский иммунологический журнал - 2019 – Т.22 - №2-2 – С.707-709.
4. Sennikov SV, Alshevskaya AA, Zhukova J, Belomestnova I, Karaulov AV, Lopatnikova JA. Expression Density of Receptors as a Potent Regulator of Cell Function and Property in Health and Pathology // Int Arch Allergy Immunol. – 2019 – Vol.78 - №2 – P.182–191
5. Sennikov S, Alshevskaya A, Zhukova J, Belomestnova I, Karaulov A, Evsegneeva I, Lopatnikova J. Co-expression of membrane-bound TNF-alpha type 1 and 2 receptors differ in the subsets of immunocompetent cells. // Immunol Lett. – 2019 – Vol. 207 – P.1-5.
6. Alshevskaya A, Lopatnikova J, Zhukova J, Chumasova O, Shkaruba N, Sizikov A, Evsegneeva I, Gladkikh V, Karaulov A, Sennikov SV. "Co-expression profile of TNF membrane-bound receptors type 1 and 2 in rheumatoid arthritis on immunocompetent cells subsets" // Int. J. Mol. Sci. – 2020 – Vol,21 -№1 – P.288.
7. Патент RU2735738C1 от 06.11.2020 Способ ранней диагностики ревматоидного артрита С.В. Сенников, А.А Альшевская, Ю.А. Лопатникова, Ю.В. Жукова, Ф.Д. Киреев, А. Э Сизиков, Н.С. Шкаруба, О.А. Чумасова.

Список сокращений

Фактор некроза опухоли- α	TNF α
Рецептор к TNF α 1 типа	TNFR1
Рецептор к TNF α 2 типа	TNFR2
Ревматоидный артрит	РА
Регуляторные Т клеток	Treg
Интерквартильный размах	ИКР