

На правах рукописи



Альшевская Алина Анатольевна

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

14.03.09 –Клиническая иммунология, аллергология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск-2015

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

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор

Сенников Сергей Витальевич

Официальные оппоненты:

Щелкунов Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессора, заведующий отделом геномных исследований и разработки методов ДНК-диагностики поксвирусов Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор».

Шевченко Алла Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии».

Ведущая организация: Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» Федерального медико-биологического агентства России, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «10» декабря 2015 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.001.01 в НИИФКИ по адресу: 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИФКИ и на сайте <http://www.niikim.ru/ru/диссовет/объявления-диссовета>

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук



Белгородцев С.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

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

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

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

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

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

В связи с важностью рецепторов для обеспечения функций цитокинов, в настоящее время исследователями ведется активная работа по изучению роли рецепторов к иммунорегуляторным цитокинам в норме и при различных патологиях (Klimiuk et al., 2003; Conti et al., 2008; Cañete et al., 2011; Booy et al., 2014; Hu et al., 2014). Стандартно используемыми методами исследования экспрессии рецепторов являются оценка процента клеток, несущих рецепторы (Bebes et al., 2014; Müller et al., 2015), и определение уровней содержания растворимых рецепторов в биологических жидкостях (Waage et al., 1987; Klimiuk et al., 2003; Maier et al., 2006; Okamoto et al., 2009). Однако, данные показатели не отражают полной картины состояния системы регуляции биологических эффектов цитокинов. Исследования последних лет показывают, что как в норме, так и при патологических состояниях интенсивность и вариабельность эффектов, оказываемых иммуномодуляторными цитокинами, в значительной мере зависят от количества экспрессируемых рецепторов на поверхности клеток (Booy et al., 2014). В частности, функциональный ответ клеток на медиатор с изменением числа рецепторов на них может меняться, и при достижении определенного уровня экспрессии рецепторов цитокины и факторы роста могут оказывать на клетки принципиально иные эффекты (Conti et al., 2008; Booy et al., 2014). Кроме того, показано, что при различных соотношениях количества экспрессируемых рецепторов разных типов возможна перекрестная активация их сигнальных путей с модуляцией действия цитокина (Fotin-Mlecsek et al., 2002). В связи с этим, представляется важным и актуальным изучение не только стандартно определяемого процента клеток, экспрессирующих соответствующий рецептор, в субпопуляции, но и числа экспрессируемых рецепторов каждого типа на иммунокомпетентных клетках с последующим сопоставлением с уровнями растворимых рецепторов и самих медиаторов.

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

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

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

моноклеарных клеток периферической крови больных ревматоидным артритом в состоянии обострения заболевания и после ответа на терапию.

4. Оценить ассоциации между показателями экспрессии мембраносвязанных и содержания растворимых рецепторов и медиаторов и интегральным показателем активности ревматоидного артрита DAS-28.

Научная новизна работы

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

Установленные особенности экспрессии мембраносвязанных рецепторов к TNF α и IL-1 у больных ревматоидным артритом позволяют расширить современные представления о функционировании системы рецепторов к иммуномодуляторным цитокинам при патологии. Показано, что у больных ревматоидным артритом изменения в уровне экспрессии рецепторов реализуются как через изменение процента клеток, экспрессирующих эти рецепторы, так и через увеличение или уменьшение плотности экспрессии рецепторов к TNF α и IL-1, причем данные изменения могут быть разнонаправленными. В частности, у больных ревматоидным артритом с высокой активностью заболевания показано, что изменение экспрессии рецепторов 1 типа к TNF α и рецепторов 1 типа к IL-1 β на моноцитах происходит со снижением процента позитивных клеток и увеличением количества рецепторов на них, а у больных ревматоидным артритом, ответивших на терапию, разнонаправленные изменения процента клеток и числа рецепторов характерны для показателей IL-1R1 в субпопуляциях В-лимфоцитов и моноцитов.

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

Основные положения, выносимые на защиту

1. При ревматоидном артрите изменяется не только продукция цитокинов TNF α и IL-1 β и растворимых форм их рецепторов, но и уровень экспрессии

мембраносвязанных форм рецепторов к TNF α и IL-1 β на клетках периферической крови.

2. Изменения в экспрессии мембраносвязанных рецепторов к TNF α и IL-1 β при ревматоидном артрите реализуются как через процент позитивных клеток, так и через увеличение или уменьшение плотности экспрессии рецепторов на них, причем эти изменения могут быть разнонаправленными.

Апробация материалов диссертации

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

Публикации

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

Личный вклад автора в проведенное исследование

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

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения и выводов. Библиографический указатель включает 251 источник, из них 233 зарубежных. Работа иллюстрирована 23 рисунками и 4 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования

Объектами исследования являлись мононуклеарные клетки периферической крови и сыворотка периферической крови больных ревматоидным артритом (40 человек в возрасте от 28 до 75 лет, 32 женщины и 8 мужчин), находившихся на госпитализации в ревматологическом отделении клиники иммунопатологии НИИФКИ, г. Новосибирск. Диагноз ревматоидного артрита верифицирован в соответствии с критериями ACR (2010 г.). Все пациенты на момент поступления в отделение имели высокую активность заболевания (DAS-28>5.1). Кровь для исследования забиралась у пациентов в стадии обострения заболевания и после прохождения курса лечения на основе базисной терапии, включая пульс-терапию метилпреднизолоном или биологический агент (ритуксимаб), при условии эффективности лечения по критерию EULAR и выявления положительной клинической и/или лабораторной динамики: изменение индекса DAS-28 >1.2 при исходном значении >5.1 (далее – больные, ответившие на терапию).

В качестве контрольной группы сравнения были использованы данные по условно-здоровым донорам, полученные в лаборатории молекулярной лаборатории при участии автора и опубликованные ранее (Vasilyev et al., 2013, Lopatnikova et al., 2013). Образцы цельной крови были получены в пункте заготовки крови №1 ГБУЗ НСО «Новосибирский центр крови», выборка сформирована из числа жителей г. Новосибирска (n=150) в возрасте от 19 до 55 лет, 83 мужчины и 67 женщин. Исследование проводилось с добровольного информированного согласия каждого больного РА и условно-здорового донора

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

Сывороточное содержание цитокинов и растворимых форм рецепторов определяли иммуноферментным твердофазным анализом. Для определения содержания sTNFR1, sTNFR2, sIL-1R1 и sIL-1R2 использовали наборы фирмы RayBiotech, Inc. (США), для определения содержания TNF α , IL-1 β и рецепторного антагониста IL-1 использовали наборы фирмы ЗАО «Вектор-Бест» (Россия) согласно инструкциям производителя.

Выделение и культивирование мононуклеарных клеток периферической крови

Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли стандартно (Вёуит, 1968) из венозной крови путем центрифугирования в градиенте плотности фиколлюрографина: ($\rho=1,077$ г/л). МНК культивировали в конечной концентрации 2 млн. клеток/мл в 96-луночном планшете (TPP, Швейцария) в течение 24 часов в инкубаторе во влажной атмосфере при температуре 37°C и концентрации CO₂ 5% в отсутствие и присутствии LPS *Escherichia coli* (серотип 055:B5, «Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 200 нг/мл.

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

Оценка фенотипических характеристик проводилась методом проточной цитометрии (цитофлуориметры FACSAria и FACSVerse (BD, США)) с использованием моноклональных антител: APC-конъюгированных анти-CD3 (клон ОКТ3), FITC-конъюгированных анти-CD14 (клон 61D3) и PE-Cy7-конъюгированных анти-CD19 (клон H1B19) (eBioscience, San Diego, CA), а также anti-humanTNFR1-PE, anti-humanTNFR2-PE, anti-human IL-1 RI и anti-human IL-1 RII PE (R&D Systems, Minneapolis, MN). Обработка данных и расчет показателей интенсивности флуоресценции производились с использованием программного обеспечения FacsDiva (BD, США). Для создания калибровочной кривой и перевода значений интенсивности флуоресценции клеток, экспрессирующей соответствующий маркер, в абсолютные показатели количества рецепторов, использовался набор BD QuantiBRITE PE («BD Biosciences», США), содержащий 4 фракции лиофилизированных бус, каждая из которых несет различный уровень фикоэритрина.

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 на рисунках представлены в виде медианы и межквартильного интервала, сравнение независимых выборок с определением статистической значимости отличий проводилось с использованием критерия Манна-Уитни и непараметрического дисперсионного рангового критерия Краскела-Уоллиса с множественным сравнением медиан. Корреляции между исследуемыми параметрами устанавливались с использованием коэффициента корреляции Спирмана (при $p \leq 0,05$). Статистическая значимость стимуляции в спонтанных и стимулированных культурах и изменений в зависимых выборках устанавливалась с помощью критерия Вилкоксона (отличия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$).

Для выявления линейных связей между интегральным показателем активности ревматоидного артрита DAS-28 и исследуемыми параметрами экспрессии мембраносвязанных рецепторов к TNF α и IL-1 β и содержания растворимых рецепторов и растворимых форм цитокинов TNF α и IL-1 β использовались модели множественной линейной регрессии (ММЛР) со стандартной оценкой коэффициентов регрессии методом наименьших квадратов. Для получения возможности количественного сравнения коэффициентов в ММЛР с учетом того, что исследуемые параметры различались на 1-4 порядка, в прилагаемых моделях проводилась нормировка исходных данных на величину в три интерквартильных интервала (25-75 квартили) соответствующего показателя здоровых доноров плюс один.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Для изучения регуляции биологической эффективности провоспалительного цитокина TNF α при ревматоидном артрите, оценивалась экспрессия рецепторов 1 и 2

типа к нему клетками периферической крови, активно вовлеченными в патологический процесс: Т-лимфоцитами (CD3+), В-лимфоцитами (CD19+) и моноцитами (CD14+) больных РА в состоянии обострения и после ответа на терапию. Методом проточной цитометрии оценивался процент клеток, несущих рецепторы 1 и 2 типа (рис. 1А), в каждой из субпопуляций и рассчитывалось количество самих экспрессируемых рецепторов на клетках (рис. 1Б).

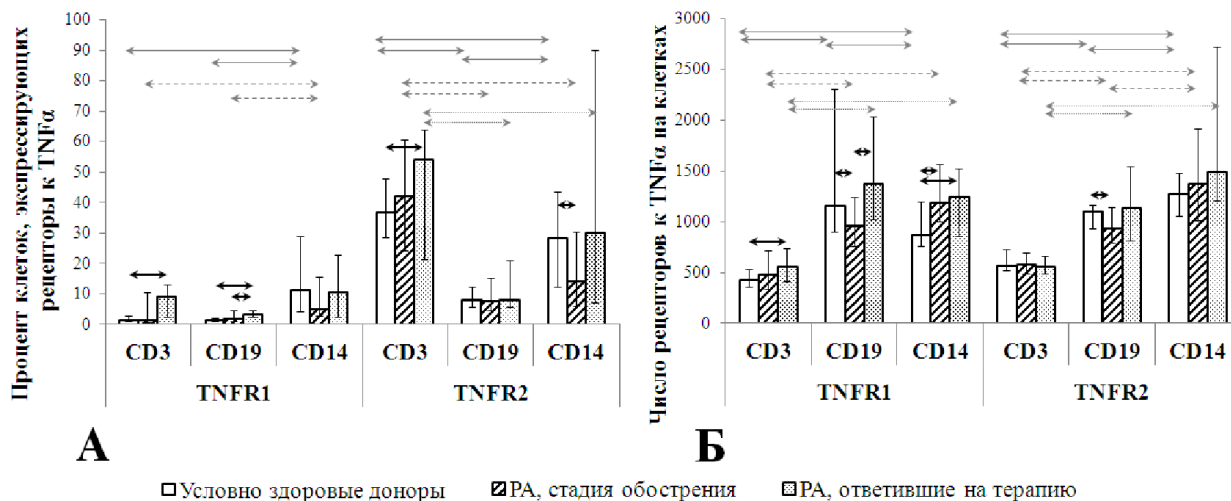


Рисунок 1. Процент клеток, экспрессирующих TNFR1 и TNFR2, (А) и число рецепторов на клетках (Б) в субпопуляциях МНК условно-здоровых доноров (n=150), больных РА в состоянии обострения (n=40) и после ответа на терапию (n=21). Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелками на рисунке указана статистическая значимость отличий между группами исследуемых, $p \leq 0,05$.

Было показано, что интактные клетки субпопуляций МНК ПК различаются как по относительному проценту клеток, экспрессирующих рецепторы 1 и 2 типа к TNF α , так и по абсолютному числу рецепторов на них. При этом высокое число рецепторов на клетке не обязательно связано с высоким процентом позитивных клеток, и наоборот. В частности, как у здоровых, так и у больных РА вне зависимости от активности воспалительного процесса для субпопуляции Т-лимфоцитов характерен наибольший процент клеток, экспрессирующих TNFR2, при наименьшем числе рецепторов обоих типов на них. Кроме того, показано, что увеличение или уменьшение количества рецепторов на клетках при патологии по сравнению с нормой не всегда происходит однонаправленно с изменением процента клеток, несущих данные рецепторы. Установленные изменения могут быть связаны с тем, что, согласно литературным данным, изменение процента клеток, экспрессирующих рецепторы, в субпопуляциях и изменение количества рецепторов обуславливается различными механизмами. Для TNF α исследователями показано, что при большой плотности рецепторов 2 типа на поверхности клетки возможно локальное увеличение концентрации связанного либо эндогенного цитокина, и опосредованная передача сигнала на рецепторы 1 типа (Grell, 1999; Haas, et al., 1999; Tartaglia et al., 1993; Fotin-Mieczek et al., 2002). Этот механизм служит для увеличения эффективности воздействия медиатора на клетку, а за счет различного соотношения плотности экспрессии рецепторов 1 и 2 типа будет проходить переключение с одних сигнальных путей на другие и, соответственно, реализация разных биологических функций TNF α .

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

У больных РА, ответивших на терапию, по сравнению со здоровыми донорами, происходит усиление экспрессии рецепторов 1 типа либо по проценту позитивных клеток (для Т- и В-лимфоцитов), либо по числу рецепторов на клетках (для моноцитов), что, вероятно, обусловлено реакцией клеток данных субпопуляций на проводимое лечение.

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

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

При сравнении показателей больных РА со здоровыми донорами было установлено, что большинство отличий проявляется по числу рецепторов на моноцитах, а не по стандартно определяемому проценту позитивных клеток. Показатели экспрессии рецепторов различались по ответу клеток на стимуляцию. Под действием LPS для всех исследованных групп при 24-часовом культивировании по сравнению со спонтанными культурами было показано статистически значимое увеличение процента клеток, экспрессирующих рецепторы к TNF α 2 типа (но не первого). При оценке же количества экспрессируемых рецепторов на моноцитах было установлено, что стимуляция клеток липополисахаридом приводит к статистически значимому увеличению количества рецепторов к TNF α обоих типов во всех исследуемых группах.

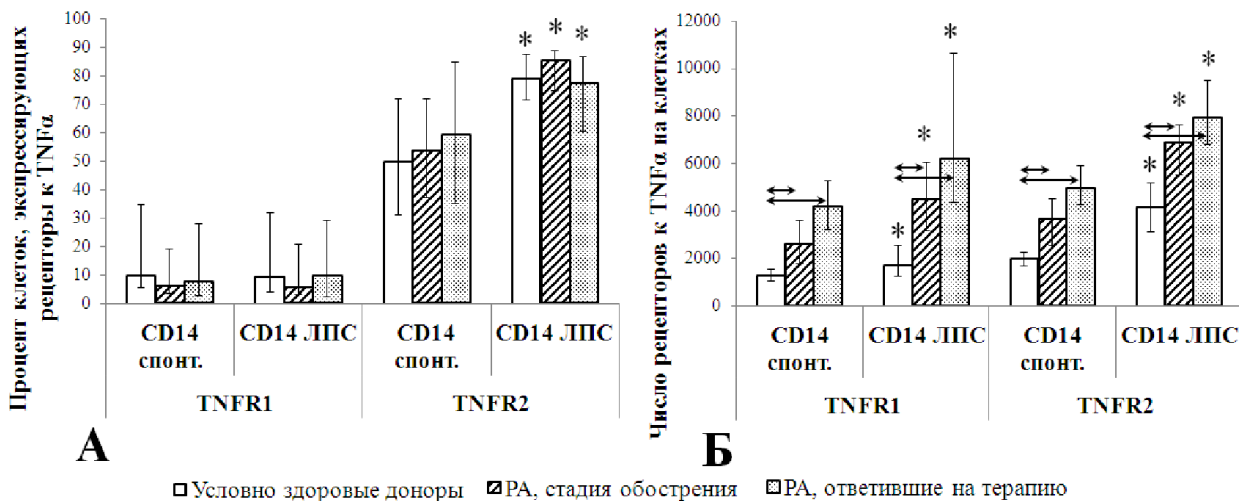


Рисунок 2. Процент клеток, экспрессирующих TNFR1 и TNFR2, (А) и число рецепторов на них (Б) среди моноцитов спонтанных и LPS-стимулированных 24-часовых культур МНК. условно-здоровых доноров (n=150), больных РА в состоянии обострения (n=40) и после ответа на терапию (n=21). Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелками на рисунке указана статистическая значимость отличий между группами исследуемых, $p \leq 0,05$. * – статистическая значимость стимуляции под действием LPS.

Полученные данные свидетельствуют о том, что увеличение или уменьшение количества рецепторов на клетках при хронических воспалительных заболеваниях с различным иммунопатогенезом по сравнению с нормой не всегда происходит одновременно с изменением процента клеток, несущих данные рецепторы, и наоборот. Показателем, отражающим отличия состояния рецепторного аппарата TNF α при ревматоидном артрите под действием поликлонального активатора, является количество рецепторов на поверхности клеток.

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

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

Показатели сывороточного содержания цитокина у больных РА значимо выше, чем у здоровых доноров, при этом у больных, ответивших на терапию, уровень TNF α значимо снижается по сравнению с обострением заболевания. Больные РА в стадии обострения демонстрируют более высокое содержание рецепторов 1 типа по

сравнению со здоровыми донорами и более низкое содержание рецепторов 2 типа, а после ответа на терапию сохраняется отличие только по рецепторам 2 типа.

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

Для характеристики экспрессии рецепторов 1 и 2 типов к провоспалительному цитокину IL-1 β больных РА в состоянии обострения и после ответа на терапию в субпопуляциях интактных клеток – Т-лимфоцитов (CD3+), В-лимфоцитов (CD19+) и моноцитов (CD14+) оценивался процент позитивных клеток в субпопуляции (рисунок 3А) и рассчитывалось число рецепторов на клетках (рисунок 3Б).

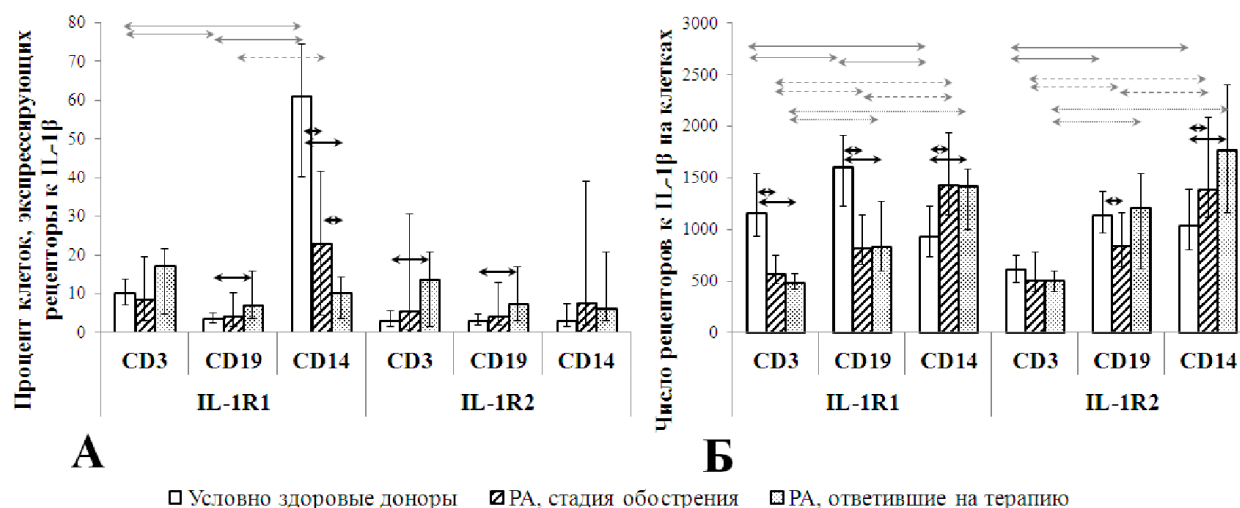


Рисунок 3. Процент клеток, экспрессирующих IL-1R1 и IL-1R2, (А) и число рецепторов на клетках (Б) в субпопуляциях МНК условно-здоровых доноров (n=150), больных РА в состоянии обострения (n=33) и после ответа на терапию (n=21). Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелками на рисунке указана статистическая значимость отличий между группами исследуемых, p<0,05.

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

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

повышение процента IL-1R2+ клеток, а моноциты больных вне зависимости от фазы заболевания демонстрируют статистически значимое повышение количества этих рецепторов. Таким образом, установленные отличия свидетельствуют о важности и вовлеченности 2 типа рецепторов к IL-1 β для ответа клеток на проводимое лечение и улучшение состояния больных РА.

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

Для более подробного изучения изменений в системе рецепторов к IL-1 β в условиях смоделированной ситуации активации провоспалительных реакций оценивалась экспрессия рецепторов на моноцитах (CD14+) в спонтанной и стимулированной культуре МНК человека. Для изучения способности клеток реагировать на действие стимулятора, оценивалась экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к IL-1 β на моноцитах 24-часовых культур в присутствии и отсутствии LPS (O55:B5). Определялся процент моноцитов, экспрессирующих рецепторы 1 и 2 типа к IL-1 β (рисунок 4А) и рассчитывалось количество рецепторов на клетках (рисунок 4Б).

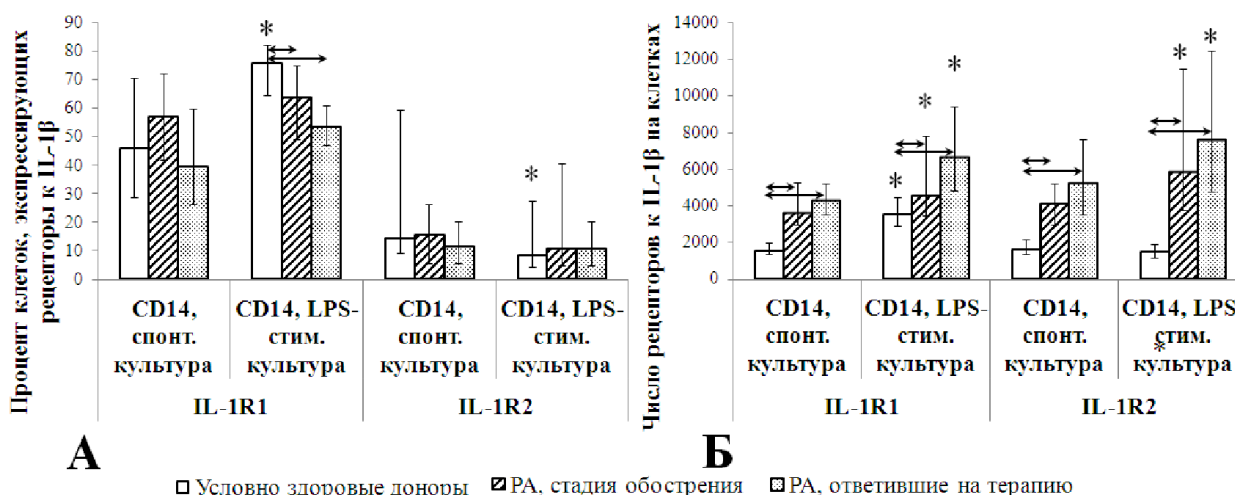


Рисунок 4. Процент клеток, экспрессирующих IL-1R1 и IL-1R2, (А) и число рецепторов на клетках (Б) среди моноцитов спонтанных и LPS-стимулированных 24-часовых культур МНК. условно-здоровых доноров (n=150), больных РА в состоянии обострения (n=33) и после ответа на терапию (n=21). Данные представлены как медиана и межквартильный интервал. Стрелками на рисунке указана статистическая значимость отличий между группами исследуемых, p \leq 0,05. * – статистическая значимость стимуляции под действием LPS.

Было показано, что 24-часовая культивация с LPS вызывает статистически значимую стимуляцию по показателям количества рецепторов к IL-1 β как у здоровых, так и у больных РА с значимо более высокими показателями для больных по сравнению с нормой. Однако по проценту позитивных клеток статистически значимые изменения регистрируются только для здоровых доноров – с увеличением по 1 типу рецептора к IL-1 β и уменьшением по второму, в то время как для больных не показан ответ на действие стимулятора по проценту позитивных клеток.

Для показателей экспрессии рецепторов 1 типа к IL-1 β показано, что для моноцитов характерно снижение процента IL-1R1+клеток с одновременным повышением количества рецепторов IL-1R1 на них. Разнонаправленные изменение

процента позитивных клеток и числа рецепторов отражают 2 разных механизма регуляции действия цитокина на клетки целевой субпопуляции, которые могут приводить к активации различных сигнальных путей или к более таргетному воздействию на конкретные иммунокомпетентные клетки.

Было установлено, что вне зависимости от активности протекания патологического процесса, моноцитарная популяция не имеет отличий по процентам позитивных клеток между группами исследуемых, но при этом по показателям количества рецепторов моноциты больных РА несут значимо большее число всех исследуемых рецепторов (как к IL-1 β , так и к TNF α) по сравнению со здоровыми донорами. Процент клеток, экспрессирующих рецепторы обоих типов к IL-1 β , изменяется под действием стимулятора только у здоровых доноров, при этом у больных РА вне зависимости от стадии заболевания, процент IL-1R1+моноцитов значимо ниже. По количеству рецепторов моноциты больных РА демонстрируют большее число рецепторов на поверхности клеток по сравнению со здоровыми донорами для всех типов рецепторов. Выявленные отличия по интактным клеткам и по реакции моноцитов на активацию поликлональным стимулятором свидетельствуют о том, что регуляция действия цитокинов моноцитами может осуществляться для IL-1 β как отдельным изменением процента позитивных клеток либо числа рецепторов на клетках, так и одновременным разнонаправленным изменением обоих этих показателей. Установленные отличия, характерные для больных РА, свидетельствуют о потенциале моноцитов отвечать на активацию клетки различным изменением показателей экспрессии рецепторов к разным иммуномодуляторным цитокинами, что может служить одним из механизмов регуляции переключения сигнальных путей.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Из всех исследуемых моделей (полных для каждого из цитокинов; комбинированных по разным сочетания показателей растворимых медиаторов, процентного содержания клеток с рецепторами и числа рецепторов; редуцированных с помощью последовательного удаления статистически незначимых предикторов) наилучшими характеристиками обладали полные для каждого из цитокинов, а также модели с последовательной редукцией.

Сравнение моделей с различными комбинациями показателей TNF α позволили выявить, что показатели числа рецепторов на поверхности клеток в целом вносят более значительный вклад в величину DAS-28 по сравнению с показателями процента клеток и содержанием растворимых sTNFR1, sTNFR2 и TNF α . Кроме того, исследование моделей с различными комбинациями групп показателей для цитокина TNF α (содержание в сыворотке цитокина и растворимых форм рецепторов, процентное содержание в субпопуляциях клеток, экспрессирующих рецепторы, число рецепторов на поверхности клеток) продемонстрировало, что измерение только процента позитивных клеток и содержания растворимых медиаторов не являются достаточными для объяснения уровня активности заболевания DAS-28, что также подтверждается отсутствием статистически значимых корреляций между показателем активности РА и исследуемыми величинами. В то же время введение в модель показателей количества рецепторов на поверхности клеток, даже при устранении показателей процентного содержания позитивных клеток, позволяет получить модель высокого качества, хорошо объясняющую величину DAS-28 у больных в стадии обострения заболевания. Это свидетельствует о том, что измерение только процента позитивных клеток и уровней растворимых форм цитокина рецепторов не являются достаточными для оценки изменений в рецепторном аппарате цитокина при нозологии. Аналогичная закономерность была установлена и для моделей с показателями IL-1 β – показатели числа рецепторов на поверхности клеток вносят больший вклад в значение DAS-28 по сравнению с растворимыми медиаторами и процентным содержанием позитивных клеток.

Установленные статистически значимые отличия, характерные для параметров больных РА в стадии обострения и после ответа на терапию по сравнению со здоровыми донорами, а также между фазами заболевания обобщены и представлены в таблице 1.

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

Показатели для TNF α

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

Показатели для IL-1 β

	РА обострение		РА, ответившие на терапию	
	IL-1R1	IL-1R2	IL-1R1	IL-1R2
Показатели экспрессии мембраносвязанных рецепторов				
Т-лимфоциты	↓ ρ		↓ ρ	↑ %
В-лимфоциты	↓ ρ	↓ ρ	↑ % и ↓ ρ	↑ %
Моноциты	↓ % и ↑ ρ	↑ % и ↑ ρ	↓ %* и ↑ ρ	↑ % и ↑ ρ
Моноциты спонт. культур	↑ ρ	↑ ρ	↑ ρ	↑ ρ
Моноциты LPS-стим. культур	↓ % и ↑ ρ	↑ ρ	↓ % и ↑ ρ	↑ ρ
Показатели растворимых рецепторов цитокина				
IL-1 β		↑		↑
raIL-1	↑	↑	*	*
Растворимый рецептор	↑	↑	↑*	↑

Примечание: здесь в таблице 1 стрелками показаны изменения (↑ – увеличение, ↓ – снижение) по сравнению с показателями условно здоровых доноров.

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

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

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

В целом, полученные данные свидетельствуют об отличиях в экспрессии рецепторов к TNF α и к IL-1 β различными субпопуляциями иммунокомпетентных клеток в норме и при патологии, и о формирующихся при воспалительных

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

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

6. Экспрессия мембраносвязанных рецепторов к TNF α и IL-1 β на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток у больных ревматоидным артритом имеет отличия по сравнению со здоровыми донорами как по проценту клеток с рецепторами в субпопуляциях, так и по числу рецепторов на них, причем эти изменения могут быть разнонаправленными, что свидетельствует об их участии в механизмах действия провоспалительных цитокинов при данной нозологии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) *Альшевская, А. А.* Изучение состояния системы ФНО в норме и при ревматоидном артрите / А. А. Альшевская, Ф. Ф. Васильев, Ю. А. Лопатникова // Студент и научно-технический прогресс : материалы XLIX Междунар. науч. конф. (16-20 апр. 2011 г.). Медицина. – Новосибирск, 2011. – С. 57–58.
- 2) Васильев, Ф. Ф. Изменения экспрессии рецепторов к ФНО-альфа в культуре МНК человека / Ф. Ф. Васильев, *А. А. Альшевская*, Ю. А. Лопатникова, С. В. Сенников // Дни иммунологии в Сибири : материалы Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Абакан, 2011. – С. 44–45.
- 3) Васильев, Ф. Ф. Экспрессия рецепторов к ФНО-альфа на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток / Ф. Ф. Васильев, *А. А. Альшевская*, Ю. А. Лопатникова // Вестн. Урал. мед. акад. науки. – 2011. – № 2/1. – С. 18–19.
- 4) *Альшевская, А. А.* Мембраносвязанные и растворимые рецепторы к фактору некроза опухоли- α в норме и при ревматоидном артрите / А. А. Альшевская, Ф. Ф. Васильев, Ю. А. Лопатникова, С. В. Сенников // *Бюл. Вост.-Сиб. науч. центра СО РАМН.* – 2012. – № 3, ч. 2. – С. 23-28.
- 5) Лопатникова, Ю. А. Аутоантитела и рецепторы к ФНО-альфа при иммунопатологических заболеваниях / Ю. А. Лопатникова, Е. А. Голикова, *А. А. Альшевская* [и др.] // Рос. иммунол. журн. – 2013. – Т. 7, № 2/3. – С. 142.
- 6) Лопатникова, Ю. А. Аутоантитела и рецепторы к TNF α в патогенезе иммуноопосредованных заболеваний / Ю. А. Лопатникова, *А. А. Альшевская*, Е. А. Голикова [и др.] // Цитокины и воспаление: Материалы юбилейной научно-практической конференции «Современные проблемы иммунофармакологии биотехнологии и цитокиновой регуляции посвященной 40-летию ФГУП «Гос. НИИ ОЧБ» ФМБА РФ. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 108–109.
- 7) *Альшевская, А. А.* Экспрессия мембраносвязанных рецепторов к TNF α на моноцитах при атопическом дерматите и ревматоидном артрите / А. А. Альшевская, Ю. А. Лопатникова, Н. С. Шкаруба [и др.] // *Цитокины и воспаление.* – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 18–23.
- 8) *Альшевская, А. А.* Экспрессия рецепторов к TNF-alpha при ревматоидном артрите / А. А. Альшевская, Ю. А. Лопатникова, Н. С. Шкаруба [и др.] // Дни

иммунологии в Сибири : материалы XII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – Красноярск, 2015. – С. 25–26.

- 9) **Alshevskaya, A.** TNF membrane-bound and soluble receptors in health and in rheumatoid arthritis / A. Alshevskaya, J. Lopatnikova, F. Vasiliev [et al.] // *EULAR J.* – 2013. – Vol. 72, suppl. 3. – P. 834.
- 10) **Alshevskaya, A.** IL-1 β membrane-bound receptors in health and in rheumatoid arthritis / A. Alshevskaya, F. Vasiliev, J. Lopatnikova [et al.] // 15th International Congress of Immunology (ICI-2013) (Milan, 22-27 Aug. 2013) : abstr. – Milan, 2013. – P. 775.
- 11) Lopatnikova, J. A. Quantitative flow cytometric analysis of expression of tumor necrosis factor receptor types I and II on mononuclear cells / J. A. Lopatnikova, F. F. Vasilyev, **A. A. Alshevskaya**, S. V. Sennikov // *J. of Receptors a. Signal Transduction.* – 2013. – Vol. 33, № 1. – P. 49–55.
- 12) **Alshevskaya, A. A.** Expression of TNF α receptors on immune cells in rheumatoid arthritis / A. A. Alshevskaya, J. A. Lopatnikova, N. S. Shkaruba [et al.] // *Intern. J. of Rheumat. Diseases.* – 2014. – Vol. 17, suppl. 2. – P. 21.
- 13) **Alshevskaya, A. A.** Expression of receptors to IL-1 on peripheral blood immunocompetent cells in rheumatoid arthritis / A. A. Alshevskaya, J. A. Lopatnikova, N. S. Shkaruba [et al.] // *Annals of the Rheumatic Diseases.* – 2015. – Vol. 74, suppl. 2. – P. 909.
- 14) **Alshevskaya, A. A.** Differences of IL-1 β receptors expression by immunocompetent cells subsets in rheumatoid arthritis / A. A. Alshevskaya, J. A. Lopatnikova, N. S. Shkaruba [et al.] // *Mediators of Inflammation.* – 2015. – Vol. 2015, art. 948393. – P. 1–9.
- 15) Sennikov, S. V. Expression of TNF α membrane-bound receptors in the peripheral blood mononuclear cells (PMBC) in rheumatoid arthritis patients / S. V. Sennikov, **A. A. Alshevskaya**, N. S. Shkaruba [et al.] // *Cytokine.* – 2015. – Vol. 73, № 2. – P. 288–294.