

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



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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

д.м.н., профессор С.В. Сенников

Новосибирск

2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА I. TNF $\alpha$ -ОПОСРЕДОВАННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ В НОРМЕ И ПРИ РАЗВИТИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА	13
1.1 Структура и функции фактора некроза опухоли альфа и его рецепторов	13
1.2 Регуляция внутриклеточного сигналинга.	23
1.3. Влияние плотности экспрессии рецепторов на функции.	26
1.4. TNF $\alpha$ –опосредованная регуляция биологических функций отдельных популяций иммунных клеток	30
1.5. Роль TNF $\alpha$ -опосредованной передачи сигналов при ревматоидном артрите	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.1. Объект исследования	42
2.2 Подготовка образцов периферической крови	45
2.3 Гейтирование	46
2.4. Определение ко –экспрессии рецепторов	49

2.5. Определение среднего числа TNFR1 и TNFR2 на клетках.	50
2.6 Методы статистической обработки	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	56
3.1. Ко-экспрессия и среднее количество рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$ на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток у здоровых доноров	57
3.2. Определение ко- экспрессии и среднего количества рецепторов на субпопуляциях хелперных и регуляторных Т-клеток.	60
3.3. Определение ко- экспрессии и среднего количества рецепторов на субпопуляциях цитотоксических Т-клеток.	63
3.4. Сравнение ко-экспрессии и среднего количества рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$ на основных популяциях и субпопуляциях иммунокомпетентных клеток у здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом.	67
3.5. Сравнение ко-экспрессии и среднего количества рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$ хелперных и регуляторных Т- клеток у здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом.	76
3.6. Сравнение ко-экспрессии и среднего количества рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$ на цитотоксических Т лимфоцитах у здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом.	89
3.7. Корреляция между параметрами ко-экспрессии и показателями тяжести РА.	99
3.8. Построение параметрической логистической регрессионной модели диагностики РА на основании различий в показателях экспрессии рецепторов к TNF $\alpha$ .	103

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	106
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	119
ВЫВОДЫ	120
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	122
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	125

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность

Фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) –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 $\alpha$  участвует в патогенезе многих заболеваний, таких как ревматоидный артрит [Guo2018], анкилозирующий спондилит, болезнь Крона [Kollias 1999, Baumgart 2007] и многих других. TNF $\alpha$  выполняет клеточные функции, опосредованные одним из двух своих рецепторов [Grell 1995, 1998]. Рецептор к TNF $\alpha$  1 типа (TNFR1) повсеместно экспрессируется почти на всех клетках организма. Рецептор к TNF $\alpha$  2 типа (TNFR2), наоборот, ограничен клетками гемопоэтического ряда [Beldi 2020] и иммунной системы, таких как моноциты, Т- и В-лимфоциты, Т-лимфоциты тимуса и тучные клетки. Также этот рецептор экспрессируется эндотелиальными клетками, кардиомиоцитами, микроглией, олигодендроцитами [Dopp 2002] и клетках предстательной железы [Srinivasan 2010].

Противоположные эффекты TNF $\alpha$  могут быть связаны с различиями в путях активации рецепторов, в исследованиях показано, что TNFR1 может активироваться как растворимым, так и мембраносвязанным TNF $\alpha$ , в то время как TNFR2 полностью активируется только мембраносвязанным TNF $\alpha$ . TNFR1 и TNFR2 часто играют разные, независимые роли, при этом показано, что они могут демонстрировать частично перекрывающиеся сигнальные механизмы. [Al-Lamki 2009, Chen, Palmer, 2013, Maney 2014, Pan2007].

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, Booy 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-Mleczek et al., 2002].

Применяемые в большинстве случаев стандартные методы, которые используются для определения процента клеток, экспрессирующих 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. Результаты исследований с использованием калибровочных частиц показали, что популяции иммунокомпетентных клеток отличаются у здоровых доноров, а именно: Т- и В-лимфоциты и моноциты различались по процентному содержанию клеток экспрессирующих рецепторы, и количеству рецепторов на клетках между популяциями [Lopatnikova 2013, Альшевская 2015]. Это позволяет предположить, что разные популяции иммунокомпетентных клеток могут иметь разный потенциал ответа на TNF $\alpha$  в зависимости от уровня экспрессии рецепторов на клетках.

Таким образом, для понимания регуляции функционального ответа важно учитывать не только тип рецептора, с которым связывается TNF $\alpha$ , 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 $\alpha$  для иммунокомпетентных клеток, которая позволит выявить распределение рецепторов на клетках внутри основных субпопуляций

иммунокомпетентных клеток для более детальной оценки функциональных возможностей каждой из них.

Неоднородность популяционного состава иммунокомпетентных клеток и наличие субпопуляций внутри одного пула клеток, выполняющих различные функции создает предпосылки для изучения процента клеток, несущих рецепторы, ко-экспрессию, а также среднее количество 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 настоящее время имеется множество доказательств того, что TNF $\alpha$  играет центральную роль в патогенезе различных аутоиммунных заболеваний [Erickson 1994, Farrugia 2016]. Одним из наиболее ярких примеров таких заболеваний является ревматоидный артрит (РА), при котором, в клинических исследованиях было выявлено критическое участие TNF $\alpha$  [Di Giovine 1988]. Ученые продемонстрировали, что TNF $\alpha$  чрезмерно экспрессируется в синовиальной жидкости больных РА. Более того, экспрессия рецепторов TNF $\alpha$  также активируется на клетках синовиальной мембраны пациентов с РА, особенно в областях, прилегающих к эрозиям, и повышенные концентрации рецепторов 1 типа к TNF $\alpha$  коррелируют с активностью заболевания [Alsalameh 1999, 2003]. При ревматоидном артрите отмечается нарушение баланса в экспрессии рецепторов, что приводит к усугублению течения заболевания и наоборот, блокада сверхэкспрессии рецепторов приводит к стабилизации [Ackermann 2007, Воронина 2018].

Плотность экспрессии рецептора является важным механизмом, с помощью которого регулируются функции не только в нормально функционирующих клетках, но и при патологических состояниях [Booy 2014]. При исследовании регуляции растворимых рецепторов показано существование «порогового» уровня [Conti 2008], при этом если количество рецепторов не достигает

«порогового» уровня, то передача сигнала почти прекращается и клетка остается интактной к воздействию цитокина. Высокая плотность экспрессии увеличивает вероятность связывания рецептора, что способствует усилению эффектов цитокина. Эти данные позволяют нам предположить, что, поскольку основные популяции, иммунокомпетентных клеток демонстрируют определенный уровень экспрессии рецепторов  $\text{TNF}\alpha$ , то пороговое количество рецепторов будет варьировать среди различных популяций и будет изменяться в зависимости от патогенетической вовлеченности клеток. Так, при РА [Sennikov 2015], показано, что изменения процента клеток, экспрессирующих соответствующий рецептор в популяциях моноцитов, Т и В -лимфоцитов, и изменение плотности экспрессии рецепторов на данных клетках носили разнонаправленный характер. Учитывая, что основные популяции иммунокомпетентных клеток разнородны по-своему субпопуляционному составу и в патогенезе РА клетки разных субпопуляций играют разные роли, важно оценивать показатели ко-экспрессии рецепторов, а также плотности экспрессии рецепторов не только на основных популяциях моноцитов, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов, но и на субпопуляциях хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов и регуляторных Т клетках.

Таким образом, ко-экспрессия рецепторов 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.

**Цель:** провести сравнительный анализ ко-экспрессии и среднего числа рецепторов 1 и 2 типа к  $\text{TNF}\alpha$  у здоровых доноров и пациентов с РА на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток, охарактеризовать значимость указанных показателей для диагностики РА.



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

1. Исследовать ко-экспрессию и среднее число мембраносвязанных рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  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 $\alpha$  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 TNF $\alpha$  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 $\alpha$  на иммунокомпетентных клетках при помощи однофакторного и многофакторного регрессионного анализа и математического моделирования наиболее значимо отличающихся параметров.

### **Научная новизна работы**

В работе впервые проведена оценка среднего количества рецепторов на клетках и ко-экспрессии рецепторов к TNF $\alpha$  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. Так же было установлено, что у здоровых доноров для всех популяций Т клеток характерно более высокое процентное содержание клеток экспрессирующих только 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 $\alpha$  1 и 2 типов у пациентов с различной активностью ревматоидного артрита на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток, связанных с патогенезом данного заболевания, для пациентов с ревматоидным артритом 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 было выше по сравнению с соответствующими показателями у здоровых доноров. При этом наблюдается тенденция к снижению количества рецепторов 2 типа и увеличению рецептора 1 типа по большинству субпопуляций. Сравнение ко-экспрессии рецепторов к TNF $\alpha$  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 коррелируют с клиническими проявлениями заболевания.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные в ходе работы данные, позволяют раскрыть отдельные молекулярные механизмы регуляции и оценить особенности экспрессии мембраносвязанных рецепторов к TNF $\alpha$  на различных субпопуляциях иммунокомпетентных клеток, что способствует расширению современных представлений о 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 значительно различаются по ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к  $\text{TNF}\alpha$ . При этом субпопуляции Т клеток варьируют по сочетанной экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к  $\text{TNF}\alpha$ , 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  $\text{TNF}\alpha$  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)) значительно различаются по ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к  $\text{TNF}\alpha$  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  $\text{TNF}$ , 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%. Патент [RU2735738C1](#) от 06.11.2020

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Основные субпопуляции иммунокомпетентных клеток различаются по ко-экспрессии и среднему числу рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  на клетках, что показывает различия регуляторных механизмов экспрессии рецепторов в зависимости от субпопуляции.
2. При ревматоидном артрите происходит изменение соотношения экспрессируемых рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  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.

### **Апробация материалов диссертации**

Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

1. Семинарах лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ (Новосибирск, 2017, 2019, 2020, 2021).
2. Отчетных конференциях аспирантов и ординаторов НИИФКИ (Новосибирск, 2017, 2019, 2020, 2021).
3. Объединённый иммунологический форум 24—29 июня 2019 г. Новосибирск
4. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) - Madrid, Spain 12 Jun 2019

5. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR) - Frankfurt/Main  
Germany 3 Jun 2020

### **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.

### **Самостоятельность выполненной работы**

Результаты по больным ревматоидным артритом и здоровым донорам, представленные в данной работе, получены лично автором на базе лаборатории молекулярной иммунологии НИИФКИ.

Большую признательность автор выражает научному руководителю работы профессору, д.м.н. С. В. Сенникову за подробное обсуждение полученных результатов, сотрудникам лаборатории молекулярной иммунологии А.А. Альшевской, Ю.А. Лопатниковой, за помощь в освоении методов молекулярной и клеточной иммунологии и всем остальным сотрудникам лаборатории за ценные замечания и благожелательное отношение в ходе выполнения работы, а также сотрудникам лаборатории вычислительной физики ФГБУ «Институт вычислительной математики и математической геофизики» В. С. Гладких и А. В. Москалеву за консультирование по вопросам статистической обработки данных.

## **ГЛАВА I. TNF $\alpha$ -ОПОСРЕДОВАННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ В НОРМЕ И ПРИ РАЗВИТИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА**

### **1.1 Структура и функции фактора некроза опухоли альфа и его рецепторов**

Фактор некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ) - провоспалительный цитокин, играющий важную роль в обеспечении клеточного гомеостаза и в поддержании иммунитета.

Идентификации фактора некроза опухоли альфа произошла в 1975 году [Carswell 1975], а его выделение и характеристика в 1984 году [Aggarwal 1984]. С этого момента секретируемая форма TNF $\alpha$  была признана мощным воспалительным цитокином с множеством разнообразных функций и стала потенциальной мишенью для лечения воспалительных заболеваний, таких как ревматоидный артрит (РА) [Seymour 2001], болезнь Крона [Ghosh 2004], анкилозирующий спондилит [Coates 2010], псориаз [Kircik 2009], а как же в качестве эффективной терапии у пациентов с меланомой с множественными метастазами [Deroose 2012].

Ген TNF $\alpha$  является частью главного комплекса гистосовместимости (МНС), расположен на коротком плече хромосомы 6p21.32 [Kalliolias 2015], длиной 2762 п.н. и состоит из четырех экзонов, прерванных тремя интронами. Более 80% этого цитокина кодируется четвертым экзоном; первый и второй экзоны кодируют только ведущую последовательность растущего пептида [Nedwin 1985]. Экспрессия TNF $\alpha$  регулируется транскрипционными и посттранскрипционными механизмами, включая стабильность и трансляцию мРНК. Посттранскрипционный контроль осуществляется через богатую аденозин-уридиновыми повторами 3'-нетранслируемую область мРНК, с которой связываются ряд белков. Одним из наиболее хорошо охарактеризованных таких

белков является тристетрапролин (ТТР), который регулирует стабильность сигнализации TNF-альфа. [Bazzoni 1996, Deleault 2008].

Экспрессируется TNF $\alpha$  в виде молекулы-предшественника из 157 аминокислот. Эта пре-последовательность является высококонсервативной и служит для закрепления полипептида-предшественника в мембране [Vilcek 1991]. Структура TNF $\alpha$  представляет собой мономеры самоорганизующиеся в нековалентные гомотримеры, состоящие из  $\beta$ -складок, которые напоминают «пробку», которая сверху шире, а снизу уже [Bodmer 2002]. Соответствующие мономеры рецептора связываются снаружи на границе раздела между двумя мономерами лиганда [Mukai 2010]. Это критически важно для активации рецептора, так как гарантирует, что только интактный тримерный лиганд может запускать передачу сигналов, потому что даже потеря одного мономера лиганда приводит к потере двух сайтов связывания рецептора [Smith 1987].

Существование TNF $\alpha$  в виде тримера с тройной симметрией, обеспечивает молекулу идентичными сайтами связывания рецепторов, где каждая из трех субъединиц содержит дисульфидный мостик [Fiers 1991, Vilcek 1991, Beyaert 1994]. В исследованиях показано, что относительно низкие pH способствовали конформационным изменениям TNF $\alpha$ , которые приводили к повышенной гидрофобности поверхности и встраиванию в мембрану. Кроме того, TNF $\alpha$  формировал pH-зависимые, потенциал-зависимые, проницаемые для ионов каналы в плоских двухслойных липидных мембранах и увеличивал проницаемость клеток для натрия. [Baldwin 1996; Kagan 1992]. Это свидетельствует о том, что конформационные изменения имеют важное регуляторное значение.

TNF $\alpha$  существует в виде мембраносвязанной формы (mTNF $\alpha$ ) с относительной молекулярной массой приблизительно 26 кДа. mTNF $\alpha$  и может быть преобразован в растворимый TNF $\alpha$  17 кДа (sTNF $\alpha$ ) под действием матричной металлопротеиназы, известной как TNF $\alpha$ -конвертирующий фермент (TACE: ADAM17). mTNF $\alpha$  обладает способностью обрабатывать внешние сигналы в

качестве рецептора [Eissner 2004]. sTNF $\alpha$  циркулирует по всему телу и функционирует вдали от места его синтеза. И sTNF $\alpha$ , и mTNF $\alpha$  активны как нековалентно связанные гомотримеры.

В многочисленных исследованиях показано участие TNF $\alpha$  в развитии воспалительных и защитных реакций организма [Останин 2002, Grivennikov 2005, Совалкин 2013, Колесникова 2018] регуляции апоптоза и некроптоза [Baud 2001, Wajant 2003], а также пролиферации и дифференцировке иммунокомпетентных клеток [Zhou 2002, Beutler 1998, Naismith 1995]. Помимо этого TNF $\alpha$  опосредует синтез других провоспалительных цитокинов и способствует усилению их действия [Zelová 2013, Kallioli 2006], действует на опухолевые клетки различной природы [Скворцова 2008, Тыринова 2018].

Считалось, что TNF $\alpha$  в основном продуцируется макрофагами и Т-клетками, но в настоящее время известно, что он продуцируется большим количеством клеток, включая лимфоидные клетки, тучные клетки, эндотелиальные клетки, кардиомиоциты [Середавкина 2010], жировую ткань, фибробласты, эритробласты [Sennikov 2004], остеобласты и остеокласты [Новиков 2010], нейроны, астроциты, клетки микроглии [Gahring 1996], кератиноциты, адипоциты, клетки надпочечников и мезангиальные клетки клубочков [Hale 1995, Bradley 2008].

Одним из основных стимуляторов запускающих производство TNF-а считается бактериальный липополисахарид (ЛПС, эндотоксин). Однако, установлено, что помимо ЛПС, вирусные, грибковые и паразитарные антигены, энтеротоксин, анафилотоксин C5a, суперантиген, иммунные комплексы, IL-1, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, TGF- $\beta$  и TNF $\alpha$  сам по аутокринным механизмам способен индуцировать экспрессию TNF $\alpha$ . Существует так же ряд патофизиологических состояний, которые могут стимулировать выработку TNF $\alpha$  , включая инфекцию и воспаление, а также ожоги, травмы, инфаркт, сердечная недостаточность, нестабильная стенокардия, инсульт, черепно-мозговые травмы и астма и многие другие состояния [Галякин 2012, Соснина 2013]. Ослабляться продукция TNF $\alpha$



может при действии IL-4 и других агентов, которые способны снизить уровень цАМФ [Cairns 2000].

Установлено, что клетки никогда не создают резервов TNF $\alpha$ , стимуляция запускает его синтез de novo. При синтезе TNF $\alpha$  задействованы механизмы транскрипционной, трансляционной и посттрансляционной регуляции [Camussi 1991].

Отрицательная обратная связь - еще один регуляторный механизм, играющий важную роль в биосинтезе TNF $\alpha$ . TNF $\alpha$  способен сам индуцировать синтез противовоспалительных факторов, такие как IL-10, кортикостероиды или простаноиды, которые отрицательно регулируют его экспрессию. В целом эта система способствует лучшему контролю воспаления, что способствует развитию быстрой иммунной реакции опосредованной TNF $\alpha$  и, следовательно, регулированию ее степени и продолжительности [Sullivan 2003 Lee 2003].

Таким образом, многочисленные исследования демонстрируют, что строение и функции TNF $\alpha$  опосредуют большой спектр разнообразных эффектов данного цитокина в организме в норме и при патологии.

### **Рецепторы TNF $\alpha$ и сигнальные пути**

Эффекты TNF $\alpha$  реализуются при связывании его с двумя типами рецепторов - TNFR1 и TNFR2. TNF $\alpha$  человека сильно связывается с рецепторами как первого так и второго типа с константой диссоциации K<sub>d</sub> около 0,5 и 0,1 нМ для TNFR-1 и TNFR-2 соответственно. Сложные взаимодействия между циркулирующей и мембраносвязанной формой самого цитокина и различных типов его рецепторов обеспечивают молекулярную основу плеiotропных биологических эффектов TNF $\alpha$  [Tartaglia LA 1991].

Ген TNFR1 локализован в хромосомном локусе 12p13.31, имеет десять экзонов и кодирует трансмембранный рецептор 55/60 кДа. Ген TNFR2 расположен в хромосомном локусе 1p36.22, состоит из десяти экзонов и кодирует

трансмембранный рецептор 75/80 кДа [Loetscher 1990, Schall 1990, Fuchs 1992, Santee 1996]. Внеклеточные лиганд-связывающие домены этих рецепторов имеют субдомены, богатые цистеином, характерные для членов суперсемейства TNFR с 28% гомологией. При этом, внутриклеточные домены TNFR1 и TNFR2 не обладают гомологией последовательностей или внутренней ферментативной активностью и способны запускать различные сигнальные пути из-за различий в их взаимодействии с цитозольными белками [Ihnatko. 2007]. Оба рецептора могут существовать в растворимой форме (sTNFR1 и sTNFR2), создаваемой мембранными рецепторами за счет активности фермента TACE, который также отвечает за образование растворимой формы TNF $\alpha$ . Эти свободные рецепторы способны ослаблять действие TNF $\alpha$  за счет конкурирующих механизмов, или они могут стабилизировать TNF $\alpha$  и защищать его от деградации [Aderka 1992; Wang 2003]. TNFR1 экспрессируется на поверхности почти всех типов клеток человека (кроме эритроцитов [Tracey 2008]) и может быть активирован трансмембранным и растворимым TNF $\alpha$ , TNFR2 находится в основном на иммунных и эндотелиальных клетках и для его активации необходим трансмембранный TNF $\alpha$ . Существуют данные, что мембраносвязанная форма TNF $\alpha$  может, создавать более высокоупорядоченные кластеры рецепторов, чем растворимый TNF $\alpha$ , и, как следствие, может обеспечивать усиление сигнала трансдукции TNFR2.

Сборка внутриклеточного сигнального комплекса белков TNF-рецепторов происходит в ответ на индуцируемую лигандом тримеризацию рецептора [Banner 1993] или «олигомеризацию» с большим числом мономеров. Показано, что активация TNFR2 сильно зависит от олигомеризации [Karathanasis 2020].

TNF $\alpha$  связывается с TNFR1 и TNFR2 (0,04 и 0,082 нМ), при этом, TNFR2 обладает более низким сродством связывания с TNF $\alpha$  и легче отделяет цитокин от рецептора. При низкой концентрации TNF $\alpha$  TNFR2 может на мгновение связываться и впоследствии высвободить TNF $\alpha$  обеспечивая в случае необходимости передачу сигнала на TNFR1 [Al-Lamki 2001].

Считается, что TNFR1 является ключевым медиатором действия TNF $\alpha$  для большинства клеток, тогда как TNFR2 играет основную роль в клетках лимфатической системы или вспомогательную роль, усиливая или синергизируя с TNFR1 [Grell M, 1995, Grell 1998].

### **TNF $\alpha$ - индуцированная передача сигналов**

TNF $\alpha$  запускает множество внутриклеточных сигнальных событий; в основном это приводит к транскрипции генов провоспалительных медиаторов, с одной стороны, и генов, связанных с апоптозом, с другой [Parameswaran, 2010].

Внеклеточный домены как TNFR1, так и TNFR2 богаты цистеином и способны связываться с одним и тем же лигандом - TNF $\alpha$ . Однако, внутриклеточные домены разительно отличаются. TNFR1 содержит цитоплазматический «домен смерти», который представляет собой консервативную последовательность из 80 аминокислот, образующую характерную складку [Lavrik 2005, Tartaglia 1993]. Этот «домен смерти» позволяет TNFR1 рекрутировать молекулу-адаптер TNFR1-ассоциированный белок домена смерти (TRADD), который является важным компонентом сигнального комплекса TNFR1 [Hsu 1995]. Напротив, TNFR2 лишен последовательности цитоплазматического домена смерти и рекрутирует TNFR-ассоциированный фактор 1 (TRAF1) и TRAF2, вместо TRADD [Tartaglia 1993, Hsu 1995, Rothe 1995]. Было показано, что как TNFR1, так и TNFR2 обладают сборочным доменом, предшествующим связыванию лиганда, который не взаимодействует с лигандом, но необходим для инициации передачи сигналов [Chan, 2000]. Следовательно, рецептор уже существует в своей тримерной форме еще до лигирования с TNF $\alpha$ . Как передача сигналов TNFR1-TRADD, так и передача сигналов TNFR2 через TRAF1 и TRAF2 могут приводить к активации NF- $\kappa$ B. Участие TNFR2 способствует выживанию клеток через этот путь, и наоборот, TNFR1-TRAD передача сигналов может приводить либо к выживанию клеток, либо к гибели клеток в зависимости от последующих сигнальных событий. До сих пор не совсем ясно, как регулируется передача сигналов TNFR1

и TNFR2, помимо паттернов дифференциальной экспрессии самих рецепторов. Во многих случаях иммунные клетки, которые экспрессируют TNFR2, также экспрессируют TNFR1, и это затрудняет прогнозирование исхода опосредованной TNF передачи сигналов. Было показано, что относительные уровни TNFR1 и TNFR2 на поверхности клеток и их статус активации в специфическом контексте играют важную роль в определении судьбы клеток [Lenardo 1991, Pimentel-Muinos 1999]. Помимо этого существуют перекрестные связи между этими рецепторами и за последнее десятилетие были сформулированы несколько новых концепций, которые расширили наш взгляд на эффекты TNF $\alpha$  -индуцированной передачи сигналов.

### **TNFR1-опосредованные сигнальные пути**

TNFR1 экспрессируется почти на всех ядродержащих клетках. Он активируется связыванием растворимого или мембраносвязанного цитокина, (растворимый TNF $\alpha$  предпочтительно связывает TNFR1) [Grell 1998]. Связывание TNF $\alpha$  с TNFR1 считается необратимым событием, и это взаимодействие лиганд-рецептор затем запускает внутриклеточную передачу сигналов.

При взаимодействии с TNF $\alpha$  TNFR1 перемещается к липидным рафтам в плазматической мембране, и это имеет решающее значение для активации NF- $\kappa$ B [Legler 2003]. Связывание TNF $\alpha$  с предварительно собранным TNFR1 вызывает конформационные изменения в цитоплазматическом домене рецептора, что позволяет рекрутировать TRADD, который, в свою очередь, рекрутирует рецептор-взаимодействующую серин / треонин-протеинкиназу 1 (RIPK1) [Hsu 1996, Ting 1996].

После связывания TNFR1, TRADD и RIPK1 инициирует сборку комплекса I TNFR1, который направляет события передачи сигналов далее. Следующим шагом в образовании комплекса I является рекрутирование TRAF2, который связывается с аминоконцевым TRAF-связывающим доменом TRADD [Hsu 1996]. В этот момент сигнальные каскады TNFR1-TRADD-RIPK1-TRAF2 и TNFR2-

TRAF2 снова становятся похожими, но связывание TRAF2 с TNFR2 намного слабее, чем у TRAF2 с TRADD [Park 2000]. Это различие предполагает, что может существовать основанный на аффинности регуляторный механизм для контроля этих двух путей, индуцированных  $\text{TNF}\alpha$ . В связи с этим можно предположить, что при определенной концентрации  $\text{TNF}\alpha$  TNFR2 может блокировать передачу сигналов, ослабляя или изменяя силу или результат передачи с помощью TNFR1 в той же самой клетке [Park 2000, Grech 2005, Fotin-Mleczek 2002]. Далее TRAF2 связывается с клеточным ингибитором апоптозного белка 1 (cIAP1; также известного как BIRC2) и cIAP2 (также известного как BIRC3). При этом существуют исследования на мышах, которые подтверждают, что TRADD, TRAF2, RIPK1 и cIAPs важны, но не обязательны для TNFR1-индуцированной активации NF- $\kappa$ B [Yeh 1997, Chen 2008, Ermolaeva 2008, Pobezinskaya 2008, Mahoney 2008].

### **TNFR2-опосредованные сигнальные пути**

Экспрессия TNFR2, в отличие от повсеместного TNFR1 более ограничена и обнаруживается на эндотелиальных и иммунных клетках, особенно моноцитах и макрофагах, но также на Т-клетках, В-клетках и NK-клетках [Hehlgans 2005, Aggarwal 2003]. В отличие от TNFR1 события передачи сигналов, опосредованные исключительно TNFR2, не очень хорошо изучены. Как упоминалось выше, TNFR2 может полностью активироваться только мембранным  $\text{TNF}\alpha$ , но не растворимым. Сигнальные пути, инициированные через TNFR2, включают TRAF1 и TRAF2, c-IAP1 и c-IAP2, что приводит к активации NF- $\kappa$ B [Rothe 1995]. Кроме того, было показано, что TNFR2 опосредует активацию MAPK [Rothe 1995]. TRAF2, по-видимому, играет центральную роль в этом каскаде передачи сигнала, поскольку доминантно-отрицательные формы этой молекулы блокируют, тогда как чрезмерная экспрессия усиливает TNFR2-опосредованную активацию NF- $\kappa$ B. В отличие от TNFR1, который активирует классический путь, TNFR2 также, активирует неканонический путь активации NF- $\beta$ , который запускает процессинг p100 и образование p52-содержащих

гетеродимеров этого фактора транскрипции [Rauert 2010]. Следует отметить, что внутриклеточная часть TNFR2 лишена домена смерти, чтобы взаимодействовать, например, с FADD, как это делает TNFR1. Однако существует множество сообщений, описывающих важную роль TNFR2 на развитие апоптоз различных типов клеток, таких как Т-клетки и миелоидные клетки [Chan 2000]. Однако механистическая основа этих наблюдений неизвестна. В целом, по сравнению с обилием информации о событиях передачи сигнала TNFR1, который является одним из наиболее хорошо охарактеризованных сигнальных каскадов, по TNFR2 имеется мало убедительной информации. Частично это связано с тем, что многие эксперименты проводились с использованием растворимого TNF $\alpha$ , который, как упоминалось ранее, не активирует полностью TNFR2. Кроме того, многие отчеты, демонстрирующие роль одного TNFR2 в передаче сигналов, были выполнены с использованием систем, в которых рецепторы и / или нижестоящие компоненты были сверхэкспрессированы, и имеется мало данных о событиях опосредованной TNFR2 передачи сигнала в первичных клетках. Кроме того, было проведено всего несколько экспериментов с TNFR1-дефицитными клетками, которые могли подтвердить TNFR1-независимые эффекты TNFR2. Следовательно, остаются открытыми вопросы относительно функциональных свойств TNFR2 [Blum1 2012].

### **TNFR1-TNFR2 «комбинированные сигнальные пути»**

Несмотря на необходимость понимания рецептор-специфических модальностей активации и передачи сигналов, биологические эффекты TNF $\alpha$  также зависят от перекрестного действия TNFR1-TNFR2. Поскольку оба рецептора могут отщепляться от поверхности клеток, концентрация растворимых рецепторов может сильно влиять на TNF $\alpha$ -зависимые биологические эффекты. Сообщалось, в частности, о том, что из-за своей высокой аффинности связывания с TNF $\alpha$  растворимая форма TNFR2 ингибируют TNF $\alpha$ , убирая цитокин, тем самым подавляя взаимодействие с сигнальными рецепторами. Более того, связывание TNF $\alpha$  с TNFR2 имеет быструю кинетику включения и выключения. Следовательно, одна из функций ассоциированного с мембраной TNFR2 состоит

в том, чтобы концентрировать TNF $\alpha$  на поверхности клеток и действовать как рецептор, передающий лиганд TNFR1, и тем самым усиливающий сигналы, опосредованные TNFR1 [Tartaglia 1993].

## **1.2 Регуляция внутриклеточного сигналинга**

Существует несколько механизмов с помощью которых происходит регуляция внутриклеточного сигналинга и переключение сигнальных путей, которые ведут к реализации клетками различных функциональных ответов. Важную роль в определении исходов, вызванных TNF $\alpha$  имеет посттрансляционная модификация белков, участвующих в сигнальных каскадах TNF $\alpha$ .

### **Роль убиквитилирования в регуляции внутриклеточной передачи сигналов**

Убиквитилирование, ковалентное связывание высококонсервативного белка убиквитина с белком-мишенью, представляющий собой иерархический трехэтапный процесс, включающий активацию убиквитина E1, конъюгирование убиквитина E2 и ферменты убиквитинлигазы E3, прикрепляющие определенные цепочки молекул убиквитина к белкам-мишеням с образованием полиубиквитилированных конъюгатов. Длина присоединенной убиквитиновой цепи может изменить судьбу целевого белка, как и природа ковалентной связи между самими белками убиквитина. Эти полиубиквитиновые связи обычно включают определенные остатки лизина или метионина. Для TNF-индуцированной передачи сигналов полиубиквитилирование через разветвленные связи K11, K48 или K63 или, альтернативно, через линейные связи M1, играет преобладающую роль в определении судьбы целевого белка. Например, белки, которые присоединены к цепям полиубиквитина, связанным с K48, подвергаются деградации [Hershko 1998]; такое разрушение медиатора передачи сигналов способствует отключению внутриклеточной передачи сигналов. Напротив, события полиубиквитилирования, связанные с K63 и M1, усиливают белковый каркас и активацию клеток. Обе функции деградации и активации описаны для K11-связанных цепей полиубиквитина [Komander 2012]. Что касается TNF-

индуцированной активации NF- $\kappa$ B, считается, что создание K63-связанного убиквитилированного каркаса, содержащего RIPK1, является критическим для рекрутирования нижестоящих сигнальных медиаторов. Также считается, что TRAF2 и TRAF5 функционируют как лигазы E3, которые присоединяют цепи полиубиквитина, связанные с K63, к RIPK1 [Bertrand 2008]. Однако, действительно ли TRAF2 выполняет функцию лигазы E3, является предметом многочисленных споров [Zheng 2010, Yin 2009, Vince 2009].

Таким образом убиквитилирование является одним из центральных механизмов внутриклеточной регуляции сигналинга рецепторов TNF $\alpha$ .

### **Роль NF- $\kappa$ B в регуляции внутриклеточной передачи сигналов**

Цепи убиквитина прикрепленные к RIPK1 рекрутируют комплекс киназ I $\kappa$ B (IKK) с сигнальным ядром TNFR1 [Haas 2009, Tokunaga 2009]. Комплекс IKK состоит из трех субъединиц: двух киназ, называемых IKK $\alpha$ , и IKK $\beta$  и регуляторная субъединица NF- $\kappa$ B Essential Modulator (NEMO; также известный как IKK $\gamma$ ) [Israel 2010, Hoffmann 2006]. После активации IKK фосфорилирует ингибитор NF- $\kappa$ B- $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ), который связывается с NF- $\kappa$ B в стационарных условиях и сохраняет его неактивным в цитоплазме. При фосфорилировании I $\kappa$ B $\alpha$  нацеленом на K48-связанное происходит убиквитилирование с последующим деградацией, которая делает NF- $\kappa$ B активным. Активированный NF- $\kappa$ B перемещается в ядро и активирует транскрипцию своих многочисленных генов-мишеней, которые участвуют в выживании и пролиферации клеток [Israel 2010, Hoffmann 2006].

Привлечение NEMO к убиквитилированной RIPK1 имеет решающее значение для активации IKK для активация NF- $\kappa$ B [Weil 2003]. Соответственно, мутации в убиквитин-связывающем домене NEMO ослабляют активацию NF- $\kappa$ B в ответ на TNF $\alpha$  [Ea 2006, Wu 2006, 2018].

### **Передача сигналов TNF при апоптозе и некроптозе**



TNF $\alpha$  - это очень универсальный цитокин с плеiotропными функциями в отношении иммунитета, воспаления и гибели клеток [Bemelmans 1996]. Интересно, что механизм, с помощью которого опосредуются различные функции TNF $\alpha$ , не сводится к простому связыванию с различными рецепторами. Фактически, связывание TNF $\alpha$  с TNFR1 может индуцировать либо выживание клеток, либо различные формы гибели клеток; следовательно, регуляция передачи сигнала TNF $\alpha$  - это постоянный баланс между противоположными функциями. [Bluml 2012].

TNF $\alpha$ -индуцированная передача сигналов через TNFR1, приводит к активации NF- $\kappa$ B, которая поддерживает выживаемость клеток, а воспаление реализуется с помощью связанного с мембраной сигнального ядра TNFR1-TRADD-RIPK1-TRAF2, известного как комплекс I [Micheau 2003]. Однако, исходя из его структуры, TNFR1 классифицируется как рецептор смерти, и было показано, что классический апоптоз возникает при связывании TNF $\alpha$  с TNFR1 [Aggarwal 2012].

Апоптотический каскад, инициированный связыванием TNF $\alpha$  с TNFR1 может быть опосредован одним из двух сигнальных комплексов TNFR1, известных как комплекс IIa и комплекс IIb. Начальная сборка этих белковых комплексов при стимуляции TNFR1 происходит проксимальнее мембраны, но они перемещаются в цитозоль для продолжения дальнейшего образования комплекса.

### **RIPK1 как центральный молекулярный переключатель**

Важным молекулярным переключателем, который определяет, передачу сигналов TNF $\alpha$ -TNFR1 для выживания клеток или апоптоза, является статус убиквитилирования RIPK1. Не только полиубиквитилирование RIPK1, связанного с TRADD, необходимо для активации NF- $\kappa$ B, но также блокировка образования комплекса IIa и комплекса IIb, что приводит к выживанию клетки. [He 2009, Cho 2009]. Когда RIPK1 не убиквитилирован, TNF $\alpha$ -управляемая передача сигналов NF- $\kappa$ B выключается, так что апоптотическая передача сигналов доминирует и клетка умирает. Неубиквитилированный RIPK1 приводит к диссоциации

комплекса, содержащего RIPK1 от мембраны и образованию белковых комплексов, которые способствуют гибели клеток.

### **Передача сигналов TNF при некроптозе**

Некроптоз - это провоспалительная форма гибели клеток, при которой исходные события не зависят от каспазы. В отличие от ограниченного самоуничтожения апоптотической клетки, некроптозная клетка демонстрирует набухание клеточных органелл, разрыв клеточной мембраны и неконтролируемое высвобождение клеточного содержимого в окружающую ткань, что в конечном итоге приводит к гибели клетки [Kroemer 2009, Galluzzi 2012]. На молекулярном уровне RIPK1 является основной молекулой в сложном и универсальном сигнальном пути, который решает, приведет ли взаимодействие  $\text{TNF}\alpha$  -  $\text{TNFR1}$  к активации NF- $\kappa$ B (выживанию клеток), апоптозу (запрограммированной гибели клеток) или некроптозу (беспорядочной гибели клеток). Как упоминалось ранее, если присутствуют высокие уровни убиквитилированного RIPK1, то образуется мембраносвязанный комплекс I, происходит активация NF- $\kappa$ B и клетка выживает [Brenner 2016].

Белок-ингибитор FLICE (FADD-подобный IL-1 $\beta$ -превращающий фермент) (с-FLIP) является основным антиапоптотическим белком с-FLIP экспрессируется в виде длинных (с-FLIPL), коротких (с-FLIPS) вариантов сплайсинга с-FLIPR в человеческих клетках. Если цитозольные комплексы IIa и IIb собраны, а деубиквитилированные RIPK1 и RIPK3 расщепляются активным FLIPL, затем активируют другие каспазы, происходит апоптоз [Vince 2007, Varfolomeev 2007]. Однако, если деубиквитилированный RIPK1 присутствует, но каспазы инактивированы, так что RIPK1 и RIPK3 не могут быть расщеплены FLIPL, то программа гибели клеток переключается с апоптоза на некроптоз [Vercammen 1998, Zhang 200].

### **1.3. Влияние плотности экспрессии рецепторов на функции**

В многочисленных исследованиях последних лет показано, что функционирование цитокинов осуществляется посредством специфических рецепторов, поэтому в настоящее время ведется активная работа по их изучению в норме и при различных патологиях.

В исследованиях для различных типов рецепторов показано, что дифференциальная активность некоторых цитокинов может быть продиктована не только собственной кинетикой связывания лиганда и рецептора, но также плотностью компонентов рецептора на клеточной поверхности, которая может влиять на функциональный ответ клетки [Moraga 2009, Booy 2014]. Также показано существование «порогового» уровня, который служит регулятором функционального ответа клеток на медиатор [Conti 2008]. Кроме того, возможна перекрестная активация сигнальных путей при различных соотношениях количества экспрессируемых рецепторов [Fotin-Mleczek 2002].

Для понимания регуляции функционального ответа важно учитывать не только тип рецептора, с которым связывается TNF $\alpha$ , но и плотность этого рецептора на поверхности клетки-мишени. Важным является и оценка внутривнутрипопуляционного состава клеток, которые имеют значимые отличия по уровню экспрессии рецепторов. Основные субпопуляции иммунокомпетентных клеток (Т-лимфоциты, В-лимфоциты и моноциты) отличаются по экспрессии рецепторов 1 и 2 типа как в норме [Lopatnikova 2013], так и при различных заболеваниях [Alshevskaya 2014, Sennikov 2015, Альшевская 2015, Киреев 2019], при этом изменение процента клеток, экспрессирующих соответствующий рецептор в субпопуляции носят разнонаправленный характер.

Важна роль уровня экспрессии рецепторов при развитии онкологических заболеваний, так при почечно-клеточной карциноме, клетки которой секретируют TNF $\alpha$  показано значительное увеличение экспрессии TNFR2, но не TNFR1, на злокачественных клетках, что коррелировало с увеличением степени их злокачественности [Al-Lamki 2010].

В исследованиях показана оценка уровня экспрессии TNFR 1 и 2 в человеческих аллотрансплантатах сердца. В сердце человека без признаков отторжения высоко экспрессировался TNFR1 одновременно с неактивной киназой-1 (ASK1), регулирующей сигнал апоптоза в кардиомиоцитах и эндотелиальных клетках сосудов. TNFR2 экспрессировался только в эндотелии сосудов. В локальных микрососудах отмечались низкие уровни TNF $\alpha$ . При отторжении сердечных аллотрансплантатов было выявлено увеличение TNF $\alpha$  в микрососудах, снижение TNFR1, активация ASK1, повышенная экспрессия TNFR2, коэкспрессируемая с активированной эндотелиальной / эпителиальной тирозинкиназой (Etk), и, как следствие, увеличение апоптоза кардиомиоцитов. При оценке ответа культур тканей сердца от мышей дикого типа по сравнению с культурами тканей сердца мышей нокаутных по TNFR1 и TNFR2 и по двум рецепторам одновременно на действие TNF $\alpha$ , было выявлено, что в миокарде дикого типа TNF $\alpha$  увеличивал как апоптоз, так и вход в клеточный цикл. Обработанные TNF $\alpha$  клетки миокарда мышей нокаутных по TNFR1 показали слабую индукцию апоптоза, но увеличение пролиферации клеток. Миокард мышей нокаутных по TNFR2 показал небольшой уровень пролиферации и увеличение апоптоза. Эти наблюдения демонстрируют независимую регуляцию и дифференциальные функции TNFR в миокарде, согласующиеся с TNFR1-опосредованной гибелью клеток и TNFR2-опосредованной репарацией [Al-Lamki 2009].

Роль экспрессии TNFR2 показана при различных онкологических заболеваниях. Дефицит TNFR 2 на мышинной модели рака легкого не только усиливал апоптоз опухолевых клеток, но также приводил к подавлению проангиогенных факторов, таких как факторы роста эндотелия сосудов, гепатоцитов и плаценты, из эндотелиальных клеток-предшественников [Sasi 2012]. Кроме того, передача сигналов TNFR2 косвенно способствует ангиогенезу, индуцируя секрецию интерлейкина -6 [Lauenborg 2015]. При почечной карциноме TNFR2 на эндотелиальных и канальцевых эпителиальных клетках активирует эндотелиальную / эпителиальную тирозинкиназу, а затем активирует рецептор-2

фактора роста эндотелия сосудов или напрямую способствует делению клеток [Al-Lamki 2016], при этом экспрессия TNFR2, коррелирует со степенью злокачественности. При колоректальной карциноме высокая экспрессия TNFR2 способствует пролиферации опухолевых клеток через путь PI3K-AKT [Zhao 2017] или через активацию NF- $\kappa$ B [Jain 2010]. Эти исследования предполагают, что TNFR2 напрямую усиливает рост опухоли, а также участвует в злокачественной трансформации [Feng 2016]. В моделях хронического воспаления на животных TNFR2 индуцирует активацию NF- $\kappa$ B в эпителиальных клетках, что впоследствии приводит к канцерогенезу [Nagaishi 2016].

При исследовании плотности экспрессии рецепторов TNF $\alpha$  у больных ревматоидным артритом по сравнению со здоровыми, было показано, что «МНК различаются по проценту клеток, экспрессирующих рецепторы, так и по числу рецепторов на них. При этом увеличение или уменьшение плотности экспрессии рецепторов на клетках при РА не связано с изменением процента клеток, экспрессирующих данные рецепторы. Т-лимфоциты характеризовались наибольшим процентом клеток, экспрессирующих рецептор 2 типа и минимальной плотностью экспрессии рецепторов обоих типов». Авторы считают, что это может быть связано с низкой пороговой плотностью рецепторов и более высокой чувствительностью данной популяции к действию цитокина. Выявленные в ходе данного исследования особенности распределения рецепторов по основным популяциям позволяют предположить различный потенциал связывания медиатора с рецепторами [Alshevskaya 2017].

Таким образом, одним из важных механизмов регуляции эффективности действия цитокинов и вариабельности их биологических эффектов является плотность экспрессии рецепторов на поверхности клеток, и количество рецепторов, участвующих во взаимодействии лиганда с клеткой. Поэтому при исследовании изменений в системе мембраносвязанных форм рецепторов и самого цитокина необходимо оценивать не только процентное содержание клеток, несущих рецепторы, но и количество самих экспрессируемых рецепторов.

Изучение плотности экспрессии рецепторов к медиаторам имеет важное практическое значение, для понимания механизмов ответа клетки при изменении уровня экспрессии рецепторов в норме и при различных патологиях. Все это может служить терапевтической мишенью для лечения и профилактики различных заболеваний.

#### **1.4. TNF $\alpha$ –опосредованная регуляция биологических функций отдельных популяций иммунных клеток**

TNF $\alpha$  играет важную роль в пролиферации, апоптозе и дифференцировке основных популяций иммунных клеток, таких как моноциты, Т и В –лимфоциты, при этом, в исследованиях показано, что различные популяции экспрессируют различные уровни рецепторов, что связано с различием в выполняемых данными клетками функций и в возможностях реализовывать функциональный ответ на действие TNF $\alpha$ .

##### **Регуляция биологических функций моноцитов**

В исследованиях показано, что экзогенное добавление TNF $\alpha$  активирует макрофаги после примирования гамма-интерфероном (IFN $\gamma$ ). TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  демонстрируют перекрестную связь на уровне TNFR1, вызывая активацию макрофагов. Было показано, что TNF $\alpha$  вызывает более сильную активацию NF $\kappa$ B в присутствии IFN- $\gamma$ . Передача сигналов IFN- $\gamma$  вызывает ядерную локализацию STAT1 $\alpha$ , которая препятствует его рекрутированию на TNFR1, что приводит к усиленной TNF $\alpha$ -индуцированной активации NF $\kappa$ B [Wesemann 2003].

Активированные макрофаги могут мигрировать к участкам воспаления, где они сталкиваются с патогенами и лизируют их. Это достигается за счет увеличения производства токсичных форм кислорода и индукции индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) с образованием оксида азота (NO). В недавнем исследовании было показано, что контроль инфекции *Trypanosoma congolense* зависит от растворимого TNF $\alpha$ , происходящего из макрофагов и нейтрофилов [Magez 2007].

Исследования передачи сигналов TNF $\alpha$  в макрофагах в основном сосредоточены на острой и временной активации путей передачи сигнала и факторов транскрипции, таких как NF $\kappa$ B. В недавнем исследовании изучалась реакция первичных макрофагов в течение 2-дневного периода после стимуляции TNF $\alpha$  [Yarilina 2008]. Результаты этого исследования показали, что TNF $\alpha$  индуцирует аутокринную петлю, которая характеризуется низкой и устойчивой продукцией IFN- $\beta$ . Было обнаружено, что IFN- $\beta$  действует синергетически с каноническим сигналом TNF $\alpha$ , вызывая устойчивую экспрессию генов, кодирующих воспалительные молекулы, и замедленную экспрессию генов, кодирующих молекулы, отвечающие за интерферон. Затем считается, что эти молекулы запускают макрофаги для усиления реакции на последующее заражение микробными продуктами или цитокинами. Эта петля прямой связи играет важную роль в поддержании воспаления [Michlewska 2009].

### **Роль TNF $\alpha$ в пролиферации, апоптозе и дифференцировке макрофагов**

Исследования показали, что долгосрочное выживание макрофагов зависит от аутокринной передачи сигналов с помощью TNF $\alpha$  [Lombardo 2007]. Поскольку TNF $\alpha$  опосредует многие патологические эффекты LPS-TLR4 в таких условиях, как септический шок, предполагается, что длительное выживание макрофагов, опосредованное TNF $\alpha$ , играет важную роль в сепсисе [Conte 2006]. Пытаясь определить роль TNFR в Fas-индуцированном апоптозе, исследователи создали линии нокаутированных макрофагов, полученные от мышей дикого типа [Takada 2004, 2007]. Авторы продемонстрировали, что и TNFR1, и TNFR2 необходимы для Fas-индуцированного апоптоза макрофагов, потому что как TNFR1, так и TNFR2 нокаутированные клетки были устойчивы к анти-Fas-индуцированному апоптозу.

Помимо этих эффектов, транскрипты гена TNF $\alpha$  экспрессируются во время дифференцировки макрофагов, происходящих из костного мозга. Чтобы проверить важность этого, авторы использовали блокировку экспрессии гена

TNF $\alpha$  во время дифференцировки. Они обнаружили, что в отсутствие TNF $\alpha$  (в дифференцирующихся макрофагах) клетки следовали программе пролиферации вместо того, чтобы проходить программу дифференцировки. Эти результаты предполагают, что «аутокринные» эффекты TNF $\alpha$  важны для стимуляции дифференцировки макрофагов [Witse 1993, Ярилин 2018].

Субпопуляции моноцитов экспрессируют не только разные уровни CD14, CD16 и HLA-DR, но также разные уровни TNFR1 и TNFR2. В исследованиях показано, что моноциты экспрессировали TNFR1, при этом промежуточные моноциты показали более высокую экспрессию TNFR1, чем классические и неклассические. Неклассические моноциты экспрессировали самые высокие уровни TNFR2. Промежуточные моноциты экспрессировали меньше TNFR2, чем неклассические, но больше, чем классические. Промежуточные моноциты также экспрессируют самый высокий уровень TNFR1 среди субпопуляций моноцитов, в то время как неклассические моноциты [Hijdra 2012].

Эти результаты предполагают, что подобно другим типам клеток, TNF $\alpha$  играет важную роль в пролиферации, апоптозе и дифференцировке моноцитов и макрофагов

### **Регуляция биологических функций Т-лимфоцитов**

Т- лимфоциты являются не только продуцентами, но и реципиентами TNF $\alpha$ . Было показано, что во время ранней фазы запуска Т-клеточного рецептора (TCR) TNF $\alpha$  способен усиливать TCR-зависимую активацию как CD4, так и CD8 Т-клеток, включая увеличение уровней IL-2R и усиление пролиферации Т-клеток [Yokota 1988]. Это потенциально возможно за счет увеличения активации сигнальных путей NF- $\kappa$ B [Banerjee 2005]. Показано, что именно передача сигналов TNF через TNFR2, а не TNFR1, является непосредственно костимулирующим для TCR-опосредованной активации Т-клеток [Andrews 1990; Tartaglia 1991, Ware 1991].



TNFR2-дефицитные Т-клетки обладают меньшей реактивностью при активации посредством перекрестного связывания TCR, и, что интересно, предоставление сигналов CD28 не восстанавливает ответ этих клеток, таким образом предполагая роль TNF в стимулировании ранней активности Т-клеток. Важно отметить, что сигналы TNFR2, снижают пороговый уровень передачи сигналов TCR, необходимый для активации Т-клеток [Kim 2001]. В соответствии с этим, дефицит TNFR2 у мышей приводит как к снижению пролиферации, так и к продукции цитокинов в CD4 и CD8 Т-клетках [Kim 2006]. Аналогичным образом было обнаружено, что сигналы TNF / TNFR2 в Т-клетках критически необходимы для эффективного праймирования, пролиферации и рекрутирования Т-клеток CD8 в места роста опухоли *in vivo* [Calzascia 2007]. Эти данные подтверждают мнение о том, что TNF можно рассматривать как костимулирующий лиганд для Т-клеток. Недавно было показано, что передача сигналов TNFR2 в эффекторных Т-клетках CD4 увеличивает устойчивость к супрессии опосредованной регуляторными Т-клетками (Treg) [Calzascia 2010], а также передачу сигналов в наивных CD4+Т-клетках и противодействует действию TGF- $\beta$  в стимулировании дифференцировки Foxp3 + Treg-клеток [Zhang 2013]. Это позволяет сделать вывод о том, что TNF может играть сильную роль в стимулировании эффекторного звена Т-клеточного ответа.

Помимо стимулирующего действия TNF $\alpha$  при пролиферации Т-клеток, он также может способствовать поддержанию выживания Т-клеток во время инициации иммунных ответов. Некоторые исследования показали, что передача сигналов TNF через TNFR2 может увеличивать экспрессию антиапоптотических молекул, таких как Bcl-2, Bcl-xL и сурвивин, во время ранней фазы активации Т-клеток [Lin 1997, 2006]. Эти наблюдения были подкреплены обнаружением, что TNFR2-дефицитные мыши могут обладать значительно уменьшенными пулами Т-клеток памяти, что, вероятно, является следствием низкого количества эффекторных Т-клеток в первичном ответе [Lin 2001, Atreya 2011]. Аналогичным образом, передача сигналов через TNFR2 была показана для защиты эффекторных

Т-клеток CD8 дыхательных путей от апоптотической гибели во время инфекций вирусом гриппа [Richter 2007]. Наконец, сообщалось о потенциальной перекрестной реакции между TNFR2 и TNFR1 на Т-клетках CD8. Отсутствие передачи сигналов TNFR2 во время ранней активации Т-клеток привело к устойчивости и к индуцированной активацией гибели клеток (AICD) при простимуляции анти-CD3, и эти события были опосредованы передачей сигналов TNF $\alpha$  через TNFR1 [Twu 2011]. Следовательно, возможно, что TNFR1 также может передавать сигналы выживания Т-клеткам. TNF $\alpha$  также может оказывать противовоспалительное действие на Т-клетки. TNF $\alpha$  может быть основным путем, ведущим к апоптозу различных клеток [Brenner 2015], особенно для CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, которые могут подвергаться сильному клональному сокращению после пика эффекторного ответа. Таким образом, длительное воздействие TNF $\alpha$  или передача сигналов TNF $\alpha$  на более поздних стадиях эффекторного ответа может поддерживать повышенную гибель Т-клеток. Это может либо ограничить патологию, либо ограничить воспаление при некоторых хронических аутоиммунных заболеваниях.

Апоптотическая активность TNF $\alpha$  во многих типах клеток в первую очередь приписывается TNFR1, но TNFR2 может усиливать апоптотическую гибель, управляемую TNFR1 [Li 2001] и данные исследований подтверждают роль TNFR2 в контроле этой активности в Т-клетках. Так, было обнаружено, что передача сигналов TNF / TNFR2 усиливает функции эффекторных Т-клеток во время ответа на вирус гриппа, в то же время избирательный дефицит TNFR2 в Т-клетках CD8 приводил к увеличению количества этих клеток, сохраняющихся после обезвреживания вируса [Wortzman 2013]. Так же было показано, что TNF $\alpha$  и агонисты TNFR2 вызывают гибель аутореактивных CD8 Т-клеток у пациентов с диабетом, что указывает на апоптотическую роль TNFR2 в модулировании Т-клеточных ответов на аутоантиген. Подобно исследованиям, проведенным с CD8 Т-клетками, различные исследования также показали роль передачи сигналов

TNF $\alpha$  через TNFR1 или TNFR2 в индукции апоптоза CD4 T-клеток, особенно у пожилых или ВИЧ-инфицированных пациентов [Gupta 2002, 2005].

Помимо воздействия на обычные T-клетки, в недавних исследованиях показано, что TNF $\alpha$  может проявлять сильную активность в отношении регуляторных T (Treg) –клеток [Yang 2018]. Установлено, что TNFR2 экспрессируется клетками CD4 Foxp3 + Treg человека и мыши [Chen 2007], и предполагается, что совместная экспрессия CD25 с TNFR2 маркирует клетки с наибольшей супрессорной активностью [Chen 2010]. TNF $\alpha$  может оказывать два различных эффекта на клетки Treg: один - подавлять их супрессивную способность, а второй - способствовать их пролиферации. У пациентов с ревматоидным артритом Treg-клетки плохо ингибируют выработку эффекторных цитокинов обычными T-клетками, и несколько исследований показали, что этот дефект обусловлен TNF $\alpha$ , поскольку он может быть устранен ингибиторами TNF $\alpha$  [Ehrenstein.2004, Valencia 2006, Nie 2013].

Предложены так же и другие механизмы, с помощью которых TNF $\alpha$  может контролировать супрессивное действие Treg-клеток. Foxp3 является основным фактором транскрипции для многих Treg-клеток и определяет ингибирующую функцию. Было обнаружено, что TNF $\alpha$  сильно подавляет экспрессию Foxp3 в исследованиях человеческих Treg-клеток [Valencia 2003], а также противодействует повышающей регуляции Foxp3 в наивных T-клетках, дифференцирующихся в Treg-клетки под влиянием TGF- $\beta$  [Zhang 2013]. Также, для придания супрессорной активности белку Foxp3 необходимо фосфорилирование. В проведенном исследовании передача сигналов TNF $\alpha$  к Treg-клеткам увеличивала уровни и активность протеинфосфатазы 1. Было описано, что это, в свою очередь, дефосфорилирует Foxp3, что приводит к нарушению супрессивной функции [Nie 2013]. Точные пути передачи сигналов, необходимые для этих эффектов TNFR2, неизвестны, но каноническая передача сигналов NF- $\kappa$ B может быть ключевой, так же как путь PI3K / Akt [Nagar 2010].

Существует ряд сообщений, в которых показано, что TNF $\alpha$  может способствовать пролиферации и экспансии Treg-клеток. В совместных культурах мышинных Treg-клеток и эффекторных Т-клеток. Воздействие TNF $\alpha$  временно отменяло супрессию, но более длительное воздействие восстанавливало супрессивные эффекты, и в синергии с IL-2 приводило к увеличению популяции Treg-клеток [Chen 2007]. Кроме того, было обнаружено, что TNF $\alpha$  поддерживает экспрессию Foxp3 в Treg-клетках тимуса *in vitro* за счет действия TNFR2 [Housley 2011, Chen 2013].

Недавно было высказано предположение, что развитие Foxp3 + Treg клеток в тимусе также зависит от активности TNFR2 [Mahmud 2015]. Это показывает, что передача сигналов TNF $\alpha$  может увеличивать накопление Treg-клеток. Эти данные предполагают, что регулирование активностью TNF может изменить баланс между патогенными эффекторными Т-клетками и Treg-клетками в любом направлении.

### **Регуляция биологических функций В-лимфоцитов**

Данные, полученные на мышах, продемонстрировали роль TNFR2 в активации В-клеток [Hostager 2002]. Опубликованные данные предполагают избыточную роль TNFR2 и CD40 в активации В-клеток на основе общего сигнального пути с участием TRAF2 [Munroe 2004]. Более того, у пациентов СКВ терапия, нацеленная на TNF $\alpha$ , была связана с повышенным развитием аутоантител и волчаночных синдромов [Shakoor 2002, Markham 2000]. Хотя эти клинические наблюдения недостаточно понятны, они указывают на то, что TNF $\alpha$  обладает до сих пор не признанной регуляторной ролью в дифференцировке В-клеток. В исследованиях показано, что экспрессия TNFR2 в В-клетках стимулируется через TLR9 и совпадает с высвобождением IL-10 и терминальной дифференцировкой В-клеток, а так же в человеческих В-лимфоцитах повышение экспрессии TNFR2 совпадает с выработкой IL-10 [Ticha 2018].

Так же показано, что на периферических CD19 + В-клетках человека экспрессия TNFR1 и TNFR2 ограничена 3 и 10%, соответственно [Lopatnikova 2013]. По аналогии с другими типами клеток, экспрессия TNFR2 на В-клетках индуцируется, в то время как экспрессия TNFR1 является конститутивной, но слабой и изменяется только на небольшой субпопуляции В-клеток при стимуляции TLR9. [Ticha 2018].

В экспериментах В-клетки, оставшиеся отрицательными по экспрессии TNFR2 после стимуляции CpG ODN, принадлежали фракции наивных В-клеток, в то время как индукция экспрессии TNFR2 наблюдалась как на наивных субпопуляциях, так и в субпопуляциях В-клеток памяти. Было установлено, что экспрессия TNFR2 коррелирует с пролиферацией В-клеток и начальной дифференцировкой. Однако экспрессия TNFR2 уменьшается и, наконец, теряется при терминальной дифференцировке в плазматические бласты. TNFR2 не экспрессируется на плазматических клетках, выделенных из периферической крови человека. [Ziegler 2014]. Это наблюдение хорошо согласуется с концепцией о том, что В-клетки, секретирующие ИЛ-10, возникают как промежуточная стадия дифференцировки во время терминальной дифференцировки В-клеток [Heine 2014, van Dang 2014], и это дополнительно подтверждается данными о том, что количества IgM и IgG, измеренное в супернатанте TNFR2 + В-клеток были значительно выше, чем обнаруженные в TNFR2- В-клетках.

Опубликованные данные подтверждают, что TNF-опосредованная регуляция имеет критическое значение в процессах развития и функционирования основных популяций иммунных клеток.

### **1.5. Роль TNF $\alpha$ -опосредованной передачи сигналов при ревматоидном артрите**

В настоящее время имеется множество доказательств того, что TNF $\alpha$  играет центральную роль в патогенезе различных аутоиммунных заболеваний [Erickson 1994, Lorenz 2002, Smolen 2005, Trent. 2005, Оранский 2011]. Одним из

наиболее ярких примеров таких заболеваний является ревматоидный артрит (РА), при котором, в клинических исследованиях было выявлено критическое участие TNF $\alpha$  [Di Giovine 1988, Пачкунова 2014]. Полученные данные продемонстрировали, что TNF $\alpha$  чрезмерно экспрессируется в синовиальной жидкости, а также в синовиальной мембране больных РА. Более того, экспрессия рецепторов TNF $\alpha$  также активируется в синовиальной мембране пациентов с РА, особенно в областях, прилегающих к эрозиям и повышенные концентрации растворимых рецепторов коррелируют с активностью заболевания [Alsalameh 1999]. Дальнейшие доказательства ключевого участия TNF $\alpha$  в развитии артрита были получены от генетически измененных мышей, где избыточная экспрессия TNF $\alpha$  предполагает, что он напрямую участвует в патогенезе заболевания. Показано, что у мышей, которые сверхэкспрессируют человеческий TNF $\alpha$ , развивается артрит -подобные поражения суставов, с образованием гиперплазии синовиальной оболочки в сочетании с разрушением хряща и кости [Keffer 1991].

Доказательством служит и подавление биологической активности TNF $\alpha$  у пациентов, страдающих этими заболеваниями, приводящее к значительному улучшению их состояния [Ackermann 2007].

### **Роль TNFR1-опосредованных сигнальных путей в патогенезе РА**

Несмотря на доминирующую роль TNF $\alpha$  в аутоиммунитете, информации о двух его рецепторах в инициации и поддержании аутоиммунных заболеваний меньше. Используя модели воспалительного артрита на животных, TNFR1 однозначно был определен как движущая сила в развитии артрита. К примеру, у мышей с дефицитом TNFR1 наблюдалось снижение развития индуцированного коллагеном артрита [Tada 2001], а отсутствие TNFR1 полностью защищало этих животных от артрита.

TNFR1 так же способствует развитию местного разрушения кости за счет увеличения образования остеокластов [Zhang 2001, Kobayash 2000].

При этом, существуют исследования, в которых показано, что отсутствие TNFR1 на гематopoэтических клетках приводило к усилению признаков и симптомов артрита [Williams-Skipp 2009]. TNF $\alpha$  через TNFR1 ингибирует развитие патогенных клеток Th17 в CIA а при блокада TNFR1 Th17 клеток увеличивалось [Notley 2008, Aerts 2010]. Таким образом роль TNFR1 в развитии РА хотя и широко изучается, но остается неоднозначной.

### **Роль TNFR2-опосредованных сигнальных путей в патогенезе РА**

Существуют исследования, демонстрирующие противовоспалительные и антиартритогенные свойства TNF $\alpha$  реализуемые через TNFR2. В модели TNFR2-дефицитного артрита, у мышей развивается воспаление и разрушение суставов по сравнению с мышами дикого типа [Kontoyiannis 1992]. Показано, что экспрессия TNFR2 на гематopoэтических клетках снижает тяжесть TNF-зависимого артрита [Blum 2010].

Потеря TNFR2 кроветворными клетками приводит к усилению миграции воспалительных клеток к синовиальной мембране. Так же показано увеличение остеокластогенеза *in vitro*, а также *in vivo* у мышей, лишенных TNFR2, что усугубляло TNF-управляемый артрит, особенно в отношении местного разрушения костей [Abu-Ame 2000].

В настоящее время появляется все больше свидетельств, при различных экспериментальных аутоиммунных патологиях, предполагающих, что противовоспалительные сигналы доставляются через TNFR2. Был предложен и подтвержден один из механизмов, который заключается в шеддинге TNFR2, при котором происходит связывание растворимого TNF $\alpha$  и блокирует его провоспалительные свойства.

Полученные данные в целом свидетельствуют о важной роли TNF $\alpha$  в обеспечении клеточного гомеостаза и в поддержании иммунитета. Существующие различные формы самого цитокина и его рецепторов опосредуют

множество различных эффектов реализуемых при действии цитокина. Показано, что связывание с одним и тем же рецептором может вызывать как выживание клеток, так и различные формы их гибели.

На данный момент существует несколько регуляторных механизмов способных объяснить это явление. Одним из таких механизмов является регуляция внутриклеточного сигналинга и переключение сигнальных путей, которые ведут к реализации клетками различных ответов. Важную роль в определении исходов, вызванных  $\text{TNF}\alpha$  имеет посттрансляционная модификация белков, участвующих в сигнальных каскадах  $\text{TNF}\alpha$ .

Другим важным механизмом регуляции эффективности действия  $\text{TNF}\alpha$  и различии его биологических эффектов является плотность экспрессии рецепторов на поверхности клеток. Для понимания этого типа регуляции важно учитывать не только тип рецептора, с которым связывается  $\text{TNF}\alpha$ , но и плотность рецепторов на поверхности клетки-мишени.

$\text{TNF}\alpha$  и его рецепторы играют важную роль в пролиферации, апоптозе и дифференцировке основных популяций иммунных клеток таких как моноциты, Т и В –лимфоциты, при этом, различные популяции иммунных клеток экспрессируют различные уровни рецепторов, что связано с различием в выполняемых данными клетками функций и в возможностях реализовывать функциональный ответ на действие  $\text{TNF}\alpha$ .

Особенности распределения рецепторов по популяциям позволяют предположить наличие популяционно-зависимого механизма  $\text{TNF}\alpha$ -опосредованной регуляции биологических функций.

Связывание  $\text{TNF}\alpha$  с различными типами рецепторов оказывает различное влияние на судьбу клеток. Показано, что действие  $\text{TNF}\alpha$  связано с пролиферацией, дифференцировкой и апоптозом иммунокомпетентных клеток. Изменения в системах проведения сигнала в иммунокомпетентные клетки



наблюдается при развитии патологии, что приводит к изменениям в реализации функционального ответа клеток вовлеченных в патогенез заболевания. Так, при ревматоидном артрите нарушение баланса в экспрессии рецепторов приводит к усугублению течения заболевания и наоборот, блокада сверхэкспрессии рецепторов приводит к стабилизации.

Таким образом, оценка экспрессии рецепторов TNF $\alpha$  может являться перспективной для понимания механизмов регуляции иммунного ответа клеток в норме и при развитии патологии, а так же стать дополнительным критерием диагностики иммуноопосредованных заболеваний и терапевтической мишенью для создания новых подходов в лечении.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объект исследования

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

При постановке диагноза учитывались классификационные критерии РА ACR/EULAR, 2010, основанные на оценке клинических признаков поражения суставов, результатов лабораторных методов определения РФ и АЦЦП, результатов лабораторных методов определения "острофазовых" показателей и оценке длительности артрита. Все пациенты имели не менее 6 баллов, что является подтверждением ревматоидного артрита.

В качестве основного метода оценки активности воспаления, а также критерия эффективности проводимой терапии при РА применялся индекс DAS28. По уровню индекса DAS28 все пациенты были разделены на три группы по степени активности ревматоидного артрита. Для оценки функциональных нарушений суставов в динамике использовался опросник Health Assessment Questionnaire (HAQ).

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(ИРК) 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.

Демографическая и клиническая характеристика включенных пациентов и здоровых доноров представлены в таблице 1.

Кровь для исследования забиралась у пациентов в стадии обострения заболевания, все пациенты находились на базисной противовоспалительной терапии. Из этой группы дополнительно были отобраны 15 пациентов получавших терапию генно-инженерным биологическим препаратом ритуксимабом и после проведенного курса лечения на 7-е сутки осуществлялся повторный забор крови для исследования.

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

Таблица 1. Характеристика пациентов с РА и здоровых доноров, включенных в исследование.

Показатель		Пациенты с РА (n= 64)	Пациенты с РА после лечения ритуксимабом (n=15)	Здоровые доноры (n= 43)
Пол	Женщины, n (%)	54 (84.4%)	12(80%)	30 (65.2%)
Возраст	Медина (ИКР)	55 (45:65)	55(44:63,5)	36.5 (30: 54)
Продолжительность болезни	Медиана (ИКР)	8.5 (5:17)	8(4:14)	-
Эрозивный артрит	N (%)	52 (81.3%)	11(73,3%)	-
Системные проявления артрита	N (%)	32 (50%)	7(46%)	-
Рентгенологическая стадия РА	I, n (%)	1 (1.6%)	0(0%)	-
	II, n (%)	25 (39.1%)	5(33%)	
	III, n (%)	30 (46.9%)	8(53,3%)	
	IV, n (%)	8 (12.5%)	2(13,3%)	
Степень активности РА	0, n (%)	7 (10.9%)	3 (20%)	-
	1, n (%)	4 (6.3%)	1(6,6%)	
	2, n (%)	32 (50%)	7(46,6%)	
	3, n (%)	21 (32.8%)	4(26,6%)	
	4, n (%)	0 (0%)	0(0%)	
Уровень активности РА по DAS-28	Низкий (<3.2), n (%)	12 (18.8%)	5(33,3)	-
	Средний (3.2–5.1), n (%)	28 (43.8%)	5(33,3%)	
	Высокий (> 5.1), n (%)	24 (37.5%)	5(33,3)	

## 2.2 Подготовка образцов периферической крови

Осуществление забора крови натошак из локтевой вены в стерильных условиях по 9 мл в вакуумные пробирки с антикоагулянтом K3-EDTA (3-х замещенной калиевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты, Vacuette K3-EDTA, GreinerBio-OneGmbH, Austria).

Выполнение общего анализа крови, с подсчетом общего количество лейкоцитов

Аликвотирование необходимого объема крови, содержащего 1млн. лейкоцитов, в цитометрические пробирки.

Пробоподготовка образцов:

- 1.Внесение десятикратно разведенного в PBS (натрий-фосфатный буфер) лизирующего буфера BDFACSLysingSolution (кат.номер 349202; BD, США) согласно инструкции производителя в десятикратном объеме по отношению к объему пробы. Инкубация в течении 15минут при комнатной температуре
2. Внесение PBSв объеме 1 мл на пробу. Центрифугирование при 1500об/мин, 10минут. Удаление надосадочной жидкости, внесение 100мкл. PBS.
3. Проведение инкубации в пробирках для проточной цитометрии в PBS с человеческим IgG (ФГУП «НПО «Микроген», Россия) в конечной концентрации 3 мг/мл 20 минут в темноте при комнатной температуре для блокировки Fc-рецепторов и уменьшения неспецифического связывания антител с ними при фенотипировании.
4. Внесение моноклональных антител с флуорохромов (красителем) в объеме, указанном производителем для окраски 1млн. клеток согласно таблице 2.

Таблица 2. Таблица внесения флуорохромов в пробирки

	<b>Fitc</b>	<b>PE</b>	<b>APC</b>	<b>PE-Cy7</b>	<b>APC-Cy7</b>	<b>PerCP</b>	<b>Pacific Blue</b>
1 Контроль							
2				CD19	CD3	CD14	
3		TNFR1	TNFR2	CD19	CD3	CD14	
4		TNFR2	TNFR1	CD19	CD3	CD14	
5 Контроль							
6	CD25			CD4	CD8		
7	CD25	TNFR1	TNFR2	CD4	CD8		
8	CD25	TNFR2	TNFR1	CD4	CD8		
9 Контроль							
10	CD25			CD4	CD127		
11	CD25	TNFR1	TNFR2	CD4	CD127		
12	CD25	TNFR2	TNFR1	CD4	CD127		
13 Контроль							
14	CD45R0			CD4	CD8		CD45RA
15	CD45R0	TNFR1	TNFR2	CD4	CD8		CD45RA
16	CD45R0	TNFR2	TNFR1	CD4	CD8		CD45RA

5. Внесение PBS в объеме 1 мл на пробу. Центрифугирование при 1500 об/мин, 10 минут. Удаление надосадочной жидкости, внесение 100 мкл. PBS.

3. Анализ на проточном цитофлуориметре

3.1. Настройка переднего и бокового светорассеивания на пробе №1

3.2. Настройка вольтажа лазеров и чувствительности ФЭУ (фотоэлектронный умножитель) всех каналов с использованием контрольных проб №2, 6, 10, 14.

## 2.3 Гейтирование

**Гейтирование популяций моноцитов, Т и В-лимфоцитов (рисунок 1)**

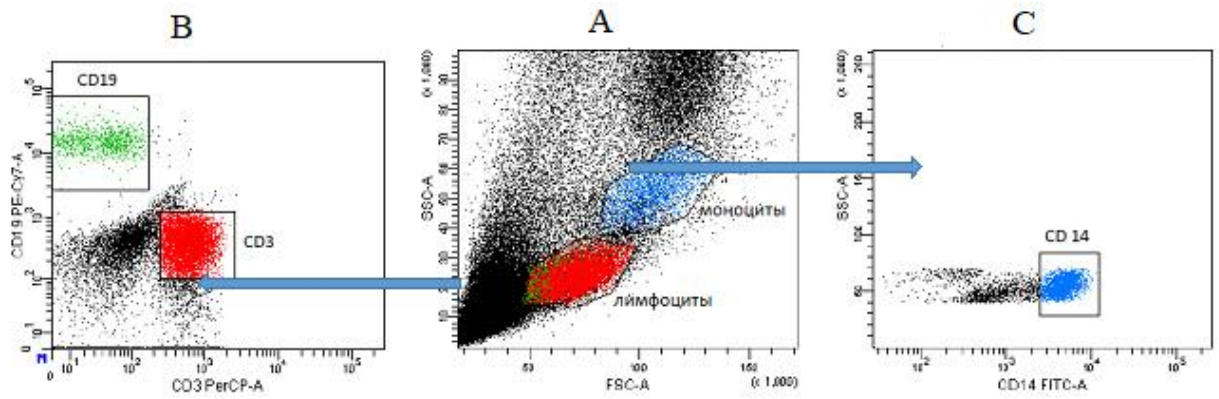


Рисунок 1. Гейтирование популяций моноцитов Т и В-лимфоцитов

А. Выделение общего пула фенотипических лимфоцитов и моноцитов на дот-плоте (прямое рассеяние против бокового рассеяния).

В. Выделение популяции моноцитов (CD14+) из гейта фенотипических моноцитов (CD14 против бокового рассеяния).

С. Выделение популяции Т-лимфоцитов (CD3+) и В-лимфоцитов (CD19+) из гейта фенотипических (CD19 против CD3).

### Гейтирование общего пула CD4+, CD8+ клеток и активированных хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов (рисунок 2)

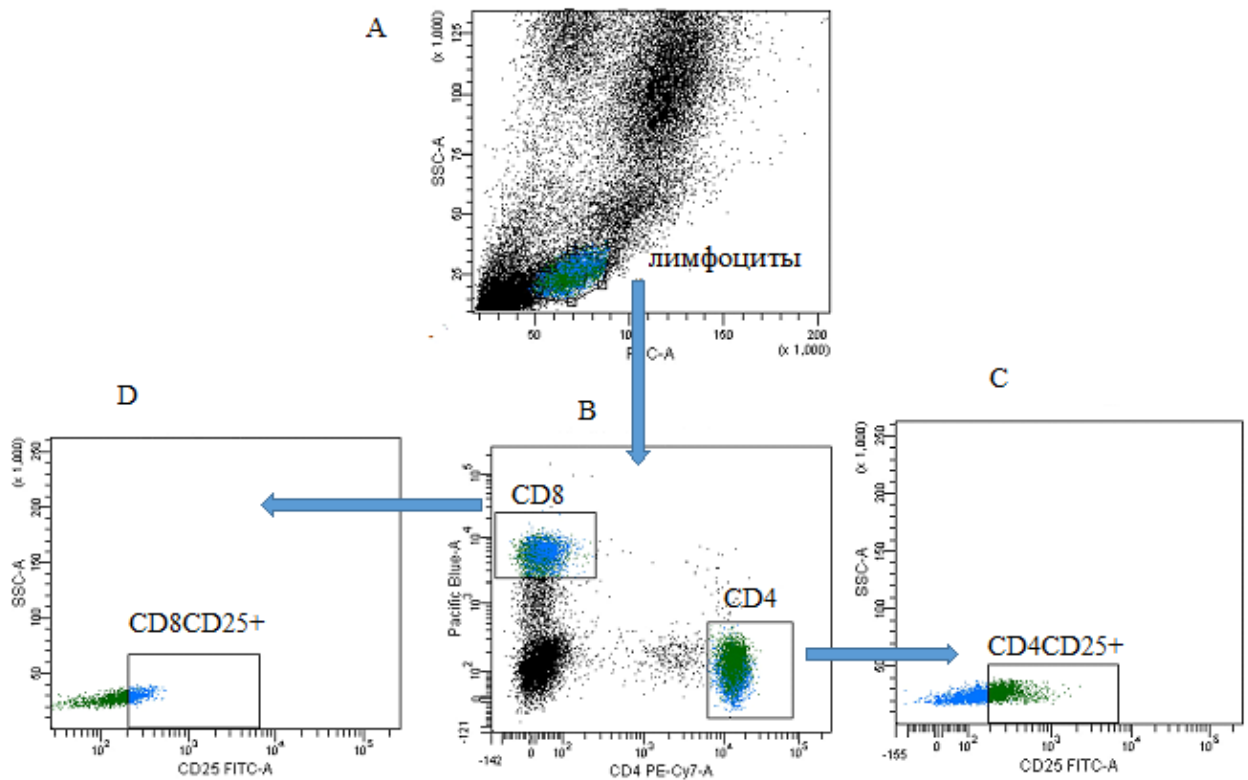


Рисунок 2. Гейтирование общего пула CD4+, CD8+ клеток и активированных хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитов

- A. Выделение лимфоцитов на дот-плоте (прямое рассеяние против бокового рассеяния).
- B. Выделение общего пула CD4<sup>+</sup> клеток и общего пула CD8<sup>+</sup> клеток из гейта фенотипических лимфоцитов (CD4 против CD8)
- C. Выделение субпопуляции активированных Т-хелперных клеток (CD4+CD25<sup>+</sup>) из гейта CD4<sup>+</sup> клеток (CD25 против бокового рассеяния)
- D. Выделение активированных цитотоксических-Т клеток (CD8+CD25<sup>+</sup>) из гейта CD8<sup>+</sup> (CD25 против бокового рассеяния).

### Гейтирование субпопуляции регуляторных Т-клеток (рисунок 3)

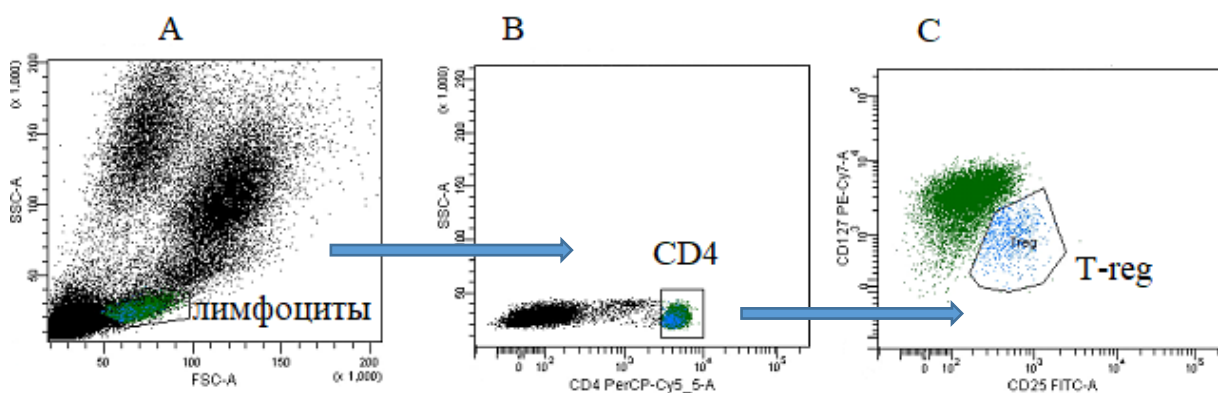


Рисунок 3. Гейтирование субпопуляции регуляторных Т-клеток

- A. Выделение лимфоцитов на дот-плоте (прямое рассеяние против бокового рассеяния).
- B. Выделение общего пула CD4<sup>+</sup> клеток из гейта фенотипических лимфоцитов (CD4 против бокового рассеяния)
- C. Выделение субпопуляции CD25<sup>high</sup> CD127<sup>low</sup> из гейта CD4<sup>+</sup> клеток (CD127 против CD25)

### Гейтирование наивных клеток и клеток памяти среди цитотоксических и хелперных Т-лимфоцитов (рисунок 4)



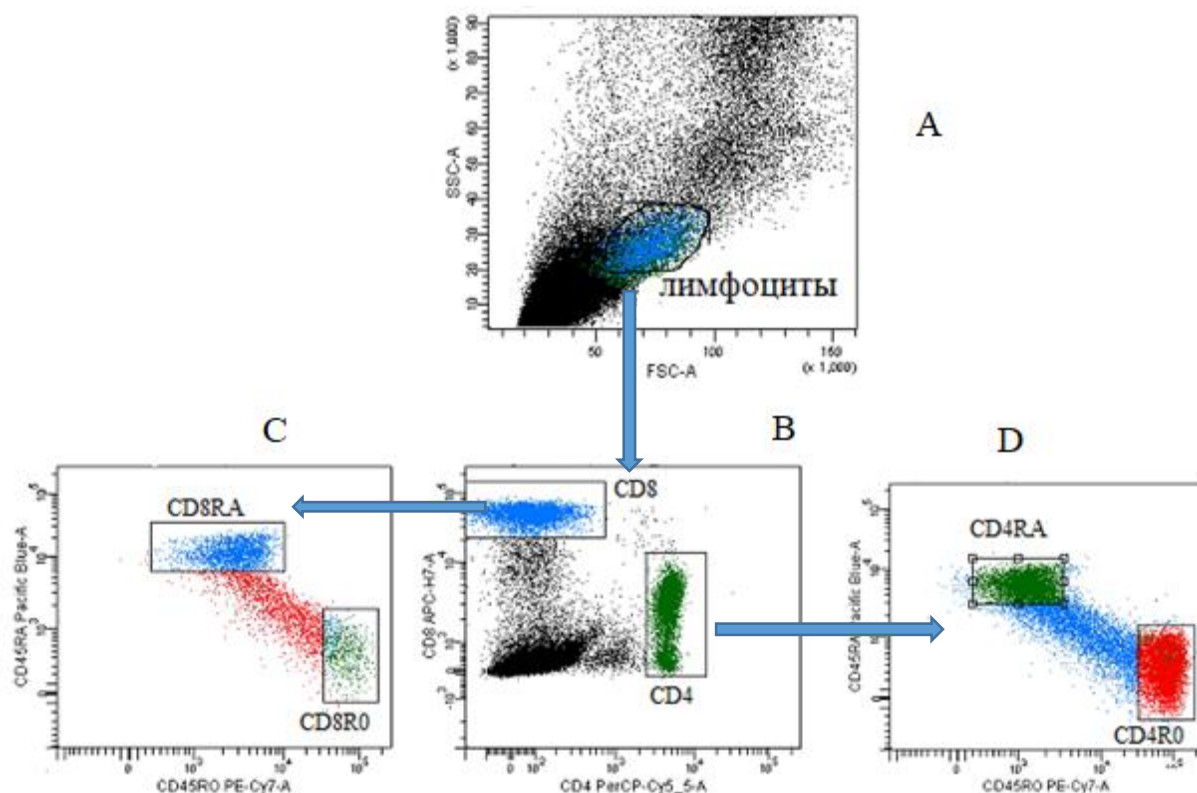


Рисунок 4. Гейтирование наивных клеток и клеток памяти среди цитотоксических и хелперных Т-лимфоцитов

- А. Выделение лимфоцитов на дот-плоте (прямое рассеяние против бокового рассеяния).
- В. Выделение общего пула CD4<sup>+</sup> клеток и общего пула CD8<sup>+</sup> клеток из гейта фенотипических лимфоцитов (CD4 против CD8)
- С. Выделение из гейта CD8<sup>+</sup> клеток CD8RA<sup>+</sup> и CD8R0<sup>+</sup> (CD8RA против CD8R0)
- Д. Выделение из гейта CD4<sup>+</sup> клеток CD4RA<sup>+</sup> и CD4R0<sup>+</sup> (CD4RA против CD4R0)

#### 2.4. 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 | BDBiosciences-US для каждой из 12 исследуемых субпопуляций (рисунок 5).

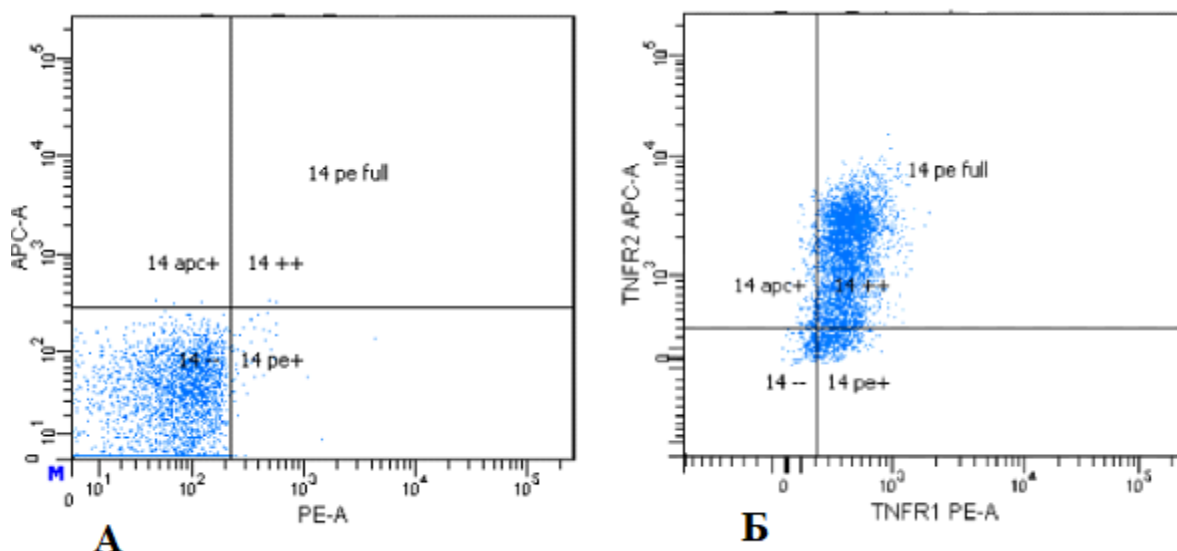


Рисунок 5. Пример оценки ко-экспрессии для популяции моноцитов

А. Неокрашенный контроль Б. Образец с внесенными антителами

14 - - гейт дубль-отрицательных клеток

14 ++ гейт дубль-положительных клеток

14 pe+ гейт клеток экспрессирующих только рецептор 1 типа

14 apc- гейт клеток экспрессирующих только рецептор 2 типа

Для одновременного определения количества рецепторов TNF $\alpha$  типов 1 и 2 на различных субпопуляциях проводили двойное мечение парных образцов (TNFR1 + TNFR2-, TNFR1 + TNFR2 +, TNFR1-TNFR2 +, TNFR1-TNFR2-).

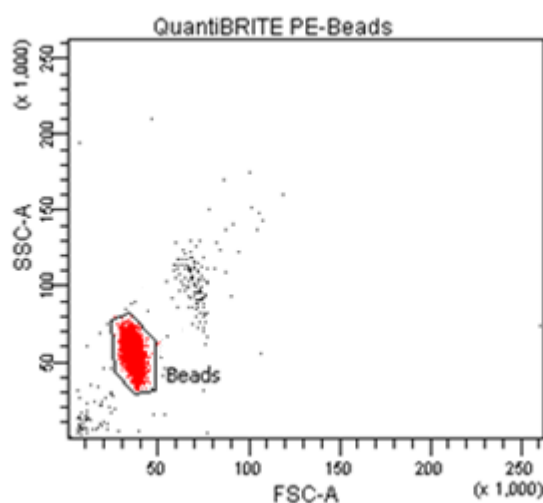
После цитометрического анализа количество рецепторов типа 1 (для фракций TNFR1 + TNFR2- и TNFR1 + TNFR2 +) подсчитывали в пробирках с TNFR1-PE и TNFR2-APC. Количество рецепторов типа 2 (для фракций TNFR1-TNFR2 + и TNFR1 + TNFR2 +) рассчитывали в пробирках с TNFR2-PE и TNFR1-APC. Процент каждой фракции определяли, как среднее значение между двумя образцами.

## 2.5. Определение среднего числа TNFR1 и TNFR2 на клетках

«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 РЕ-детектору, что и при проведении анализа калибровочных бус, это позволяет нам конвертировать значения интенсивности флуоресценции в число РЕ молекул на клетку. Далее, число РЕ молекул на клетку можно перевести в число молекул антител на клетку с помощью известного соотношения молекул РЕ на антитело, равное 1:1, согласно инструкции производителя» [Lopatnikova 2013].

«Для создания калибровочной кривой и перевода значений интенсивности флуоресценции клеток, экспрессирующих соответствующий маркер, в абсолютные показатели количества рецепторов, использовался набор BD QuantiBRITE PE («BD Biosciences», США), содержащий 4 фракции лиофилизированных бус, каждая из которых несет различный уровень фикоэритрина». Пробирку с бусами разводили в 500 мкл PBS (137 мМ NaCl, 2,68 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12H<sub>2</sub>O, 1,47 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,53 мМ EDTA и 0,1% NaN<sub>3</sub>), перемешивали в течение 1 минуты и анализировали на проточном цитометре. На FSC-A/SSC-A дот-плоте гейтировали популяцию бус и записывали 10,000 событий. Далее на гистограмме РЕ флуоресценции выставляли маркеры по четырем пикам калибровочных частиц (Low, Medium Low, Medium High, High). (Рисунок 6).



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

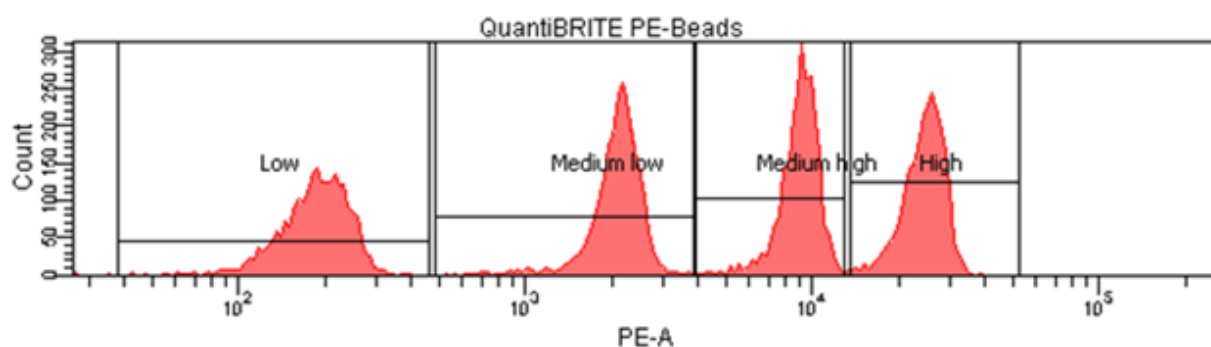


Рисунок 6. Гейт калибровочных частиц и гистограмма распределения флюоресценции PE. Фракции Low, Med Low, Med High и High.

Средние значения интенсивности флюоресценции для пиков представлены в таблице 3.

Популяция	Среднее значение интенсивности флюоресценции (PE-mean)
(Low)	191
(Med Low)	2125
(Med High)	9168
(High)	25029

Таблица 3. Средние значения интенсивности флюоресценции для каждого из четырёх пиков – Low, Med Low, Med High, High

«По результатам анализа бус строился график зависимости значений логарифма числа молекул PE от значений логарифма интенсивности флюоресценции и устанавливалась математическая линейная зависимость логарифмических значений» (рисунок 7). 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.

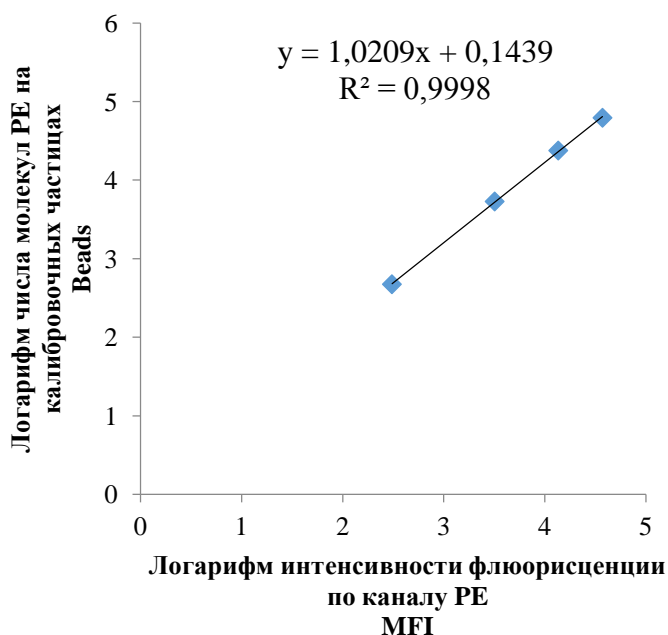


Рисунок 7. График зависимости значений логарифма числа молекул PE на частицу от значений логарифма интенсивности флюоресценции.

Таким образом, финальная формула для расчета количества рецепторов имела вид:

$$\text{Количество рецепторов} = 10^{(1,0197 \cdot \lg(MFI) + 0,256)},$$

где MFI – средняя интенсивность флюоресценции клеток, экспрессирующих рецепторы».

По полученной формуле, с использованием значений интенсивности флюоресценции каждой из субпопуляций, была оценена количественная экспрессия рецепторов на клетках.

## 2.6 Методы статистической обработки

Статистическая обработка данных производилась с использованием программного обеспечения STATISTICA 7.0 (StatSoft, США) и базовых пакетов статистической среды R (<https://www.r-project.org>). Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала, сравнение независимых выборок с определением статистической значимости отличий проводилось с

использованием критерия Манна-Уитни (при сравнении показателей здоровых доноров и больных РА, число последовательных сравнений – 2) и непараметрического дисперсионного рангового критерия Краскела-Уоллиса с множественным сравнением медиан (при сравнении идентичных показателей для разных субпопуляций, число последовательных сравнений – 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 [Kuhn 2013]. Параметры модели определены 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].

Построенная логистическая регрессионная модель включала в себя следующие коэффициенты:

$$\alpha_0 = 2.386696717005736$$

$$\alpha_1 = -0.00276285111326$$

$$\alpha_2 = 0.00189985337763$$

$$\alpha_3 = -0.28206543500757,$$

Эти коэффициенты были вычислены из отношения показателей экспрессии рецепторов TNFR1 и TNFR2 у больных РА и здоровых доноров.

Для формулы расчета вероятности РА:

$$P = \frac{e^{\alpha_0} \cdot (e^{\alpha_1})^{x_1} \cdot (e^{\alpha_2})^{x_2} \cdot (e^{\alpha_3})^{x_3}}{1 + e^{\alpha_0} \cdot (e^{\alpha_1})^{x_1} \cdot (e^{\alpha_2})^{x_2} \cdot (e^{\alpha_3})^{x_3}},$$

где,

в качестве коэффициентов используются рассчитанные коэффициенты  $\alpha$ , а в качестве независимых параметров -

$x_1$  - количество рецепторов TNFR2 на CD3+ Т-лимфоцитах

$x_2$  - количество TNFR1 на Т-хелперных клетках памяти (CD4+CD45R0+)

$x_3$  - процент TNFR1 положительных клеток среди наивных Т-хелперных клеток CD4+CD45RA+,

$e=2,7182818$  - математическая константа (основание натурального логарифма)

Подставляя в формулы полученные значения коэффициентов, получаем:

$$P = \frac{2,7182818^{2.386696717005736} \cdot (2,7182818^{-0.00276285111326})^{x_1} \cdot (2,7182818^{0.00189985337763})^{x_2} \cdot (2,7182818^{-0.28206543500757})^{x_3}}{1 + 2,7182818^{2.386696717005736} \cdot (2,7182818^{-0.00276285111326})^{x_1} \cdot (2,7182818^{0.00189985337763})^{x_2} \cdot (2,7182818^{-0.28206543500757})^{x_3}}$$

Итоговая формула для расчета вероятности:

$$P = \frac{10.877503 \cdot 0.997241^{x_1} \cdot 1.001902^{x_2} \cdot 0.754224^{x_3}}{1 + 10.877503 \cdot 0.997241^{x_1} \cdot 1.001902^{x_2} \cdot 0.754224^{x_3}}$$

При полученном значении  $p \geq 0.5$  имеется вероятность наличия ревматоидного артрита.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ранее проведенных исследованиях экспрессии рецепторов 1 и 2 типа на МНК таких как: общий пул моноцитов, Т и В лимфоцитов, были установлены отличия в экспрессии рецепторов к иммуномодуляторным цитокинам в норме и при ревматоидном артрите, что свидетельствует о формирующихся при воспалительных заболеваниях изменениях экспрессии мембраносвязанных рецепторов на поверхности иммунокомпетентных клеток [Lopatnikova 2012, Альшевская 2012, Sennikov 2014]. Однако, эти данные отражают лишь общую тенденцию, поскольку входящие в состав основного пула субпопуляции клеток выполняют гетерогенные функции, что находит отражение в различных уровнях экспрессии рецепторов. Поэтому определение параметров экспрессии рецепторов именно на отдельных субпопуляциях иммунокомпетентных клеток поможет дать более полную оценку влияния этого фактора на функциональный ответ клеток. В предшествующих исследованиях также не проводилась оценка ко-экспрессии рецепторов, которая помогает выявить распределение рецепторов на клетках внутри субпопуляций для более детальной оценки функциональных возможностей каждой из них. Показатели ко-экспрессии в сочетании с определением среднего количества рецепторов на клетках более полно отражают 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 так же стать дополнительным критерием диагностики иммуноопосредованных заболеваний и терапевтической мишенью для создания новых подходов в лечении.

В связи с этим, было решено исследовать наиболее значимые субпопуляции лимфоцитов по ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$ , а также рассчитать среднее количество рецепторов на клетках в норме и при ревматоидном артрите.



Для исследования были выбраны следующие популяции: общий пул моноцитов; общий пул В-лимфоцитов; общий пул Т-лимфоцитов; а также субпопуляции цитотоксических Т клетки (CD8+), Т-хелперных клеток (CD4+), активированных CD8+ клеток, активированных CD4+ клеток, субпопуляций Т-клеток памяти (CD45RO+) и наивных Т-клеток (CD45RA+) среди цитотоксических и Т-хелперных клеток; Т-регуляторные клетки (CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>). Данные субпопуляции экспрессируют оба типа рецептора, которые необходимы для развития, дифференцировки и реализации функционального ответа этих клеток.

### **3.1. Ко-экспрессия и среднее количество рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$ на клетках субпопуляций МНК у здоровых доноров**

Для оценки ко-экспрессии и среднего количества рецепторов TNFR1 и TNFR2 использовалась периферическая кровь здоровых доноров. В качестве основных популяций были выделены моноциты, Т и В лимфоциты, для которых определяли ко-экспрессию рецепторов 1 и 2 типа и среднее количество рецепторов 1 или 2 типа на клетках каждой популяции.

#### **Ко-экспрессия TNFR1 и TNFR2 на клетках основных популяций**

Оценка ко-экспрессии проводилась путем определения процента клеток при помощи проточной цитометрии после выделения интересующей популяции, для нее оценивали процент дубль-позитивных, дубль-негативных клеток, клеток экспрессирующих только рецептор 1 типа и клетки, экспрессирующие только рецептор 2 типа (рисунок 8).

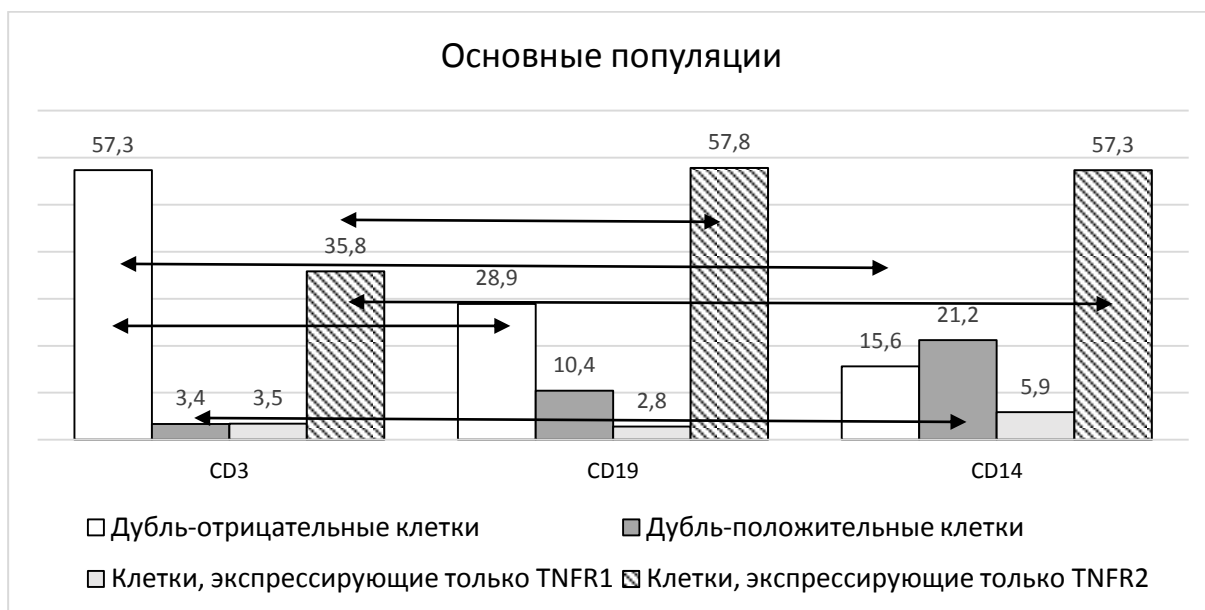


Рисунок 8. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к  $\text{TNF}\alpha$  на основных популяциях иммунных клеток у здоровых доноров ( $n=43$ ). Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан. Стрелками указана статистическая значимость отличий между группами  $p < 0,05$ .

Для основных популяций иммунных клеток (рис.8) выявлены статистически значимые отличия по различным типам экспрессии рецепторов. По проценту клеток 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%).

В целом полученные данные свидетельствуют о различной ко-экспрессии рецепторов в зависимости от популяции клеток, что может быть связано с различиями в выполняемых данными клетками функций в организме.

### **Определение среднего количества рецепторов 1 и 2 типа на клетках основных популяций.**

Для выбранных популяций осуществлялся подсчет среднего количества рецепторов 1 и 2 типа на клетках (рисунок 9)

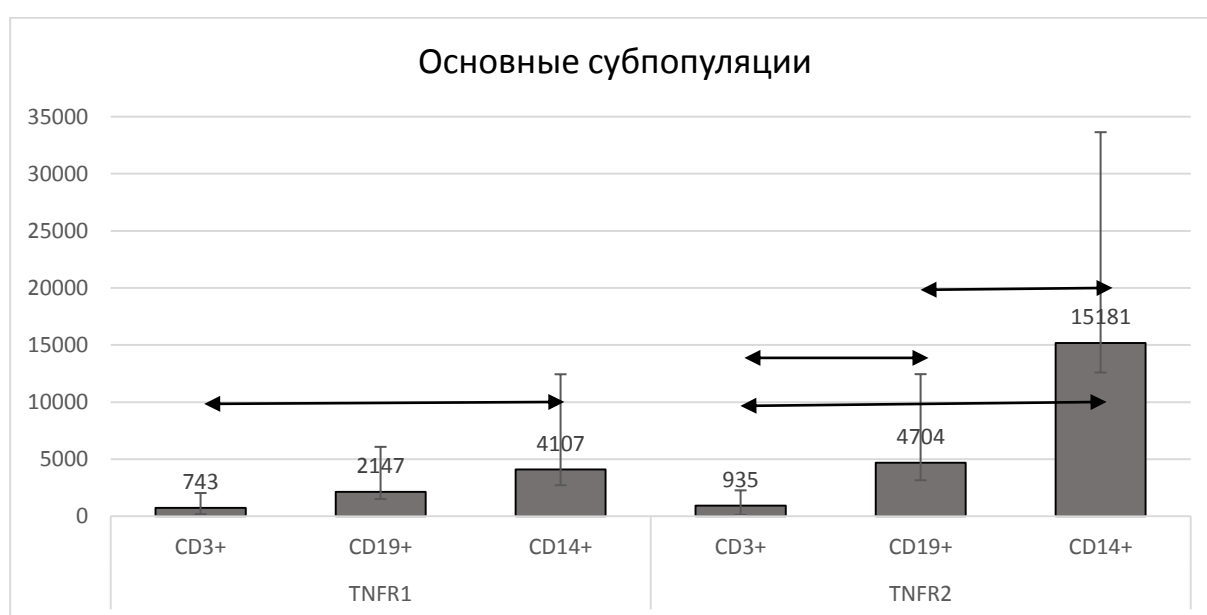


Рисунок 9. Количество рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  на основных популяциях иммунных клеток у здоровых доноров (n=43). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Стрелками указана статистическая значимость отличий между группами  $p < 0,05$ .

Исследованные популяции значительно различались по количеству рецепторов 1 и 2 типа на клетках. Отличия по TNFR1 были выявлены между популяциями Т лимфоцитов и моноцитов (743 и 4107  $p < 0.05$ ). 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. Высокий уровень экспрессии рецепторов 1 типа сочетался с большим процентом TNFR1+ клеток.

Полученные данные показывают, что популяции МНК различаются как по ко-экспрессии рецепторов TNF, так и по количеству рецепторов, однако, эти данные отражают лишь общую тенденцию, поскольку основные субпопуляции иммунных клеток гетерогенны, а входящие в их состав основного пула субпопуляции клеток выполняют различные функции, что может отражаться в уровнях экспрессии рецепторов. Поэтому нами было принято решение исследовать ко-экспрессию рецепторов и определить среднее количество рецепторов на клетках на отдельных субпопуляциях цитотоксических, хелперных и регуляторных Т-клеток.

### **3.2. Определение ко- экспрессии и среднего количества рецепторов на субпопуляциях хелперных и регуляторных Т-клеток**

Среди лимфоцитов при проведении проточной цитометрии выделяли общий пул CD4+ клеток, наивные Т-хелперные клетки (CD4+CD45RA+), активированные Т-хелперные клетки (CD4+CD25+), Т-хелперные клетки памяти (CD4+CD45RO+) и регуляторные Т-клетки (CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>). Для каждой субпопуляции определяли процент дубль-негативных, дубль-позитивных клеток, TNFR1 + и TNFR2+ клеток.

#### **Определение ко- экспрессии рецепторов на субпопуляциях хелперных и регуляторных Т-клеток (рисунок 10)**

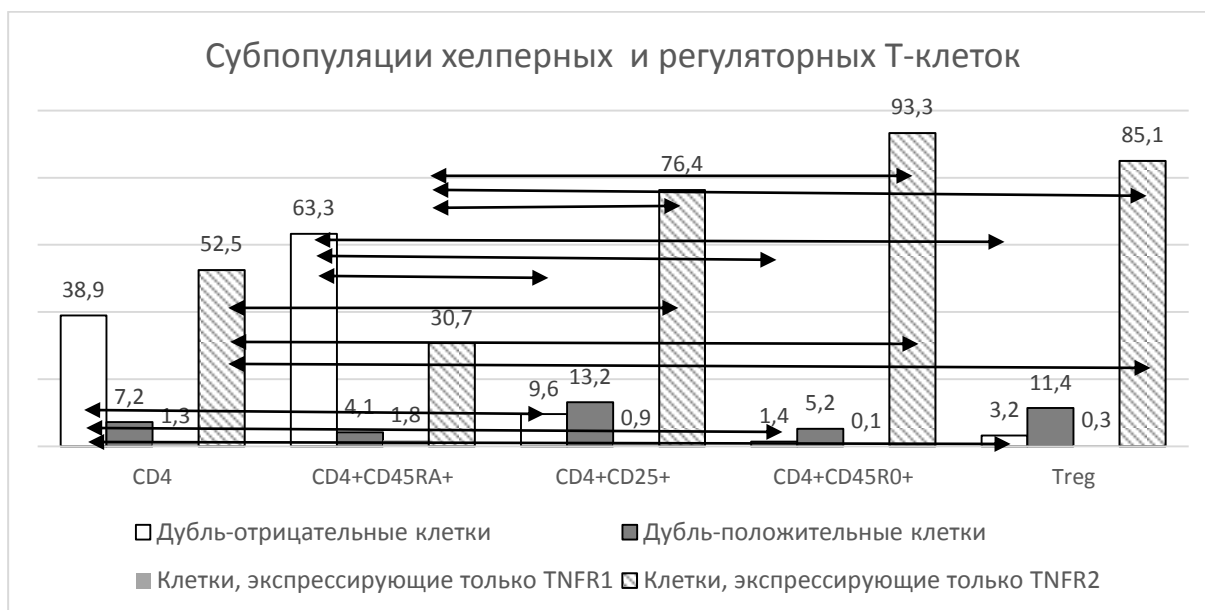


Рисунок 10. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  на субпопуляциях хелперных и регуляторных Т-клеток здоровых доноров (n=43). Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан. Стрелками указана статистическая значимость отличий между группами  $p < 0,05$ .

Субпопуляции CD4<sup>+</sup> клеток, хелперные и регуляторные Т-клетки различались по сочетанной экспрессии рецепторов к TNF $\alpha$ . По проценту дубль-негативных клеток достоверно различалась общая популяция CD4<sup>+</sup> (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<sup>+</sup> клеток отличалась общая CD4<sup>+</sup> 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% ( $p<0,0001$ )).

При оценке ко-экспрессии обращает внимание высокий процент клеток экспрессирующих только 2 тип рецептора на субпопуляциях активированных Т-хелперных клеток, Т-клетках памяти и регуляторных Т-клетках. Полученные данные согласуются с данными литературы, в которых показана роль TNFR2 для дифференцировки данных субпопуляций.

### Определение среднего количества рецепторов 1 и 2 типа на субпопуляциях хелперных и регуляторных Т-клеток

Для каждой субпопуляции рассчитывалось среднее количество рецепторов (рисунок 11).

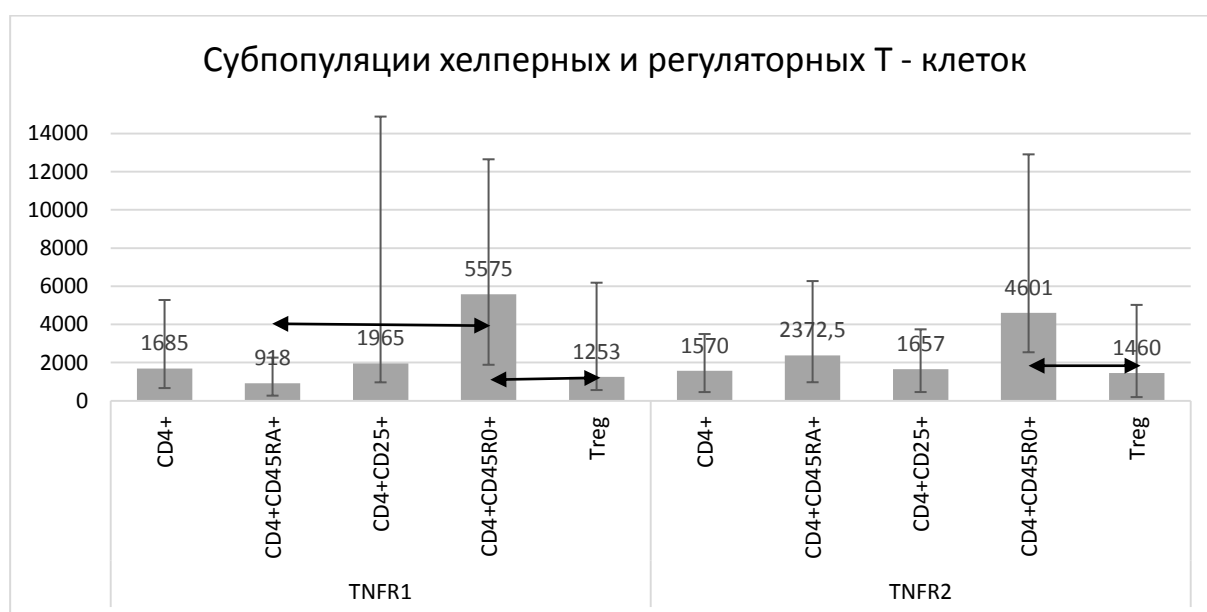


Рисунок 11. Количество рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  на субпопуляциях хелперных и регуляторных Т-клеток здоровых доноров (n=43). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Стрелками указана статистическая значимость отличий между группами  $p < 0,05$ .

Значимые отличие по количеству первого (5575) типа рецептора отмечалось для субпопуляции Т хелперных клеток памяти, 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 ( $p=0,002$ )).

Т-хелперные клетки памяти отличались наиболее высоким процентом клеток экспрессирующих только рецептор 2 типа и наибольшим количеством рецептора 2 типа на клетках по сравнению с остальными субпопуляциями, что может говорить о более высоком потенциале данной субпопуляции к реализации эффектов опосредуемых именно 2 типом рецептора.

### 3.3. Определение ко- экспрессии и среднего количества рецепторов на субпопуляциях цитотоксических Т-клеток

Среди лимфоцитов при проведении проточной цитометрии выделяли общий пул CD8+ клеток, наивные Т-хелперные клетки (CD8+CD45RA+), активированные Т-хелперные клетки (CD8+CD25+), Т-хелперные клетки памяти (CD8+CD45RO+). Для каждой субпопуляции определяли процент дубль-негативных, дубль-позитивных клеток, TNFR1 + и TNFR2+ клеток.

#### Определение ко- экспрессии рецепторов на субпопуляциях цитотоксических Т-клеток (рисунок 12)

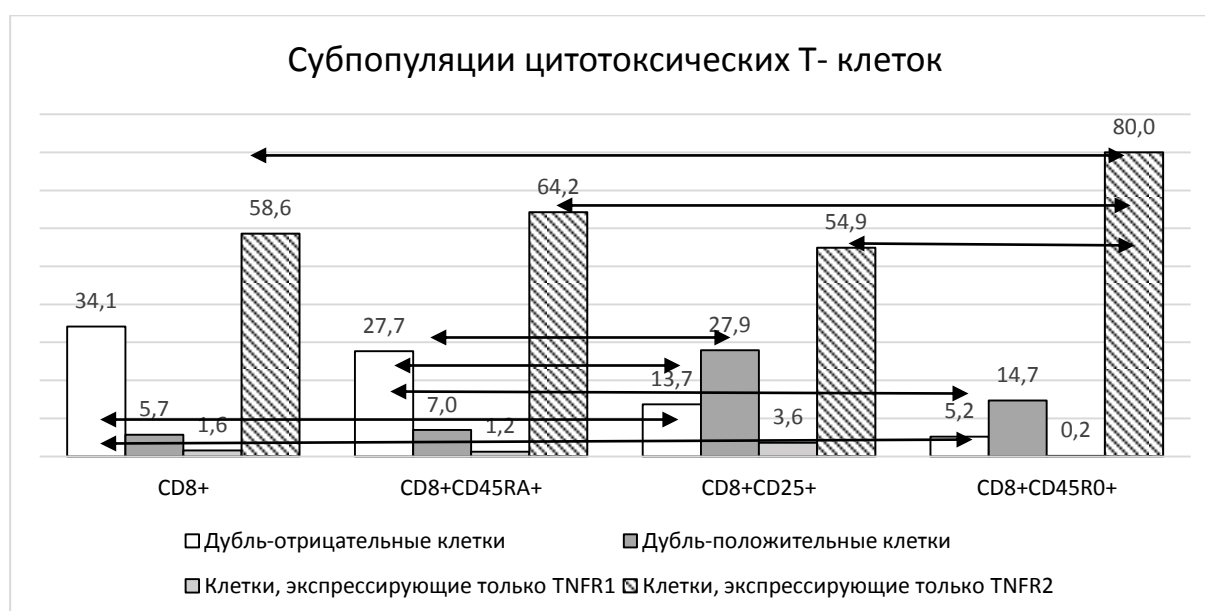


Рисунок 12. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  на субпопуляциях цитотоксических Т- клеток здоровых доноров (n=43). Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан. Стрелками указана статистическая значимость отличий между группами  $p < 0,05$ .

По проценту дубль-отрицательных клеток (рис.12) различалась общая субпопуляция 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% ( $p=0,0047$ )).

Для цитотоксических субпопуляций, так же как и для хелперных, обращает внимание значительный процент клеток, экспрессирующих только 2 тип рецептора. По данным литературы этот тип рецептора так же важен для дифференцировки цитотоксических субпопуляций.

### **Определение среднего количества рецепторов 1 и 2 типа на субпопуляциях цитотоксических Т-клеток**

Для каждой субпопуляции рассчитывалось среднее количество рецепторов (рисунок 13).



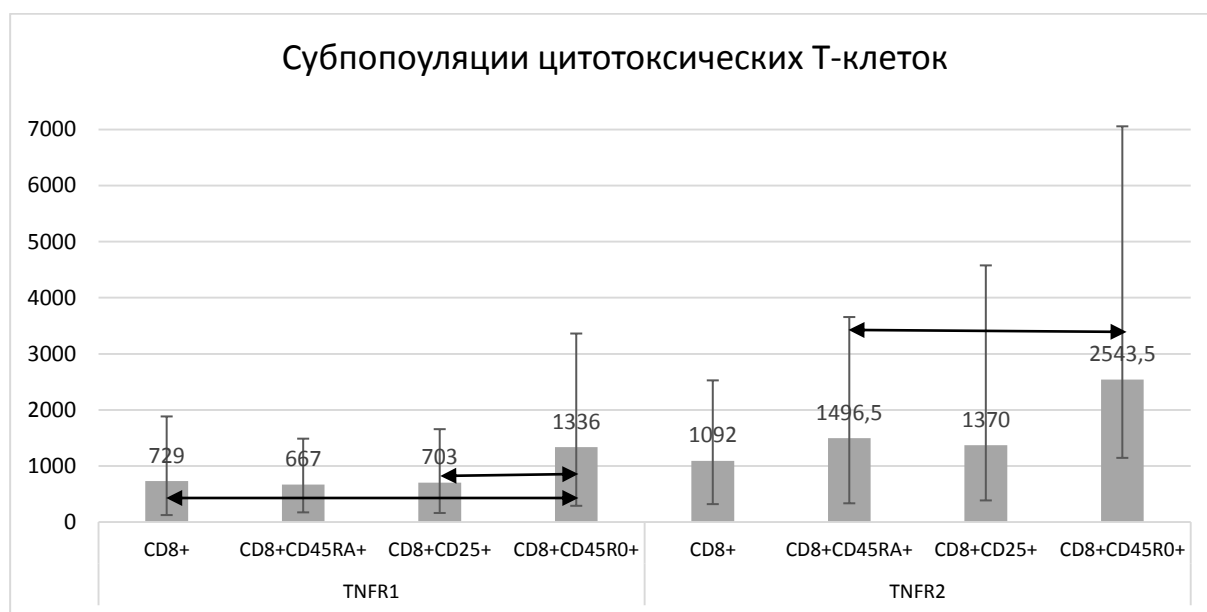


Рисунок 13. Количество рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  на субпопуляциях цитотоксических Т-клеток здоровых доноров (n=43). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Стрелками указана статистическая значимость отличий между группами  $p < 0,05$ .

Значимые отличия по количеству рецептора 1 типа 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 (рис.13) 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, что говорит об особенностях регуляции экспрессии рецепторов на данной субпопуляции.

**Оценка количества рецепторов 1 и 2 типа на дубль-позитивных клетках и клетках экспрессирующих один из типов рецептора**

При оценке количества рецепторов на клетках всех субпопуляций была выявлена общая закономерность: для всех субпопуляций характерно более высокое количество рецепторов первого и второго типа на дубль-позитивных клетках, по сравнению с количеством рецепторов на клетках экспрессирующих один из типов рецептора (таблица 4).

Таблица 4. Среднее количество рецепторов 1 и 2 типа на дубль-позитивных клетках и клетках экспрессирующих только один из типов рецептора

Субпопуляция	N T1 ++	N T1 ре+	P	N T2 ++	N T2 ре+	P
CD3	642.6	265.4	p=0,032	2064.7	880.4	p=0,041
CD19	1140.8	677.1	p<0,001	3555.7	1041.7	p=0,052
CD14	6356.1	1913.8	p<0,001	12830.9	5596.5	p<0,001
CD4	982.0	393.0	p=0,043	1180.7	383.6	p=0,058
CD8	489.0	128.2	p=0,056	1618.1	723.6	p=0,044
CD4+CD25+	1020.0	940.8	p=0,036	1784.9	645.2	p<0,05
CD8+CD25+	780.7	240.4	p<0,001	1195.4	787.5	p<0,05
Treg	2578.1	1046.1	p=0,052	6785.6	2152.0	p<0,001
CD4+CD45R0+	4389.0	1159.2	p=0,021	3851.3	1755.5	p=0,034
CD8+CD45R0+	672.7	271.5	p=0,017	1930.8	1584.2	p=0,055
CD4+CD45RA+	1122.5	485.2	p=0,028	2855.4	883.5	p=0,02
CD8+CD45R0+	661.2	221.3	p=0,02	1815.7	811.9	p=0,031

N T1 ++ - среднее количество рецепторов 1 типа на дубль-позитивных клетках

N T2 ++ - среднее количество рецепторов 2 типа на дубль-позитивных клетках

N T1 re+ - среднее количество рецепторов 1 типа на клетках экспрессирующих только TNFR1

N T2 re+ - среднее количество рецепторов 2 типа на клетках экспрессирующих только TNFR2

Хотя различия по экспрессии между разными типами клеток являются ожидаемыми, ранее не было подтверждено, что количество рецепторов на них статистически значимо варьирует в норме. Учитывая различия в экспрессии рецепторов на различных субпопуляциях в норме можно прогнозировать различный тип и уровень ответа клеток на цитокин.

Представленные популяции и субпопуляции иммунных клеток принимают активное участие не только в поддержании гомеостаза, но и при развитии различных патологий и в частности ревматоидного артрита (РА), поэтому было принято решение провести сравнительную оценку ко-экспрессии рецепторов к TNF альфа у пациентов с ревматоидным артритом и здоровых доноров.

#### **3.4. Сравнение ко-экспрессии и среднего количества рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$ на клетках основных популяций и субпопуляций МНК у здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом**

Для сравнения ко-экспрессии и среднего количества рецепторов TNFR1 и TNFR2 использовалась цельная кровь условно-здоровых доноров и больных ревматоидным артритом с обострением заболевания и после прохождения курса терапии. Исследовались основные популяции МНК и субпопуляции CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток.

**Сравнение ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  на клетках основных популяций (моноциты (CD 14), В клетки (CD19), общий пул Т клеток (CD3)) у здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом**

Было проведено сравнение ко-экспрессии рецепторов у больных ревматоидным артритом при обострении заболевания по сравнению со здоровыми донорами, а так же среднего количества рецепторов на клетках (рисунок 14)

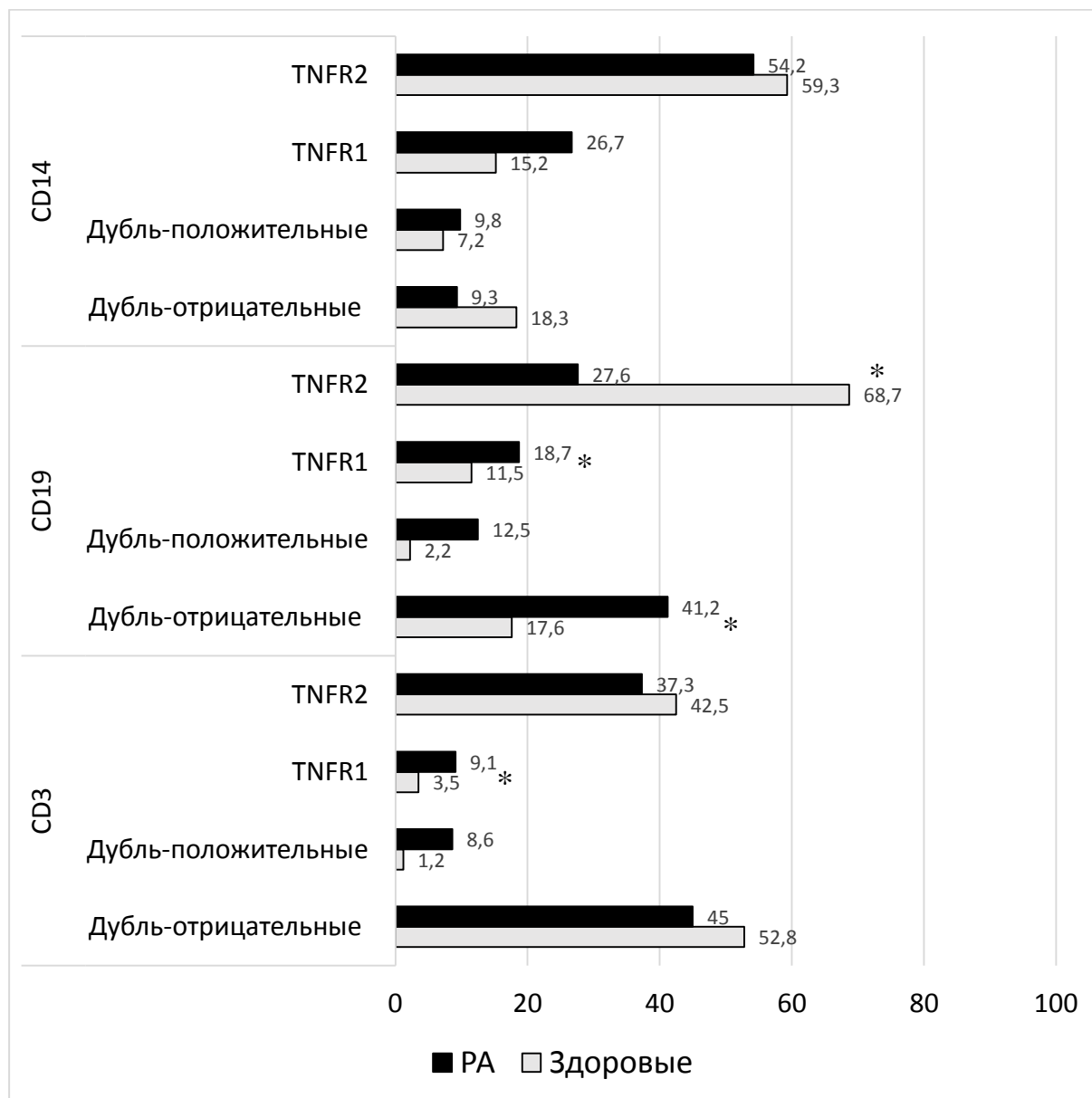


Рисунок 14. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к  $\text{TNF}\alpha$  на основных исследованных популяциях (моноциты (CD 14), В клетки (CD19), общий пул Т клеток (CD3)) у пациентов с РА (n=64) и здоровых доноров (n=43). Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан.

\*- указана статистическая значимость отличий между группами пациентов с РА и здоровыми донорами  $p < 0,05$ .

Было установлено, что основные исследованные популяции (моноциты, В клетки, общий пул Т клеток) значимо различаются по ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  как между собой, так и по сравнению с показателями здоровых доноров.

Наиболее выраженные различия по проценту клеток с различными типами экспрессии рецепторов были выявлены для популяции В-лимфоцитов.

Процент дубль-негативных клеток был выше у здоровых доноров (41,2 %) по сравнению с пациентами с РА (28,9 % ( $p=0,0048$ )). Процент TNFR1+ клеток у здоровых доноров был ниже (2,8%) по сравнению с больными РА (12,5 ( $p<0,0001$ )). Процент клеток экспрессирующих только TNFR2 был выше у здоровых доноров (57,8%) по сравнению с больными РА (27,6% ( $p<0,0001$ )).

Популяция Т-лимфоцитов значимо различалась по проценту TNFR1+ клеток, 8,6% у пациентов с РА и 3,5% у здоровых доноров ( $p=0,0042$ )).

В целом при оценке ко-экспрессии обращает внимание более низкий процент клеток экспрессирующих только 2 тип рецептора для В-лимфоцитов и более высокий процент клеток экспрессирующих только 1 тип рецептора для всех популяций, что согласуется с литературными данными о роли TNFR1 в патогенезе РА.

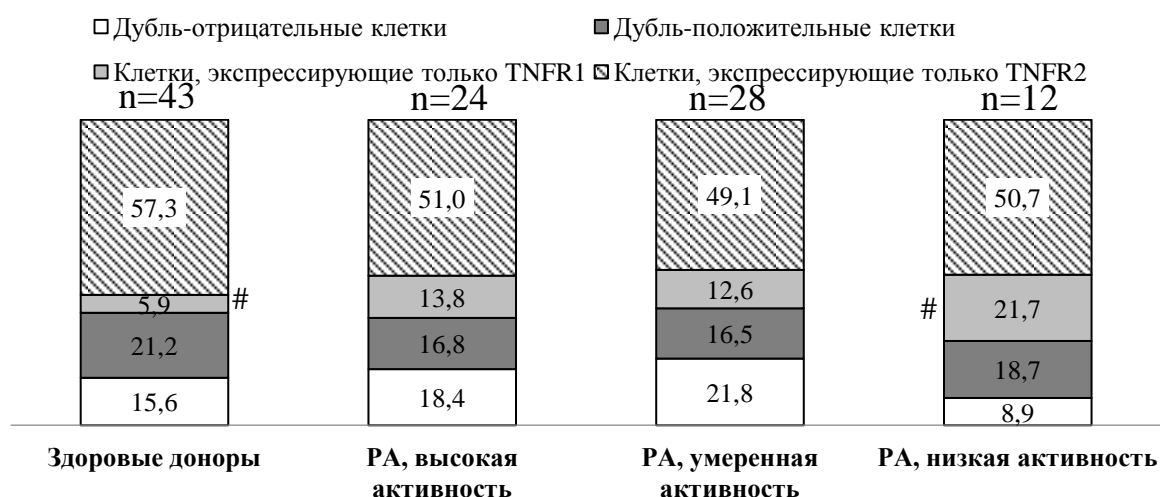
### **Сравнение ко-экспрессии у больных РА с обострением, имеющих различную степень активности заболевания, пациентов после прохождения курса терапии и здоровых доноров для основных популяций иммунных клеток**

Для более детальной оценки ко-экспрессии рецепторов пациенты с ревматоидным артритом в стадии обострения были разделены на группы по степени активности заболевания, которые сравнивались со здоровыми донорами и была выделена группа пациентов прошедших патогенетическую терапию ритуксимабом.

При оценке ко-экспрессии рецепторов для популяции моноцитов (рисунок 15) для группы пациентов с низкой активностью РА характерен более высокий процент TNFR1+ клеток (21,7%) по сравнению со здоровыми донорами (3,9% ( $p=0,0286$ )).

Значимые отличия по проценту клеток экспрессирующих TNFR2 выявлены у пациентов с РА после коррекции базисной терапии (11,2 %) по сравнению с пациентами с обострением РА (55,3 % (0,031)). Так же группа пациентов после коррекции терапии отличалась более высоким процентом дубль-отрицательных клеток (43,4%) по сравнению с группой с обострением РА (7,4% ( $p=0,011$ )).

### Моноциты



### Моноциты

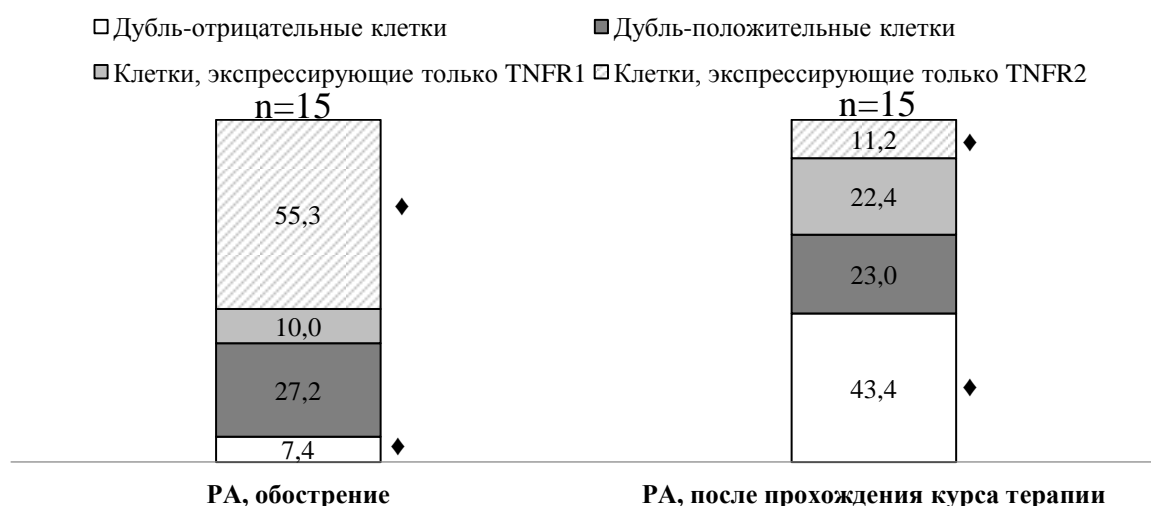


Рисунок 15. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  среди моноцитов у пациентов с обострением РА имеющих различную степень активности, пациентов прошедших курс терапии и здоровых доноров. Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан.

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

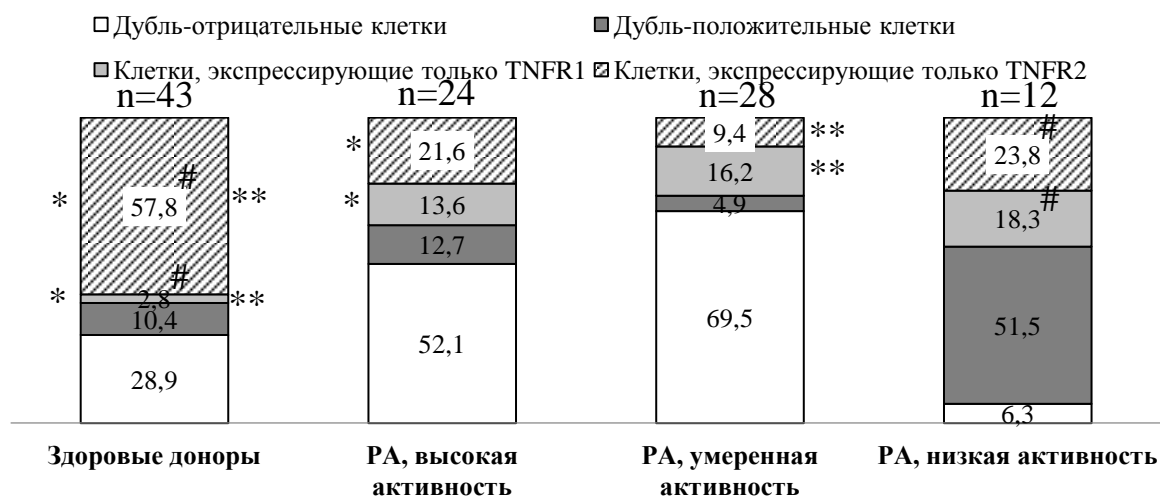
♦ - указана статистическая значимость отличий между группами пациентов ( $n=15$ ) с РА и прошедших курс терапии ( $n=15$ )  $p < 0,05$ .

При оценке показателей ко-экспрессии у больных РА с обострением, имеющих различную степень активности заболевания, и здоровых доноров были выявлены достоверные отличия для всех основных популяций, при этом изменения носили разных характер для каждой популяции. У пациентов прошедших лечение отмечался высокий процент дубль-негативных клеток, по сравнению с данными полученными при поступлении.

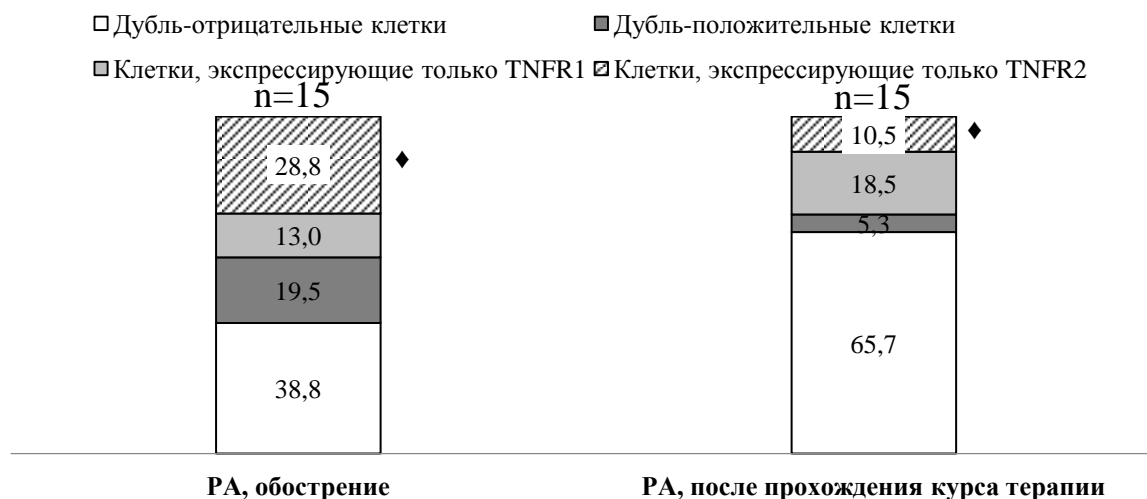
Значимые отличия среди В-лимфоцитов (рисунок 16) выявлены по проценту клеток экспрессирующих только TNFR1 и TNFR2 во всех группах пациентов с РА по сравнению со здоровыми донорами. По проценту дубль-отрицательных клеток отличалась группа с умеренной активностью РА (69,5 %) по сравнению со здоровыми донорами (28,9 % (0,0221)). Статистическая значимость отличий пациентов с различной активностью РА по сравнению со здоровыми донорами представлена в таблице 5.

Для группы пациентов после прохождения терапии ритуксимабом был характерен низкий процент клеток экспрессирующих только TNFR2 (10,5%) по сравнению с данными при поступлении (28,8 % ( $p=0,044$ )).

## В-лимфоциты



## В-лимфоциты



\*- достоверные отличия между группой пациентов с высокой активностью

РА и здоровыми донорами

\*\* - достоверные отличия между группой пациентов с умеренной активностью

РА и здоровыми донорами

# - достоверные отличия между группой с низкой активностью РА и здоровыми донорами.

◆- указана статистическая значимость отличий между группами пациентов с РА (n=15) и прошедшими курс лечения (n=15)  $p < 0,05$



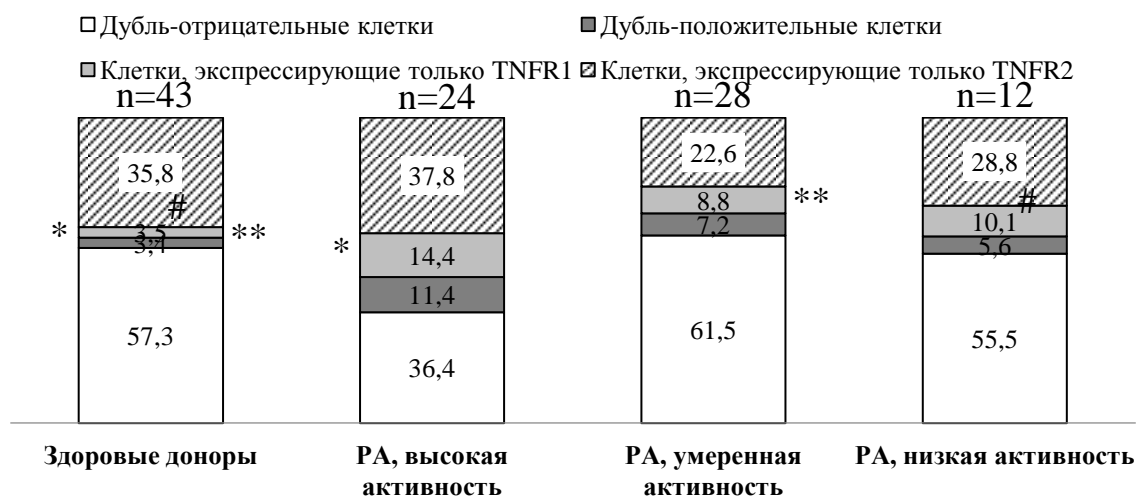
Рисунок 16. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  среди В лимфоцитов у пациентов с обострением РА имеющих различную степень активности, пациентов прошедших курс лечения и здоровых доноров. Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан.

Таблица 5. Статистическая значимость отличий между группами пациентов с различной активностью РА и здоровыми донорами

	Дубль-отрицательные клетки	Дубль-положительные клетки	Клетки, экспрессирующие только TNFR1	Клетки, экспрессирующие только TNFR2
РА, умеренная активность **	0,0221	$\geq 0,05$	0,0188	0,0024
РА, низкая активность #	$\geq 0,05$	$\geq 0,05$	0,0038	0,0148
РА, высокая активность *	$\geq 0,05$	$\geq 0,05$	0,0376	0,0387

Значимые различия в ко-экспрессии среди общего пула Т-лимфоцитов (рисунок 17) отмечались для всех пациентов с РА по проценту TNFR1+ клеток (группа с низкой активностью 10,1%, группа с умеренной активностью 8,8%, группа с высокой активностью 14,4 %) по сравнению со здоровыми донорами (3,4% ( $p=0,2643$ ,  $0,0268$  и  $0,0216$ )).

## Т-лимфоциты



## Т-лимфоциты

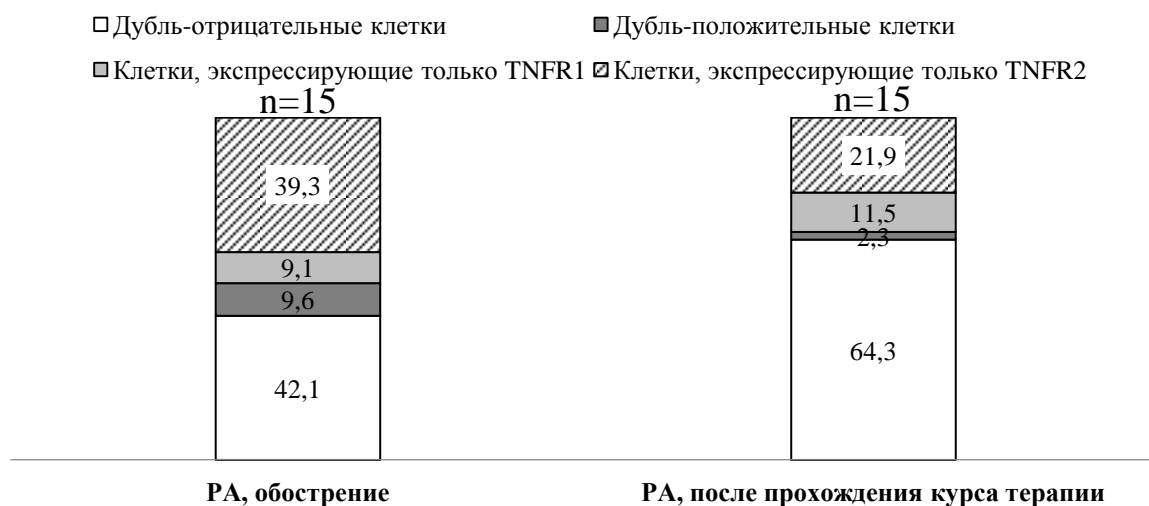


Рисунок 17. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  среди Т лимфоцитов у пациентов с обострением РА имеющих различную степень активности, пациентов после коррекции базисной терапии и здоровых доноров. Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан.

\*- достоверные отличия между группой пациентов с высокой активностью РА и здоровыми донорами

\*\* - достоверные отличия между группой пациентов с умеренной активностью РА и здоровыми донорами

# - достоверные отличия между группой с низкой активностью РА и здоровыми донорами.

### **Определение количества рецепторов 1 и 2 типа для TNF $\alpha$ на поверхности основных популяций иммунных клеток**

При оценке количества рецепторов 1 и 2 типа на клетках основных популяций иммунных клеток (таблица 6) значимые различия по уровню экспрессии рецептора 2 типа выявлены для общего пула Т лимфоцитов и В лимфоцитов. При этом отличия носят разнонаправленный характер. В-лимфоциты экспрессировали более высокий уровень TNFR2 при РА по сравнению со здоровыми донорами, а Т-лимфоциты- наоборот, более низкий.

Таблица 6.Количество рецепторов 1 и 2 типа для TNF $\alpha$  на поверхности основных популяций иммунных клеток. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха.

TNFR1	Популяция	Здоровые n=43	РА n=64	p
	CD14+	4107 (2713–12,435)	4604 (1853–10,353)	0.640
	CD19+	2147 (1510–6077)	820 (577–2218)	0.757
	CD3+	743 (190–2036)	754 (481–1844)	0.120
TNFR2	Популяция	Здоровые	РА	p
	CD14+	15181 (12,588–33,641)	8029 (4809–21,546)	0.785
	CD19+	4704 (3155–12,446)	2056 (1264–3022)	0.033
	CD3+	935 (120–2269)	1404 (1075–2405)	<0.001

**3.5.  
Ср  
авн  
ени  
е  
ко-  
экс  
пре  
сси  
и  
сре  
дне  
го  
кол**

### **ичества рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$ хелперных и регуляторных Т- клеток у здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом**

Для Т клеток анализировались различия между субпопуляциями CD4 +, Т хелперных клеток в которые входили наивные (CD4+CD45RA+); активированные (CD4+CD25+); Т-клетки памяти (CD4+CD45RO+) и Т регуляторные клетки.

### **Сравнение ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$ хелперных и регуляторных Т- клеток у здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом**

Для общего пула CD4+ клеток (рисунок 18) характерно достоверное различие по проценту клеток экспрессирующих только TNFR1 у пациентов с РА (15,2%) по сравнению со здоровыми донорами (1,3% ( $p=0,0048$ )).

Для субпопуляции наивных Т-хелперных клеток характерен высокий процент (63,3%) дубль-негативных клеток у здоровых доноров по сравнению с больными РА (41,9% ( $p=0,0035$ )) и низкий процент дубль-позитивных клеток (1,8%) у здоровых доноров по сравнению с группой РА (13,4% ( $p=0,011$ )).

Субпопуляция активированных Т-хелперных клеток характеризовалась наличием достоверных отличий по проценту дубль-позитивных клеток, 28,5% у больных РА и всего 0,9% у здоровых доноров ( $p<0.001$ ), по проценту TNFR1+ клеток, 2,9 у пациентов с РА и 13,2% у здоровых доноров ( $p<0.001$ ), и по проценту клеток экспрессирующих только рецептор 2 типа 55,3% у пациентов с РА и 76,4% у здоровых доноров ( $p=0,0021$ ).

Для субпопуляции Т-хелперных клеток памяти характерные достоверные различия по всем типам экспрессии рецепторов между здоровыми донорами и пациентами с РА.

Для субпопуляции регуляторных Т-клеток характерны достоверные различия по проценту дубль-позитивных клеток и TNFR1+ и TNFR2+ клеток.

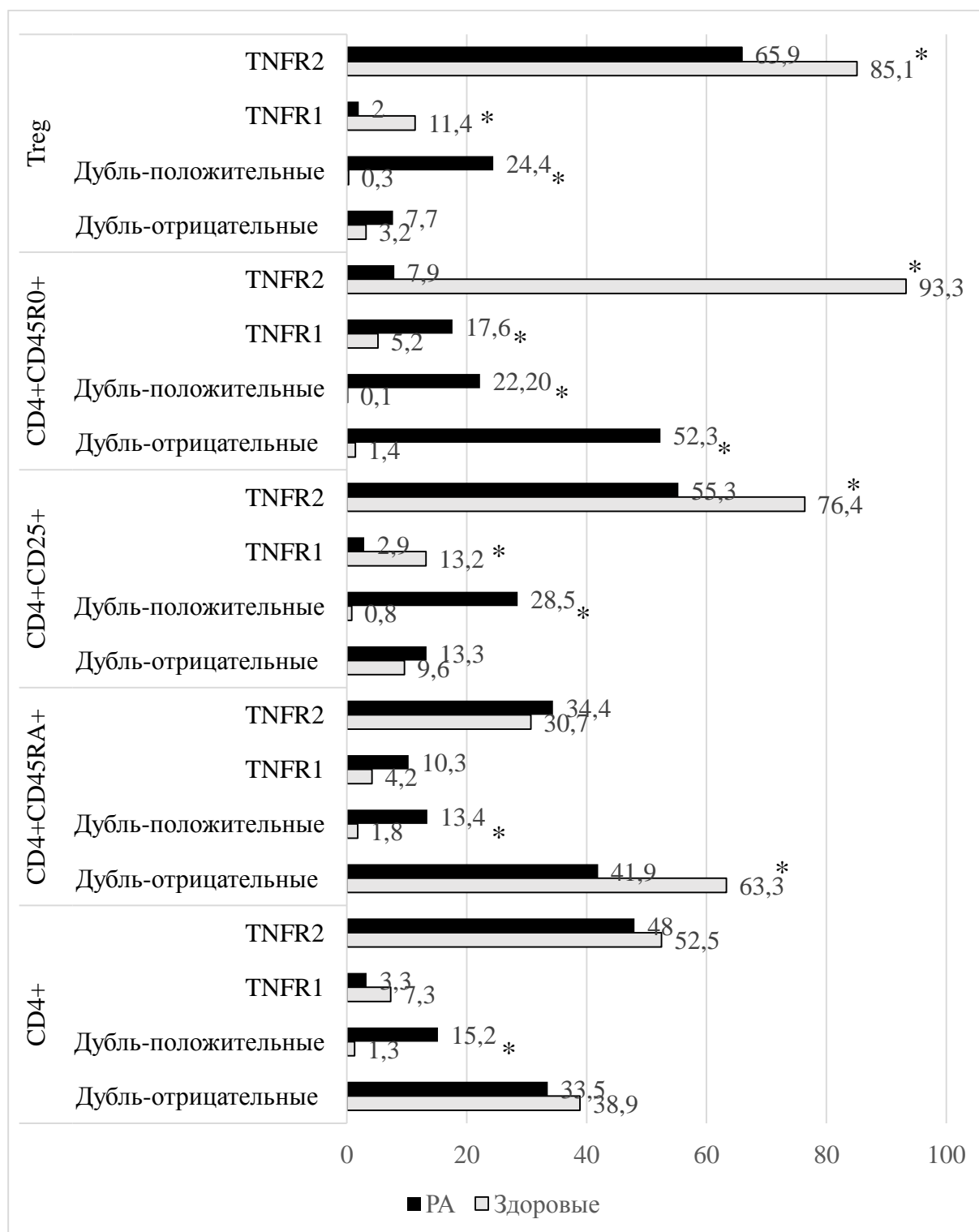


Рисунок 18. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  среди Т хелперных субпопуляций и Т регуляторных клеток и общего пула CD4 $^{+}$  Т клеток у пациентов с РА (n=64) и здоровых доноров (n=43). Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан.

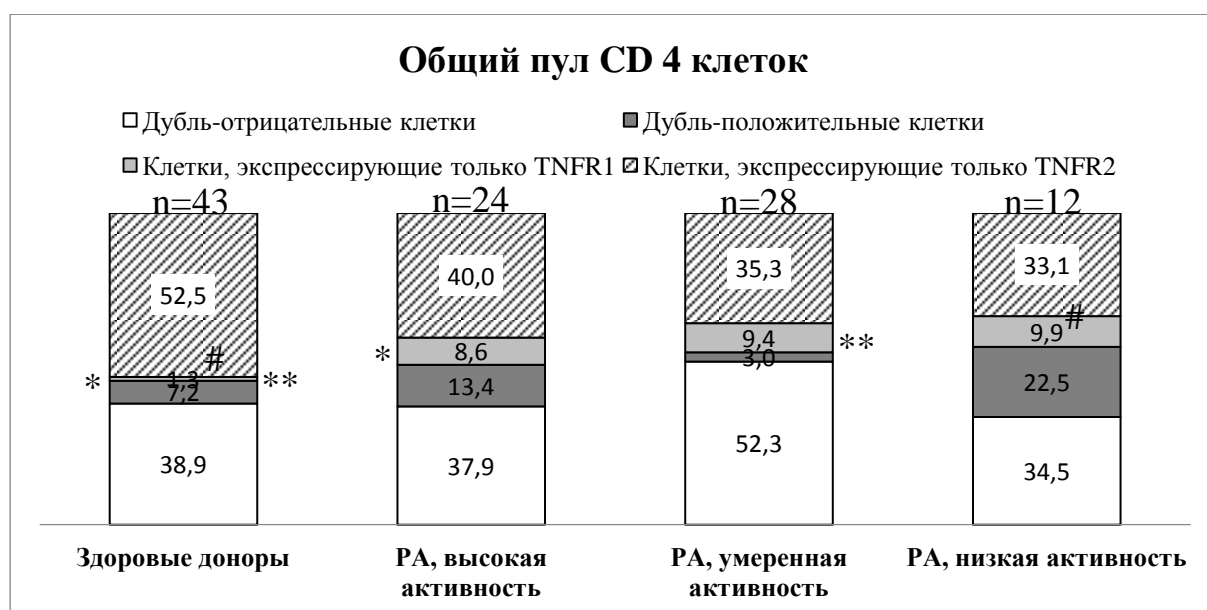
\*- указана статистическая значимость отличий между группами пациентов с РА и здоровыми донорами  $p < 0,05$ .

При оценке хелперных субпопуляций обращает внимание более низкий процент клеток экспрессирующих только 2 тип рецептора на субпопуляциях активированных Т-клеток, Т-клеток памяти и регуляторных Т-клеток, что может быть связано с участием данных субпопуляций в патогенезе РА.

**Оценка ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  у больных РА с обострением, имеющих различную степень активности заболевания, больных, прошедших курс терапии и здоровых доноров в общей популяции CD4<sup>+</sup> клеток, субпопуляциях хелперных и регуляторных Т-клеток**

Для более детальной оценки различий пациенты с обострением РА были разделены на группы по степени активности РА, каждая из которых последовательно сравнивалась с группой здоровых доноров и между собой.

Для общего пула CD4<sup>+</sup> клеток (рисунок 19) характерен более высокий процент клеток, экспрессирующих только TNFR1 во всех группах больных РА (высокая активность 8,6%, умеренная активность 9,4%, низкая активность 9,9%) по сравнению с группой здоровых доноров (1,3% ( $p = 0,0262, 0,0422$  и  $0,0011$ )).



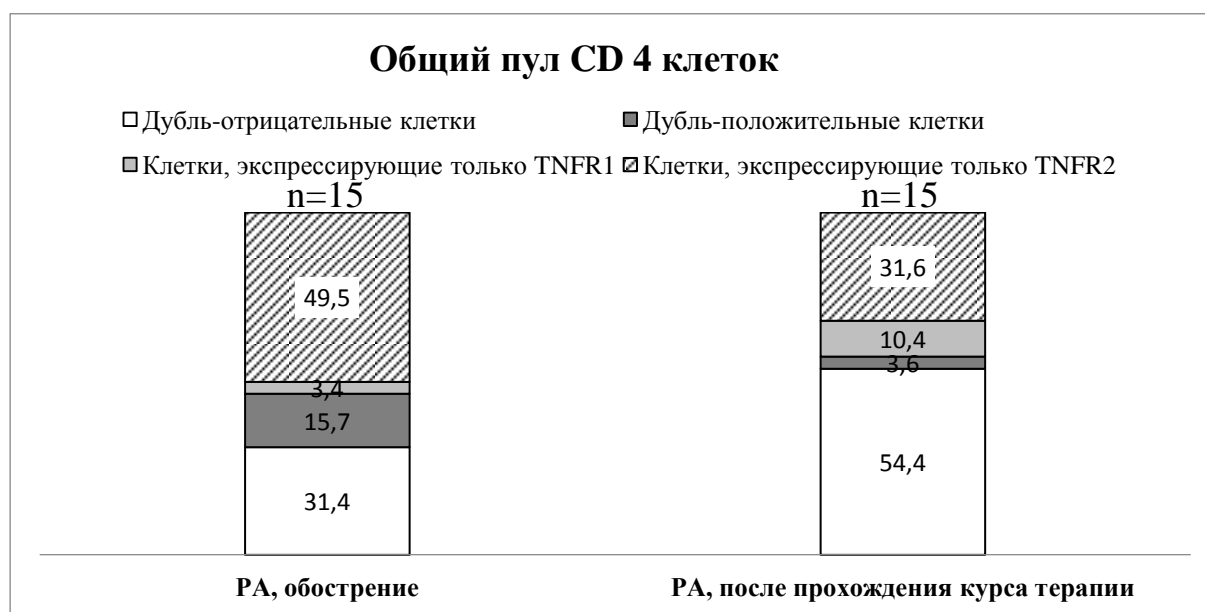


Рисунок 19. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  среди общего пула CD4 + клеток у пациентов с обострением РА имеющих различную степень активности, здоровых доноров и пациентов после прохождения терапии. Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан.

\*- 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  $p < 0,05$ .

◆- указана статистическая значимость между группами пациентов с обострением РА и пациентами с РА после прохождения курса терапии  $p < 0,05$ .

Для субпопуляции наивных Т-хелперных клеток (рисунок 20) отмечались значимые различия в проценте клеток экспрессирующих только рецептор 1 типа во всех группах пациентов с РА (высокая активность 12,7%, умеренная активность 8,2%, низкая активность 12,9%) по сравнению со здоровыми донорами (1,8% ( $p=0,0096$ ,  $0,0287$  и  $0,0024$ )).

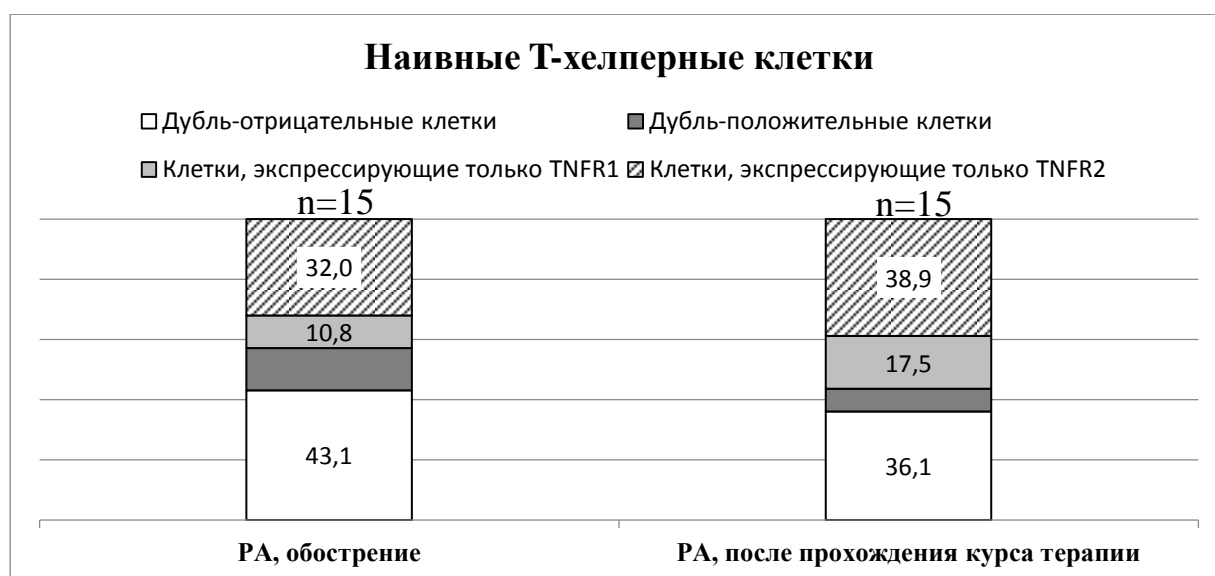
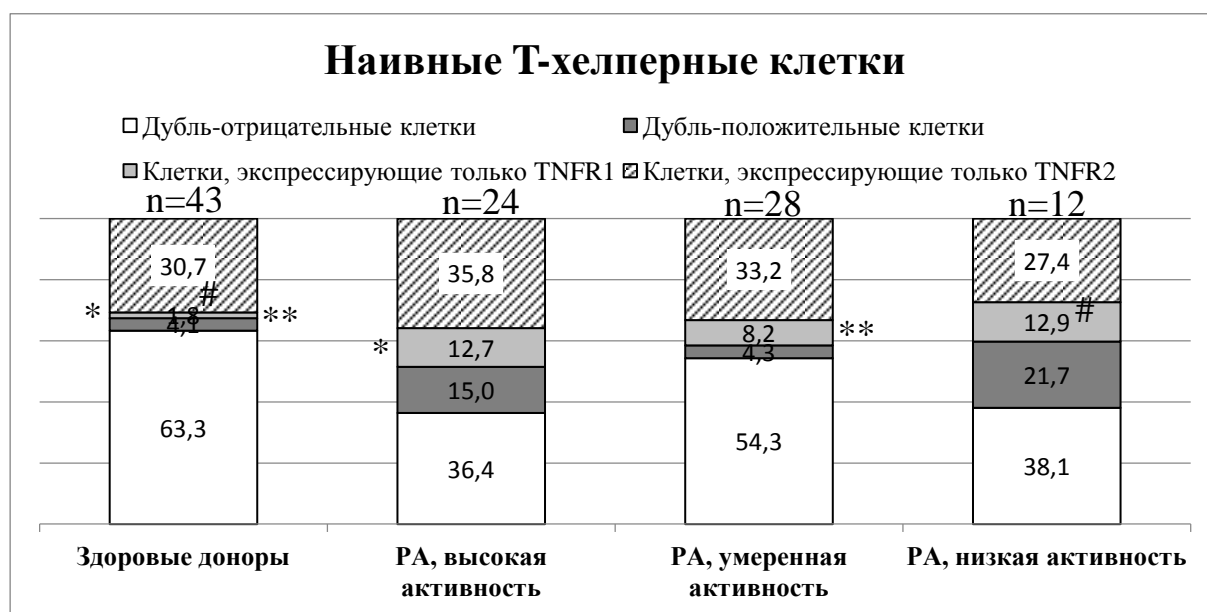


Рисунок 20. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  среди наивных Т хелперных клеток у пациентов с обострением РА имеющих различную степень активности, пациентов после прохождения курса терапии и здоровых доноров. Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан.

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

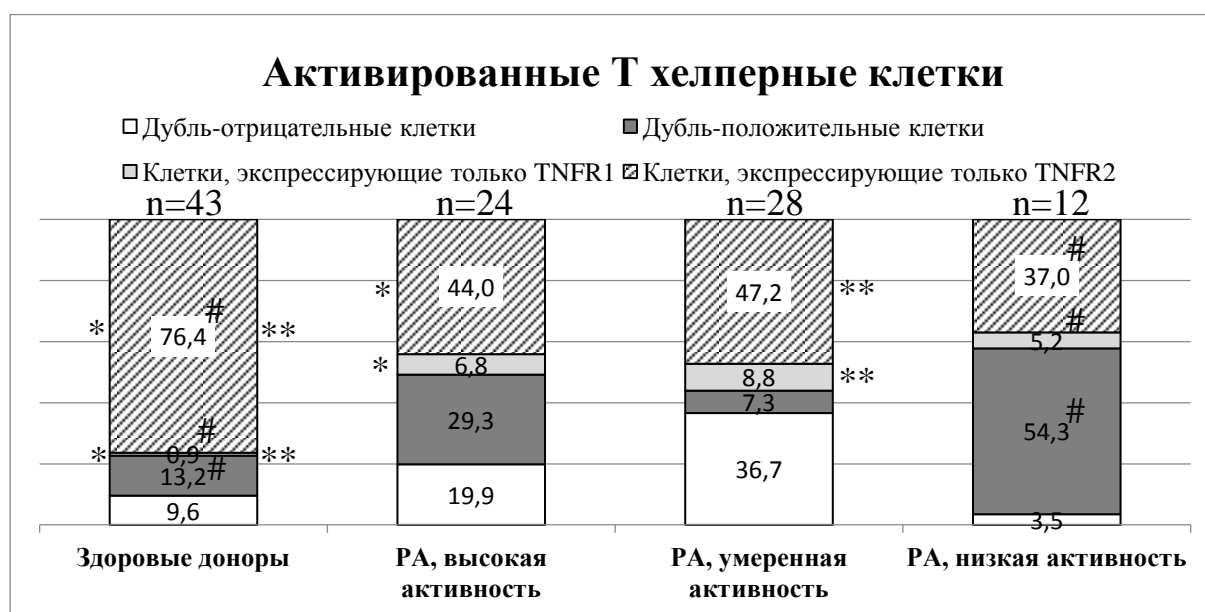
\*\* - указана статистическая значимость отличий между группой пациентов с умеренной активностью РА и здоровыми донорами  $p < 0,05$ .



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

Для субпопуляции активированных Т-хелперных клеток (рисунок 21) характерно выраженное перераспределение процента клеток с различными типами экспрессии в группах пациентов с РА по сравнению со здоровыми донорами. В группе с умеренной активностью наблюдался более высокий процент дубль-положительных клеток по сравнению со здоровыми донорами. В группе здоровых доноров практически отсутствовали TNFR1 + клетки, при этом процент TNFR2+ клеток был достоверно выше, чем во всех группах пациентов с РА. Статистическая значимость отличий данных пациентов с различной активностью РА по сравнению со здоровыми донорами представлена в таблице 7.

Увеличение процента дубль-отрицательных клеток (45,7 %) и уменьшение клеток экспрессирующих только TNFR2 и TNFR1 (28,6% и 7,7%) наблюдалось в группе пациентов после прохождения терапии по сравнению с группой пациентов с обострением РА (дубль-негативные- 10,7% ( $p = 0,021$ ), TNFR2 57,6% (0,007), TNFR1 28,6% ( $p = 0,018$ )).



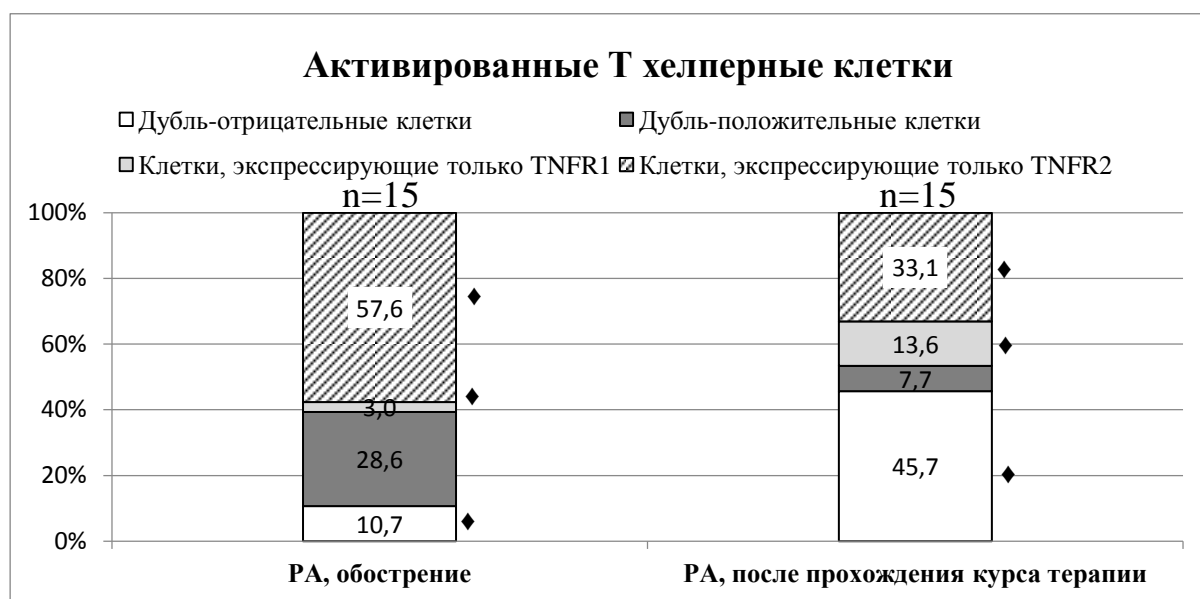


Рисунок 21 - Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  среди активированных Т хелперных клеток у пациентов с обострением РА имеющих различную степень активности, пациентов после прохождения курса терапии и здоровых доноров. Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан.

\*- 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  $p < 0,05$ .

◆- указана статистическая значимость между группами пациентов с обострением РА и пациентами с РА после прохождения курса терапии.

Таблица 7. Статистическая значимость отличий ко-экспрессии рецепторов у пациентов с различной активностью РА по сравнению со здоровыми донорами

	Дубль-отрицательные	Дубль-положительные	Клетки, экспрессирующие	Клетки, экспрессирующие
--	---------------------	---------------------	-------------------------	-------------------------

	клетки	е клетки	щие только TNFR1	щие только TNFR2
РА, высокая активность *	$\geq 0,05$	$\geq 0,05$	0,0307	0,0309
РА, умеренная активность **	$\geq 0,05$	$\geq 0,05$	0,0416	0,0184
РА, низкая активность #	$\geq 0,05$	0,0021	0,02	0,0234

Данная субпопуляция характеризовалась перераспределением ко-экспрессии рецепторов у всех групп пациентов с РА в зависимости от степени активности и по сравнению со здоровыми донорами. Так же отмечалось перераспределение ко-экспрессии после прохождения курса терапии по сравнению с данными полученными при поступлении.

Для субпопуляции Т-хелперных клеток памяти (рисунок 22) характерно отличие всех групп пациентов с РА по сравнению со здоровыми донорами. Группа здоровых доноров характеризовалась низким процентом всех типов ко-экспрессии рецепторов, кроме TNFR2 + которая составляла 93,3 %. Статистическая значимость отличий пациентов с различной активностью РА по сравнению со здоровыми донорами представлена в таблице 8.

Для группы пациентов после прохождения курса терапии характерно уменьшение процента дубль-отрицательных клеток с 75,2 % при поступлении до 37,9 % ( $p=0,041$ ), увеличение процента клеток экспрессирующих только TNFR2 (2,1 и 22,2 % ( $p=0,011$ )) и TNFR1 (0,4 и 14,1% ( $p=0,004$ )).

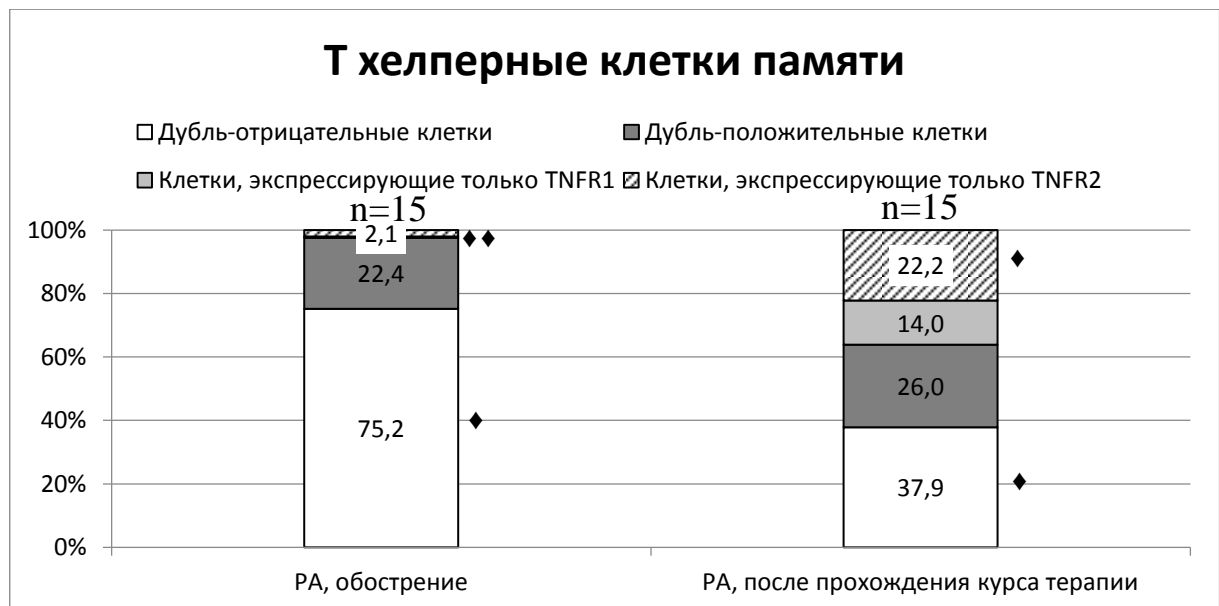
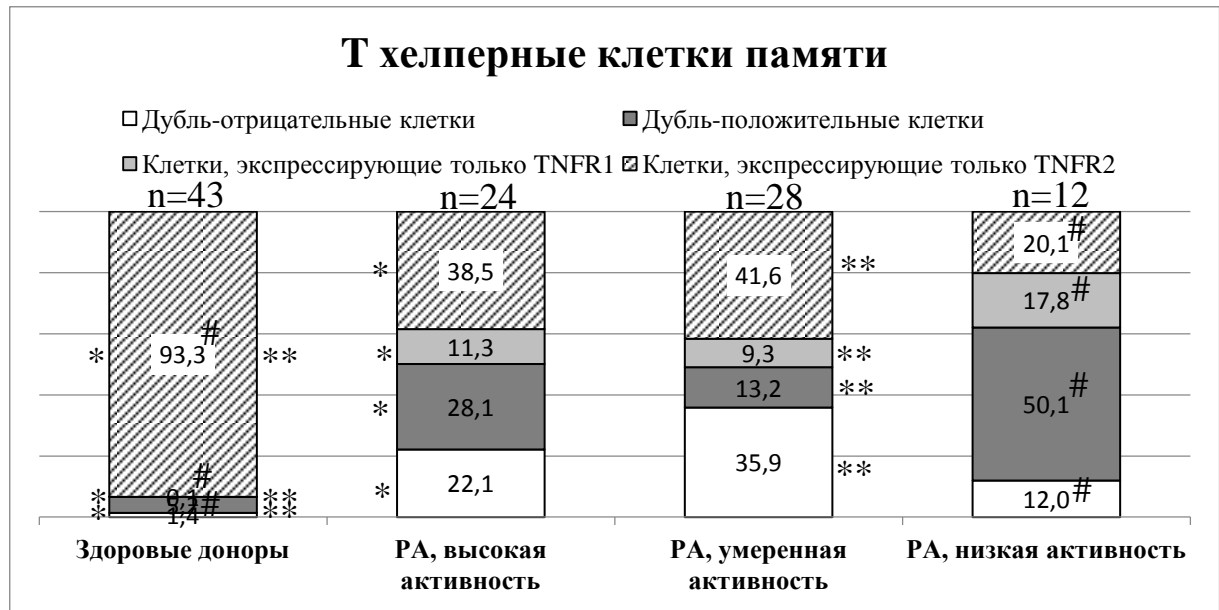


Рисунок 22. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  среди Т-хелперных клеток памяти у пациентов с обострением РА имеющих различную степень активности, пациентов после прохождения курса терапии и здоровых доноров. Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан

\*- 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  $p < 0,05$ .

♦- указана статистическая значимость между группами пациентов с обострением РА и пациентами с РА после прохождения курса терапии.

Таблица 8. Статистическая значимость отличий ко-экспрессии рецепторов у пациентов с различной активностью РА по сравнению со здоровыми донорами.

	Дубль-отрицательные клетки	Дубль-положительные клетки	Клетки, экспрессирующие только TNFR1	Клетки, экспрессирующие только TNFR2
РА, высокая активность *	0,027	0,0356	0,001	0,0064
РА, умеренная активность **	0,0208	0,002	0,0033	0,0043
РА, низкая активность #	0,014	0,031	0,0004	0,0005

Субпопуляция регуляторных Т-клеток (рисунок 23) характеризовалась достоверными отличиями по проценту дубль-негативных клеток в группе пациентов с умеренной активностью РА (35,1%) по сравнению со здоровыми донорами (3,2%). По проценту дубль-позитивных клеток были выявлены достоверные отличия в группах с высокой и низкой активностью по сравнению со здоровыми донорами. Для всех групп пациентов характерно достоверное отличие по проценту TNFR1 и TNFR2 + клеток по сравнению со здоровыми донорами. Достоверность отличий пациентов с различной активностью РА по сравнению со здоровыми донорами представлена в таблице 9.

Для группы пациентов после коррекции терапии РА, характерно увеличение процента дубль-негативных клеток (33,8%) по сравнению с пациентами с обострением РА (8,1% ( $p=0,022$ )).

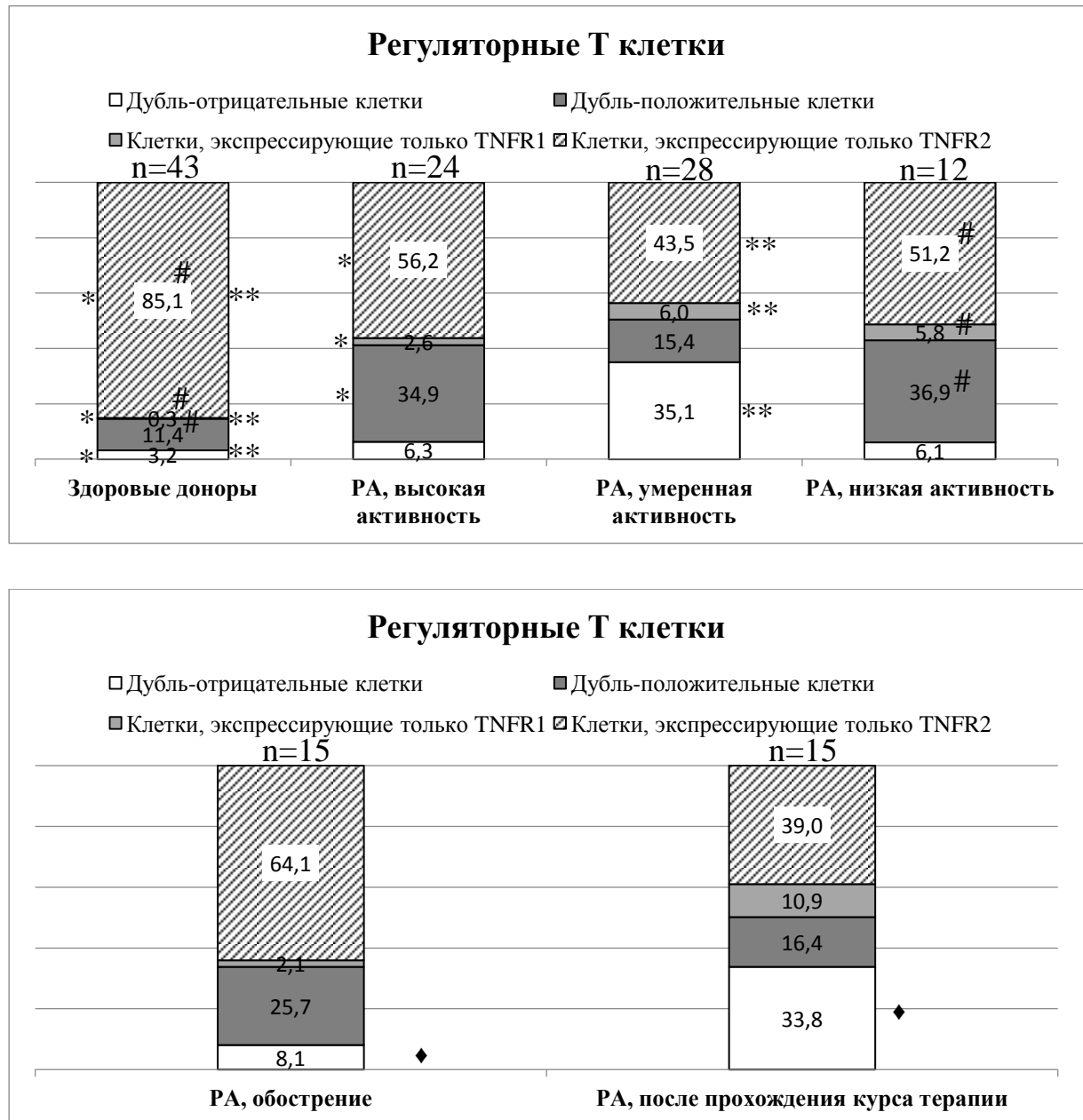


Рисунок 23. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  среди регуляторных Т клеток у пациентов с обострением РА имеющих различную степень активности, пациентов после прохождения курса терапии и здоровых доноров. Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан.

\*- 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  $p < 0,05$ .

♦- указана статистическая значимость между группами пациентов с обострением РА и пациентами с РА после прохождения курса терапии.

Таблица 9. Статистическая значимость отличий ко-экспрессии рецепторов у пациентов с различной активностью РА по сравнению со здоровыми донорами

	Дубль-отрицательные клетки	Дубль-положительные клетки	Клетки, экспрессирующие только TNFR1	Клетки, экспрессирующие только TNFR2
РА, высокая активность *	$\geq 0,05$	0,0222	0,04	0,0278
РА, умеренная активность **	0,0059	$\geq 0,05$	0,0011	0,0356
РА, низкая активность #	$\geq 0,05$	0,0163	0,0029	0,023

**Определение среднего количества рецепторов 1 и 2 типа для TNF $\alpha$  на поверхности хелперных и регуляторных Т- клеток**

Был проведен анализ различий по среднему количеству рецепторов 1 и 2 типа для TNF $\alpha$  между субпопуляциями хелперных и регуляторных Т- клеток в которые входили общий пул CD 4+ клеток, субпопуляции цитотоксических Т клеток (наивные (CD4+CD45RA+); активированные (CD4+CD25+) и цитотоксические Т

клетки памяти (CD4+CD45R0+), регуляторных Т-клеток (CD4+CD25highCD127low) (таблица 10).

Таблица 10. Количество рецепторов 1 и 2 типа для TNF $\alpha$  на поверхности субпопуляций хелперных и регуляторных Т-клеток. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха

	Субпопуляция	Здоровые	РА	p
TNFR1	CD4+	1685 (673–5286)	784 (437–1074)	<0.001
	CD4+CD25+	1965 (973–14,891)	730 (500–970)	0.000
	CD4+CD45R0+	5575 (1893–12,654)	818 (530–1142)	<0.001
	CD4+CD45RA+	918 (276–2269)	469 (376–674)	0.000
	Treg	1253 (569–6191)	764 (592–1560)	0.020
TNFR2	CD4+	1570 (463–3504)	2477 (1434–4620)	0.475
	CD4+CD25+	1657 (465–3750)	3238 (1586–6582)	0.327
	CD4+CD45R0+	4601 (2547.5–12,913.5)	23392 (3536–56,201)	0.048
	CD4+CD45RA+	2372.5 (979–6276.5)	1209 (970–1981)	0.009
	Treg	1460 (201–5029)	2885 (1790–6996)	0.237

Для всех субпопуляций хелперных и регуляторных Т-клеток выявлены статистически значимые отличия в количестве рецептора 1 типа у больных с РА по сравнению со здоровыми. Отличия в количестве рецептора 2 типа у больных с



РА по сравнению со здоровыми были выявлены для субпопуляций наивных Т хелперных клеток и Т хелперных клеток памяти.

### **3.6. Сравнение ко-экспрессии и среднего количества рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$ на цитотоксических Т лимфоцитах у здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом**

Был проведен анализ различий между субпопуляциями CD8<sup>+</sup> клеток, в которые входили общий пул CD 8<sup>+</sup> клеток, субпопуляции цитотоксических Т клеток (наивные (CD8+CD45RA<sup>+</sup>); активированные (CD8CD25) и цитотоксические Т клетки памяти (CD8+CD45RO<sup>+</sup>))

#### **Сравнение ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$ на цитотоксических Т лимфоцитах у здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом**

Для общего пула CD8<sup>+</sup> клеток (рисунок 24) характерно достоверное различие по проценту дубль-позитивных клеток 1,6% у здоровых доноров и 19,6% у пациентов с РА ( $p < 0.001$ )).

Для субпопуляции наивных цитотоксических Т клеток характерны различия по проценту клеток экспрессирующих только рецепторы 1 и только 2 тип. Для пациентов с РА характерен высокий процент клеток экспрессирующих только TNFR2 (54,9%) и низкий процент TNFR1<sup>+</sup> клеток (27,9%) у пациентов с РА наблюдается обратная картина: 54,4 % клеток экспрессируют TNFR1 и 11% - TNFR2.

Для субпопуляции активированных цитотоксических клеток характерны статистически значимые отличия по проценту дубль-позитивных клеток. 28,2% у пациентов с РА и только 1,2% у здоровых доноров ( $p < 0.001$ ).

Наиболее выраженные отличия характерны для субпопуляции цитотоксических клеток памяти. Данные клетки различаются по проценту дубль-позитивных клеток у пациентов с РА 29,9% и 0,2% у здоровых доноров ( $p < 0.001$ ), по проценту клеток экспрессирующих только рецептор 1 типа, 0,4 % у пациентов с РА и 14,7%

у здоровых доноров ( $p < 0.001$ ) и по проценту TNFR2+ клеток, 64,9 % у пациентов с РА и 80% у здоровых доноров ( $p < 0.001$ ).

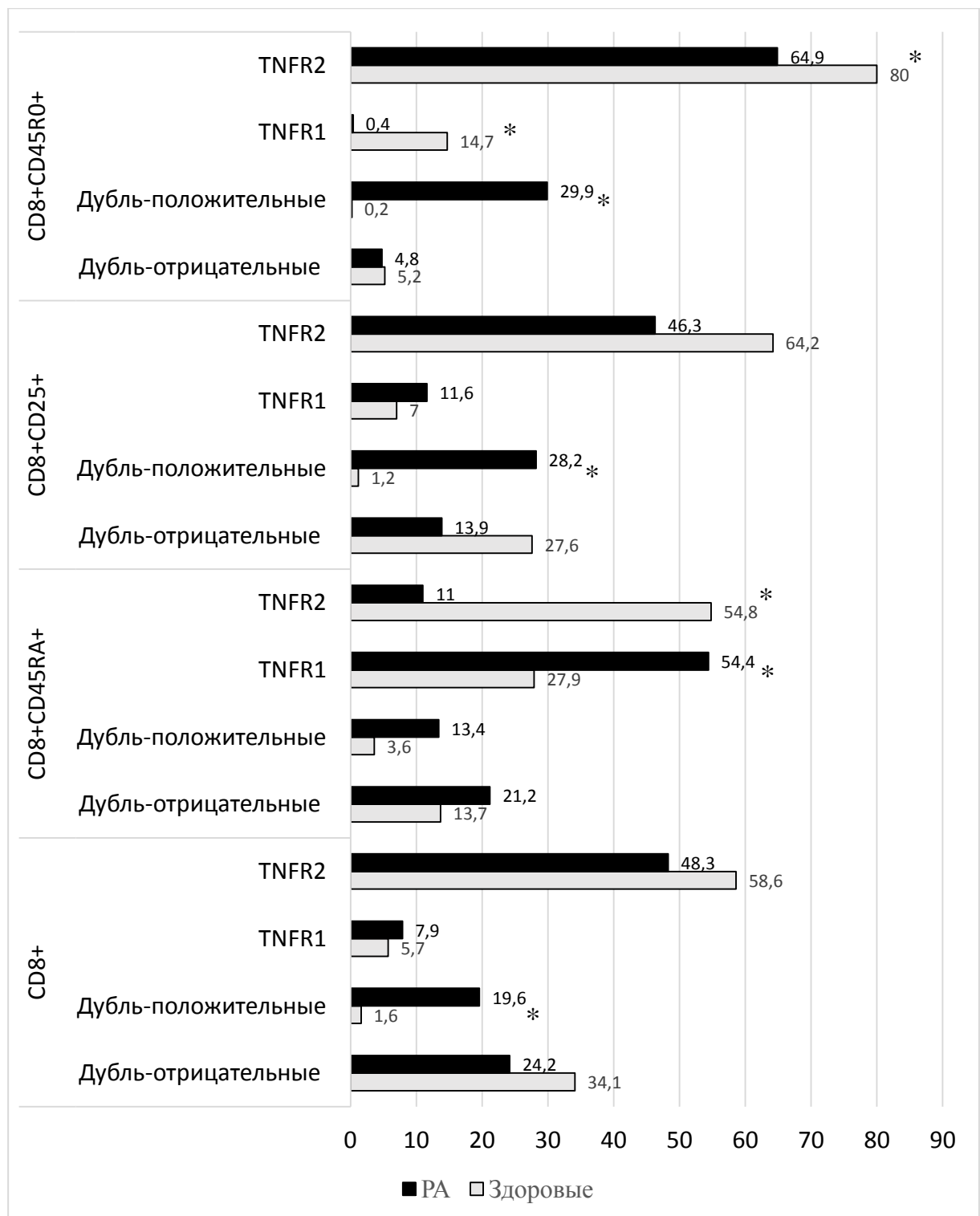


Рисунок 24. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  среди цитотоксических Т клеток и общей популяции CD8+ Т клеток у пациентов с РА (n=64) и здоровых

доноров (n=43). Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан.

\*- указана статистическая значимость отличий между группами пациентов с РА и здоровыми донорами  $p < 0,05$ .

Полученные данные демонстрируют, что распределение рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  значительно различается между основными популяциями иммунокомпетентных клеток, и меняется при патологии. В частности, у здоровых доноров наибольший процент дубль-положительных клеток характерен для активированных цитотоксических лимфоцитов, наибольший процент клеток, экспрессирующих только рецептор 1 типа - для цитотоксических Т-лимфоцитов памяти, и наибольший процент клеток, экспрессирующих только рецептор 2 типа, - для наивных цитотоксических Т-лимфоцитов. При РА происходит перераспределение рецепторов в субпопуляциях, однако, наибольший процент клеток, экспрессирующих только рецептор 1 типа, наблюдается для цитотоксических Т-лимфоцитов памяти.

**Оценка ко-экспрессии у больных РА с обострением, имеющих различную степень активности заболевания, пациентов после прохождения курса терапии и здоровых доноров для субпопуляций цитотоксических Т-клеток**

Общий пул CD8<sup>+</sup> (рисунок 25) клеток характеризуется значимым различием среди клеток экспрессирующих только рецептор 1 типа для всех групп пациентов с разной степенью активности РА по сравнению со здоровыми донорами. Процент данных клеток являлся минимальным для группы здоровых доноров 1,6 %, для группы с высокой активностью РА – 15,7% ( $p=0,0066$ ), для группы с умеренной активностью – 10% ( $p=0,002$ ), для группы с низкой активностью -16,2% ( $p=0,0005$ ). По проценту дубль-позитивных клеток отличалась группа пациентов с высокой активностью (23,6%) по сравнению со здоровыми донорами 7,2% ( $p=0,0308$ ).

По проценту клеток экспрессирующих рецептор 1 типа отличалась и группа пациентов после коррекции базисной терапии по сравнению с пациентами с обострением РА. В данном случае процент TNFR1 вырос с 8,7 до 22,7 ( $p=0,02$ ).

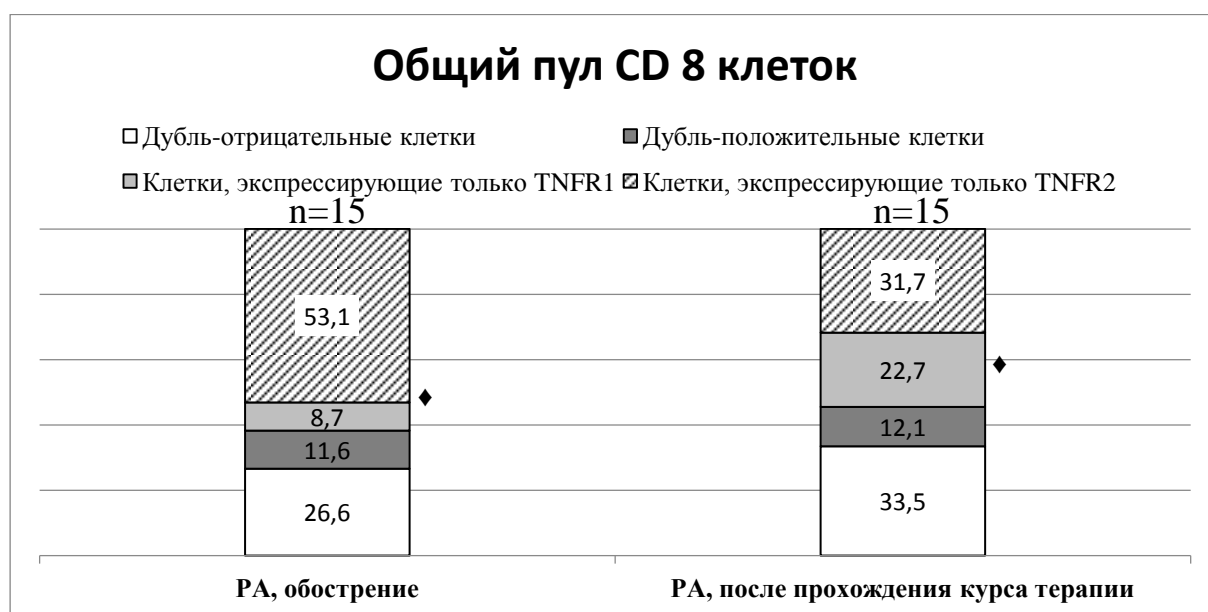
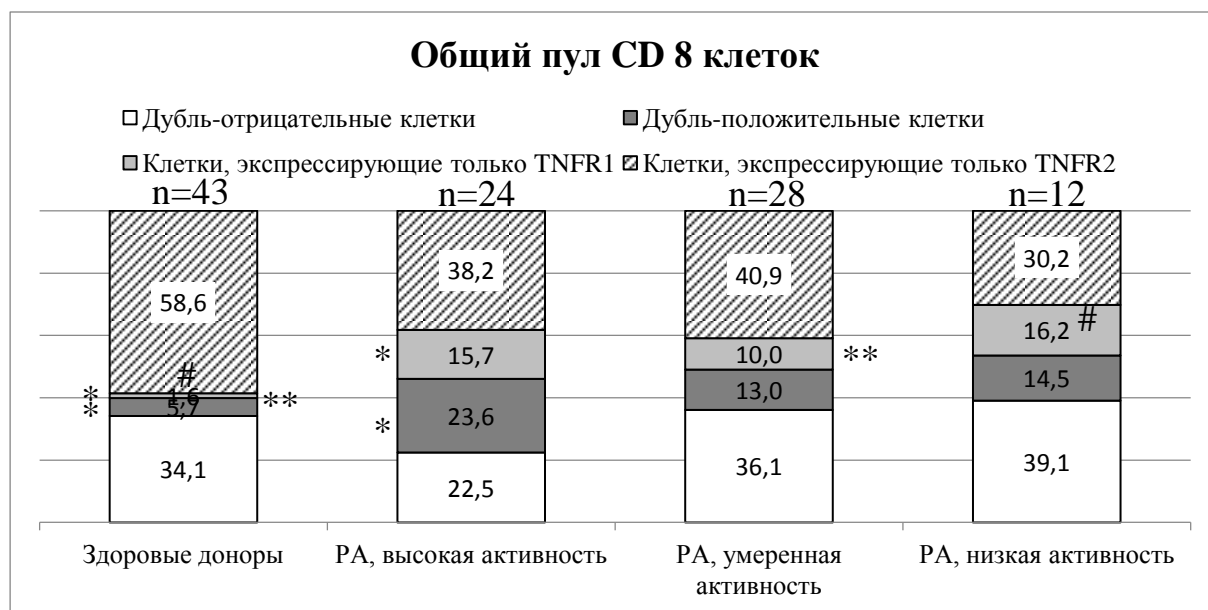


Рисунок 25. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  среди общего пула CD8 + клеток у пациентов с обострением РА имеющих различную степень активности, пациентов, после прохождения курса терапии и здоровых доноров. Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан

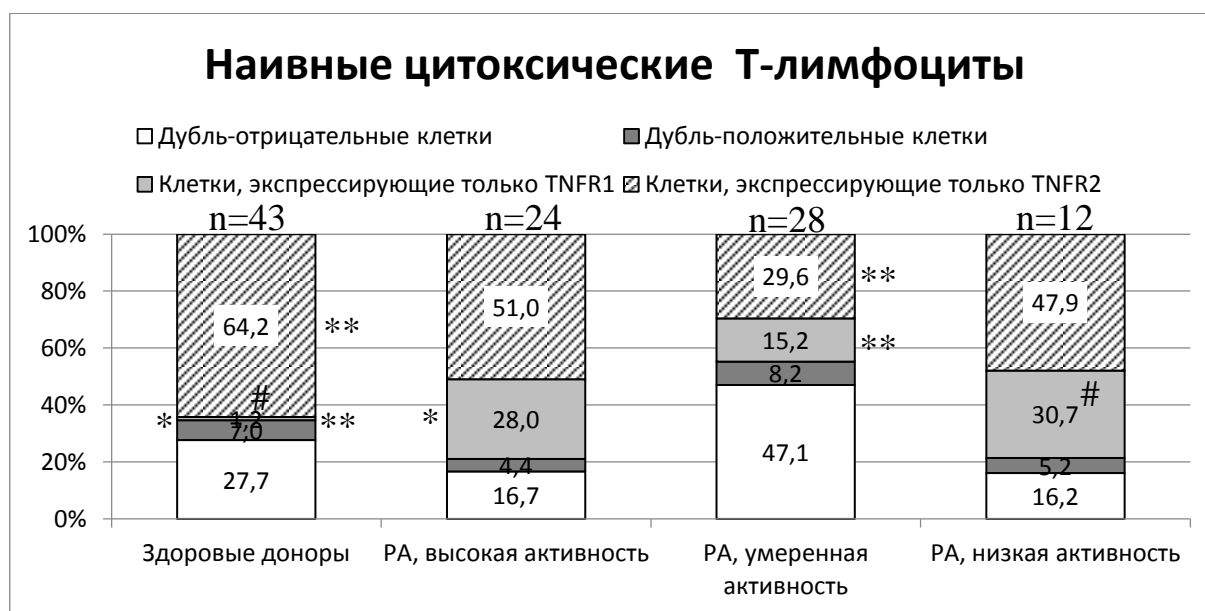
\*- указана статистическая значимость отличий между группой пациентов с высокой активностью РА и здоровыми донорами  $p < 0,05$ .

\*\* - 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  $p < 0,05$ .

◆ - указана статистическая значимость между группами пациентов с обострением РА и пациентами с РА после прохождения курса терапии  $p < 0,05$ .

Для данной субпопуляции (рисунок 26) характерен более высокий процент клеток экспрессирующих только рецептор 1 типа во всех группах пациентов с РА по сравнению со здоровыми донорами, где процент TNFR1 + клеток составлял 1,2%, в группе с высокой активностью РА – 28% ( $p=0,0002$ ), в группе с умеренной активностью РА- 15,2% ( $p= 0,0048$ ), в группе с низкой активностью РА- 30,7% ( $p= 0,0046$ ). В группах с умеренной активностью РА отмечался более низкий процент клеток экспрессирующих только TNFR 2 (29,6 %) по сравнению со здоровыми донорами (64,2 % ( $p=0,0008$ )).



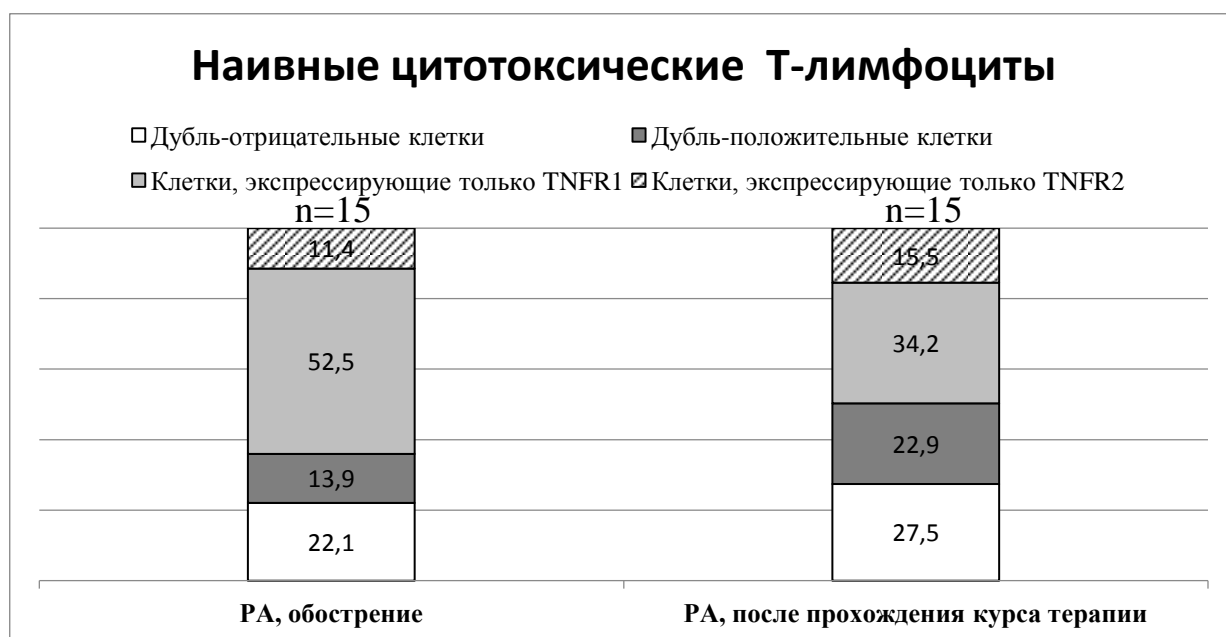


Рисунок 26. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к  $\text{TNF}\alpha$  среди наивных цитотоксических Т лимфоцитов у пациентов с обострением РА имеющих различную степень активности, пациентов после прохождения курса терапии и здоровых доноров. Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан.

\*- 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 активированных цитотоксических Т клеток (рисунок 27) характерен более высокий процент дубль-отрицательных клеток и клеток экспрессирующих только TNFR1 для всех групп пациентов с РА по сравнению со здоровыми донорами. Для групп с низкой и умеренной активностью РА характерны значимые отличия по проценту TNFR2+ клеток (20,1% и 22,2%) по сравнению со здоровыми донорами (54,9%). Статистически значимые отличия

различных групп пациентов с РА по сравнению со здоровыми донорами указаны в таблице 11.

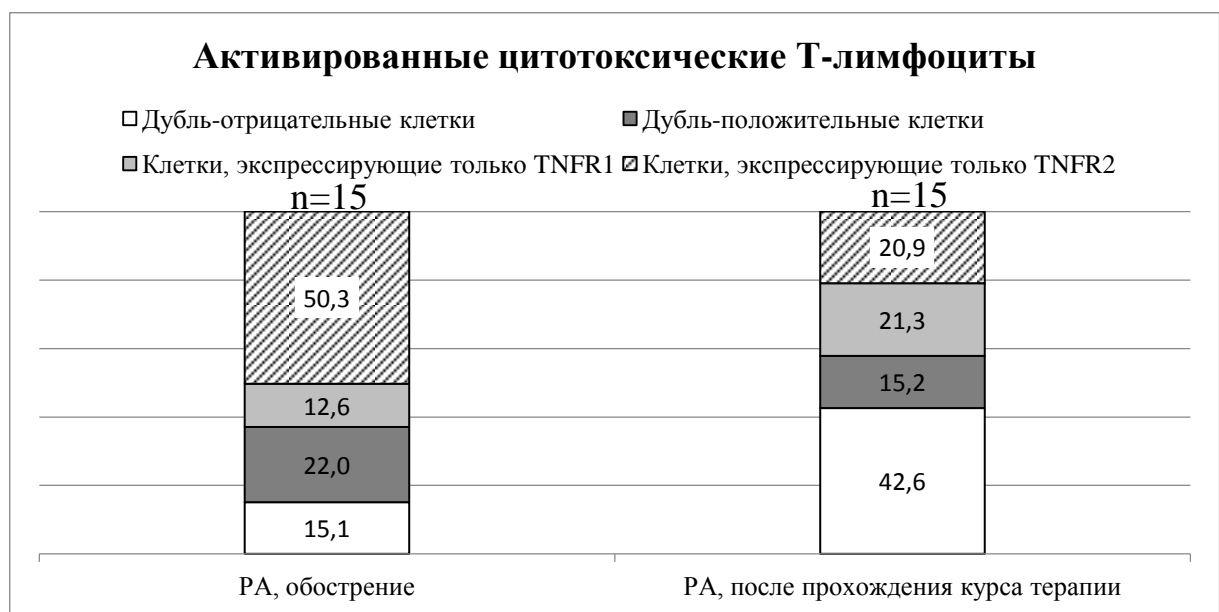
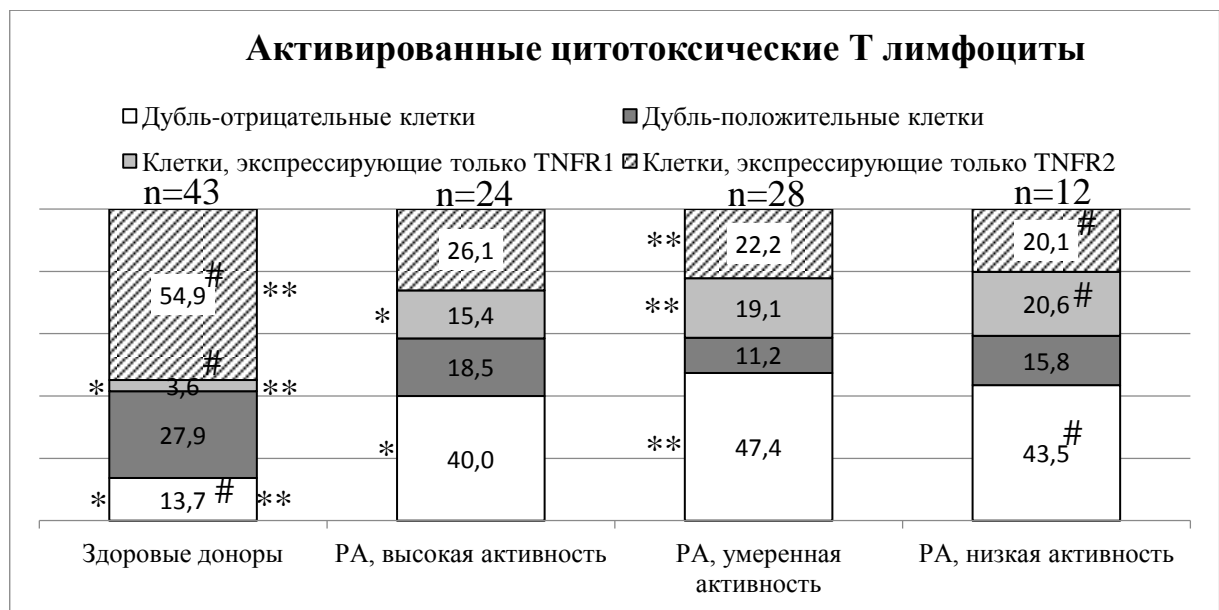


Рисунок 27. Ко-экспрессия рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  среди активированных цитотоксических Т клеток у пациентов с обострением РА имеющих различную степень активности, пациентов после прохождения курса терапии и здоровых доноров. Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан. \*- 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  $p < 0,05$ .

Таблица 11. Статистическая значимость отличий ко-экспрессии рецепторов у пациентов с различной активностью РА по сравнению со здоровыми донорами.

	Дубль-отрицательные клетки	Дубль-положительные клетки	Клетки, экспрессирующие только TNFR1	Клетки, экспрессирующие только TNFR2
РА, высокая активность *	0,0424		0,0441	
РА, умеренная активность **	0,0042		0,0048	0,0281
РА, низкая активность #	0,0231		0,0062	0,0251

Данная субпопуляция (рисунок 28) характеризовалась наиболее выраженным перераспределением 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. Достоверные отличия различных групп пациентов с РА по сравнению со здоровыми донорами указаны в таблице 12.

Группа пациентов после коррекции базисной терапии характеризовалась значимым увеличением процента дубль-отрицательных клеток по сравнению с пациентами с обострением (56,8 и 5,3  $p < 0,0001$ ). Для пациентов после коррекции базисной терапии характерно увеличение процента клеток экспрессирующих



TNFR1 с 0,4% до 11,7 % ( $p=0,0012$ ) и уменьшение процента TNFR2+ клеток с 71,3% до 22,6 % ( $p=0,0042$ ).

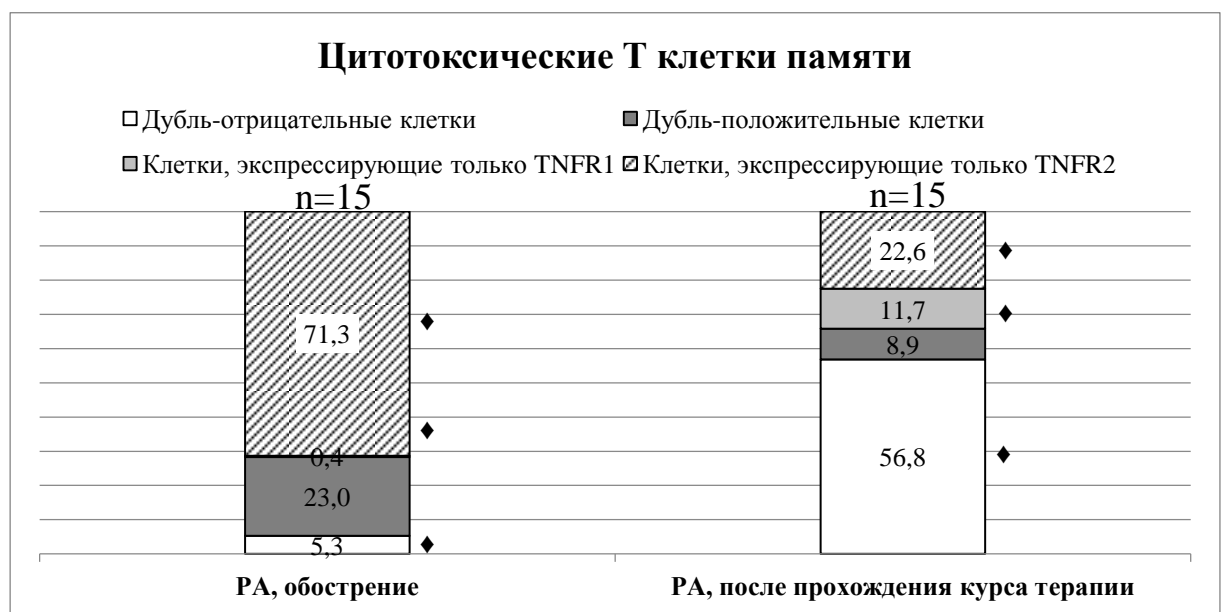
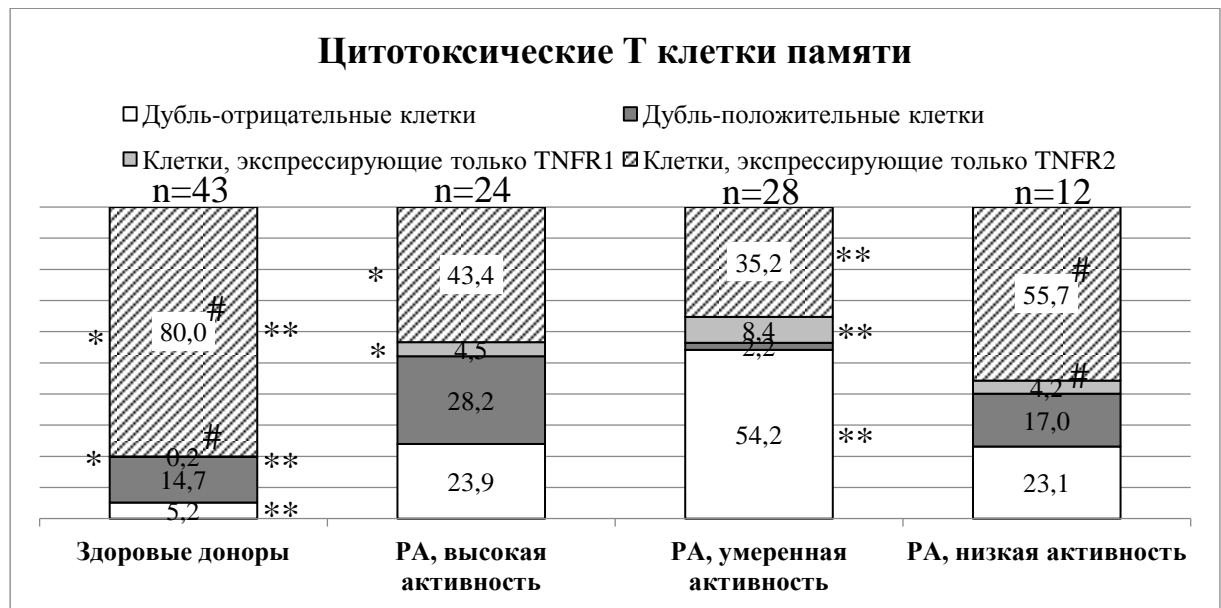


Рисунок 28. Ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  среди цитотоксических Т клеток памяти у пациентов с обострением РА имеющих различную степень активности, пациентов после прохождения курса терапии РА и здоровых доноров. Данные представлены в виде нормированных на общую сумму медиан.

\*- 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  $p < 0,05$ .

♦- указана статистическая значимость между группами пациентов с обострением РА и пациентами с РА после прохождения курса терапии  $p < 0,05$ .

Таблица 12. Статистическая значимость отличий ко-экспрессии рецепторов у пациентов с различной активностью РА по сравнению со здоровыми донорами.

	Дубль-отрицательные клетки	Дубль-положительные клетки	Клетки, экспрессирующие только TNFR1	Клетки, экспрессирующие только TNFR2
РА, высокая активность *			0,0106	0,0315
РА, умеренная активность **	0,0056		0,0027	0,0052
РА, низкая активность #			0,0009	0,0015

#### **Определение количества рецепторов 1 и 2 типа для TNF $\alpha$ на поверхности основных популяций иммунных клеток**

По количественной экспрессии рецепторов (таб.13), 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, соответственно. Для рецептора 1 типа значимые различия отмечались среди общего пула CD8+ клеток у здоровых по сравнению с больными РА.

Таблица 13 - Количество рецепторов 1 и 2 типа для TNF $\alpha$  на поверхности цитотоксических Т- клеток. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха.

	Субпопуляция	Здоровые	РА	p
TNFR1	CD8+	729 (127–1885)	450 (366–525)	0,034
	CD8+CD25+	703 (164–1658)	523 (415–619)	0,203
	CD8+CD45R0+	1336 (292–3363)	787 (565–1008)	0,047
	CD8+CD45RA+	667 (175–1489)	443 (404–681)	0,178
TNFR2	CD8+	1092 (322–2528)	1302 (833–2781)	0,252
	CD8+CD25+	1370 (388–4578)	1628 (922–3060)	0,728
	CD8+CD45R0+	2543,5 (1146.5–7057)	11915 (2476–27,212)	0,009
	CD8+CD45RA+	1496,5 (336.5–3657)	1220 (857–2415)	0,743

### **3.7. Корреляция между параметрами ко-экспрессии и показателями тяжести РА.**

Всего было идентифицировано семь показателей экспрессии рецепторов, которые значимо отличаются у пациентов с РА с высокой активностью заболевания по сравнению со здоровыми донорами, но не отличаются между

здоровыми донорами и пациентами с низкой активностью заболевания: четыре показателя, основанные на количестве рецепторов на клетках (число рецепторов типа 2 на дважды положительных клетках TNFR1 + TNFR2 + среди В-клеток и активированных цитотоксических лимфоцитах (CD8 + CD25 +), числа рецепторов 2 типа среди лимфоцитов TNFR1-TNFR2 + В, число рецепторов 1 типа среди моноцитов TNFR1 + TNFR2-) и три показателя, основанные на процентном содержании клеток, экспрессирующих определенные комбинации рецепторов (процент клеток TNFR1 + TNFR2- среди общего пула Т-лимфоцитов и процент клеток, экспрессирующих хотя бы один из двух типов рецепторов TNF $\alpha$  среди наивных Т-хелперных клеток и Т-хелперные клетки памяти).

Корреляционный анализ взаимосвязи между тяжестью заболевания и показателями активности (индекс DAS-28, длительность заболевания, радиологическая стадия, стадия активности, уровни ревматоидного фактора (РФ), уровни анти- ЦЦП и ЦРБ, наличие системных проявлений и эрозивный артрит) и параметры экспрессии рецептора TNF $\alpha$  проводили для субпопуляций иммунных клеток (Таблица 14,15). Рентгенологическая стадия и наличие системных признаков не коррелировали ни с одним параметром экспрессии TNFR1 или TNFR2.

Таблица 14 - Корреляционный анализ основных популяций иммунных клеток ( $p < 0,05$ ).

%--: процент дубль-отрицательных клеток. %++: процент дубль позитивных клеток. %T1: процент TNFR1+TNFR2- клеток. %T1: процент TNFR1-TNFR2+ клеток. N T1 (T2) ++: количество TNFR1 (TNFR2) на дубль-позитивных клетках. N T1+: количество TNFR1 на TNFR1+TNFR2- клетках. N T2+: количество TNFR2 на TNFR1-TNFR2+ клетках. N T1 (T2) full: общее количество TNFR1 (TNFR2) в субпопуляции.

Субпопуляция	DAS-28	Длительность РА	Уровень РФ	АЦЦП	уровень ЦРБ	Эрозивный артрит	Степень активности
CD14	% T1 (r = -0,72)	-	% T2 (r = 0,78)	-	%-- (r = 0,97)	-	% T2 (r = 0,78)
	% T2 (r = 0,82)				% T1 (r = 0,79)		
	N T2++ (r = 0,71)						
	N T2+ (r = 0,71)						
CD19	-	% T1 (r = 0,77)	-	-	N T2++ (r = 0,96)	-	-
					N T2+ (r = 0,95)		
					N T2 full (r = 0,95)		
CD3	-	% T1 (r = 0,71)	% T2 (r = 0,70)	-	N T2+ (r = 0,77)	-	-
					N T2 full (r = 0,77)		
Treg	-	% ++ (r = 0,82)	N T1++ (r = 0,78)	-	-	-	-
		N T1 + (r = 0,87)					
		N T2++ (r = 0,89)					
		N T2full (r = 0,94)					
		N T2+ (r = 0,93)					

Таблица 15 - Корреляционный анализ основных популяций хелперных, цитотоксических и регуляторных Т-клеток ( $p < 0,05$ ).

%--: процент дубль-отрицательных клеток. %++: процент дубль позитивных клеток. %T1: процент TNFR1+TNFR2- клеток. %T1: процент TNFR1-TNFR2+ клеток. N T1 (T2) ++: количество TNFR1 (TNFR2) на дубль-позитивных клетках. N T1+: количество TNFR1 на TNFR1+TNFR2- клетках. N T2+: количество TNFR2 на TNFR1-TNFR2+ клетках. N T1 (T2) full: общее количество TNFR1 (TNFR2) в субпопуляции.

Субпопуляция	DAS-28	Длительность РА	Уровень РФ	АЦЦП	уровень ЦРБ	Эрозивный артрит	Степень активности
CD4+	-	% ++ (r = 0,75)	-	-	-	-	-
CD8+	-	% ++ (r = 0,79)	-	-	-	-	-
		% T1 (r = 0,81)					
		% T2 (r = -0,73)					
CD4 активированные	-	% ++ (r = 0,85)	-	% T1 (r = -0,72)	N T2 ++ (r = 0,72)	-	-
CD4 памяти	-	-	% ++ (r = 0,73)	% T1 (r = -0,96)	-	N T1 ++ (r = -0,73)	-
			NT2++(r = 0,74)			N T1 full (r = -0,73)	
			N T2full r = 0,79)				
			N T2 + (r = 0,80)				
CD4 наивные	-	-	N T2full (r = 0,75)	-	-	% T1 (r = -0,86)	-
			N T2+ (r = 0,73)				
CD8 памяти	N T2full (r = 0,75)	% ++ (r = 0,90)	N T2++(r = 0,78)	% T1+ (r = -0,89)	-	-	N T2 + (r = 0,70)
	N T2 + (r = 0,76)	% T2= (r = -0,074)	N T2full(r = 0,90)				
		N T1 ++(r = 0,77)	N T2 +(r = 0,98)				
		N T1full(r = 0,77)					
CD8 наивные	-	% ++ (r = 0,83)	-	-	-	-	
		N T ++ (r = 0,77)					
		N T1full(r = 0,78)					

Проведенный корреляционный анализ взаимосвязей 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 $\alpha$  на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток, выявил следующие ассоциации: ревматоидный фактор положительно коррелирует с процентом дубль-позитивных TNFR1+TNFR2+клеток, количеством рецепторов 2 типа среди Т-хелперных клеток памяти (уровни корреляции от 0,73 до 0,80 при

$p < 0.05$ ), уровень С-реактивного белка положительно коррелировал с процентом клеток, несущих только рецептор 1 типа, среди субпопуляций памяти как хелперных, так и цитотоксических (уровни корреляции от 0,89 до 0,96 при  $p < 0.05$ ); наличие системных проявлений коррелирует с количеством рецепторов как 1, так и 2 типа на цитотоксических клетках памяти и моноцитах (уровни корреляции от 0,71 до 0,76 при  $p < 0.05$ ), 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 при  $p < 0.05$ ).

### **3.8. Построение параметрической логистической регрессионной модели диагностики РА на основании различий в показателях экспрессии рецепторов к TNF $\alpha$ .**

В ходе исследования для каждого человека оценивалось по 72 параметра, к которым относились процент дубльпозитивных и дубльнегативных клеток, клеток экспрессирующих только первый или только второй тип рецептора и среднее количество рецепторов первого и второго типа на клетках для 12 субпопуляций (моноциты, Т и В- лимфоциты, общий пул CD4+ и CD8+ клеток, наивные, активированные и клетки памяти для хелперных и цитотоксических популяций и регуляторные Т-клетки). Эти 72 параметра включались в однофакторный логистический регрессионный анализ для определения их ассоциированности с ревматоидным артритом. По результатам однофакторного анализа были выбраны 7 параметров, статистически значимо ассоциированных с РА, и они были включены в многофакторный анализ. (таблица 16)

Таблица 16 - Однофакторный и многофакторный логистический регрессионный анализ.

-Параметр	Однофакторный анализ		Многофакторный анализ	
	ОШ (2,5-97,5% ДИ)	p	ОШ (2,5-97,5%ДИ)	p
Процент TNFR1+ клеток среди CD4+CD45RA+ клеток	0,737(0,637 - 0,828)	<0,001	0,754 (0,59 – 0,9)	0,008
Процент TNFR1+ клеток средиCD8+ клеток	0,782 (0,678 - 0,874)	<0,001		
Количество TNFR1 на CD4+CD45R0+ клетках	1,001 (1,001 – 1,002)	0,001	1,002 (1 – 1,005)	0,005
Процент TNFR1+ клеток средиCD8+CD25+ клеток	0,882 (0,811 – 0,945)	0,001		
Количество TNFR2 на CD3+ клетках	0,999 (0,998 – 0,999)	0,003	0,997 (0,992 – 0,999)	0,008
Процент TNFR2+ клеток средиCD8+CD45RA+ клеток	1,034 (1,01 – 1,062)	0,009		
Количество TNFR2 на CD8+CD45R0+ клетках	1 (1 – 1,001)	0,012		

В результате постепенной редукции статистически незначимых параметров был построен набор моделей, из которого была выбрана оптимальная модель по критерию качества AIC (Sakamoto, Y., Ishiguro, M., Kitagawa G. 1986), и 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+) (таблица 17).

Таблица 17 - Показатели итоговой многофакторной модели

Показатель	OR (2,5-97,5% CI)	P value	R2
Ревматоидный артрит (vs показателей здоровых доноров)			
Процент TNFR1+TNFR2- клеток среди CD4+CD45RA+ клеток	1,326 (1,111-1,695)	0,008	0,68
Количество TNFR1 на CD4+CD45R0+ клетках	0,998 (0,995-1)	0,005	
Количество TNFR2 на CD3 клетках	1,003 (1,001-1,008)	0,008	



Полученная модель имела  $R^2=0.68$ (коэффициент детерминации).

Использование модели можно проследить на примере двух пациентов.

Пациент 8 обследован стандартным способом и с помощью проточной цитометрии у него определены проценты 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.

Далее эти данные подставляются в формулу. Значение Р у данного пациента составляет 0,995981, что является более 0,5, следовательно данного пациента следует отнести в группу здоровых.

Пациент 57 обследован стандартным способом и с помощью проточной цитометрии у него определены проценты 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.

Далее эти данные подставляются в формулу. Значение Р у данного пациента составляет 0,012175, что является менее 0,5, следовательно данного пациента следует отнести в группу больных (таблица 18).

Таблица 18. Показатели для расчета вероятности наличия РА

Пациент	Значение	Кол-во TNFR2 на CD3+	Кол-во TNFR1 на CD4+CD45R0+	Процент TNFR1+TNFR2- клеток среди CD4+CD45RA+ клеток
8	0,995981	1631	66033	31.4
57	0,012175	2517	1165	26.9

#### ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

TNF $\alpha$  и его рецепторы реализуют в организме больше количество эффектов, которые проявляются во всех системах и на разных уровнях. Как в норме, так и при патологии значение имеют изменения продукции не только самого цитокина и экспрессии его рецепторов, но и изменения сигналинга в иммунокомпетентные клетки, что приводит к реализации различных функциональных ответов клеток.

При патологии, изменения в системе растворимых рецепторов TNF $\alpha$  изучены лучше, этом изучение экспрессии мембраносвязанных рецепторов является перспективным, для понимания регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и гибели иммунокомпетентных клеток как в норме, так и при патологии.

Клеточные эффекты TNF $\alpha$  реализуются через взаимодействие цитокина с одним из его рецепторов. В исследованиях показано, что активация рецептора 1 типа приводит, в основном, к клеточной гибели и связана с развитием воспалительных процессов, активация рецептора 2 типа, связана с выживанием клеток и противовоспалительным эффектом, однако, существует немало работ, в которых был продемонстрирован противоположный эффект при активации рецепторов [Al-Lamki et al., 2009, Chen and Palmer, 2013, Maney et al, 2014, Pan. 2007].

Противоречивость имеющихся данных создает предпосылки для более углубленного изучения процессов регуляции цитокин/рецептор.

Для различных систем мембраносвязанных рецепторов показано существование «порогового» уровня экспрессии рецептора на поверхности клетки, который определяет тип и интенсивность ответа при связывании с цитокином [Conti 2008, Reynes2000]. Помимо этого, плотность экспрессии рецептора может играть роль «переключателя» с одного типа сигналинга на другой [Moraga 2009; Vooy 2014; Gudipaty 2001]. В настоящее время, в литературе не представлены данные по влиянию уровня экспрессии рецепторов TNF $\alpha$  на биологическую активность клеток, поэтому оценка уровня экспрессии мембраносвязанных рецепторов на

иммунокомпетентных клетках в норме является перспективной и поможет оценить потенциал различных субпопуляций клеток реализовывать различные эффекты при связывании с медиатором.

Иммунокомпетентные клетки представляются эффективной системой для анализа экспрессии мембраносвязанных рецепторов к TNF $\alpha$  и позволяют исследовать общие принципы зависимости ответа клеток от количества экспрессируемых молекул на поверхности. Предшествующие исследования продемонстрировали, что общий пул Т клеток, В клеток и моноцитов значимо отличаются по экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  как по проценту позитивных клеток, так и по количеству рецепторов. Основные популяции иммунных клеток экспрессируют на своей поверхности оба типа рецептора и активно принимают участие в патогенезе РА, поэтому могут являться отличными кандидатами для изучения экспрессии и ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа в норме и проведение сравнительного анализа этих параметров при РА.

Существует несколько методов определения уровня экспрессии мембраносвязанных структур на поверхности клеток, наиболее часто применяемым является использование калибровочных частиц с известным содержанием флуорохромов, [Vogt 2008, Rossmannetal 2007], также описан метод, основанный на кинетике реакции связывания антител с рецептором [Orlova 2011]. В настоящий момент, методы количественного определения поверхностных маркеров с помощью наборов калибровочных бус на проточном цитофлуориметре [Lopatnikova 2013] позволяют определять показатели экспрессии рецепторов вне зависимости от типа цитофлуориметра и его настроек, что существенно увеличивает достоверность полученных результатов [Kantor 2012]. Таким образом, изучая показатели экспрессии мембранных форм рецепторов, недостаточно знать процент позитивных клеток в субпопуляции, но также необходимо оценивать плотность экспрессии рецепторов на поверхности клеток в стандартизованных величинах, независимых от используемого оборудования либо его настроек (каковыми не являются наиболее часто используемые прямые

показатели интенсивности флюоресценции, выражаемые в условных единицах). Поэтому нами использовались калибровочные частицы и методика, разработанные фирмой BD, предлагаемые для точного определения числа молекул рецепторов на поверхности клеток.

Оценка ко-экспрессии позволяет оценить взаимное влияние рецепторов на функциональный ответ клетки. А сравнение ко-экспрессии и плотности экспрессии рецепторов позволяет оценить потенциальные возможности клетки отвечать на действие цитокина.

При изучении ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа на основных популяциях иммунных 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 так же 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 хелперных и цитотоксических лимфоцитов, а так же регуляторные Т-клетки по ко-экспрессии рецепторов к TNF $\alpha$ , а также рассчитать среднее количество рецепторов на клетках у здоровых доноров, что позволило оценить вариабельность отдельных субпопуляций клеток и их потенциальную возможность по разному отвечать на связывание лиганда.

В результате проведенного исследования было установлено, что отдельные субпопуляции хелперных регуляторных Т-клеток различались по сочетанной экспрессии рецепторов к TNF $\alpha$ .

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<sup>+</sup> 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.

При анализе ко-экспрессии рецепторов среди субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов, наблюдалась сходная картина по дубль-негативным клеткам, процент которых 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<sup>+</sup> лимфоцитов. Активация CD8<sup>+</sup> Т-клеток приводит к шеддингу и альтернативному сплайсингу TNFR2 с сопутствующим снижением экспрессии мембраносвязанного TNFR2 и увеличением уровня растворимого TNFR2, что приводит к снижению чувствительности активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток к действию TNF $\alpha$ . Кроме того, растворимый TNFR2 может связывать TNF $\alpha$  для регулирования действия цитокина, что является важным как в норме так и при развитии различных патологических процессов.

В исследованиях показано, что передача сигналов TNF $\alpha$  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 в большей степени реализовывать ответ на действие TNF $\alpha$ .

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- $\alpha$  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- $\alpha$  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.

В результате проведенного нами исследования было установлено, что у пациентов с РА картина распределения рецепторов к TNF на иммунокомпетентных клетках отличается от здоровых доноров.

Все данные обобщены и представлены в таблице 19.

Таблица 19. Сравнение ко-экспрессия и среднего количества рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  на клетках основных субпопуляций МНК у пациентов с ревматоидным артритом (n=64) по сравнению со здоровыми донорами (n=43).

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

Стрелками (↑ и ↓) показаны более высокие и низкие значения процентного содержания и количества рецепторов на клетках больных с ревматоидным артритом по сравнению со здоровыми донорами.

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. 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 значительно 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 как между больными РА и здоровыми донорами подтверждают этот факт, поскольку связаны непосредственно с влиянием на дифференцировку, пролиферацию и функциональный ответ этих клеток.

При сравнении показателей ко-экспрессии пациентов с РА и здоровых доноров было выявлено различное перераспределение по типам ко-экспрессии для разных субпопуляций. Для субпопуляций Т-хелперных клеток памяти и регуляторных Т-клеток были характерны перераспределения 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 ФНО 2 типа. Мы наблюдаем, что при РА происходит перераспределение данных рецепторов в субпопуляции:

увеличение доли TNFR2+ клеток при снижении доли дубль-позитивных клеток; при этом среднее количество рецепторов 2 типа на клетках почти в 2 раза выше, чем у здоровых доноров.

Мы продемонстрировали, что 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 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 хелперных 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 главным образом 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 перераспределение рецепторов и увеличение их количества является компенсаторным механизмом.

Для наивных цитотоксических Т клеток продемонстрирован интересный вариант перераспределения рецепторов по сравнению в паттерном здоровых доноров: процент клеток с рецепторами 1 типа резко увеличен, а процент клеток с рецепторами 2 типа – напротив, резко 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.

Но для более детальной оценки ко-экспрессии рецепторов пациенты с ревматоидным артритом в стадии обострения были разделены на группы по степени активности заболевания, а так же проведено исследование влияния патогенетической терапии ритуксимабом на показатели экспрессии и ко-экспрессии.

Полученные данные обобщены и представлены в таблице 20.

Таблица 20. Сравнение ко-экспрессии рецепторов 1 и 2 типа к TNF $\alpha$  на иммунокомпетентных клетках у пациентов РА прошедших курс терапии (n=15) по сравнению с пациентами до терапии РА (n=64)

	% Дубль- негативные	% TNFR1	% TNFR2
<b>В-лимфоциты</b>	p>0,05 38,8/65,7%	p>0,05 13,0/18,5%	p=0,0357 ↓ 28,8/10,5%
<b>Моноциты</b>	p=0,0377 ↑ 7,4/43,4%	p>0,05 10/22,4%	p=0,024 ↓
<b>Регуляторные Т-клетки</b>	p=0,0129 ↑ 8,1/33,8%	p>0,05 2,1/10,9%	p>0,05 64/39: %
<b>Хелперные клетки памяти</b>	p=0,0318 ↑ 37,9/75,2%	p=0,0117 ↑ 0,5/14%	p= 0,0055 ↑ 2,1/22,2%
<b>Активированные хелперные клетки</b>	p= 0,0428 ↑ 10,7/45,7%	p=0,0292 ↑ 3,0/13,6%	p=0,0097 ↓ 57,6/33,1%
<b>Цитотоксические клетки памяти</b>	p=0,0001 ↑ 5,3/56,8%	p=0,0012 ↑ 0,4/11,7%	p=0,0056 ↓ 71,3/22,6%

Стрелками показаны изменения (↑ – увеличение, ↓ – снижение) по сравнению с показателями пациентов до проводимой терапии.

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

TNFR2 снижался и увеличивался процент дубль-отрицательных клеток у пациентов после проведения терапии по сравнению с пациентами при обострении РА.

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. А группа пациентов после прохождения курса терапии показывала снижение экспрессии рецепторов 2 типа по сравнению с пациентами с обострением.

При оценке показателей ко-экспрессии у больных РА с обострением, имеющих различную степень активности заболевания, пациентов после прохождения курса терапии и здоровых доноров были выявлены отличия для всех основных популяций, при этом изменения носили разных характер для каждой популяции, что говорит о разных возможностях данных клеток реагировать на действие цитокина.

В целом, по всем популяциям отмечался высокий процент дубль-негативных клеток для пациентов после проведения терапии ритуксимабом по сравнению со здоровыми донорами, что может говорить о влиянии проводимой терапии на экспрессию рецепторов. Однако, основные популяции не достаточно полно отражают картины перераспределения рецепторов у больных РА по сравнению со здоровыми донорами, поэтому нами были исследованы показатели экспрессии и ко-экспрессии рецепторов на субпопуляциях хелперных и цитотоксических клеток.

При оценке показателей ко-экспрессии у больных РА с обострением, имеющих различную степень активности заболевания, пациентов после проведенной терапии ритуксимабом и здоровых доноров для субпопуляций цитотоксических клеток было выявлено, что субпопуляция цитотоксических клеток памяти характеризовалась наиболее выраженным перераспределением 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.

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, соответственно. Для рецептора 1 типа значимые различия отмечались среди общего пула CD8+ клеток у здоровых по сравнению с больными РА.

При сравнении показателей ко-экспрессии между пациентами с обострением РА и после проведения 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.

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 $\alpha$  на субпопуляциях иммунокомпетентных клеток. Выявлен ряд корреляционных взаимосвязей: ревматоидный фактор положительно коррелирует 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 при  $p < 0,05$ ). Полученные данные показывают связь клинических проявлений РА с ко-экспрессией и количеством рецепторов на клетках и могут иметь диагностическое значение для оценки выраженности воспалительного процесса при РА.

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 используется 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  $R^2=0.68$  (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 $\alpha$  обладает взаимоусиливающим эффектом.

Так же было установлено, что у здоровых доноров для всех популяций Т клеток характерен высокий процент клеток, экспрессирующих рецептор 2 типа, при этом наибольший показатель наблюдался среди клеток памяти (как хелперных, так и цитотоксических).

Для пациентов с ревматоидным артритом характерно перераспределение соотношения рецепторов по большинству субпопуляций. При этом наблюдается тенденция к снижению количества рецепторов 2 типа и увеличению рецептора 1 типа по большинству субпопуляций. Что 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 различающиеся у пациентов с РА

коррелирует с высокой активностью заболевания по сравнению со здоровыми донорами.

Проведение однофакторного и многофакторный регрессионного анализа позволило построить математическую модель диагностики РА на основе объективных лабораторных данных, с чувствительностью 93% и специфичностью 90%.

## ВЫВОДЫ

1. У здоровых доноров среди субпопуляций Т-лимфоцитов наибольшее процентное содержание клеток экспрессирующих рецептор 2 типа для  $\text{TNF}\alpha$  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  $\text{TNF}\alpha$  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  $\text{TNF}\alpha$  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  $\text{TNF}\alpha$  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  $\text{TNF}\alpha$ , 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  $\text{TNF}\alpha$  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 СОКРАЩЕНИЙ**

TNF $\alpha$  - Фактор некроза опухоли- $\alpha$

mTNF $\alpha$  - мембраносвязанная форма TNF $\alpha$

sTNF $\alpha$ - растворимая форма TNF $\alpha$

кДа – килодальтон

РА - ревматоидный артрит

TNFR1 (CD120a, p55) - рецептор TNF $\alpha$  первого типа

TNFR2 (CD120b, p75) - рецептор TNF $\alpha$  второго типа

sTNFR1 – растворимый рецептор TNF $\alpha$  первого типа

sTNFR2 - растворимый рецептор TNF $\alpha$  второго типа

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

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

IFN-бета интерферон бета

CD - кластер дифференцировки

MHC- главный комплекс гистосовместимости

мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота

TTP тристетрапролин

TACE: ADAM17 - TNF $\alpha$ -конвертирующий фермент

ЛПС(LPS) липополисахарид

IL- интерлейкин,

IFN- интерферон

GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

TGF- $\beta$  - трансформирующий фактор роста бета

TRADD - TNFR1-ассоциированный белок домена смерти

TRAF1 - TNFR-ассоциированный фактор 1

TRAF2 - TNFR-ассоциированный фактор 2

NF-κB- ядерный фактор, усилитель легкой каппа-цепи активированных В-клеток.

RIPK1 - рецептор-взаимодействующая серин / треонин-протеинкиназа 1

cIAP1 (BIRC2) - клеточным ингибитором апоптозного белка 1

cIAP2 (BIRC3) - клеточным ингибитором апоптозного белка 2

NK-клетки - естественные киллеры

MAPK - фосфатазы митоген-активируемых протеинкиназ

Fas - FS-7-ассоциированный поверхностный антиген

FADD - Fas-ассоциированный белок с доменом смерти

IKK - ингибитор ядерного фактора κB

NEMO - регуляторная субъединица NF-κB;

FLICE (с-FLIP) (FADD-подобный IL-1β-превращающий фермент

ASK1 - киназа, регулирующая сигнал к апоптозу, тип 1 активированной эндотелиальной / эпителиальной тирозинкиназой (Etk)

PI3K - фосфоинозитид-3-киназы

АКТ - семейство протеинкиназ В

МНК ПК – моноклеарные клетки периферической крови

IFNγ - гамма-интерферон

STAT - сигнальный белок и активатор транскрипции

iNOS индуцибельная синтаза оксида азота

NO - оксид азота

TLR - толл-подобные рецепторы

HLA-DR - антиген МНС класса II

TCR - Т-клеточный рецептор

Foxp3 - белок Forkhead box P3, является основным фактором транскрипции

Bcl-2, Bcl-xL антиапоптотические молекулы,

AICD индуцированная активация гибели клеток

Treg регуляторные Т -клетки.

CpG ODN - CpG олигонуклеотиды

Th17 - Т-хелперы 17

CIA - модель коллаген-индуцированного артрита

ACR/EULAR - Европейская лига против ревматизма / Американский колледж ревматологии

РФ - ревматоидный фактор

АЦЦП - Антитела к циклическому цитруллинированному пептиду

DAS28 - индекс активности заболевания

HAQ - анкета для оценки здоровья

PBS - натрий-фосфатный буфер

FITC - флуоресцеина изотиоцианат

РЕ - фикоэритрин

Per-CP - перидинин-Хлорофилл Протеин

APC - алофикоцианин

РЕ-Су7 - фикоэритрин с цианином 7

APC-Су7 - аллофикоцианин- с цианином 7

ФЭУ - фотоэлектронный умножитель

FSC – прямое светорассеяние

SSC- боковое светорассеяние

MFI – средняя интенсивность флюоресценции клеток

CD45RO/ CD45RA – изоформы общего лейкоцитарного антигена

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Альшевская, А. А. Мембраносвязанные и растворимые рецепторы к фактору некроза опухоли- $\alpha$  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.
2. Альшевская, А. А. Экспрессия мембраносвязанных рецепторов к TNF $\alpha$  на моноцитах при atopическом 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.
3. Воронина Е.В. Роль фактора некроза опухолей-альфа в иммунопатогенезе заболеваний различной этиологии и его значимость в развитии антицитокиновой терапии моноклональными антителами / Воронина Е.В., Лобанова Н.В., Яхин И.Р., Романова Н.А., Серегин Ю.А.// Медицинская иммунология. – 2018 – Т.20 - №6 – С.797-806
4. Глякин, Д. С. Провоспалительные цитокины у больных раком эндометрия / Д. С. Глякин, А. В. Самойлова, А. Г. Гунин // Проблемы репродукции. – 2012. – Т. 18, № 1. – С. 35-37.
5. Дрейпер, Н. Прикладной регрессионный анализ. Т.1-2. Изд. 2, перераб. и доп. / Н. Дрейпер, Г. Смит. М.: Финансы и статистика, 1987. 720 с.
6. Киреев Ф.Д., Альшевская А.А., Лаушкина Ж.А., Сенников С.В. Рецепторы к фактору некроза опухоли у больных активным туберкулёзом лёгких. // Российский иммунологический журнал. – 2019 – Т.22 -№2-1 – С.302-304.
7. Колесникова Е.В. Оценка показателей цитокинового статуса у пациенток с различными вариантами течения папилломавирусной инфекции. / Е.В Колесникова, Г.А. Пенжоян, А.В Жаров, С.В Сторожук. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2018 – Т.25 - №4 – С.43-50

8. Коненков В.И. Комплексный анализ полиморфизма в промоторных участках генов цитокинов IL-1B T-31C, IL-6 G-174C, TNFA G-238A, TNFA G-308A, TNFA C-863A, IL-4 C-590T И IL-10 C-592α в прогнозе эффекта от лечения ревматоидного артрита. / Коненков В.И., Прокофьев В.Ф., Шевченко А.В., Голованова О.В., Зонова Е.В., Королев М.А., Леонова Ю.Б // Медицинская иммунология. – 2010 – Т.12 - №4-5 – С.361-374,
9. Кричевская, О. А. Фактор некроза опухоли α и его растворимые рецепторы при ревматических заболеваниях: клиническое и патогенетическое значение / О. А. Кричевская, Н. Г. Ключкина, Е. Н. Александрова [и др.] // Науч.-практ. ревматология. – 2005. – № 2. – С. 43-46.
10. Недоспасов С.А. На свете есть только один фактор некроза опухолей. / Недоспасов С.А // Медицинская иммунология. – 2020 – Т.22 - №6 – С.1221-1224
11. Новиков, А. А. Роль цитокинов в патогенезе ревматоидного артрита / А. А. Новиков, Е. Н. Александрова, М. Н. Диатроптова // Науч.-практ.ревматология. – 2010. – № 2. – С. 71-82.
12. Оранский, С. П. Цитокиновый баланс и некоторые сывороточные биомаркеры метаболизма костно-суставной ткани у больных ревматоидным артритом на фоне курсовой терапии инфликсимабом / С. П. Оранский, Л. Н. Елисеева, Р. А. Ханферян [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2011. – Т. 10, № 1. – С. 65-69.
13. Останин А. А. Цитокин-опосредованные механизмы развития системной иммуносупрессии у больных с гнойно-хирургической патологией / А. А. Останин, О. Ю. Леплина, М. А. Тихонова и др. // Цитокины и воспаление. – 2002. – № 1. – С. 38-45.
14. Пачкунова М.В Изучение некоторых цитокинов крови у больных ревматоидным артритом: клинико- иммунологические взаимосвязи / М.В.

- Пачкунова, Т.Г. Данилова, Е.В. Феофанова. // Медицинская иммунология. – 2014 – Т.16 - №3 – С.273-280
15. Прилуцкая И.А. Уровни фактора некроза опухолей  $\alpha$  у больных ишемическим инсультом / И.А. Прилуцкая, Ю.Я. Крюк // Медицинская иммунология - 2019 – Т.21 - №4 – С.755-764.
  16. Прохоренко, Т. С. Система фактора некроза опухолей  $\alpha$  в патогенезе аутоиммунного сахарного диабета/ Т. С. Прохоренко, Т. В. Саприна, Ф. Э. Лазаренко и др. // Бюл. сиб. медицины. – 2011. – № 1. – С. 64-69.
  17. Ройт А. Иммунология. / Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. – Мир, 2000. – 592 с.
  18. Сенников, С. В. Роль альтернативного сплайсинга генов цитокинов в формировании полиморфной структуры цитокиновой сети / С. В. Сенников, А. Н. Силков, В. А. Козлов // Мед. иммунология. – 2001. – Т. 3, № 3. – С. 389-400.
  19. Середавкина Н.В. Маркеры воспаления у больных с антифосфолипидным синдромом с кардиоваскулярной патологией. / Н.В. Середавкина, Т.М. Решетняк, Е.Н. Александрова и др. // Научно-практическая ревматология. – 2010 – Т.48 - №5 – С.37-43.
  20. Симбирцев, А. С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма / А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 9-16.
  21. Скворцова, Н. В. Клиническое значение некоторых цитокинов и их прогностическая роль у пациентов с неходжкинскими злокачественными лимфомами / Н. В. Скворцова, Т. И. Поспелова, И. Б. Ковынев и др. // Бюл. сиб. медицины. – 2008. – Прил. 3. – С. 63-70\
  22. Совалкин В.И. Роль полиморфизма генов фактора некроза опухолей  $\alpha$  g-308a, интерлейкина-1 $\beta$  с-511t и интерлейкина-10 g-1082a в развитии затяжного течения внебольничной пневмонии / В.И. Совалкин, Е.Г. Поморгайло, О.Н. Сабитова // Бюллетень сибирской медицины. – 2013 – Т.12 - №6 – С.54-6

23. Соснина, А. В. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований: информ.-метод. пособие / А. В. Соснина, Н. В. Великая, А. И. Аутеншлюс. – Новосибирск: Вектор-Бест, 2013. – 80 с.
24. Тыринова Т.В., Мишинов С.В., Леплина О.Ю., Альшевская А.А., Курочкина Ю.Д., Олейник Е.А., Калиновский А.В., Лопатникова Ю.А., Чернов С.В., Ступак В.В., Сенников С.В., Останин А.А., Черных Е.Р. Роль TNFA/TNF-R1-сигнального пути в реализации цитотоксического эффекта дендритных клеток против глиобластомных линий. / Т.В. Тыринова, С.В. Мишинов, О.Ю. Леплина [и др.]. // Медицинская иммунология. – 2018 – Т.20 - №3 – С.353-364.
25. Хаитов Р.М. Иммунология / Хаитов Р.М., Игнатъева Г.Л., Сидорович И.Г. – Медицина, 2000. – 432 с.
26. Ярилин, Д. А. Роль фактора некроза опухолей в регуляции воспалительного ответа моноцитов и макрофагов / Д. А. Ярилин // Иммунология. – 2014. – Т. 35, № 4. – С. 195-201.
27. Abu-Amer Y, Erdmann J, Alexopoulou L, Kollias G, Ross FP, Teitelbaum SL. Tumor necrosis factor receptors types 1 and 2 differentially regulate osteoclastogenesis. // J. Biol. Chem. – 2000 - Vol. 275 – P.27 - 33
28. Ackermann C, Kavanaugh A. Tumor necrosis factor as a therapeutic target of rheumatologic disease. // Expert Opin Ther Targets. – 2007 – Vol.11 – No.11 – P.1369-84.
29. Aderka D, Engelmann H, Maor Y, Brakebusch C, Wallach D. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors.// J Exp Med. - 1992 – Vol.175 – No.2 – P.323-9
30. Aggarwal B. B. et al. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. // J. Biol. Chem. – 1985. – Vol.260 – P.2345–2354.
31. Aggarwal B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. // Nature Rev. Immunol. – 2003. – Vol.3 – P.745–756.



32. Aggarwal B. B., Gupta, S. C., Kim, J. H. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. // *Blood* – 2012. – Vol.119 – P.651–665.
33. Aggarwal S, Gollapudi S, Gupta S. Increased TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in lymphocytes from aged humans: changes in TNF- $\alpha$  receptor expression and activation of caspases. // *Journal of immunology*. – 1999 – Vol.162 – No.4 – P.2154–61.
34. Al-Lamki RS, Sadler TJ, Wang J, et al. Tumor necrosis factor receptor expression and signaling in renal cell carcinoma. // *Am J Pathol*. – 2010 – Vol.177 – No.2 – P.943-954.
35. Al-Lamki RS, Wang J, Skepper JN, Thiru S, Pober JS, Bradley JR. Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants. // *Lab Invest*. 2001 – Vol.81 – No.11 – P.1503-15.
36. Al-Lamki RS, Wang J, Yang J, et al. Tumor necrosis factor receptor 2-signaling in CD133-expressing cells in renal clear cell carcinoma. // *Oncotarget*. – 2016 – Vol.7 – No.17 – P.24111-24124.
37. Alsalameh S, Amin RJ, Kunisch E et al. Preferential induction of prodestructive matrix metalloproteinase-1 and proinflammatory interleukin 6 and prostaglandin E2 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via tumor necrosis factor receptor-55. // *J Rheumatol*. – 2003- Vol.30 - No8- P.1680-90.
38. Alshevskaya, A. A. Expression of TNF $\alpha$  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.
39. Amin P, Florez M, Najafov A, et al. Regulation of a distinct activated RIPK1 intermediate bridging complex I and complex II in TNF $\alpha$ -mediated apoptosis. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2018 – Vol.115 – No.26 – E5944–E5953.
40. Anderton H, Rickard JA, Varigos GA, et al. Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) Limit RIPK1-Mediated Skin Inflammation. // *J Invest Dermatol*. – 2017 – Vol.137 – No.11 – P.2371–2379.

41. Andrews JS, Berger AE, Ware CF. Characterization of the receptor for tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin (LT) on human T lymphocytes. TNF and LT differ in their receptor binding properties and the induction of MHC class I proteins on a human CD4<sup>+</sup> T cell hybridoma. // *Journal of immunology*. – 1990 – Vol.144 – No.7 – P.2582–91
42. Annibaldi A, Wicky John S, Vanden Berghe T, et al. Ubiquitin-Mediated Regulation of RIPK1 Kinase Activity Independent of IKK and MK2. // *Mol Cell*. – 2018 – Vol.69 – No.4 – P.566–580.
43. Atreya R, Zimmer M, Bartsch B, et al. Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal CD14(+) macrophages. // *Gastroenterology*. – 2011 – Vol.141 – No.6 – P.2026–38.
44. Bae S, Kim H, Lee N, et al.  $\alpha$ -Enolase expressed on the surfaces of monocytes and macrophages induces robust synovial inflammation in rheumatoid arthritis. // *J Immunol*. – 2012 – Vol.189 – No.1 – P.365–72.
45. Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. // *Annu Rev Immunol*. – 1996 – Vol.14 – P.649-83
46. Ban L, Zhang J, Wang L, et al. Selective death of autoreactive T cells in human diabetes by TNF or TNF receptor 2 agonism. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008 – Vol.105 – No.36 – P.13644–9.
47. Banerjee D, Liou HC, Sen R. c-Rel-dependent priming of naive T cells by inflammatory cytokines. // *Immunity*. – 2005 – Vol.23 – No.4 – P.445–58
48. Banner DW, D'Arcy A, Janes W et al. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. // *Cell*. – 1997 – Vol.73 – No.3 – P.431-45
49. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. // *Trends Cell Biol*. – 2001 – Vol.11 – No9 – P.372-7

50. Baumgart, Sandborn, Crohn's disease. // The Lancet - 2012 - Vol.380 – Issue - 9853 – P.1590-1595
51. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. // N Engl J Med. - 1996 – Vol.27 – No.26 – P.1717-25
52. Beldi G, Bahiraii S, Lezin C, et al. TNFR2 Is a Crucial Hub Controlling Mesenchymal Stem Cell Biological and Functional Properties. // Front Cell Dev Biol. - 2020 – Vol. – 8 – P.596831
53. Bemelmans MH, van Tits LJ, Buurman WA. Tumor necrosis factor: function, release and clearance. // Crit Rev Immunol. – 1996 – Vol.16 – No.1 – P.1-11
54. Bertrand, M. J. et al. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. // Mol. Cell – 2008 – Vol.30 – P.689–700.
55. Beutler B, Bazzoni F. TNF, apoptosis and autoimmunity: a common thread? // Blood Cells Mol Dis. - 1998 – Vol.24 –No.2 – P.216-30.
56. Beyaert R, Fiers W. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. // FEBS Lett. - 1994 – Vol.340 – No.1-2 – P.9-16.
57. Billmeier U, Dieterich W, Neurath MF, Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases. // World J Gastroenterol. – 2016 – Vol.122 –No.42 - 9300-9313.
58. Biton J, et al. Interplay between TNF and regulatory T cells in a TNF-driven murine model of arthritis. // J. Immunol. – 2011 – Vol.186 – P.3899–3910.
59. Black R. A. et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. // Nature – 1997. – Vol.385 – P.729–733.
60. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. // Nature. - 1997 - Vol.20 – No.385 – P.729-33

61. Blüml S., Binder N.B., Niederreiter B., et al. Antiinflammatory effects of tumor necrosis factor on hematopoietic cells in a murine model of erosive arthritis. // *Arthritis Rheum.* - 2010 – Vol.62 – P.1608-1619.
62. Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. // *Trends Biochem Sci.* - 2002 - Vol.27 – No.1 – P.19-26
63. Boisson B, Laplantine E, Dobbs K, et al. Human HOIP and LUBAC deficiency underlies autoinflammation, immunodeficiency, amylopectinosis, and lymphangiectasia. // *J Exp Med.* – 2015 – Vol.212 –No.6 – P.939–51.
64. Boisson B, Laplantine E, Prando C, et al. Immunodeficiency, autoinflammation and amylopectinosis in humans with inherited HOIL-1 and LUBAC deficiency. // *Nat Immunol.* – 2012 – Vol.13 – No.12 – P.1178–86.
65. Boks MA, Kager-Groenland JR, Mousset CM, et al. Inhibition of TNF receptor signaling by anti-TNF $\alpha$  biologicals primes naïve CD4<sup>+</sup>T cells towards IL-10<sup>+</sup> T cells with a regulatory phenotype and function. // *Clin Immunol.* – 2014 – Vol.151 –No.2 – P.136–45
66. Booy S, van Eijck CH, Dogan F et al. Influence of type-I Interferon receptor expression level on the response to type-I Interferons in human pancreatic cancer cells. // *J Cell Mol Med.* - 2014 – Vol.18 – Vol.3 – P.492-502.
67. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. // *J Pathol.* -2008 – Vol.214 – No.2 – P.149-60
68. Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. // *Nature reviews Immunology.* – 2015 – Vol.15 – No.6 – P.362–74.
69. Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. // *Nat Rev Immunol.* – 2015 – Vol.15 –No.6 – P.362–74.
70. Bruggeman L.A, Drawz P.E., Kahoud N., et al. TNFR2 interposes the proliferative and NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory response by podocytes to TNF- $\alpha$ . // *Lab Invest.* - 2011 – Vol.91 - 413-25.

71. Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2010 – Vol.10 – P.849–859
72. Bulua AC, Mogul DB, Aksentijevich I, et al. Efficacy of etanercept in the tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: a prospective, open-label, dose-escalation study. // *Arthritis Rheum.* – 2012 – Vol.64 – No.3 – P.908–13.
73. Cairns CB, Panacek EA, Harken A et al. Bench to bedside: tumor necrosis factor-alpha: from inflammation to resuscitation. // *Acad Emerg Med.* – 2000 – Vol.7 – No.8 – P.930-41
74. Calzascia T, Pellegrini M, Hall H, et al. TNF-alpha is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice. // *The Journal of clinical investigation.* - 2007 – Vol.117 – No.12 – P.3833–45.
75. Camussi G, Albano E, Tetta C, Bussolino F. The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. // *Eur J Biochem.* – 1991- Vol.15 – No.202(1) – P.3-14.
76. Carswell E.A, Old L.J, Kassel R.L, et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1975. – Vol.72 – No.9 – P.3666–70.
77. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, et al. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. // *Science.* - 2000 Vol.30 – No.288(5475) – P.2351-4.
78. Chee J, et al. TNF receptor 1 deficiency increases regulatory T cell function in nonobese diabetic mice. // *J. Immunol.* – 2011 – Vol.187 – P.1702–1712
79. Chen KW, Lawlor KE, von Pein JB, et al. Cutting Edge: Blockade of Inhibitor of Apoptosis Proteins Sensitizes Neutrophils to TNF- but Not Lipopolysaccharide-Mediated Cell Death and IL-1 $\beta$  Secretion. // *J Immunol.* – 2018 – Vol.200- No.10 – P.3341–3346.
80. Chen N. J. et al. Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors. // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2008 – Vol.105 – P. 12429–12434.

- 81.Chen W, et al. A protocol to develop T helper and Treg cells in vivo. // Cell. Mol. Immunol. – 2017 – Vol.14 – P.1013–1016.
- 82.Chen X, Baumel M, Mannel DN, et al. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. // Journal of immunology. – 2007 – Vol.179- No.1 – P.154–61.
- 83.Chen X, Baumel M, Mannel DN, et al. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4 + CD25 + T regulatory cells. // J. Immunol. – 2007 - Vol.179 – P.154–161.
- 84.Chen X, et al. Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4 + FOXP3 + regulatory T cells in human peripheral blood. // Eur. J. Immunol. – 2010 – Vol.40 – P.1099–1106.
- 85.Chen X, et al. Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4 + CD25 + FoxP3 + T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. // J. Immunol. – 2008 – Vol.180 – P.6467–6471.
- 86.Chen X, Hamano R, Subleski JJ, et al. Expression of costimulatory TNFR2 induces resistance of CD4+FoxP3- conventional T cells to suppression by CD4+FoxP3+ regulatory T cells. // Journal of immunology. – 2010 – Vol.185 – No.1 – P.174–82.
- 87.Chen X, Subleski JJ, Hamano R, et al. Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood. // European journal of immunology. - 2010 – Vol.40 – No.4 – P.1099–106.
- 88.Chen X, Wu X, Zhou Q, et al. TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment. // Journal of immunology. – 2013 – Vol.190 – No.3 – P.1076–84.
- 89.Cho Y. S. et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. // Cell – 2009 – Vol.137 – P.1112–1123.
- 90.Coates LC, Marzo-Ortega H, Bennett AN, et al. Anti-TNF Therapy in Ankylosing Spondylitis: Insights for the Clinician. // Ther Adv Musculoskelet Dis. – 2010 – Vol.2 – No.1 – P.37–43.

- 91.Conti L, Cardone M, Varano B, et al. Role of the cytokine environment and cytokine receptor expression on the generation of functionally distinct dendritic cells from human monocytes. // *Eur J Immunol.* – 2008 – Vol.38 – No.3 P.750-62
- 92.Coornaert B, Baens M, Heyninck K, et al. T cell antigen receptor stimulation induces MALT1 paracaspase-mediated cleavage of the NF-kappaB inhibitor A20. // *Nat Immunol.* – 2008 – Vol.9 - No3 – P.263–71.
- 93.Damgaard RB, Walker JA, Marco-Casanova P, et al. The Deubiquitinase OTULIN Is an Essential Negative Regulator of Inflammation and Autoimmunity. // *Cell.* – 2016 – Vol. 166 – No.5 – P.1215–1230.
- 94.Davies LC, Rice CM, Palmieri EM, et al. Peritoneal tissue-resident macrophages are metabolically poised to engage microbes using tissue-niche fuels. // *Nat Commun.* – 2017 – Vol.8 – No.1 – P.2074.
- 95.de Oliveira Pinto LM, Garcia S, Lecoecur H, et al. Increased sensitivity of T lymphocytes to tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1)- and TNFR2-mediated apoptosis in HIV infection: relation to expression of Bcl-2 and active caspase-8 and caspase-3. // *Blood.* - 2002 – Vol.99 – No.5 – P.1666-75.
- 96.De Rosa V, Galgani M, Porcellini A, et al. Glycolysis controls the induction of human regulatory T cells by modulating the expression of FOXP3 exon 2 splicing variants. // *Nat Immunol.* – 2015 - Vol.16 – No.11 – P.1174–84.
- 97.Deleault KM, Skinner SJ, Brooks SA. Tristetraprolin regulates TNF TNF-alpha mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways. // *Mol Immunol.* - 2008 - Vol.45 – Vol.1 – P.13-24.
- 98.Deroose JP, Eggermont AM, van Geel AN, et al. 20 years' experience of TNF-based isolated limb perfusion for in-transit melanoma metastases: TNF dose matters. // *Ann Surg Oncol.* – 2012 – Vol.19 - No2 – P.627–35.
- 99.Devin A. et al. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. // *Immunity* – 2000 – Vol.12 – P.419–429.

100. Di Giovine FS, Nuki G, Duff GW. Tumour necrosis factor in synovial exudates. // *Ann Rheum Dis.* – 1988 – Vol.47 – Vol.9 – P.768-772.
101. Dondelinger Y, Jouan-Lanhoutet S, Divert T, et al. NF- $\kappa$ B-Independent Role of IKK $\alpha$ /IKK $\beta$  in Preventing RIPK1 Kinase-Dependent Apoptotic and Necroptotic Cell Death during TNF Signaling. // *Mol Cell.* – 2015 – Vol.60 – No.1 – P.63–76.
102. Dopp JM, Sarafian TA, Spinella FM, et al. Expression of the p75 TNF receptor is linked to TNF-induced NF $\kappa$ B translocation and oxyradical neutralization in glial cells. // *Neurochem Res.* - 2002 – Vol. 27 – No.11 – P.1535-42.
103. Douanne T, Gavard J, Bidère N: The paracaspase MALT1 cleaves the LUBAC subunit HOIL1 during antigen receptor signaling. // *J Cell Sci.* – 2016 – Vol.129 – No.9 – P.1775–80.
104. Draber P, Kupka S, Reichert M, et al. LUBAC-Recruited CYLD and A20 Regulate Gene Activation and Cell Death by Exerting Opposing Effects on Linear Ubiquitin in Signaling Complexes. // *Cell Rep.* – 2015 – Vol.13 – No.10 – P.2258–72.
105. Ea CK, Deng L, Xia ZP, et al. Activation of IKK by TNF $\alpha$  requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. // *Mol Cell.* – 2006 – Vol.22 – No.2 – P.245–57.
106. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF $\alpha$  therapy. // *The Journal of experimental medicine.* – 2004 – Vol. 200 – No.3 – P.277–85.
107. Eissner G, Kolch W, Scheurich P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2004 – Vol.15 – No.5 – P.353–66.
108. Erickson SL, de Sauvage FJ, Kikly K, et al. Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. // *Nature.* – 1994 – Vol.8 – 372 – P.560-3.



109. Ermolaeva M. A. et al. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. // *Nature Immunol.* – 2008. – Vol.9 – P.1037–1046.
110. Fahlman C, Jacobsen FW, Veiby OP, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) potently enhances in vitro macrophage production from primitive murine hematopoietic progenitor cells in combination with stem cell factor and interleukin-7: novel stimulatory role of p55 TNF receptors. // *Blood.* – 1994 - Vol.84 – Vol.5 – P.1528–1533
111. Farrugia M, Baron B. The role of TNF- $\alpha$  in rheumatoid arthritis: a focus on regulatory T cells. // *J Clin Transl Res.* – 2016 – Vol.2 - No3 – P.84-90
112. Faustman D, Davis M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. // *Nat Rev Drug Discov.* – 2010 – Vol.9 – No.6 – P.482–93.
113. Feng T, Zheng L, Liu F, et al. Growth factor progranulin promotes tumorigenesis of cervical cancer via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. // *Oncotarget* – 2016- Vol.7 – P.58381–95
114. Fiers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. // *FEBS Lett.* - 1991 – Vol.285 – No.2 – P.199-212
115. Fischer JC, Otten V, Kober M, et al. A20 Restrains Thymic Regulatory T Cell Development. // *J Immunol.* – 2017 – Vol.199 – No.7 – P.2356–2365.
116. Fischer, R.E. Kontermann, O. Maier. Targetting sTNF/TNFR1 Signaling as a New Therapeutic Strategy. // *Antibodies.* – 2015 – Vol.4 – P.48-70.
117. Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C, et al. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2008 – Vol.105 – No.49 – P.19396–401.
118. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Pillars article: Foxp3 programs the development and function of CD4 + CD25 + regulatory T cells. // *J. Immunol.* – 2017 – Vol.198 –P.986–992]

119. Fotin-Mleczek M. et al. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. // J. Cell Sci. – 2002. – Vol.115 – P.2757–2770.
120. Francisco NM, Hsu NJ, Keeton R, et al. TNF-dependent regulation and activation of innate immune cells are essential for host protection against cerebral tuberculosis. // J Neuroinflammation. – 2015 – Vol.12 – P.125-128.
121. Fuchs P, Strehl S, Dworzak M, Himmeler A, Ambros PF. Structure of the human TNF receptor 1 (p60) gene (TNFR1) and localization to chromosome 12p13 [corrected]. // Genomics. – 1992 – Vol.13 - No1 – P.219-24.
122. Galluzzi L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. // Cell Death Differ. - 2012 – Vol.19 – P.107–120.
123. Garcia-Carbonell R, Wong J, Kim JY, et al. Elevated A20 promotes TNF-induced and RIPK1-dependent intestinal epithelial cell death. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2018 – Vol.115 – No.39 - E9192–E9200.
124. Gattorno M, Obici L, Cattalini M, et al. Canakinumab treatment for patients with active recurrent or chronic TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS): an open-label, phase II study. // Ann Rheum Dis. – 2016 – Vol.76- No.1 – P.173–8.
125. Generalized Linear Models By P. McCullagh, John A. Nelder Copyright Year 1989
126. Geng J, Ito Y, Shi L, et al. Regulation of RIPK1 activation by TAK1-mediated phosphorylation dictates apoptosis and necroptosis. // Nat Commun. – 2017 – Vol.8- No.1 – P.359 -363.
127. Ghosh S Anti-TNF therapy in Crohn's disease. // Novartis Found Symp. – 2004 – Vol.263 – P.193–205.
128. Ghosh S. Anti-TNF therapy in Crohn's disease. // Novartis Found Symp. 2004 – Vol.263 – P.193-205
129. Grech AP, Gardam S, Chan T, et al. Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) signaling is negatively regulated by a novel, carboxyl-terminal TNFR-associated

- factor 2 (TRAF2)-binding site. // J Biol Chem. – 2005 – Vol.280 – No.36 – P.31572–81.
130. Grell M, Douni E, Wajant H, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. // Cell. – 1995 – Vol. 83 – No.5 – P.793–802.
  131. Grell M, Wajant H, Zimmermann G. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1998 – Vol.95 - No2 – P.570-575.
  132. Grinberg-Bleyer Y, Saadoun D, Baeyens A, et al. Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. // The Journal of clinical investigation. – 2010 – Vol.120 – No.12 – P.4558–68
  133. Grivennikov SI, Tumanov AV, Liepinsh DJ, et al. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by t cells and macrophages/neutrophils: Protective and deleterious effects. // Immunity. – 2005 – 22 - No1 – P.93–104
  134. Guo X, Wang S, Godwood A, et al. Pharmacodynamic biomarkers and differential effects of TNF- and GM-CSF-targeting biologics in rheumatoid arthritis. // Int J Rheum Dis. – 2019 – Vol.;22 -No4 – P.646-653.
  135. Gupta S, Bi R, Gollapudi S. Central memory and effector memory subsets of human CD4(+) and CD8(+) T cells display differential sensitivity to TNF- $\alpha$ -induced apoptosis. // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2005 – Vol.1050 – P.10–14.
  136. Gupta S. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules. // Experimental gerontology. – 2002 – Vol.37 – No.2–3 – P.293–9.
  137. Haas T. L. et al. Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. // Mol. Cell – 2009 – Vol.36 – No.5 – P.831–844.

138. Hale KK, Smith CG, Baker SL, et al. Multifunctional regulation of the biological effects of TNF- $\alpha$  by the soluble type I and type II TNF receptors. // *Cytokine*. - 1995 – Vol.7 – No.1 – P.26-38
139. Hartley G, Regan D, Guth A, et al. Regulation of PD-L1 expression on murine tumor-associated monocytes and macrophages by locally produced TNF- $\alpha$ . // *Cancer Immunol Immunother*. – 2017 - Vol.66 – No.4 – P.523–35.
140. He S. et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- $\alpha$ . // *Cell* – 2009. – Vol.137 – P.1100–1111.
141. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. // 2005 - Vol.115 – No.1 – P.1-20.
142. Hershko A., Ciechanover A. The ubiquitin system. // *Annu. Rev. Biochem.* – 1998 – Vol.67 – P.425–479.
143. Hijdra D, Vorselaars AD, Grutters JC, et al.. Differential expression of TNFR1 (CD120a) and TNFR2 (CD120b) on subpopulations of human monocytes. // *J Inflamm (Lond)* - 2012 – Vol.;9 – No.1 – P.38- 42
144. Hitomi, J. et al. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. // *Cell* – 2008. – Vol.135. – P.1311–1323.
145. Hoffmann A., Baltimore, D. Circuitry of nuclear factor  $\kappa$ B signaling. // *Immunol. Rev.* – 2006. – Vol.210. – P.171–186.
146. Holbrook J, Lara-Reyna S, Jarosz-Griffiths H, et al. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. // *F1000Res*. – 2019 – Vol.28 - No;8 - F1000 Faculty Rev-111
147. Horwitz DA, et al. Therapeutic polyclonal human CD8 + CD25 + Fox3 + TNFR2 + PD-L1 + regulatory cells induced ex-vivo. // *Clin. Immunol.* – 2013 – Vol.149 – P.450–463.
148. Hostager BS, Bishop GA. Role of TNF receptor-associated factor 2 in the activation of IgM secretion by CD40 and CD120b. // *J Immunol* – 2002 – Vol.168 – No.7 – P.3318–22.

149. Housley WJ, Adams CO, Nichols FC et al. Natural but not inducible regulatory T cells require TNF- $\alpha$  signaling for in vivo function. // *Journal of immunology*. – 2011 – Vol.186 – No.12 – P.6779–87.
150. Housley WJ, et al. Natural but not inducible regulatory T cells require TNF- $\alpha$  signaling for in vivo function. // *J. Immunol.* – 2011 – Vol.186 – P.6779–6787
151. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- $\kappa$ B activation. // *Cell*. – 1995 – Vol.81 - No4 – P.495–504.
152. Hsu H., Huang J., Shu H. B., et al. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. // *Immunity* – 1996 – Vol.4. – P.387–396.
153. Hsu H., Shu H. B., Pan M. G, et al. V TRADD–TRAF2 and TRADD–FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. // *Cell* – 1996 – Vol.84 – P.299–308.
154. Ihnatko R, Kubes M. TNF signaling: early events and phosphorylation. // *Gen Physiol Biophys.* - 2007 – Vol.26 –No.3 – P.159-67
155. Israel, A. The IKK complex, a central regulator of NF- $\kappa$ B activation. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol* – 2010 – Vol.2 – P.21-24.
156. Jain V, Singh PP, Silawat N, et al. A preliminary study on pro- and anti-inflammatory cytokine profiles in *Plasmodium vivax* malaria patients from central zone of India. // *Acta Trop.* - 2010 – Vol.113 – No.3 – P.263-8
157. Kagan BL, Baldwin RL, Munoz D, Wisnieski BJ. Formation of ion-permeable channels by tumor necrosis factor- $\alpha$ . // *Science*. - 1992 - Vol.13 –No.255 – P.1427-30
158. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. // *Nat Rev Rheumatol.* - 2016 – Vol.12- Vol.1- P.49-62.
159. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. // *Nat Rev Rheumatol.* – 2016 – Vol.12 – No.1 – P.49-62.

160. Karathanasis C, Medler J, Fricke F, et al.. Single-molecule imaging reveals the oligomeric state of functional TNF $\alpha$ -induced plasma membrane TNFR1 clusters in cells. // *Sci Signal.* - 2020 – Vol.13 – No.614 - eaax5647.
161. Keffer J., Probert L., Cazlaris H., et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. // *EMBO J.* – 1991 – Vol.13 – P.4025-31.
162. Kim EY, Priatel JJ, Teh SJ, Teh HS. TNF receptor type 2 (p75) functions as a costimulator for antigen-driven T cell responses in vivo. // *Journal of immunology.*- 2006 – Vol.176 – No.2 – P.1026–35.
163. Kim EY, Teh HS. TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation. // *Journal of immunology.* 2001;167(12):6812–20. [PubMed] [Google Scholar]
164. Kircik LH, Del Rosso JQ Anti-TNF agents for the treatment of psoriasis. // *J Drugs Dermatol.* – 2009 – Vol.8 – No.6 – P.546–59.
165. Klein SA, Dobmeyer JM, Dobmeyer TS et al. TNF-alpha mediated apoptosis of CD4 positive T-lymphocytes. A model of T-cell depletion in HIV infected individuals. // *European journal of medical research.* – 1996 – Vol.1 – No.5 – P.249–58.
166. Kollias G, Douni E, Kassiotis G. On the role of tumor necrosis factor and receptors in models of multiorgan failure, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. // *Immunol Rev.* – 1999 – Vol.169 – P.175-94
167. Komander D., Rape M. The ubiquitin code. // *Annu. Rev. Biochem.* – 2012 – Vol.81 – P.203–229.
168. Kroemer G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. // *Cell Death Differ.* – 2009 – Vol.16 – P.3–11.
169. Kuhn M., Johnson K., *Applied Predictive Modeling* Springer-Verlag // Kuhn, Max, Johnson, Kjell - New York, January 2013

170. Lauenborg B, Christensen L, Ralfkiaer U, et al. Malignant T cells express lymphotoxin  $\alpha$  and drive endothelial activation in cutaneous T cell lymphoma. // *Oncotarget*. - 2015 – Vol.20 – No.6(17) – P.15235-49
171. Lavrik I, Golks A, Krammer PH. Death receptor signaling.// *J Cell Sci*. - 2005 - Vol.118 -Pt 2 – P.265-7.
172. Lee JW, Lee J, Um SH, Moon EY. Synovial cell death is regulated by TNF- $\alpha$ -induced expression of B-cell activating factor through an ERK-dependent increase in hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . // *Cell Death Dis*. 2017 –Vol.8 – No.4 - e2727.
173. Lee LF, Lih CJ, Huang CJ, et al. Genomic expression profiling of TNF-alpha-treated BDC2.5 diabetogenic CD4+ T cells. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2008 – Vol.105 – No.29 – P.10107–12.
174. Lee T. H., Shank J., Cusson N. et al. The kinase activity of Rip1 is not required for tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced I $\kappa$ B kinase or p38 MAP kinase activation or for the ubiquitination of Rip1 by Traf2. // *J. Biol. Chem*. – 2004 – Vol.279 – P.33185–33191.
175. Legler D. F., Micheau O., Doucey M. A, et al. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation. // *Immunity* – 2003 – Vol.18 – P.655–664.
176. Lenardo M. J. Interleukin-2 programs mouse  $\alpha\beta$  T lymphocytes for apoptosis. // *Nature* – 1991 – Vol.353 – P.858–861.
177. Li X, Yang Y, Ashwell JD. TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. // *Nature*. – 2002 – Vol. 416 – No.6878 – P.345–7.
178. Lin J, Kumari S, Kim C, et al. RIPK1 counteracts ZBP1-mediated necroptosis to inhibit inflammation. // *Nature*. – 2016 – Vol.540 – No.7631 – P.124–128.
179. Lin RH, Hwang YW, Yang BC. TNF receptor-2-triggered apoptosis is associated with the down-regulation of Bcl-xL on activated T cells and can be prevented by CD28 costimulation. // *Journal of immunology*. – 1997 – Vol.158 – No.2 – P.598–603.

180. Loetscher H, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, Lesslauer W. Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. // Cell. – 1990 – Vol.20 - No61(2) – P.351-9.
181. Lombardo E, Alvarez-Barrientos A, Maroto B, et al. TLR4-mediated survival of macrophages is MyD88 dependent and requires TNF-alpha autocrine signalling. // J Immunol. – 2007 – Vol.178 – No.6 – P.3731-9
182. Lopatnikova JA, Vasilyev FF, Alshevskaya AA et al. Quantitative flow cytometric analysis of expression of tumor necrosis factor receptor types I and II on mononuclear cells. // J Recept Signal Transduct Res. – 2013 – Vol.33 – No.1 – P.49-55.
183. Magez S, Radwanska M, Drennan M, et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor-1 (TNFp55) signal transduction and macrophage-derived soluble TNF are crucial for nitric oxide-mediated Trypanosoma congolense parasite killing. // J Infect Dis. - 2007 – Vol.196 - No6 – P.954-62.
184. Mahmud SA, Manlove LS, Schmitz HM, et al. Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. // Nature immunology. – 2014 – Vol.15 – No.5 – P.473–81
185. Mahoney D. J. et al. Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNF $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B activation. // Proc. Natl Acad. Sci. USA – 2008 – Vol.105 – P.11778–11783.
186. Mahoney JR, Jr, Beutler BA, Le Trang N, et al. Lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells produce a mediator that inhibits lipoprotein lipase in 3T3-L1 cells. // J Immunol. – 1985 – Vol.134 – No.3 – P.1673–5.
187. Maney NJ, Reynolds G, Krippner-Heidenreich A, et al. Dendritic cell maturation and survival are differentially regulated by TNFR1 and TNFR2. // J Immunol. – 2014 – Vol. 193(10):4914-4923
188. Markham A, Lamb HM. Infliximab. A review of its use in the management of rheumatoid arthritis. Drugs (2000) 59(6):1341–59.10.2165/00003495-200059060-00010 [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]



189. Meng H, Liu Z, Li X, et al. Death-domain dimerization-mediated activation of RIPK1 controls necroptosis and RIPK1-dependent apoptosis. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2018 – Vol.115 – No.9 - E2001–E2009.
190. Micheau O., Tschopp J. Induction of TNF receptor I- mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. // *Nature* – 2011 – Vol.471 – P.591–596.
191. Michlewska S, Dransfield I, Megson IL et al. Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF- $\alpha$ . // *FASEB J.* – 2009 – Vol.23 – No.3 – P.844-54.
192. Mizoguchi E., Mizoguchi A., Takedatsu H, et al. Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. // *Gastroenterology.*- 2002 – Vol.122 – P.134-44
193. Mohammad R., Matthew V., Charles H. TNFR2 Is Expressed Preferentially By Late Differentiated CD8 T-Cells and Can be Triggered By TNFR2-Specific Ligand to Induce Cell Death of Recently Activated Antigen-Specific T Cells: A Possible Role of TNFR2 in T-Cell Deflation. // *Blood* - 2014 – Vol.124 – No.21 - 4352-4352
194. Moraga I, Harari D, Schreiber G et al. Receptor density is key to the  $\alpha$ 2/ $\beta$ 2 interferon differential activities. // *Mol Cell Biol.* – 2009 - Vol.29 – No.17 – P.4778-4787.
195. Mukai Y, Nakamura T, Yoshikawa M, et al. Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex. // *Sci Signal.* - 2010 – Vol.16 – No.3 – P.83 -87.
196. Munroe ME, Bishop GA. Role of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 2 (TRAF2) in distinct and overlapping CD40 and TNF receptor 2/CD120b-mediated B lymphocyte activation. // *J Biol Chem* – 2004 – Vol.279 – No.51 – P.53222–31.
197. Nagaishi T, Watabe T, Jose N, , et al. Epithelial nuclear factor- $\kappa$ B activation in inflammatory bowel diseases and colitis-associated carcinogenesis. // *Digestion* – 2016 – Vol.93 – P.40–6

198. Nagar M, Jacob-Hirsch J, Vernitsky H, et al. TNF activates a NF-kappaB-regulated cellular program in human CD45RA- regulatory T cells that modulates their suppressive function. // Journal of immunology. – 2010 – Vol.184 – No.7 – P.3570–81.
199. Naismith JH, Devine TQ, Brandhuber BJ, Sprang SR. Crystallographic evidence for dimerization of unliganded tumor necrosis factor receptor. // J Biol Chem. - 1995 – Vol.270 – No.22 – P.13303-7
200. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi A et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. // Nucleic Acids Res. - 1985 – Vol.13 – No.17 – P.6361-73
201. Nie H, Zheng Y, Li R, et al. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis. // Nature medicine. – 2013 – Vol.19 – No.3 – P.322–8.
202. Nie H, Zheng Y, Li R, et al. Reply to Suppressive activity of human regulatory T cells is maintained in the presence of TNF. // Nat. Med. – 2016 – Vol.- 22 – P.18–19.
203. Notley CA, Inglis JJ, Alzabin S, et al. Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells. // J Exp Med. – 2008 – Vol. 205 – No.11 – P.2491-2497.
204. Orlova DY, Borisov VI, Kozhevnikov VS, et al. Distribution function approach to the study of the kinetics of IgM antibody binding to FcγRIIIb (CD16b) receptors on neutrophils by flow cytometry. // J Theor Biol. – 2011 – Vol.7 – No.290 – P.1-6.
205. Pan W, Kastin AJ. Tumor necrosis factor and stroke: role of the blood-brain barrier. // Prog Neurobiol. – 2007 – Vol.83 - No6 – P.363-374.
206. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. // Crit Rev Eukaryot Gene Expr. – 2010 – Vol.20 – No.2 – P.87-103.
207. Park Y. C. et al. A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD–TRAF2 interaction. // Cell – 2000 – Vol.101 – P.777–787.

208. Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. // *Nature*. 2015 – Vol.517 – No.7534 – P.311–20.
209. Pimentel-Muinos F. X., Seed B. Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. // *Immunity* – 1999 – Vol.11 – P.783–793.
210. Pobeziinskaya Y. L. et al. The function of TRADD in signaling through tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors. // *Nature Immunol.* – 2008 – Vol.9 – P.1047–1054.
211. Rauert H, Wicovsky A, Müller N, et al. Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). // *J Biol Chem.* – 2010 – Vol.285 – No.10 – P.7394-404.
212. Richter MV, Topham DJ. The alpha1beta1 integrin and TNF receptor II protect airway CD8+ effector T cells from apoptosis during influenza infection. // *Journal of immunology.* – 2007- Vol.179 – No.8 – P.5054–63.
213. Rossmann ED, Lenkei R, Lundin J et al. Performance of calibration standards for antigen quantitation with flow cytometry in chronic lymphocytic leukemia. // *Cytometry B Clin Cytom.* – 2007 – Vol.72- No6 – P.450-7.
214. Rothe M, Sarma V, Dixit V, et al. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. // *Science.* – 1995 – Vol.269 – No.5229 – P.1424–7.
215. Salkowski CA, Detore G, McNally R, et al. Regulation of inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression and nitric oxide production by lipopolysaccharide in vivo: the roles of macrophages, endogenous IFN-gamma, and TNF receptor-1-mediated signaling. // *J Immunol.* - 1997 – Vol.158 – No.2 – P.905-12
216. Santee SM, Owen-Schaub LB. Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization. // *J Biol Chem.* - 1996 - Vol. 271 – No.35 – P.21151-9.

217. Schall TJ, Lewis M, Koller KJ, et al. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. // *Cell*. – 1990 – Vol.61 – No.2 – P.361-70.
218. Sennikov SV, Alshevskaya AA, Shkaruba NS, et al. Expression of TNF $\alpha$  membrane-bound receptors in the peripheral blood mononuclear cells (PMBC) in rheumatoid arthritis patients. // *Cytokine*. – 2015 – Vol.73 – No. 2 – P.288–94.
219. Sennikov SV, Injelevskaya TV, Krysov SV, et al. Production of hemo- and immunoregulatory cytokines by erythroblast antigen+ and glycophorin A+ cells from human bone marrow. // *BMC Cell Biol*. – 2004 - Vol18 – No.5(1) – P.39 -42
220. Sennikov SV, Vasilyev FF, Lopatnikova JA, et al. Polymorphisms in the tumor necrosis factor receptor genes affect the expression levels of membrane-bound type I and type II receptors. // *Mediators Inflamm*. – 2014 – P.32-37
221. Seymour HE, Worsley A, Smith JM, et al. Anti-TNF agents for rheumatoid arthritis. // *Br J Clin Pharmacol*. – 2001. – Vol.51. – Vol.3 – P.201–8.]
222. Shaikh F, He J, Bhadra P, et al. TNF Receptor Type II as an Emerging Drug Target for the Treatment of Cancer, Autoimmune Diseases, and Graft-Versus-Host Disease: Current Perspectives and In Silico Search for Small Molecule Binders. // *Front Immunol*. – 2018 – Vol.9 – P.1382-1386
223. Shakoor N, Michalska M, Harris CA, Block JA. Drug-induced systemic lupus erythematosus associated with etanercept therapy. // *Lancet* – 2002 – Vol.359 – No.9306 – P.579–80.
224. Smith RA, Baglioni C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. // *J Biol Chem*. - 1987 – Vol.262 – No.15 – P.6951-4.
225. Sullivan KE, Reddy AB, Dietzmann K, et al. Epigenetic regulation of tumor necrosis factor alpha. // *Mol Cell Biol*. – 2007 – Vol.27 - No14 – P.5147-5160.
226. Suresh M, Singh A, Fischer C. Role of tumor necrosis factor receptors in regulating CD8 T-cell responses during acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. // *Journal of virology*. – 2005 – Vol.79 – No.1 – P.202–13.

227. Tada K, Okazaki T, Sakon S, et al. Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death. // *J Biol Chem.* – 2001 – Vol.276 – No.39 – P.36530–4.
228. Tada Y., Ho A., Koarada S., F. et al. Collagen-induced arthritis in TNF receptor-1-deficient mice: TNF receptor-2 can modulate arthritis in the absence of TNF receptor-1. // *Clin. Immunol.* – 2001 – Vol.99 – P.325-333.
229. Takada Y, Aggarwal BB. Evidence that genetic deletion of the TNF receptor p60 or p80 in macrophages modulates RANKL-induced signaling. // *Blood.* - 2004 – Vol.104 – No.13 – P.4113–4121.
230. Takada Y, Sung B, Sethi G, et al. Evidence that genetic deletion of the TNF receptor p60 or p80 inhibits Fas mediated apoptosis in macrophages. // *Biochem Pharmacol.* - 2007 – Vol.74 – No.7 – P.1057–1064.
231. Tartaglia L. A., Ayres T. M., Wong G. H. et al. A novel domain within the 55kd TNF receptor signals cell death. // *Cell* – 1993 – Vol.74 – P.845–853.
232. Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, et al. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1991 – Vol.88 – No.20 – P.9292–6.]
233. Ticha O, Moos L, Wajant H, Bekeredjian-Ding I. Expression of Tumor Necrosis Factor Receptor 2 Characterizes TLR9-Driven Formation of Interleukin-10-Producing B Cells. *Front Immunol.* 2018;8:1951. Published 2018 Jan 19. doi:10.3389/fimmu.2017.01951
234. Ting A. T., Pimentel-Muinos F. X., Seed B. RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-κB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. // *EMBO J.* – 1996 – Vol.15 – P.6189–6196.
235. Tokunaga F, Nishimasu H, Ishitani R, et al. Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF-κB regulation. // *EMBO J.* – 2012 – Vol.31 – No.19 – P.3856–70.
236. Tokunaga F. et al. Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-κB activation. // *Nature Cell Biol.* – 2009 – Vol.11 – P.123–132.

237. Tokunaga, F. et al. SHARPIN is a component of the NF- $\kappa$ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex. // Nature – 2011 - Vol.471 – P.633–636 .
238. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. // Pharmacol Ther. 2008 – Vol.117 –No.2 – P.244-79.
239. Twu YC, Gold MR, Teh HS. TNFR1 delivers pro-survival signals that are required for limiting TNFR2-dependent activation-induced cell death (AICD) in CD8+ T cells. // European journal of immunology. – 2011 – Vol.41 – No.2 – P.335–44.
240. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, et al. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. // Blood. – 2006 – Vol.108 – No.1 – P.253–61.
241. Varfolomeev E, Goncharov T, Fedorova AV, et al. c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ )-induced NF-kappaB activation. // J Biol Chem. – 2008 – Vol.283 – No.36 – P.24295–9.
242. Varfolomeev E. et al. IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF- $\kappa$ B activation, and TNF $\alpha$ -dependent apoptosis. // Cell – 2007 – Vol.131 – P.669–681.
243. Vercammen D, Beyaert R, Denecker G et al. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. // J Exp Med. - 1998 – Vol.187 – No.9 – P.1477-85.
244. Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. // J Biol Chem. - 1991 – Vol.266 – No.12 – P.7313-6
245. Vince J. E. et al. IAP antagonists target cIAP1 to induce TNF $\alpha$ -dependent apoptosis. // Cell – 2007 – Vol.131 – P.682–693.
246. Vince J. E. et al. TRAF2 must bind to cellular inhibitors of apoptosis for tumor necrosis factor (TNF) to efficiently activate NF- $\kappa$ B and to prevent TNF-induced apoptosis. // J. Biol. Chem. – 2009 – Vol.284 – P.35906–35915.

247. Vogt Jr R, Marti G., Zenger V. Quantitative Fluorescence Calibration: a Tool for Assessing the Quality of Data Obtained by Fluorescence Measurements // Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements I. Springer Series on Fluorescence – 2008 - Vol 5 – P.3-31.
248. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. // Cell Death Differ - 2003 - Vol.10 - No1 – P.45-65.
249. Wajant H, Scheurich P. TNFR1-induced activation of the classical NF- $\kappa$ B pathway. // FEBS J. – 2011 –Vol.278 –No.6 – P.862–76.
250. Wang C. et al. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. // Nature - 2001 – Vol.412 – P.346–351.
251. Wang L, Tang X, Xiang X, Tang Y, Qiu L. Experimental study of TNF- $\alpha$  receptor gene transfection by ultrasound-targeted microbubble destruction to treat collagen-induced arthritis in rats *in vivo*. Exp Ther Med. 2019 Mar;17(3):1601-1610.
252. Wang L., Du F., Wang X. TNF- $\alpha$  induces two distinct caspase-8 activation pathways. // Cell – 2008 – Vol.133 – P.693–703.
253. Wang P, Zheng SG. Regulatory T cells and B cells: implication on autoimmune diseases. // Int. J. Clin. Exp. Pathol. – 2013 – Vol.6 – P.2668–2674
254. Wang X, Yang L, Huang F, et al. Inflammatory cytokines IL-17 and TNF- $\alpha$  up-regulate PD-L1 expression in human prostate and colon cancer cells. // Immunol Lett. – 2017 – Vol.184 – P.7–14.
255. Ware CF, Crowe PD, Vanarsdale TL, et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor expression in T lymphocytes. Differential regulation of the type I TNF receptor during activation of resting and effector T cells. // Journal of immunology. – 1991 – Vol.147 – No.12 – P.4229–38.
256. Weil R. et al. Induction of the NF- $\kappa$ B cascade by recruitment of the scaffold molecule NEMO to the T cell receptor. // Immunity – 2003 – Vol.18 – P.13–26.
257. Wesemann DR, Benveniste EN. STAT-1 alpha and IFN-gamma as modulators of TNF-alpha signaling in macrophages: regulation and functional implications of the

- TNF receptor 1:STAT-1 alpha complex. // J Immunol. - 2003 – Vol.171 – No.10 – P.5313-9
258. Williams-Skipp C., Raman T., Valuck R.J., et al. Unmasking of a protective tumor necrosis factor receptor I-mediated signal in the collageninduced arthritis model. // Arthritis Rheum. – 2009 – Vol. 60 – P.408-4011.
  259. Witsell AL, Schook LB. Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth regulator during macrophage differentiation. // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1992 – Vol.;89 – No.10 - 4754–4758.
  260. Wortzman ME, Lin GH, Watts TH. Intrinsic TNF/TNFR2 interactions fine-tune the CD8 T cell response to respiratory influenza virus infection in mice. // PloS one. – 2013 – Vol.8 – No.7 - e68911.
  261. Wu C. J., Conze D. B., Li, T., Srinivasula S. M., et al. Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF- $\kappa$ B activation. // Nature Cell Biol. – 2006 – Vol.8 – P.398–406.
  262. Wu G. et al. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. // Nature – 2000 – Vol.408 – P.1008–1012.
  263. Wu Y, Kang J, Zhang L, et al. Ubiquitination regulation of inflammatory responses through NF- $\kappa$ B pathway. // Am J Transl Res. – 2018 – Vol.10 – No.3 – P.881–91.
  264. Xang S, Xie C, Chen Y, et al. Differential roles of TNF $\alpha$ -TNFR1 and TNF $\alpha$ -TNFR2 in the differentiation and function of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> induced Treg cells in vitro and in vivo periphery in autoimmune diseases. // Cell Death Dis. - 2019 – Vol.10 No.1 – P.27-31.
  265. Yang S., Wang J., Brand D. Role of TNF–TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications. // Front. Immunol. - 2018 – Vol. 19 – No.9 - P.784-787
  266. Yarilina A, Park-Min KH, Antoniv T, et al. TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes. // Nat Immunol. - 2008 – Vol.9 – No.4 – P.378–387



267. Yeh W. C. et al. Early lethality, functional NF- $\kappa$ B activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. // *Immunity* – 1997 – Vol.7 – P.715–725.
268. Yin Q., Lamothe B., Darnay B. G., et al. Structural basis for the lack of E2 interaction in the RING domain of TRAF2. // *Biochemistry* – 2009 – Vol.48 – P.10558–10567.
269. Zelová H, Hošek J. TNF- $\alpha$  signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. // *Inflamm Res.* - 2013 – Vol.62 –No.7 – P.641-51.
270. Zhang DW, Shao J, Lin J, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. // *Science.* – 2009 – Vol. 17 – No.325(5938) – P.332-6
271. Zhang Q, Cui F, Fang L, et al. TNF- $\alpha$  impairs differentiation and function of TGF- $\beta$ -induced Treg cells in autoimmune diseases through Akt and Smad3 signaling pathway. // *Journal of molecular cell biology.* – 2013 – Vol.5 – No.2 – P.85–98
272. Zhang Q, et al. TNF- $\alpha$  impairs differentiation and function of TGF- $\beta$ -induced Treg cells in autoimmune diseases through Akt and Smad3 signaling pathway. // *J. Mol. Cell Biol.* – 2013 – Vol.5 – P.85–98.
273. Zhang Y. H., Heulsmann A., Tondravi M.M., et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. // *J. Biol. Chem.* – 2001 – Vol.276 – P.563–567.
274. Zhao L, Zhang B. Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. // *Sci Rep.* - 2017 – Vol.16 – Vol.7 – P.44735- 44740
275. Zheng C., Kabaleeswaran V., Wang Y., et al. Crystal structures of the TRAF2: cIAP2 and the TRAF1: TRAF2: cIAP2 complexes: affinity, specificity, and regulation. // *Mol. Cell* – 2010 – Vol.38 – P.101–113.

276. Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, , et al.. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4 + CD25- precursors. // J. Immunol. – 2002 – Vol.169 – P.4183–4189
277. Zheng SG, Wang J, Horwitz DA. Cutting edge: Foxp3 + CD4 + CD25 + regulatory T cells induced by IL-2 and TGF-beta are resistant to Th17 conversion by IL-6. // J. Immunol. – 2008 – Vol.180 – P.7112–7116.
278. Zheng SG, Wang JH, Gray JD et al. Natural and induced CD4 + CD25 + cells educate CD4 + CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. // J. Immunol. – 2004 – Vol.172 – P.5213–5221.
279. Zhong H, Bussel J, Yazdanbakhsh K: In vitro TNF blockade enhances ex vivo expansion of regulatory T cells in patients with immune thrombocytopenia. // Br J Haematol. – 2015 – Vol.168 – Vol.2 – P.274–83.
280. Zhong H, et al. TGF-beta-Induced CD8(+)CD103(+) regulatory T cells show potent therapeutic effect on chronic graft-versus-host disease lupus by suppressing B cells. // Front. Immunol. – 2018 – Vol.9 – P.35.
281. Zhou Q, Wang H, Schwartz DM, et al. Loss-of-function mutations in TNFAIP3 leading to A20 haploinsufficiency cause an early-onset autoinflammatory disease. // Nat Genet. – 2016 – Vol.48 – no.1 – P.67–73.
282. Zhou Q, Yu X, Demirkaya E, et al. Biallelic hypomorphic mutations in a linear deubiquitinase define otulipenia, an early-onset autoinflammatory disease. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2016 – Vol.113 – No.36 – P.10127–32.
283. Zhou X, et al. Cutting edge: all-trans retinoic acid sustains the stability and function of natural regulatory T cells in an inflammatory milieu. // J. Immunol. – 2010 – Vol.185 – P.2675–2679.
284. Zhu M, Lei L, Zhu Z, et al. Excess TNF- $\alpha$  in the blood activates monocytes with the potential to directly form cholesteryl ester-laden cells. // Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). – 2015 – Vol.47 –No.11 – P.899–907.

285. Zou H, Li R, Hu H, et al. Modulation of Regulatory T Cell Activity by TNF Receptor Type II-Targeting Pharmacological Agents. // Front Immunol. – 2018 – Vol.9 – P.594 -603