

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА АКТИВНОСТЬ КИНАЗЫ mTOR В CD4⁺T-ЛИМФОЦИТАХ ПРИ АУТОИММУННОМ ТИРЕОИДИТЕ

Бурцева А.В.¹, Тихонова А.Н.¹, Афанасьева З.А.², Абрамова З.И.¹

¹ ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

² Казанская государственная медицинская академия — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Резюме. В настоящее время при изучении аутоиммунных процессов стали обращать внимание на специфические процессы, в которых участвуют митохондрии: это нарушение внутриклеточной передачи сигналов, включая генерацию активированных кислородных метаболитов и выход из митохондрий в цитоплазму белков, активирующих процесс апоптоза. Эти функции митохондрий, как правило, связаны с нарушением их биоэнергетических функций и избыточной продукцией H₂O₂. В настоящее время активно развивается новое направление — участие митохондрий в иммунном ответе. Поэтому целью данного исследования было изучение динамики факторов апоптоза и аутофагии, связанных с митохондриями CD4⁺T-клеток при аутоиммунном тиреоидите. Работа выполнена на CD4⁺T-клетках, полученных от пациентов с АИТ и здоровых доноров методом магнитной сепарации. Для оценки программируемой клеточной гибели I и II типа использовали метод проточной цитометрии. Для анализа белков-маркеров аутофагии — p62, LC3I/II, киназы mTOR и регулятора апоптоза Bcl-2 в CD4⁺T-лимфоцитах пациентов и здоровых доноров использовали вестерн-блоттинг. Состояние митохондрий в CD4⁺T-лимфоцитах оценивали методом конфокальной микроскопии. На экспериментальной модели в условиях возрастания перекиси H₂O₂ мы показали, что АФК активируют LC3-белок в клетках пациентов с АИТ и накапливается аутофагический белок-адаптер p62, который регистрируется на внешней митохондриальной мембране. Установлен повышенный уровень митофагосов в CD4⁺T-клетках пациентов с АИТ. На основе полученных данных можно предположить, что H₂O₂ вызывает активацию митофагии в CD4⁺T-лимфоцитах пациентов с АИТ, а развитие ОС при избыточной продукции АФК приводит к необратимым повреждениям митохондрий, которые приводят к снижению апоптотической активности и, как следствие, развитию вторичного некроза CD4⁺T-лимфоцитов при АИТ, делая их цитотоксическими. Накопление таких клеток в ткани ЩЖ может приводить к нарушению апоптоза в тироцитах и, как следствие, ко вторичному некрозу. Результат — развитие аутоиммунного ответа. Полученные данные требуют дополнительных исследований, т. к. выявление в крови пациентов с АИТ CD4⁺T-лимфоцитов, склонных к апоптозу или к некрозу, может использоваться как диагностический критерий прогноза воспалительного процесса.

Ключевые слова: окислительный стресс, mTOR, CD4⁺T-лимфоцит, митофагия, аутоиммунный тиреоидит

Адрес для переписки:

Абрамова Зинаида Ивановна
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
420008, Россия, Республика Татарстан,
г. Казань, ул. Кремлевская, 18, каб. 104.
Тел.: 8 (960) 040-43-47.
E-mail: ziaabramova@mail.ru

Address for correspondence:

Zinaida I. Abramova
Kazan (Volga Region) Federal University
18 Kremlevskaya St, Room 104
Kazan, Republic of Tatarstan
420008 Russian Federation
Phone: +7 (960) 040-43-47.
E-mail: ziaabramova@mail.ru

Образец цитирования:

А.В. Бурцева, А.Н. Тихонова, З.А. Афанасьева, З.И. Абрамова «Влияние окислительного стресса на активность киназы mTOR В CD4⁺T-лимфоцитах при аутоиммунном тиреоидите» // Медицинская иммунология, 2025. Т. 27, № 4. С. 847-862.
doi: 10.15789/1563-0625-IOO-3141

© Бурцева А.В. и соавт., 2025

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

A.V. Burtseva, A.N. Tikhonova, Z.A. Afanasyeva, Z.I. Abramova "Influence of oxidative stress on the activity of mTOR kinase in CD4⁺T lymphocytes in autoimmune thyroiditis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2025, Vol. 27, no. 4, pp. 847-862.
doi: 10.15789/1563-0625-IOO-3141

© Burtseva A.V. et al., 2025

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-IOO-3141

INFLUENCE OF OXIDATIVE STRESS ON THE ACTIVITY OF mTOR KINASE IN CD4⁺T LYMPHOCYTES IN AUTOIMMUNE THYROIDITIS

Burtseva A.V.^a, Tikhonova A.N.^a, Afanasyeva Z.A.^b, Abramova Z.I.^a

^a Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

^b Kazan State Medical Academy, Branch of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Abstract. Current studies of autoimmunity processes are addressing specific processes involving mitochondria, i.e., altered intracellular signaling including the generation of ROS and release of proteins from mitochondria to the cytoplasm, thus activating apoptosis. These functions of mitochondria are usually associated with disturbed bioenergetic functions and excessive production of H₂O₂. Currently, a new area is actively developing, i.e., potential participation of mitochondria in the immune response. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the dynamics of apoptosis factors and autophagy associated with mitochondria of CD4⁺T cells in autoimmune thyroiditis (AIT). The study was performed with CD4⁺T cells of AIT patients and healthy donors obtained by magnetic separation. Apoptosis and autophagy were assessed by flow cytometry. Western blotting was used to analyze autophagy marker proteins (p62, LC3I/II, mTOR kinase), and apoptosis regulator Bcl-2 in CD4⁺T lymphocytes of the patients and donors. The state of mitochondria in CD4⁺T lymphocytes was assessed by confocal microscopy. Using an experimental model with increased H₂O₂, we showed that ROS activate LC3 protein in cells of patients with AIT along with accumulation of autophagic adapter protein p62, as registered on the outer mitochondrial membrane. An increased level of mitophagosomes was found in CD4⁺T cells from the AIT patients. On the basis of these data, one may assume that H₂O₂ causes activation of mitophagy in CD4⁺T cells of patients with AIT, and the development of oxidative stress with excessive production of ROS leads to irreversible damage to mitochondria, which causes a decreased apoptotic activity followed by development of secondary necrosis of CD4⁺T lymphocytes in AIT, making them cytotoxic. Accumulation of such cells in the thyroid tissue may lead to impaired apoptosis in thyrocytes and, as a consequence, to secondary necrosis, thus resulting in development of autoimmune response. The obtained data require additional studies, since the detection of CD4⁺T lymphocytes prone for apoptosis or necrosis in patients with AIT may be used as a diagnostic criterion for prediction of inflammatory conditions.

Keywords: oxidative stress, mTOR, CD4⁺T lymphocyte, mitophagy, autoimmune thyroiditis

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00443).

Введение

В 1912 году японский хирург Х. Хашимото описал аутоиммунный тиреоидит (АИТ), и, несмотря на более чем 100-летнюю историю изучения фундаментальных закономерностей развития аутоиммунных патологий, проблема остается актуальной. По статистике ежегодная заболеваемость болезнью Хашимото составляет около 2%. Поэтому важно создавать системы прогнозирования данных расстройств в семьях и популяции в целом, их предотвращения, раннего выявления и эффективной коррекции. По мнению автора [14], «требуется использование новых достижений в иммунологии, молекулярной генетике и клеточной биологии. Принимая во внимание современную концепцию «сигнального заболевания» в составе мультиорганный аутоиммунного синдрома ... следует использовать аутоим-

мунные заболевания щитовидной железы (АИЗ ЩЖ), в первую очередь АИТ, для расширенного диагностического поиска новых патологических состояний — компонентов синдрома».

Итак, заболевания ЩЖ, включая аутоиммунные заболевания, нарушения функции ЩЖ и новообразования, остаются серьезной социальной проблемой с быстро растущей распространенностью заболевания среди населения, что связывают с окислительным стрессом (ОС) [29]. Установлено, что активные формы кислорода (АФК) являются основным проявлением ОС в биологических системах, и их продукция может преодолеть антиоксидантную защиту, в конечном итоге приводя к повреждению клеток, апоптозу и смерти [13]. Данные клинических исследований указывают на то, что баланс между окислителями и антиоксидантами смещен в сторону окислительной активности у пациентов с АИТ, что позволило считать ОС ключевым событием в патофизиологии заболевания, независимо от функции ЩЖ. Исследования на моделях животных (мыши

NOD.H2h4) подтверждают, что накопление АФК в ЩЖ играет роль как в иницировании, так и прогрессировании заболевания [19].

Дисбаланс между оксидантами и антиоксидантами наблюдается на разных стадиях и при разных типах заболевания. ЩЖ, как часть эндокринной системы, использует свободные радикалы (АФК) для выработки гормонов. Клетки ЩЖ выделяют ферменты, катализирующие генерацию АФК. Нарушения баланса производства и разрушения АФК приводят к накоплению в клетке молекул с высоким окислительным потенциалом. Вследствие высокой реакционной способности АФК могут окислять и повреждать различные компоненты клетки, что является причиной развития ОС [43].

В патогенезе АИТ рассматривают несколько возможных механизмов, но наибольшее значение отводится клеточному звену иммунитета [11, 19, 39]. Например, из-за генетически обусловленного дефекта избыточно стимулированные CD4⁺Т-лимфоциты начинают принимать клетки ЩЖ за патогены, атакуют и разрушают их путем апоптоза. В свою очередь, в норме H₂O₂ выступает эффективным индуктором апоптоза, позволяющим выявить и элиминировать популяцию клеток с ослабленным антиоксидантным потенциалом и клеток, предрасположенных к генетическим повреждениям, относительно безвредным для организма. По мнению авторов [47], для иммунной системы важно распознавание и ответ на сигналы опасности, образующиеся в результате повреждения клеток, а не выяснение различий между «своим и чужим», поэтому особое внимание стали уделять исследованиям эндогенных механизмов антиоксидантной защиты, в числе которых рассматривается аутофагия [23].

Аутофагия — основа негативной селекции аутореактивных Т-клеток. В работе Walsh С.М., Edinger A.L. (2010) показано, что блокирование гена аутофагии Atg5 приводило к аутоиммунному CD4⁺Т-клеточному пролиферативному заболеванию мышей [52] и накоплению апоптотических CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток. В другой работе [38] было показано, что дефицит аутофагии в Т-клетках периферической крови вызывал ускоренную клеточную смерть наивных, но не Т-клеток памяти, что связывали с продукцией супероксидных анионов при активации наивных Т-клеток. Процесс аутофагии включает захват субстратов в аутофагосомы, которые впоследствии доставляются в лизосомы для ферментативного расщепления и переработки метаболитических предшественников. В норме АФК активируют аутофагию, которая облегчает клеточную адаптацию и уменьшает окислительное повреждение за счет деградации и переработки внутриклеточных поврежденных макромолекул и дисфункциональных органелл [34]. Т. е. важной функцией аутофагии яв-

ляется изоляция поврежденных митохондрий (мтХ), генерирующих супероксидные анионы, как источник стресса и повреждения вплоть до апоптоза самой клетки [2]. С другой стороны, удаление поврежденных мтХ с помощью митофагии исключительно важно для защиты клеток от ОС и нарушений метаболизма [3].

Вопрос о соотношении основных механизмов клеточной смерти при изучении аутоиммунной патологии до настоящего времени остается актуальным и полностью не изученным. Поэтому **целью данного исследования** был анализ влияния ОС на аутофагию CD4⁺Т-лимфоцитов больных АИТ.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования использовали CD4⁺Т-лимфоциты периферической крови здоровых доноров и пациентов с АИТ. В группу пациентов с АИТ входили 10 человек (женщины, средний возраст 25±4 года). Контрольную группу составили 11 условно здоровых доноров: (женщины средний возраст 23,5±3,5 года). Критерий исключения — жалобы и объективные признаки острых заболеваний, хронические заболевания в фазе обострения, данные о ревматологических и аутоиммунных заболеваниях в семейном анамнезе. Представленные материалы получены при информированном согласии пациентов на участие. При проведении научных биомедицинских исследований пользовались признанным этическим стандартом — Хельсинкской декларацией Международной медицинской ассоциации 1996 года, пересмотренной в 2013 г. Диагноз АИТ устанавливали на основании результатов ультрасонографии и наличия в сыворотке крови антител к тиреоидной пероксидазе и к тиреоглобулину.

Выделение CD4⁺Т-лимфоциты проводили в 2 этапа. На первом этапе в фалькон вносили 6 мл раствора фиколл-урогафина (ρ = 1,077) и наслаивали 9 мл крови, разведенной в PBS в соотношении 1:1. Центрифугировали в течение 35 мин при 400 g (Eppendorf, 5810R). Лимфоциты собирали по всей площади сечения пробирки, переносили в центрифужную пробирку и разбавляли PBS-буфером в соотношении 1:2, центрифугировали 10 минут при 18 °С 400 g (Eppendorf, 5810R). Процедуру повторяли 2 раза. Осадок клеток разбавляли в 5 мл MojoSort Buffer (BioLegend, США). Подсчет клеток проводили в камере Горяева, используя 0,1%-ный раствор трипанового синего.

Для выделения популяции CD4⁺Т-лимфоцитов использовали магнитный штатив DynaMag Invitrogen, США. После промывки клетки ресуспендировали в 100 мкл буфера MojoSort™. Добавляли 10 мкл биотин-антител, перемешивали и инкубировали на ледяной бане при 4 °С в течение 15 мин. Далее добавляли 10 мкл наногра-

нул стрептавидин-конъюгата, перемешивали и так же выдерживали на ледяной бане в течение 15 мин. После инкубации образцы разбавили в 2,5 мл MojoSort™ и ставили на магнитный штатив. Через 5 мин собрали образец с клетками и повторили магнитную сепарацию.

Для определения влияния ОС выделенные CD4⁺T-лимфоциты инкубировали в течение 24 ч в растворе пероксида водорода (H₂O₂) в концентрации от 0 до 40 мкМ в RPMI-1640 с добавлением 10% FBS.

Уровни АФК, аутофагии и апоптоза CD4⁺T-лимфоцитов оценивали на проточном цитометре BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США).

Для анализа АФК в CD4⁺T-лимфоцитах использовали 6-Карбокси-H2DCFDA, который начинает флуоресцировать после отщепления ацетильных групп клеточными эстеразами и окисления его АФК внутри клетки. Клетки отмывали дважды холодным PBS, добавили краситель в концентрации 5 мкМ. Инкубировали 30 мин в темноте при 37 °С. Образцы анализировали на первом FL1 детекторе цитометра в течение 20 мин с применением программного обеспечения CellQuest (Becton Dickinson, США). На каждый вариант опыта просчитывали не менее 10 000 клеток. Мертвые клетки исключали на основании параметров прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. С помощью программного обеспечения FlowJo подсчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

Для количественного определения аутофагосом в циркулирующих клетках периферической крови применяли набор для детекции аутофагии (Cyto-ID® Autophagy Detection Kit (Enzo Life Sciences, PA, США), содержащий индикаторный краситель Cyto-ID, конъюгированный с флуорохромом FITC (флуоресцеин-5-изотиоцианат). Этот катионный амфифильный зонд специфически распознает аутофагические вакуоли на всех стадиях аутофагии: преаутофагосомы → аутофагосомы → аутофаголизосомы. Пробоподготовку анализируемых образцов осуществляли в соответствии с инструкциями поставляемых наборов. После обработки образцы анализировали в зеленом (FL1) канале. Количество активных аутофагосом оценивали по средней интенсивности флуоресценции (MFI, mean fluorescence intensity) красителя Cyto-ID.

Уровень апоптоза в CD4⁺T-лимфоцитах анализировали по количеству аннексина V с помощью коммерческого набора для проточной цитометрии Annexin V-AF 488 (Lumiprobe, Россия). Для каждого анализа было использовано 500 000 клеток. Клетки промывали один раз охлажденным PBS и один раз аннексин V-связывающим буфером, после чего ресуспендировали в 100 мкл аннексин V-связывающего буфера. Затем клетки инкубировали с аннексином V-AF 488 10 мин

и пропидий йодидом (PI) в течение 5 мин при комнатной температуре (25 °С) в темноте. Без предварительной отмывки добавили 400 мкл аннексин V-связывающего буфера. Образцы анализировали на первом FL1 и втором FL2 детекторах цитометра. После с помощью программного обеспечения FlowJo подсчитывали процент популяции клеток, находящихся на стадии раннего и позднего апоптоза.

Для анализа белков-маркеров аутофагии — p62, LC3I/II, киназы mTOR и регулятора апоптоза Bcl-2 в CD4⁺T-лимфоцитах пациентов и здоровых доноров использовали вестерн-блоттинг. Для получения лизата к клеточному осадку (1 × 10⁶ CD4⁺T-лимфоцитов) добавляли 50 мкл RIPA-буфера с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз (Thermo Scientific, США). Концентрацию белка в образцах определяли, используя набор BCA Protein Assay (Thermo Scientific, США). Перед нанесением на гель в образцы добавляли раствор бромфенолового синего (0,1%). Аликвоты, равные по количеству белка, разделяли в 4-12%-ном градиенте SDS-ПААГ-геля и анализировали вестерн-блоттированием. Для этого по окончании электрофореза PVDF-мембрану активировали, собирали сэндвич по схеме: спонж — мембрана-гель — спонж. Помещали сэндвич в кассету трансфер-системы на 2 часа при напряжении 100 V и температуре +4 °С. Загрузку и перенос равных количеств белка подтверждали окрашиванием мембраны Ponceau S. В качестве вторичных антител использовали антимышьи или антикроличьи IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (Life Technologies, Индия). После промывки блоты визуализировали с применением ECL-набора на основе хемилюминесцентного субстрата (Bio-Rad, Китай) и детектировали хемилюминесценцию заданных белков с помощью системы гель-документирования BIORAD ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Китай). Для учета вариативности при загрузке проб осуществлялась нормализация с помощью антител к β-актину (Life Technologies, Индия).

Для оценки аутофагического клиренса мТХ свежeweделенные CD4⁺T-лимфоциты инкубировали в течение 18 часов с 10 мкМ H₂O₂ в культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS. Клетки промывали дважды в PBS, окрашивали мТХ и аутофагосомы с использованием красителей MitoTracker® Red CM-H2Xros (Invitrogen, США) и CYTO-ID® Green Detection Reagent (Enzo Life Sciences, США) соответственно. Для этого осадок клеток разводили в 100 мкл PBS, добавляли к суспензии клеток MitoTracker® в конечной концентрации 200 нМ и 0,1 мкл Green Detection Reagent и инкубировали 30 мин при 37 °С.

Для окрашивания нуклеиновых кислот использовали синий флуоресцентный краситель DAPI, разводили до 1 мкг/мл в PBS. Добавляли

разбавленный краситель к суспензии клеток и инкубировали при комнатной температуре 5 мин, затем клетки промывали в PBS и анализировали на конфокальном микроскопе ZEISS LSM 980.

Достоверность полученных результатов определяли с помощью анализа ANOVA. Обработка изображений электрофоретических блотов проводилась с помощью программного обеспечения ImageLab. Анализ изображений, полученных методом конфокальной микроскопии, осуществляли с помощью пакета программ Fiji. Для анализа данных цитометрии использовали программу FlowJo.

Статистическая обработка данных выполнена с помощью программы GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, США). Результаты выражены как среднее значение величины $\pm$ стандартное отклонение. Данные обрабатывали с использованием однофакторного дисперсионного анализа и последующего попарного сравнения с поправкой на множественность Бонферрони (* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,005$, *** — $p < 0,0005$, **** — $p < 0,0001$). Нормальность распределения количественной переменной и гомогенность дисперсий у нескольких распределений определяли с помощью тестов Шапиро–Уилка и Бартлетта соответственно.

Результаты

Аутофагию рассматривают как вторичную защиту от ОС благодаря ее способности облегчать обмен поврежденных субстратов, которые могут накапливаться во время этого процесса. Поэтому одной из первых задач экспериментального исследования явилась оценка уровня внутриклеточной продукции апоптоз-положительных клеток (аннексин V-положительные частицы) и АФК при действии H₂O₂.

Добавление в культуральную среду H₂O₂ в различных конечных концентрациях является одним из распространенных способов моделирования ОС *in vitro* [1], т. к. показана регуляторная роль АФК в процессе жизнедеятельности клеток: АФК постоянно образуются в клетках и тканях в низких, но измеримых концентрациях [48], таким образом, применение H₂O₂ в качестве модулирующего стресс-агента основано на ее способности образовываться в клетке в физиологических условиях.

По данным Roth S., Dröge W., в физиологическом диапазоне концентраций (от 1 нМ до 0,1–0,5 мкМ) H₂O₂ действует как сигнальная молекула, стимулируя миграцию и пролиферацию клеток, не вызывает заметных повреждений клетки, например при добавлении к смешанной культуре лимфоцитов 10 мкМ H₂O₂ наблюдался значительный рост включения H3-тимидина, маркера пролиферативной активности клеток. Повышении концентрации до 1–10 мкМ H₂O₂

вызывает остановку деления, которое обычно восстанавливается и даже ускоряется в случае успешной адаптации к ОС. Сигнальная функция H₂O₂ косвенно подтверждается тем, что в больших концентрациях (10–500 мкМ) и экзогенная, и внутриклеточная H₂O₂ вызывают ОС: в клетках активируются механизмы антиоксидантной защиты и репарации поврежденных белков и липидов. Если они не справляются, наступают необратимые повреждения, например при 500 мкМ и более внеклеточной H₂O₂ адаптация не срабатывает, клетка уходит в апоптоз [50]. Однако следует отметить, что границы этих реакций относительно и сильно зависят от типа клеток, условий культивирования и неоднородного распределения H₂O₂ в клетке. По данным работы Часовских Н.Ю. и соавт. [18], в клетках мононуклеарных лейкоцитов здоровых доноров инициировали ОС добавлением H₂O₂ в конечной концентрации 10, 50, 100 и 500 мкМ. При этом оптимальной для моделирования ОС *in vitro* считалась концентрация H₂O₂, при которой внутриклеточный уровень АФК, превышая контрольные значения и вызывая интенсификацию процесса апоптоза, не приводил к возрастанию числа некротизированных клеток в культуре.

Поэтому для моделирования ОС в культуральную среду добавляли H₂O₂ и определяли реакцию CD4⁺Т-лимфоцитов на повышение концентрации индуктора (10, 20, 30, 40 мкМ) в клетках здоровых доноров и пациентов с АИТ. Следует отметить, что выбранные концентрации H₂O₂ являются часто используемыми для индукции экспрессии ОС при изучении его влияния на внутриклеточные процессы [6].

Используя краситель 6-Карбокси-H2DCFDA, который начинает флуоресцировать под воздействием образующихся АФК внутри клетки (рис. 1А, см. 2-ю стр. обложки), мы установили, что инкубация CD4⁺Т-лимфоцитов здоровых доноров с H₂O₂ в диапазоне от 10 до 40 мкМ приводила к увеличению уровня АФК-положительных клеток по сравнению с интактными клетками. Однако в группе с АИТ относительное количество АФК-положительных клеток было достоверно ниже ($p < 0,05$) по отношению к группе здоровых доноров, и это отличие увеличивалось при повышении концентрации H₂O₂ (рис. 1Б, см. 2-ю стр. обложки). Полученные данные могут служить признаком развития ОС.

Кроме ОС, фундаментальным механизмом регуляции клеточного гомеостаза является апоптоз. Апоптоз — это процесс физиологической гибели клеток без воспалительного и иммунного ответа организма [26]. В норме формирование иммунной системы и созревание антиген-специфических Т- и В-лимфоцитов сопровождается массовым апоптозом клеток. Элиминация апоптотических клеток в основном происходит на

«ранних» этапах апоптоза (частицы, положительные только по аннексину V), когда экспрессия фосфатидилсерина на внешней мембране сигнализирует об «измененном своем» [36]. Ранние этапы апоптоза обратимы, а их продление обеспечивает фагоцитоз апоптотических клеток и формирование толерантности иммунной системы [54].

Как следует из рисунка 2 (см. 2-ю стр. обложки), CD4⁺T-лимфоциты пациентов с АИТ (рис. 2Б, см. 2-ю стр. обложки) были менее чувствительны к апоптозу, индуцированному H₂O₂, чем клетки здоровых доноров.

Уровень апоптотической активности (количество аннексин V-положительных клеток на ранней и поздней стадиях апоптоза в свежeweделенных лимфоцитах (0 мкМ H₂O₂) здоровых доноров (рис. 2А, см. 2-ю стр. обложки) был выше по сравнению с образцами пациентов с АИТ (рис. 2Б, см. 2-ю стр. обложки). Это различие достоверно возрастало при культивировании клеток в присутствии экзогенной H₂O₂ как на ранней стадии, так и на позднем этапе апоптоза (рис. 2В, см. 2-ю стр. обложки). Среднее значение апоптотической активности в свежeweделенных клетках пациентов с АИТ было достоверно ниже контроля в среднем в 1,2 раза. Под влиянием возрастающей концентраций экзогенной H₂O₂ в Т-лимфоцитах пациентов с АИТ доля апоптотирующих клеток снижалась в среднем в 1,4 раза при 10 мкМ, 1,8 раза при 20 мкМ и 1,3 раза при 40 мкМ.

Эффект ОС зависит от силы и формы его выраженности, в частности клетки при небольших нарушениях могут вернуться в исходное состояние, а более выраженный ОС приводит к возникновению в клетке необратимых нарушений, и, в зависимости от его силы, клетки могут погибнуть либо некрозом, либо, включив механизмы ПКГ, апоптозом и аутофагией [15]. Как следует из полученных нами данных, инкубация клеток при низких концентрациях H₂O₂ (до 10 мкМ) приводила к достоверному росту доли FITC⁺/PI⁺ клеток (рис. 2А, Б, см. 2-ю стр. обложки). H₂O₂ в концентрации 20 мкМ способствовала увеличению доли FITC⁺/PI⁺ клеток здоровых доноров и пациентов с АИТ до 34,7% и 16,1% соответственно, доля FITC⁺PI⁺ в среднем составляла примерно 2% (рис. 2А, Б, см. 2-ю стр. обложки). При повышении концентрации H₂O₂ до 40 мкМ доля FITC⁺/PI⁺Т-лимфоцитов здоровых доноров составляла 56,5%, доля FITC⁺PI⁺ — 0,86%.

В образцах пациентов с АИТ доля FITC⁺/PI⁺ снижалась до 44,1%, а доля некротических (FITC⁺/PI⁺) клеток возрастала до 6,13% по сравнению с образцами контроля, что может свидетельствовать о нарушении реализации апоптоза: снижение апоптотической активности может быть связано со стимуляцией в цитоплазме митохондриальной аутофагии, которая развивается при некрозе клеток.

Ранее в исследованиях Уразова О.А. и соавт. [16] также было показано, что содержание FITC⁺/PI⁺ клеток у больных аутоиммунными тиреопатиями было ниже нормы: при АИТ в фазу эутиреоза в 1,9 раза, в фазу гипотиреоза — в 2,4 раза, ДТЗ — в 4,6 раза. Таким образом, полученные нами данные соответствуют клиническому диагнозу пациентов — АИТ в фазе эутиреоза, при котором иммунная система человека начинает разрушать структуру ЩЖ, уничтожая клетки.

Т. к. АФК являются эффективными индукторами аутофагии [8, 23] для оценки аутофагической активности под действием H₂O₂, мы определяли количество аутофагосом в CD4⁺Т-лимфоцитах методом проточной цитометрии. Для этого использовали флуоресцентный краситель Cyto-ID, конъюгированный с флуорохромом FITC (флуоресцеин-5-изотиоцианат), который селективно связывается с аутофагосомами (рис. 3А, см. 3-ю стр. обложки).

В результате обнаружили, что в свежeweделенных CD4⁺Т-клетках пациентов с АИТ содержание аутофагосом достоверно выше по сравнению с контрольными образцами доноров (рис. 3Б, см. 3-ю стр. обложки). С увеличением концентрации H₂O₂ аутофагическая активность в условиях развития ОС понижалась как в Т-клетках здоровых доноров, так и пациентов с АИТ, но повышенное количество аутофагосом в клетках пациентов с АИТ сохранялось (рис. 3Б, см. 3-ю стр. обложки). Из полученных результатов следует, что у пациентов с АИТ в CD4⁺Т-лимфоцитах наблюдается как снижение чувствительности к апоптозу (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки), так и снижение активности аутофагии, которая сопровождается повышением количества аутофагосом в клетках (рис. 3Б, см. 3-ю стр. обложки) по сравнению с образцами контроля.

Как известно в норме конечным этапом аутофагии является слияние аутофагосомы с лизосомой с образованием аутофаголизосомы, которое приводит к деградации аутофагосомы вместе с грузом ферментами лизосом. Установленное нами повышенное содержание аутофагосом при АИТ может указывать на незавершенность процесса аутофагии в CD4⁺Т-лимфоцитах пациентов с АИТ (рис. 3, см. 3-ю стр. обложки) в стрессовых условиях.

Между аутофагией и апоптозом существует тесная взаимосвязь: оба процесса индуцируются АФК. В ответ на ОС аутофагия активируется, чтобы защитить клетки от апоптоза, тогда как ингибирование аутофагии приводит к накоплению повреждений, вызванных ОС, и гибели клеток [8], поэтому на следующем этапе мы оценили влияние ОС в CD4⁺Т-лимфоцитах на взаимосвязь апоптоза и аутофагии при АИТ. Учитывая, что в условиях ОС в клетке происходят нарушения структурных и функциональных элементов,

которые влияют на общий цитотоксический эффект АФК, мы провели анализ белков-маркеров аутофагии: p62, LC3I/II, белка-регулятора аутофагии mTOR и белка-регулятора апоптоза Bcl-2 при развитии ОС на фоне увеличения количества H₂O₂ (10 мкМ, 20 мкМ, 40 мкМ) (рис. 4).

Как следует из рисунка 4, при увеличении концентрации H₂O₂ на фоне низкого уровня mTOR в CD4⁺Т-лимфоцитах пациентов с АИТ экспрессируются цитоплазматический белок LC3-I, его липидированная форма LC3-II. Уровень белка-регулятора аутофагии p62 возрастает, а ингибитора апоптоза Bcl-2 снижается по отношению к образцам контроля.

При оценке результатов вестерн-блоттинга показали (рис. 5), что в свежeweделенных CD4⁺Т-лимфоцитах здоровых доноров (0 мкМ экзогенной H₂O₂) содержание антиаутофагической киназы mTOR (рис. 5А, а) достоверно выше по сравнению с образцами пациентов с АИТ (рис. 5А, б), что может говорить о базальном/репаративном уровне аутофагии в здоровых клетках, которая необходима для поддержания нормальных физиологических условий их функционирования. С увеличением концентрации H₂O₂ в CD4⁺Т-лимфоцитах здоровых доноров уровень киназы снижается в ответ на ОС, что говорит об активации аутофагии, а в Т-лимфоцитах пациентов с АИТ не изменяется (рис. 5А, а).

Баланс между аутофагией и апоптозом поддерживается системой взаимодействий между сигнальными путями, в которых задействованы как ключевые белки аутофагии, так и апоптоза [27]. Одним из общих регуляторов этого взаимодействия является белок Bcl-2. Этот белок относится к белкам-ингибиторам посткаспазного каскада, которые регулируют митохондриальный путь апоптоза. В клетках белок Bcl-2 связан с внешней митохондриальной мембраной и контролирует каналы транспорта цитохрома с и протеазы АИФ. Таким образом, белок, закрывая эти каналы, защищает клетку от спонтанного апоптоза [12, 51].

Изучение особенностей экспрессии Bcl-2 в интактных CD4⁺Т-лимфоцитах здоровых доноров показало крайне низкую интенсивность экспрессии этого белка (рис. 5Б, а), что можно связать с устойчивостью зрелых CD4⁺Т-лимфоцитов к апоптозу, при нормальных физиологических условиях функционирования [22]. В свежeweделенных клетках пациентов с АИТ определили достоверно высокий по сравнению с контролем уровень экспрессии Bcl-2 (рис. 5Б, б). Таким образом, установленное (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки) методом проточной цитометрии снижение чувствительности свежeweделенных CD4⁺Т-лимфоцитов пациентов с АИТ к апоптозу может быть связано с тем, что сверхэкспрессия Bcl-2 повышает устойчивость клеток к апоптозу под действием эндогенной H₂O₂. Ранее было установле-

но [49], что регуляция избыточных уровней Bcl-2 помогает гарантировать, что апоптоз происходит только тогда, когда это необходимо, способствуя поддержанию клеточного гомеостаза.

Добавление экзогенной H₂O₂ (10 мкМ, 20 мкМ, 40 мкМ) дозозависимо снижало экспрессию Bcl-2 в CD4⁺Т-лимфоцитах (рис. 5А, б), что сопровождалось повышением количества аутофагосом в этих клетках (рис. 3Б, см. 3-ю стр. обложки) по сравнению с образцами контроля, что говорит об активации аутофагии. Полученные результаты согласуются с данными работы [45], в которой было показано, что снижение экспрессии белка Bcl-2 может усиливать аутофагию каспаза-независимым путем, в результате в клетках формировались многочисленные аутофагосомы при интактных ядрах и интактных мтХ без вовлечения активации каспаз [17].

Таким образом, снижение содержания в клетках Bcl-2 при повышении экзогенной H₂O₂ (10 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ, 40 мкМ) может быть причиной зарегистрированного ранее (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки) снижения раннего апоптоза, повышения на поздней стадии апоптоза количества апоптотических и вторично-некротических клеток и увеличения некротизированных клеток у пациентов с АИТ. Конверсия апоптотических клеток во вторично-некротические происходит, как правило, при нарушении их утилизации в результате дисфункции мтХ, выражающейся в повышении проницаемости их мембран и снижении трансмембранного потенциала. Т. е. «умирающие клетки» влияют на живой организм пе-

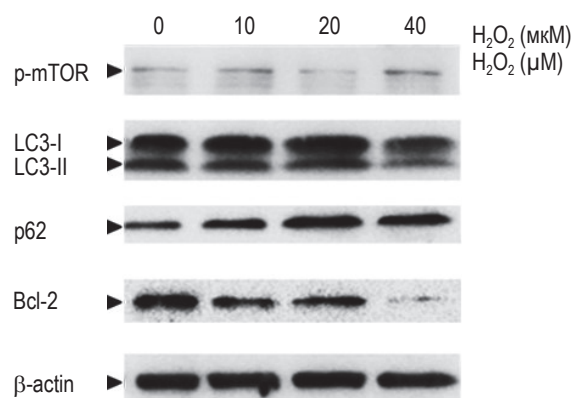


Рисунок 4. Оценка содержания белков-маркеров аутофагии: p62, LC3I/II, регуляторов аутофагии (киназы mTOR) и регулятора апоптоза (Bcl-2) в CD4⁺Т-лимфоцитах больных АИТ с эутиреозом и здоровых доноров методом иммуноблоттинга

Примечание. Показаны репрезентативные данные.

Figure 4. Evaluation of the content of autophagy marker proteins: p62, LC3I/II, autophagy regulators (mTOR kinases) and apoptosis regulator (Bcl-2) in CD4⁺T lymphocytes of euthyroid AIT patients and healthy donors by immunoblotting. Note. Representative data are shown.

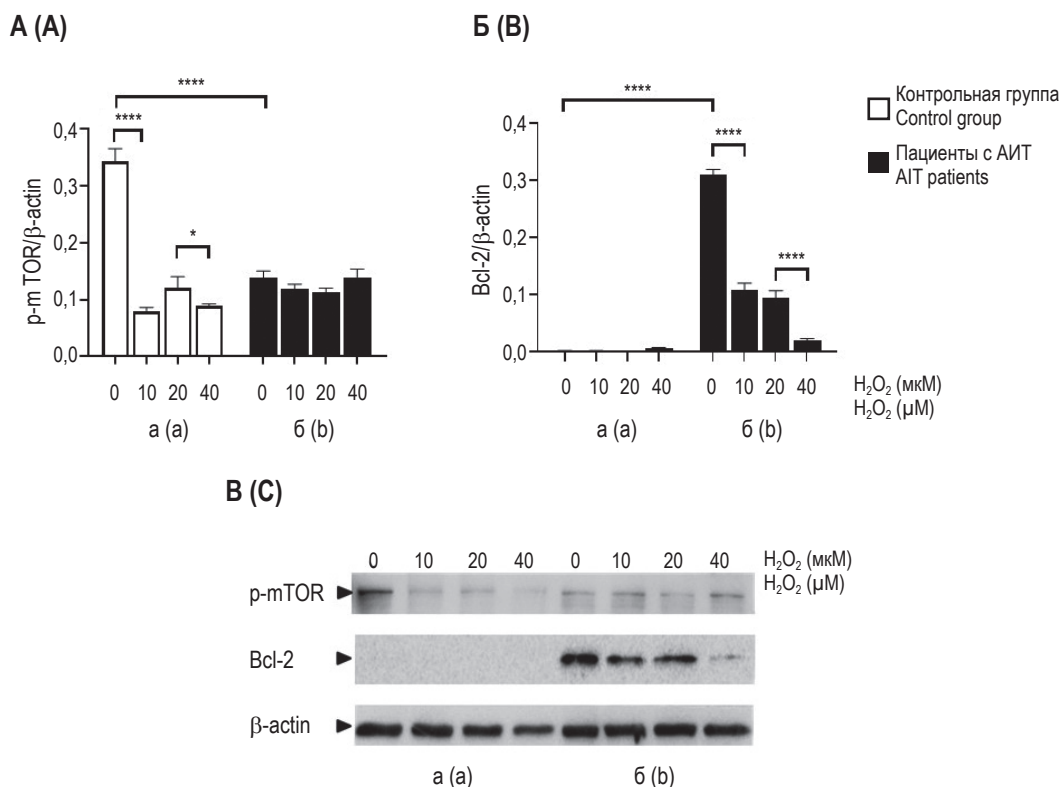


Рисунок 5. Сравнение уровня экспрессии киназы mTOR (А) и белка-регулятора Bcl-2 (Б) в CD4⁺T-лимфоцитах при развитии окислительного стресса при добавлении экзогенной H_2O_2 (10 мкМ, 20 мкМ, 40 мкМ)

Примечание. А и Б – результаты денситометрии представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM. * – $p < 0,05$, **** – $p < 0,0001$. В – белковый иммуноблот определения в образце mTOR и Bcl-2. а – образцы CD4⁺T-лимфоцитов здоровых доноров, б – пациентов с АИТ.

Figure 5. Comparison of the expression level of mTOR kinase (A) and the Bcl-2 regulatory protein (B) in CD4⁺T lymphocytes during the development of oxidative stress with the addition of exogenous H_2O_2 (10 μ M, 20 μ M, 40 μ M)

Note. A and B, the densitometry results are presented as the mean $\pm$ SEM. *, $p < 0.05$; ****, $p < 0.0001$. C, protein immunoblot of the determination of mTOR and Bcl-2 in the sample. a, CD4⁺T lymphocyte samples from healthy donors, b, patients with AIT.

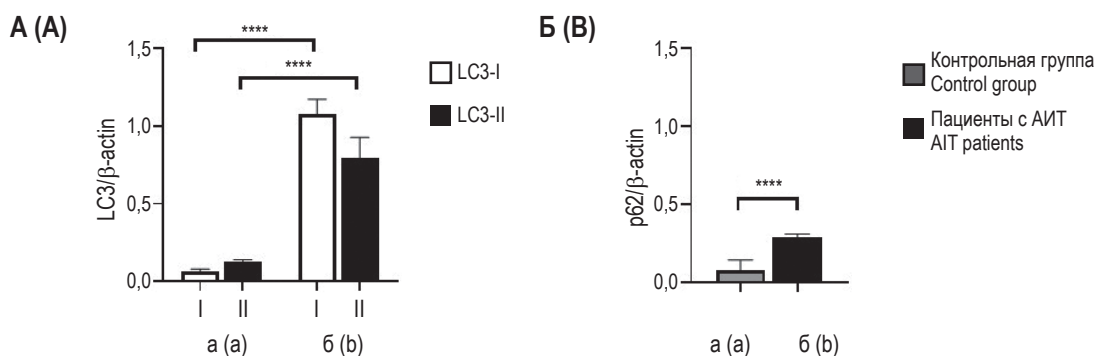


Рисунок 6. Сравнение экспрессии ключевых белков аутофагии LC3 (биомаркер формирования активных аутофагосом) (А) и адаптерного белка p62 (регулятор аутофагии, участвующий в формировании аутофагосом) (Б) в свежeweделенных CD4⁺T-лимфоцитах

Примечание. а – образцы CD4⁺T-лимфоцитов здоровых доноров, б – пациентов с АИТ. I – цитоплазматическая (LC3-I) и II – липидированная (LC3-II) формы LC3-белка. Результаты денситометрии представлены в виде среднего значения $\pm$ SEM. **** – $p < 0,0001$.

Figure 6. Comparison of expression of key autophagy proteins LC3 (biomarker of active autophagosome formation) (A) and adapter protein p62 (autophagy regulator involved in autophagosome formation) (B) in freshly isolated CD4⁺T lymphocytes

Note. a, CD4⁺T lymphocyte samples from healthy donors, b, from patients with AIT. I, cytoplasmic (LC3-I) and II, lipidated (LC3-II) forms of LC3 protein. Densitometry results are presented as mean $\pm$ SEM. ****, $p < 0.0001$.

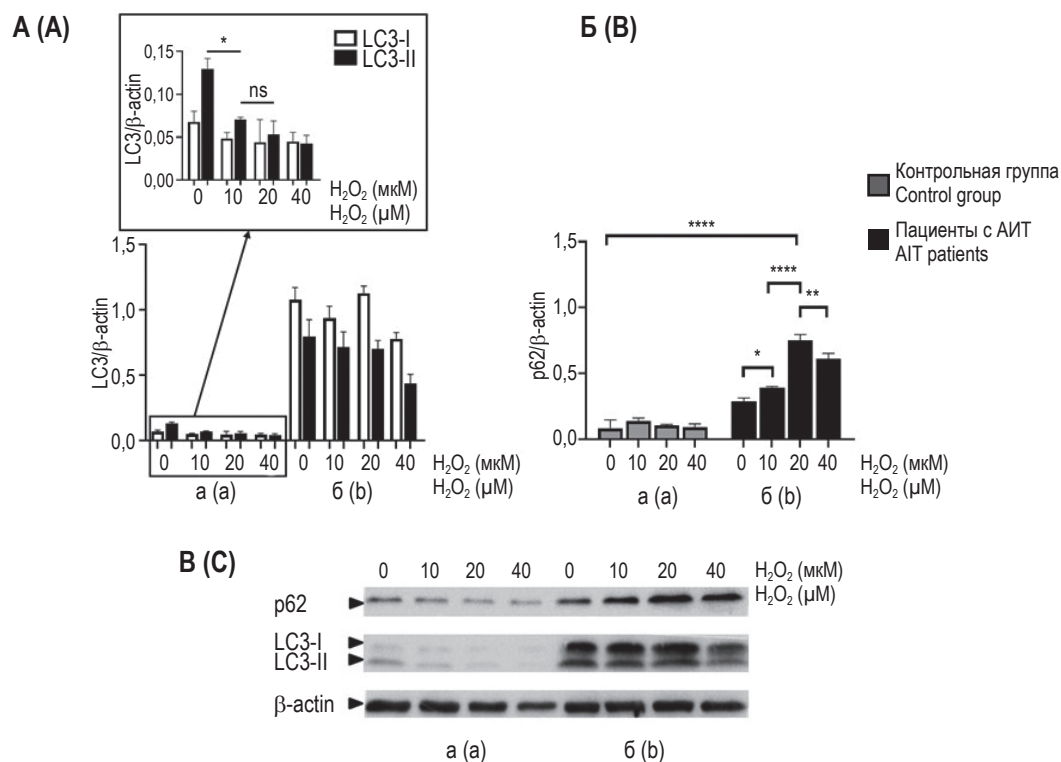


Рисунок 7. Сравнение уровня экспрессии цитоплазматического белка LC3-I и мембраносвязанного LC3-II белка (А) и белка-адаптера p62 (Б) в CD4⁺Т-лимфоцитах при развитии окислительного стресса при добавлении экзогенной H₂O₂ (10 мкМ, 20 мкМ, 40 мкМ)

Примечание. А и Б – результаты денситометрии представлены в виде среднего значения ± SEM; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,005$, **** – $p < 0,0001$. В – белковый иммуноблот определения в образце LC3/II белка и p62 белка. а – образцы CD4⁺Т-лимфоцитов здоровых доноров, б – пациентов с АИТ.

Figure 7. Comparison of the expression level of cytoplasmic LC3-I protein and membrane-bound LC3-II protein (A) and adapter protein p62 (B) in CD4⁺T lymphocytes during the development of oxidative stress with the addition of exogenous H₂O₂ (10 μM, 20 μM, 40 μM)

Note. A and B, densitometry results are presented as the mean ± SEM. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$; ****, $p < 0.0001$. C, protein immunoblot for the determination of LC3/II protein and p62 protein in the sample. a, samples of CD4⁺T lymphocytes from healthy donors, b, patients with AIT.

реходом клеток на поздние этапы апоптоза, что сопровождается снижением антиоксидантной защиты и развитием аутоиммунной реакции [24].

Один из важных механизмов, с помощью которого аутофагия ингибирует апоптоз, заключается в том, что она может поглощать поврежденные мтХ. При благоприятных условиях конститутивная аутофагия выполняет функцию контроля качества этих клеточных компонентов. При нехватке энергии аутофагия становится механизмом удаления поврежденных структур и ремобилизации метаболитов, используемых для синтеза новых структур и АТФ, что способствует выживанию клетки. Ключевые белки аутофагии LC3 (биомаркер формирования активных аутофагосом) и адаптерный белок p62 (регулятор аутофагии, участвующий в формировании фагофора аутофагосом) находятся в тесном взаимодействии с митохондриальными белками и участвуют в индукции конститутивной митофагии (удаление поврежденных мтХ) [44].

При оценке уровня аутофагии (рис. 6) в интактных CD4⁺Т лимфоцитах (0 мкМ H₂O₂) мы установили повышение уровня биомаркера формирования активных аутофагосом – LC3 (рис. 6А, б) и адаптерного белка p62 (рис. 6Б, б) в CD4⁺Т-лимфоцитах пациентов с АИТ.

Увеличение экспрессии LC3-I (рис. 6А, б) у пациентов с АИТ свидетельствует об увеличении активности процесса аутофагии по сравнению с образцами контроля. Соотношение этих белков (LC3-I/LC3-II) в Т-лимфоцитах пациентов с АИТ (рис. 6А, б) было достоверно ($p < 0,0001$) выше, чем в образцах контроля (рис. 6А, а), таким образом нарастание соотношения LC3-I/LC3-II может свидетельствовать об активации инициации аутофагии при АИТ.

На экспериментальной модели в условиях увеличения концентрации экзогенной H₂O₂ (10 мкМ, 20 мкМ, 40 мкМ) мы показали, что в CD4⁺Т-лимфоцитах здоровых доноров снижается уровень маркера аутофагосом LC3-II (рис. 7А)

и белка-адаптора р62 (рис. 7Б, а), что может свидетельствовать о репаративной форме аутофагии в норме в результате запуска антиоксидантной системы.

В клетках пациентов с АИТ в условиях увеличения концентрации экзогенной H_2O_2 (рис. 7) мы обнаружили, что АФК существенно не влияют на рост экспрессии LC3-I и скорость конверсии формы LC3-I в LC3-II по сравнению с контрольным образцом свежесыведенных клеток, за исключением высокой дозы H_2O_2 (40 мкМ) (рис. 7А, б), что происходило на фоне накопления белка-адаптера р62 (рис. 7Б, б и 7В). Это наблюдение может быть связано с нарушением базового уровня процесса аутофагии и скорости деградации аутофагосом.

Скопление р62 регистрируют на внешней мембране мтХ, поэтому полученные нами данные могут свидетельствовать [21] об участии митофагии в патогенезе АИТ. Белок р62 (рецептор груза) функционирует как селективный рецептор митофагии для деградации убиквитинированных субстратов. Благодаря наличию LC3 – взаимодействующего мотива (LIR), молекула р62 вместе с грузом связывается с LC3-II белком в составе фагофора аутофагосомы при митофагии. Нарушение процесса аутофагии приводит к накоплению р62, поэтому уровни р62 используются в качестве маркера аутофагического потока вместе с LC3-II белком [32].

Как следует из результатов рисунка 7Б (б), увеличение концентрации H_2O_2 значительно ингибирует деградацию р62, что также указывает на возможную дисфункцию аутофагии. Таким образом, из данного эксперимента следует, что при ОС в $CD4^+$ Т-лимфоцитах у пациентов с АИТ на-

блюдается нарушение процесса аутофагии, что подтверждается накоплением белка р62 при высоких уровнях белка LC3, в то время как у здоровых доноров можно говорить о репаративной форме аутофагии.

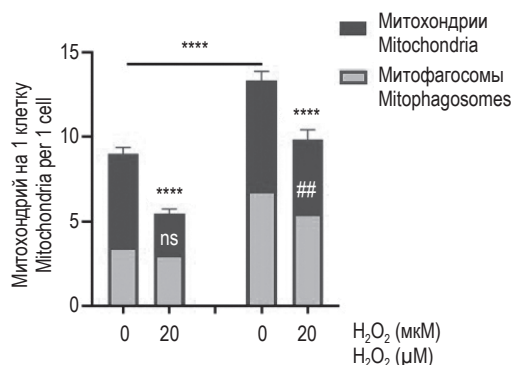
По результатам проточной цитометрии (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки) у пациентов с АИТ при развитии ОС происходит снижение активации апоптоза. Один из механизмов, с помощью которого аутофагия может ингибировать апоптоз, заключается в том, что она может поглощать поврежденные мтХ (митофагия). Поэтому мы оценили состояние мтХ в $CD4^+$ Т-лимфоцитах методом конфокальной микроскопии. МтХ и митофагосомы (мтФ) окрашивали с помощью красителей MitoTracker и СITO-ID соответственно и далее определяли их колокализацию (рис. 8, см. 3-ю стр. обложки).

В результате выявили повышение митохондриального пула у пациентов с АИТ в свежесыведенных клетках по сравнению с контрольными образцами, который снижался при внесении 20 мкМ экзогенной H_2O_2 (рис. 8А, см. 3-ю стр. обложки).

Повышение пула мтХ в образцах пациентов с АИТ было связано с увеличением количества мтФ. В контрольной группе, как показано на рисунке 8Б (см. 3-ю стр. обложки) преобладали аутофагосомы.

Чтобы выяснить, как $CD4^+$ Т-клетки реагируют на H_2O_2 , мы оценили соотношение уровня мтФ к уровню мтХ на одну клетку с базальным уровнем H_2O_2 здоровых доноров и пациентов с АИТ и при добавлении 20 мкМ H_2O_2 (рис. 9). И установили, что уровень мтФ достоверно выше у пациентов с

А (А)



Б (Б)

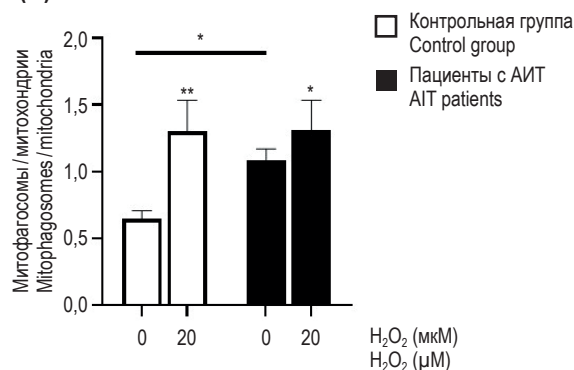


Рисунок 9. Оценка митофагии в $CD4^+$ Т-лимфоцитах

Примечание. А – количество митохондрий и митофагосом на 1 клетку здоровых доноров (А, а) и пациентов с АИТ (А, б) при окислительном стрессе. Б – соотношение количества митофагосом к количеству митохондрий (FC) в клетке здоровых доноров (Б, а) и пациентов с АИТ (Б, б); * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,005$, **** – $p < 0,0001$. Показаны репрезентативные данные.

Figure 9. Evaluation of mitophagy in $CD4^+$ Т lymphocytes

Note. A, the number of mitochondria and mitophagosomes per 1 cell of healthy donors (A, a) and AIT patients (A, b) during oxidative stress. B, the ratio of the number of mitophagosomes to the number of mitochondria (FC) in the cell of healthy donors (B, a) and AIT patients (B, b); *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ****, $p < 0,0001$. Representative data are shown.

АИТ как в свежевыделенных клетках, так и при внесении экзогенной H₂O₂ (рис. 9А, Б).

Мерой устойчивости клеток к препарату считают отношение количества измененных клеток к аналогичному показателю «здоровых клеток». Этот параметр называют изменением устойчивости (fold change-FC) или показателем кратности. Показатель кратности у резистентного (устойчивого) варианта клеток всегда меньше 1, у гиперчувствительных — больше 1. Мы определяли FC по формуле: $FC_{H_2O_2} = C_{мтФ} / C_{мтХ}$. Как следует из рисунка 9Б, показатель кратности, который отражает количество мтФ на 1 клетку, в свежевыделенных клетках здоровых доноров ниже 1 (FC = 0,65), а при действии H₂O₂ достоверно возрастал до FC = 1,304 (p < 0,005); в свежевыделенных клетках пациентов с АИТ FC — больше 1 (FC = 1,08), который также достоверно возрастал (p < 0,05) под действием H₂O₂ до FC = 1,310. Т. е. добавление экзогенной H₂O₂, как мы полагаем, увеличивает количество поврежденных мтХ. Также следует отметить, что в здоровых клетках количество мтХ превышает количество мтФ.

На основе полученных данных можно предположить, что H₂O₂ вызывает активацию митофагии в CD4⁺Т-лимфоцитах пациентов с АИТ, а развитие ОС при избыточной продукции АФК приводит к необратимым повреждениям мтХ, которые приводят к снижению апоптотической активности и, как следствие, развитию вторичного некроза CD4⁺Т-лимфоцитов при АИТ (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки).

Обсуждение

Цитотоксический потенциал активированных Т-лимфоцитов реализуется двумя способами: за счет экзоцитоза гранул, содержащих перфорин и гранзим В (т. е. за счет прямой активации каспаз клеток-мишеней). В этом случае действуют преимущественно CD8⁺ лимфоциты, тогда как цитотоксический эффект CD4⁺Т-лимфоцитов (Th1-лимфоцитов), которые в большом количестве присутствуют в тироцитах при АИТ, осуществляется в основном через клеточные «рецепторы смерти», и главным посредником цитотоксического действия этих клеток являются «смертельные лиганды» (FasL, TRAIL) [35]. При АИТ фолликулярные клетки ЩЖ, окруженные лимфоцитами, обнаруживают все признаки апоптоза [9]. Особенно в разрушенных фолликулах вблизи инфильтрированных областей по сравнению с неаутоиммунными железами. По данным [35], интратироидные лимфоциты из ЩЖ при АИТ сохраняют функциональную активность киллера. Эти результаты, по мнению авторов, говорят о том, что интратироидные лимфоциты могут быть ответственны за гибель тиро-

цитов *in vivo*. При АИТ также было обнаружено нарушение генов антиапоптоза Bcl-2 и Bcl-X на тироцитах. Эти результаты свидетельствуют о том, что гибель тироцитов может быть результатом не только специфических взаимодействий между рецепторами смерти и их лигандами, но и связано с нарушением защитных генов семейства Bcl-2. Является ли нарушение семейства Bcl-2 прямым следствием воздействия окружающей среды или результатом внутреннего изменения тироцитов (мтХ?), на тот период было неизвестно [35]. В другой работе [31] было показано, что опосредованный рецепторами апоптоз регулируется ингибиторами посткаспазного каскада, к которому относится белок Bcl-2, влияющий на проницаемость митохондриальной мембраны, которой принадлежит одна из центральных ролей в регуляции апоптоза. Белок препятствует повышению проницаемости митохондриальной мембраны и тем самым блокирует процесс апоптоза.

Еще одним важным аспектом в оценке влияния ОС на поведении Т-лимфоцитов при АИТ является образование количеств активированных кислородных метаболитов. МтХ — поставщики энергии в клетке: они производят АТФ, за счет которой происходят практически все биохимические процессы. Ранее считалось, что роль мтХ в развитии патологий — это нарушение энергообеспечения, например при дефиците кислорода или генетических нарушениях. В настоящее время стали обращать внимание на специфические процессы, в которых участвуют мтХ: это нарушение внутриклеточной передачи сигналов, включая один из наиболее изучаемых митохондриальных процессов — генерацию активированных кислородных метаболитов и выход из мтХ в цитоплазму белков, активирующих процесс апоптоза (например, цитохрома с). Эти функции мтХ, как правило, связаны с нарушением их биоэнергетических функций и избыточной продукцией H₂O₂. С другой стороны, по новым данным, в условиях гипоксии мтХ подвергаются делению и выглядят как отдельные органеллы митохондриальной сети, что нужно для содействия митофагии, поддержания продукции H₂O₂ на физиологически низком уровне и поддержания клеточного гомеостаза за счет снижения дыхательной активности. Таким образом, если роль митохондриальных АФК (митоАФК) в ОС достаточно хорошо известна, то их участие в иммунном ответе в настоящее время представляет собой активно развивающееся направление, в частности есть данные, которые позволяют предположить, что митоАФК являются потенциально незаменимыми факторами для активации Т-клеток, их эффекторных функций и дифференцировки [41]. Например, ведущее значение клеточному звену иммунитета придают при патогенезе АИТ. Предполагается

несколько механизмов развития, и по одному из них [39, 46] АИТ характеризуется иммуно-опосредованной деструкцией ЩЖ вследствие апоптоза тиреоцитов. Гибель тиреоцитов связывают с цитотоксическим эффектом в результате активации CD4⁺T-клеток, инфильтрирующих ЩЖ [5, 7]. Происходит апоптоз тиреоцитов в результате индуцированной цитокинами экспрессии FasR и FasL (FasL экспрессируется на поверхности активированных Т-лимфоцитов и связывается с FasR клетки-мишени) и проапоптотических белков.

По другому механизму разрушение клеток ЩЖ является следствием усиления ОС [13]. Активированные кислородные метаболиты участвуют во взаимодействии между аутофагией и апоптозом благодаря способности H₂O₂ опосредовать окислительно-восстановительные сигнальные пути. Это взаимодействие запускает реакцию аутофагии, которая в дальнейшем вызывает ОС, если функция аутофагии нарушается.

Впервые участие мтХ в процессе аутофагии обнаружили в 2010 году, когда Hailey D.W. и соавт. [25] наблюдали транслокацию некоторых митохондриальных белков, например белка наружной митохондриальной мембраны, в аутофагосомы.

Одной из связей между аутофагией и мтХ является избирательное устранение избыточных или поврежденных мтХ (митофагия), которые и сами являются значительным источником ОС. Таким образом, количество и функциональная активность мтХ регулируются митофагией — процессом, при котором поврежденные мтХ подвергаются аутофагической деградации. Хотя долгое время предполагалось, что это случайный процесс, доказательства указывают на то, что митофагия является избирательным процессом [29]. Следовательно, аутофагия является ключевым фактором, определяющим здоровье мтХ и правильное функционирование клеток.

Помимо значения аутофагии для целостности мтХ, ряд работ указывают на то, что мтХ также могут существенно влиять на процесс аутофагии. Способность мтХ влиять и подвергаться влиянию аутофагии ставит мтХ и аутофагию в уникальное положение, где дефекты в одной или другой системе могут увеличить риск различных метаболических и аутофагических заболеваний.

Итак, дополнительным митохондриальным продуктом, влияющим на аутофагию, являются активированные кислородные метаболиты. Во время голодания питательных веществ повышение уровня H₂O₂ необходимо для индукции аутофагии. Белок аутофагии — редокс-регулируемый фермент — цистеин-зависимая протеаза ATG4, — был идентифицирован как основа окислительно-восстановительной чувствительности аутофагии. Основная функция этого фермента — процессинг

белка Atg8 (LC3), который после такой посттрансляционной модификации становится способным связывать фосфотидилэтаноламин и, таким образом, инициировать образование аутофагосомы. На протяжении всего формирования аутофагосомы благодаря частичному протеолизу аминокислотной последовательности с С-конца LC3-I белка становится возможным его связывание с аминокислотной группой фосфатидилэтаноламина в зарождающейся аутофагосомальной мембране (белок получает название LC3-II) [28]. На сегодняшний день ATG4 считается наиболее известным белком аутофагии, который регулируется сигнализацией АФК, но другие белки также могут вносить дополнительный вклад в окислительно-восстановительную регуляцию процесса аутофагии, включая самый главный регулятор аутофагии — mTOR [40].

Белок mTOR также является одним из факторов молекулярного взаимодействия путей аутофагии и апоптоза. mTOR контролирует сигналы о питательных и энергетических ресурсах клетки, и, при достаточном количестве этих ресурсов, поддерживается базальный (репаративный) уровень аутофагии, необходимый для поддержания нормальных физиологических условий функционирования клеток. Гиперактивированный mTOR приводит к чрезмерной стимуляции биосинтеза белка в клетке и подавлению аутофагии, что, в свою очередь, приводит к окислительному и протеотоксическому стрессу. Снижение активности этой киназы является причиной некротической гибели клеток и изменения тканевой структуры [53]. Как следует из экспериментальных данных (рис. 5В, а), на фоне mTOR, контролирующего сигналы об энергетических ресурсах клетки, в CD4⁺T-лимфоцитах здоровых доноров при нормальных физиологических условиях функционирования клеток с увеличением концентрации H₂O₂ уровень этой киназы снижается в ответ на ОС, что говорит об активации аутофагии на фоне очень низкого уровня экспрессии Bcl-2 белка, в то время как в CD4⁺T-лимфоцитах пациентов с АИТ реакция mTOR на повышение H₂O₂ нарушена.

Каноническая функция Bcl-2 связана с его способностью ингибировать проницаемость митохондриальной мембраны, регулируя сборку и активацию апоптосомы путем блокирования цитозольной транслокации факторов смерти, например цитохрома с. Помимо поддержания митохондриальной целостности, Bcl-2 связан с клеточным окислительно-восстановительным состоянием. Сверхэкспрессия Bcl-2 модулирует митохондриальный окислительно-восстановительный метаболизм, создавая «прооксидантную» среду, благоприятную для выживания клеток. В условиях ОС Bcl-2 функционирует как окислительно-восстановительный сток, предот-

вращая чрезмерное накопление АФК, ингибируя сигналы выполнения. Данные [37] указывают на различные окислительно-восстановительные транскрипционные изменения и посттрансляционные модификации с различными функциональными результатами.

Нами показано, что при АИТ задействован внутренний, т. е. митотический путь апоптоза, причем активность этого процесса ниже по сравнению с образцами контроля (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки), более того, апоптоз представлен не только стадией позднего апоптоза, но и накоплением некротических клеток. Маркеры аутофагии также показали отклонение в функционировании от нормы: отмечено повышенное количество белка Bcl-2 у пациентов с АИТ (рис. 5Б, 6) и накапливается количество p62 белка (рис. 6Б). Эти биохимические показатели свидетельствовали о возможном повреждении мтХ при АИТ. Что было подтверждено при экспериментальном исследовании: в клетках пациентов с АИТ обнаружено повышенное содержание мтФ (рис. 8, см. 3-ю стр. обложки) по сравнению с контрольными образцами, а относительное содержание мтФ к мтХ достоверно было выше по сравнению с контрольными образцами.

Итак, АФК являются основным выражением ОС в биологических системах, и их продукция может преодолеть антиоксидантную защиту, в конечном итоге приводя к повреждению клеток, апоптозу и смерти. Данные клинических исследований четко указывают на то, что баланс между окислителями и антиоксидантами смещен в сторону окислительной активности у пациентов с АИТ, что позволяет предположить, что ОС может быть ключевым событием в патофизиологии заболевания, независимо от функции ЩЖ. Исследования на моделях животных, таких как мыши NOD.H2h4, подтверждают, что накопление АФК в ЩЖ играет роль в инициировании и прогрессировании АИТ [43].

Как известно, аутофагия — это одна из основных форм клеточной защиты от ОС: в норме АФК активируют аутофагию, которая облегчает клеточную адаптацию и уменьшает окислительное повреждение за счет деградации и переработки внутриклеточных поврежденных макромолекул и дисфункциональных органелл. Нарушение окислительно-восстановительного гомеостаза при патологических состояниях ведет к чрезмерному образованию АФК, что приводит к ОС и связанному с ним окислительному повреждению клеточных компонентов [34]. Современные исследования предполагают центральную роль аутофагии как реакции на ОС у млекопитающих и ее взаимосвязь с другими системами защиты от стресса.

Измененные фенотипы аутофагии наблюдались при заболеваниях онкологических, нейродегенеративных, иммунных, в частности астмы, и заболеваниях ЩЖ, поэтому понимание механизмов, с помощью которых АФК регулируют аутофагию, может предложить новые терапевтические цели для лечения заболеваний.

Заключение

Каноническая функция Bcl-2 связана с его способностью ингибировать проницаемость митохондриальной мембраны, помимо поддержания митохондриальной целостности, Bcl-2 связан с клеточным окислительно-восстановительным состоянием, кроме того, функция ингибирования апоптоза белком Bcl-2 тесно связана с сигнальным путем ПКГ II типа, т. е. аутофагией. Маркеры аутофагии также показали отклонение в функционировании от нормы: отмечено повышенное количество белка Bcl-2 у пациентов с АИТ (рис. 5Б, 6) и накапливается количество p62 белка (рис. 6Б). Эти биохимические показатели свидетельствовали о возможном повреждении мтХ при АИТ.

Ключевые белки макроаутофагии LC3 (биомаркер формирования активных аутофагосом) и адаптерный белок p62 (регулятор аутофагии, участвующий в формировании аутофагосом) также находятся в тесном взаимодействии с митохондриальными белками и участвуют в индукции конститутивной митофагии. Функциональное связывание липидированной формы белка LC3-II и p62 важно для нормального протекания этого процесса [44]. На экспериментальной модели в условиях возрастания перекиси H₂O₂ мы показали, что АФК активируют цитоплазматический LC3-I в клетках пациентов с АИТ, и накапливается аутофагический белок-адаптер p62, который регистрируется на внешней митохондриальной мембране, что свидетельствует об участии митофагии в патогенезе заболеваний [21]. И установленный в эксперименте повышенный уровень мтФ в CD4⁺T-клетках пациентов с АИТ (рис. 8, см. 3-ю стр. обложки) подтверждает наше предположение о нарушении функций мтХ при АИТ, делая CD4⁺T-клетки цитотоксическими.

Накопление таких клеток в ткани ЩЖ может приводить к нарушению апоптоза в тироцитах и, как следствие, ко вторичному некрозу. Результат — развитие аутоиммунного ответа. Полученные данные требуют дополнительных исследований, т. к. выявление в крови пациентов с АИТ CD4⁺T-лимфоцитов, склонных к апоптозу или к некрозу, может использоваться как диагностический критерий прогноза воспалительного процесса.

Список литературы / References

1. Архипов С.А., Шкурूपий В.А., Зайковская М.В., Ахраменко Е.С., Ильин Д.А. Разнонаправленные эффекты H_2O_2 на макрофаги и фибробласты в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro* // Современные наукоемкие технологии, 2010. № 8. С. 76-77. [Arkhipov S.A., Shkurupiy V.A., Zaikovskaya M.V., Akhramenko E.S., Ilyin D.A. Multidirectional effects of H_2O_2 on macrophages and fibroblasts under conditions of *in vitro* oxidative stress modeling. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii = Modern High-Tech Technologies*, 2010, no. 8, pp. 76-77. (In Russ.)]
2. Бра М., Квинан Б., Сузин С.А. Митохондрии в программированной гибели клетки: различные механизмы гибели (обзор) // Биохимия, 2005. Т. 70, № 2. С. 284-293. [Bra M., Kvinan B., Suzin S.A. Mitochondria in programmed cell death: various mechanisms of death (review). *Biokhimiya = Biochemistry*, 2005, Vol. 70, no. 2, pp. 284-293. (In Russ.)]
3. Буданов А.В. Роль сестринов в регуляции клеточного ответа на стресс // Успехи современной биологии, 2022. Т. 142, № 1. С. 5-24. [Budanov A.V. The role of sestrins in the regulation of the cellular response to stress. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2022, Vol. 142, no. 1, pp. 5-24. (In Russ.)]
4. Буданов А.В. Роль сестринов в регуляции клеточного ответа на стресс // Успехи современной биологии, 2022. Т. 142, № 1. С. 5-24. [Budanov A.V. The role of sestrins in the regulation of cellular response to stress. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2022, Vol. 142, no. 1, pp. 5-24. (In Russ.)]
5. Вольпе Р. Болезни щитовидной железы / Под ред. Л.И. Бравермана: Пер. с англ. М.: Медицина, 2010. С. 140-172. [Volpe R. Diseases of the thyroid gland / Ed. L.I. Braverman: Trans. from English]. Moscow: Meditsina, 2010. pp. 140-172.
6. Гамалей И.А., Клубин И.В. Перекись водорода как сигнальная молекула // Цитология, 1996. Т. 38, № 12. С. 1233-1247. [Gamalei I.A., Klubin I.V. Hydrogen peroxide as a signaling molecule. *Tsitologiya = Tsitologiya*, 1996, Vol. 38, no. 12, pp. 1233-1247. (In Russ.)]
7. Жуклова С.И., Каннер И.Д., Мамонтова Т.М., Шеломенцева Е.М., Максимов М.Л. Роль Т-регуляторных клеток в аутоиммунном тиреоидите // Медицинский совет, 2020. № 21. С. 152-159. [Zhukova S.I., Kanner I.D., Mamontova T.M., Shelomentseva E.M., Maksimov M.L. The role of T-regulatory cells in autoimmune thyroiditis. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2020, no. 21, pp. 152-159. (In Russ.)]
8. Зенков Н.К., Чечушков А.В., Кожин П.М., Мартинович Г.Г., Кандалинцева Н.В., Меньщикова Е.Б. Аутофагия как механизм защиты при окислительном стрессе // Бюллетень сибирской медицины, 2019. Т. 18, № 2. С. 195-214. [Zenkov N.K., Chechushkov A.V., Kozhin P.M., Martinovich G.G., Kandalintseva N.V., Menshchikova E.B. Autophagy as a mechanism of protection under oxidative stress. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2019, Vol. 18, no. 2, pp. 195-214. (In Russ.)]
9. Кандрор В.И. Аутоиммунные заболевания щитовидной железы и апоптоз // Проблемы эндокринологии, 2002. Т. 48, № 1. С. 45-48. [Kandror V.I. Autoimmune diseases of the thyroid gland and apoptosis. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2002, Vol. 48, no. 1, pp. 45-48. (In Russ.)]
10. Кормош Н.Г. Физиологическая роль активных форм кислорода (субклеточный уровень) – взгляд клинициста // Российский биотерапевтический журнал, 2011. Т. 10, № 4. С. 29-35. [Kormosh N.G. The physiological role of reactive oxygen species (subcellular level) – a clinician's view. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal*, 2011, Vol. 10, no. 4, pp. 29-35. (In Russ.)]
11. Нуралиева Н.Ф., Юкина М.Ю., Трошина Е.А. Основы иммунопатогенеза аутоиммунных тиреопатий и сахарного диабета 1 типа // Доктор. Ру, 2019. № 4 (159). С. 49-53. [Nuralieva N.F., Yukina M.Yu., Troshina E.A. Fundamentals of immunopathogenesis of autoimmune thyropathies and type 1 diabetes mellitus. *Doktor.Ru = Doctor.Ru*, 2019, no. 4 (159), pp. 49-53. (In Russ.)]
12. Потапнев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология, 2002. Т. 23, № 4. С. 237-243. [Potapnev M.P. Apoptosis of immune system cells and its regulation by cytokines. *Immunologiya = Immunologiya*, 2002, Vol. 23, no. 4, pp. 237-243. (In Russ.)]
13. Рыбакова А.А., Платонова Н.М., Трошина Е.А. Оксидативный стресс и его роль в развитии аутоиммунных заболеваний щитовидной железы // Проблемы эндокринологии, 2019. Т. 65, № 6. С. 451-457. [Rybakova A.A., Platonova N.M., Troshina E.A. Oxidative stress and its role in the development of autoimmune thyroid diseases. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2019, Vol. 65, no. 6, pp. 451-457. (In Russ.)]
14. Трошина Е.А. Хронический аутоиммунный тиреоидит – «сигнальное заболевание» в составе мультиорганного аутоиммунного синдрома // Проблемы эндокринологии, 2023. Т. 69, № 4. С. 4-10. [Troshina E.A. Chronic autoimmune thyroiditis – a “signal disease” as part of a multiorgan autoimmune syndrome. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2023, Vol. 69, no. 4, pp. 4-10. (In Russ.)]
15. Тюкавин А.И., Сучков С.В. Молекулярные механизмы функционирования клетки в норме и патологии // Формулы Фармации, 2022. Т. 4, № 4. С. 26-40. [Tyukavin A.I., Suchkov S.V. Molecular mechanisms of cell functioning in norm and pathology. *Formuly Farmatsii = Formulas of Pharmacy*, 2022, Vol. 4, no. 4, pp. 26-40. (In Russ.)]
16. Уразова О.И., Кравец Е.Б., Новицкий В.В., Рогалева А.В., Будкина Т.Е., Синюкова О.А., Недосекова Ю.В., Кузнецова В.Н. Апоптоз лимфоцитов крови у больных аутоиммунными тиреопатиями // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 2-3. С. 187-192. [Urazova O.I., Kravets E.B., Novitsky V.V., Rogaleva A.V., Budkina T.E., Sinyukova O.A., Nedosekova Yu.V., Kuznetsova V.N. Apoptosis of lymphocytes of blood in patients with autoimmune thyroid diseases // *Meditsinskaya immunologiya*, 2008. T. 10, No. 2-3. P. 187-192.]

Budkina T.E., Sinyukova O.A., Nedosekova Yu.V., Kuznetsova V.N. Apoptosis of blood lymphocytes in patients with autoimmune thyropathies. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 10, no. 2-3, pp. 187-192. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2008-2-3-187-192.

17. Фрейдлин И.С., Маммедова Д.Т., Старикова Э.А. Роль аутофагии при инфекциях // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, 2019. Т. 105, № 12. С. 1486-1501. [Freidlin I.S., Mammadova D.T., Starikova E.A. The role of autophagy in infections. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology*, 2019, Vol. 105, no. 12, pp. 1486-1501. (In Russ.)]

18. Часовских Н.Ю., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Апоптоз и окислительный стресс. Томск: Печатная мануфактура, 2009. 148 с. [Chasovskikh N.Yu., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V. Apoptosis and oxidative stress]. Tomsk: Pechatnaya manufaktura, 2009. 148 p.

19. Ates I., Arikan M.F., Altay M., Yilmaz F.M., Yilmaz N., Berker D., Guler S. The effect of oxidative stress on the progression of Hashimoto's thyroiditis. *Arch. Physiol. Biochem.*, 2018, Vol. 124, no. 4, pp. 351-356.

20. Bermann M., Magee M., Koenig R.J., Kaplan M.M., Arscott P., Maastricht J., Johnson J., Baker J.R. Differential autoantibody responses to thyroid peroxidase in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1993, Vol. 77, no. 4, pp. 1098-1101.

21. Bjørkøy G., Lamark T., Brech A., Outzen H., Perander M., Øvervatn A., Stenmark H., Johansen T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.*, 2005, Vol. 171, no. 4, pp. 603-614.

22. Czabotar P.E., Lessene G., Strasser A., Adams J.M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2014, Vol. 15, no. 1, pp. 49-63.

23. Filomeni G., De Zio D., Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ.* 2015, Vol. 22, no. 3, pp. 377-388.

24. Green D.R. The end and after: how dying cells impact the living organism. *Immunity*, 2011, Vol. 35, no. 4, pp. 441-444.

25. Hailey D.W., Rambold A.S. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, 2010, Vol. 141, no. 4, pp. 656-667.

26. Hu H., Tian M., Ding C., Yu S. The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. *Front. Immunol.*, 2019, Vol. 9, 3083. doi: 10.3389/fimmu.2018.03083.

27. Jiang P., Mizushima N. Autophagy and human diseases. *Cell Res.*, 2014, Vol. 24, no. 1, pp. 69-79.

28. Kaminsky V., Zhivotovsky B. Proteases in autophagy. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, Vol. 1824, no. 1, pp. 44-50.

29. Kim I., Rodriguez-Enriquez S., Lemasters J.J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007, Vol. 462, no. 2, pp. 245-253.

30. Kochman J., Jakubczyk K., Bargiel P., Janda-Milczarek K. The influence of oxidative stress on thyroid diseases. *Antioxidants*, 2021, Vol. 10, no. 9, 1442. doi: 10.3390/antiox10091442.

31. Kroemer G., Reed J.C. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.*, 2000, Vol. 6, no. 5, pp. 513-519.

32. Kumar A.V., Mills J., Lapierre L.R. Selective autophagy receptor p62/SQSTM1, a pivotal player in stress and aging. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2022, Vol. 10, 793328. doi: 10.3389/fcell.2022.793328.

33. Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2010, Vol. 22, no. 2, pp. 132-139.

34. Ornatowski W., Lu Q., Yegambaram M., Garcia A.E., Zemskov E.A., Maltepe E., Fineman J.R., Wang T., Black S.M. Complex interplay between autophagy and oxidative stress in the development of pulmonary disease. *Redox Biol.*, 2020, Vol. 36, 101679. doi: 10.1016/j.redox.2020.101679.

35. Palazzo F.F., Hammond L.J., Goode A.W., Mirakian R. Death of the autoimmune thyrocyte: is it pushed or does it jump? *Thyroid*, 2000, Vol. 10, no. 7, pp. 561-572.

36. Peter C., Wesselborg S., Herrmann M., Lauber K. Dangerous attraction: phagocyte recruitment and danger signals of apoptotic and necrotic cells. *Apoptosis*, 2010, Vol. 15, no. 9, pp. 1007-1028.

37. Pohl S.Ö., Agostino M., Dharmarajan A., Pervaiz S. Cross talk between cellular redox state and the anti-apoptotic protein Bcl-2. *Antioxid. Redox Signal.*, 2018, Vol. 29, no. 13, pp. 1215-1236.

38. Pua H.H., Guo J., Komatsu M., He Y.W. Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 7, pp. 4046-4055.

39. Pyzik A., Grywalska E., Matyjaszek-Matuszek B., Roliński J. Immune disorders in Hashimoto's thyroiditis: what do we know so far? *J. Immunol. Res.*, 2015, Vol. 2015, no. 1, 979167. doi: 10.1155/2015/979167.

40. Rambold A.S., Lippincott-Schwartz J. Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk. *Cell Cycle*, 2011, Vol. 10, no. 23, pp. 4032-4038.

41. Reth M. Hydrogen peroxide as second messenger in lymphocyte activation. *Nat. Immunol.*, 2002, Vol. 3, no. 12, pp. 1129-1134.

42. Roth S., Dröge W. Regulation of T-cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. *Cell. Immunol.*, 1987, Vol. 108, no. 2, pp. 417-424.

43. Ruggeri R.M., Campenni A., Giuffrida G., Casciaro M., Barbalace M.C., Hrelia S., Trimarchi F., Cannavò S., Gangemi S. Oxidative stress as a key feature of autoimmune thyroiditis: an update. *Minerva Endocrinol.*, 2020, Vol. 45, no. 4, pp. 326-344.

44. Rui Y.N., Le W. Selective role of autophagy in neuronal function and neurodegenerative diseases. *Neurosci. Bull.*, 2015, Vol. 31, no. 4, 379-381.
45. Saeki K., Yuo A., Okuma E., Yazaki Y., Susin S.A., Kroemer G., Takaku F. Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell Death Differ.*, 2000, Vol. 7, no. 12, pp. 1263-1269.
46. Santaguida M.G., Gatto I., Mangino G., Virili C., Stramazzo I., Fallahi P., Antonelli A., Segni M., Romeo G., Centanni M. BREG cells in Hashimoto's thyroiditis isolated or associated to further organ-specific autoimmune diseases. *Clin. Immunol.*, 2017, Vol. 184, pp. 42-47.
47. Seong S.Y., Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 4, no. 6, pp. 469-478.
48. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.*, 1993, Vol. 215, no. 2, pp. 213-219.
49. Singh R., Letai A., Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2019, Vol. 20, no. 3, pp. 175-193.
50. Stone J.R., Collins T. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium*, 2002, Vol. 9, no. 4, pp. 231-238.
51. van Parijs L., Biuckians A., Abbas A.K. Functional roles of Fas and Bcl-2-regulated apoptosis of T lymphocytes. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 160, no. 5, pp. 2065-2071.
52. Walsh C.M., Edinger A.L. The complex interplay between autophagy, apoptosis, and necrotic signals promotes T-cell homeostasis. *Immunol. Rev.*, 2010, Vol. 236, no. 1, pp. 95-109.
53. Weichhart T. mTOR as regulator of lifespan, aging, and cellular senescence: a mini-review. *Gerontology*, 2018, Vol. 64, no. 2, pp. 127-134.
54. Zitvogel L., Kepp O., Kroemer G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell*, 2010, Vol. 140, no. 6, pp. 798-804.

Авторы:

Бурцева А.В. — магистрант, кафедра биохимии биотехнологии и фармакологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Тихонова А.Н. — бакалавр, кафедра биохимии биотехнологии и фармакологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Афанасьева З.А. — д.м.н., профессор, профессор кафедры онкологии, радиологии и паллиативной медицины, Казанская государственная медицинская академия — филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Абрамова З.И. — д.б.н., профессор, профессор кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Authors:

Burtseva A.V., Master's Student, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Tikhonova A.N., Bachelor, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Afanasyeva Z.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Oncology, Radiology and Palliative Medicine, Kazan State Medical Academy, Branch of Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Abramova Z.I., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Поступила 14.11.2024
Отправлена на доработку 19.11.2024
Принята к печати 23.03.2025

Received 14.11.2024
Revision received 19.11.2024
Accepted 23.03.2025