

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 616.441+008.63

doi: 10.26907/2542-064X.2024.4.658-682

ОСОБЕННОСТИ АУТОФАГИИ В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМ ТИРЕОИДИТОМ

*А.В. Бурцева¹, Э.В. Смирнова¹, С.Н. Абрамов¹, М.В. Тихомирова¹,
З.А. Афанасьева², З.И. Абрамова¹*

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²Казанская государственная медицинская академия, г. Казань, 420012, Россия

Аннотация

Аутоиммунный тиреоидит (АИТ) – хроническое заболевание щитовидной железы, основную роль в патогенезе которого играют чрезмерно стимулированные CD4⁺Т-лимфоциты, провоцирующие активацию CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов, что приводит к Fas-зависимому апоптозу тиреоцитов и снижению гормональной активности щитовидной железы. По данным исследований важным процессом в патогенезе аутоиммунных заболеваний является аутофагия – клеточный процесс, в норме поддерживающий клеточный гомеостаз путем деградации поврежденных белков и органелл в аутолизосомах. Статья посвящена анализу аутофагии и экспрессии ключевых белков – регуляторов аутофагии (Vps34, p62 и LC3) – в мононуклеарах периферической крови пациентов с АИТ. Для оценки развития процесса по изменению количества аутофагосом в клетках использован метод проточной цитофлуориметрии. Уровень экспрессии белков-маркеров определен методом вестерн-блоттинга. Установлено достоверное повышение содержания маркеров аутофагии – Vps34, LC3-II и p62 – в лимфоцитах пациентов с АИТ. Высокий уровень аутофагосомного белка LC3-II коррелирует с высоким уровнем убиквитин-связывающего белка p62, что может свидетельствовать о нарушении терминального этапа аутофагии – слияния аутофагосом и лизосом. При невозможности полноценного протекания всех стадий аутофагии активация данного процесса приводит лишь к чрезмерному накоплению аутофагосом в цитоплазме клеток, что, в свою очередь, способствует активации апоптоза или последующей гибели клетки путем некроза. Таким образом, понимание механизма нарушения аутофагии в лимфоцитах может оказаться перспективным методическим подходом в решении проблемы повреждений, связанных с возникновением и развитием АИТ.

Ключевые слова: лимфоциты, аутофагия, аутоиммунный тиреоидит, проточная цитофлуориметрия.

Введение

Аутоиммунный тиреоидит (АИТ) – хроническое воспалительное аутоиммунное заболевание щитовидной железы, характеризующееся нарушением аутоотолерантности к тиреоидным антигенам, которое приводит к циркуляции аутоантител и лимфоидной инфильтрации. В результате этого на ранних этапах происходит замещение паренхимы и увеличение щитовидной железы [1–3]. Также установлено, что чрезмерно стимулированные CD4⁺-лимфоциты активи-

руют CD8⁺-цитотоксические и В-лимфоциты, что приводит к Fas-зависимому апоптозу тиреоцитов или высвобождению антител к тиреоглобулину и тиреоидной тиреопероксидазе [4, 5].

В то же время АИТ – многофакторное заболевание, вызванное сложным взаимодействием генетических, гормональных и экологических факторов [6, 7]. Важным процессом в патогенезе аутоиммунных заболеваний является аутофагия [8, 9]. Аутофагия – это клеточный процесс, поддерживающий гомеостаз путем деградации не только поврежденных белков, но и органелл в аутолизосомах [10]. Аутофагия позволяет клеткам выживать во время стрессовых условий, например, при голодании или окислительном стрессе, перерабатывая содержимое аутофаголизосом для получения энергии [11]. При длительном воздействии повреждающих факторов аутофагия, как и апоптоз, может привести клетку к гибели [12].

Хотя связь между аутофагией и АИТ на сегодняшний день остается спорной, роль аутофагии в иммунной регуляции, наблюдаемой при таких аутоиммунных заболеваниях, как системная красная волчанка, ревматоидный артрит и рассеянный склероз, предполагает ее потенциальное участие в развитии и прогрессировании данных заболеваний [13, 14]. Например, исследование на мышах показало, что нокаут белка ATG5 – инициатора аутофагии с помощью CRISPR/Cas9 приводит к снижению количества Т-клеток в центральной нервной системе и предотвращению воспаления. Это свидетельствует о важной роли белка ATG5 в развитии аутоиммунных заболеваний, при которых Т-клетки атакуют миелиновую оболочку нервных волокон через процессы аутофагии [15].

Недавние исследования в области АИТ преимущественно нацелены на модулирование иммунного ответа для уменьшения степени повреждения щитовидной железы [16, 17]. Следовательно, большой потенциал заключается в расширении набора фармакологических вмешательств, направленных на аутофагию, чтобы сбалансировать ее цитопротекторные эффекты против последствий нарушения самого процесса.

В связи с этим целью проводимого исследования стал анализ процесса аутофагии в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов с АИТ и экспрессии его ключевых белков-регуляторов.

1. Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использованы мононуклеарные клетки периферической крови здоровых доноров и пациентов с АИТ. Забор образцов периферической крови проведен у 15 пациентов в состоянии эутиреоза (1 мужчина и 14 женщин в возрасте от 20 до 65 лет). Титры антител к тиреопероксидазе составили от 100 до 4500 МЕ. Клинические данные, включая возраст, пол, длительность заболевания и результаты иммунологического анализа, были получены при опросе пациентов и изучении медицинской документации. Контрольную группу составили 12 условно здоровых доноров (2 мужчин и 10 женщин в возрасте от 20 до 69 лет).

Метод выделения мононуклеаров человека основан на отличиях в плавучей плотности различных форменных элементов крови. Фракцию, обогащенную лимфоцитами (В-клетки, Т-цитотоксические и Т-хелперные лимфоциты,

НК-клетки и моноциты), получали по стандартной методике на градиенте плотности фиколл-урографин (табл. 1).

Табл. 1

Используемые градиенты плотности при выделении клеток человека [18]

Тип клеток	Плотность градиента, г/см ³
Т-лимфоциты	1.077
В-лимфоциты	1.077
Моноциты	1.064
Гранулоциты	1.093
НК-лимфоциты	1.060
Эритроциты	1.115
Остеобласты	1.055

Для исследований *in vitro* клетки высевали в 6-луночный культуральный планшет, содержащий обедненную сывороточную среду RPMI-1640 Medium (Gibco, США) с добавлением 1%-ной термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) и 1× раствора пенициллина-стрептомицина (ПанЭко, Россия). Затем клетки инкубировали в течение 72 ч во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂, при 37 °С.

Для оценки процесса аутофагии в клетках использован набор Autophagy Assay Kit (кат. ab139484, Abcam, Великобритания). Клетки двукратно отмывали фосфатно-солевым буферным раствором, ресуспендировали в 250 мкл 1× Assay Buffer, затем добавляли 2.5 мкл зеленого красителя и инкубировали 30 мин в темноте при 37° С. Затем клетки промывали 1× Assay Buffer и ресуспендировали в 500 мкл 1× Assay Buffer. Конечная концентрация клеток в суспензии составляла 1×10⁶ клеток/мл. Образцы анализировали в зеленом (FL1) канале в течение 30 мин на проточном цитометре BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, США) с применением программного обеспечения CellQuest. На каждый опыт обсчитывали не менее 10000 клеток. Мертвые клетки исключали на основании параметров прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Клетки, содержащие аутофагосомы, определяли с помощью негативного и положительного контроля. В качестве негативного контроля использовали неокрашенные клетки, а в качестве положительного – клетки после инкубирования в течение 4 ч в растворе, содержащем 20 мкМ хлорохина, и последующего гейтирования. Для анализа результатов использовали программное обеспечение FlowJo (BD Biosciences, США).

Для проведения вестерн-блоттинга осадок клеток лизировали в RIPA-буфере с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз (Thermo Scientific, США) по стандартному протоколу. Определение концентрации белка в полученных лизатах проводили с использованием набора BCA Protein Assay (Thermo Scientific, США). Образцы загружали в 10%-ный полиакриламидный гель и после электрофореза переносили на поливинилденфторидные мембраны (Invitrogen, США). Блокирование мембран проводили в 5%-ном бычьем сывороточном альбумине в течение 1 ч, затем мембраны инкубировали с первичными антителами в течение ночи при 4 °С. В работе использовали антитела к LC3 (кат. № 4108, Cell Signaling

Technology, США), p62/SQSTM1 (кат. № 5114, Cell Signaling Technology, США), Vsp34 (кат. № 38-2100, Invitrogen, США) в разведении 1 : 1000 и β -актин (кат. № MA1-140, Invitrogen, США) в разведении 1 : 3000. После промывания в течение 30 мин трис-буферным солевым раствором, содержащим Tween® 20, мембраны инкубировали со вторичными антителами в блокирующем растворе в течение 1 ч при комнатной температуре. Мембраны проявляли с помощью реагента усиления хемилюминесценции Clarity Western ECL Substrate (BioRad, США) и визуализировали с помощью системы гель-документирования ChemiDoc XRS+ (BioRad, США). Для количественной оценки сигнала относительной интенсивности каждого изображения использовали программное обеспечение Image Lab (BioRad, США) и ImageJ (National Institutes of Health, США).

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.

2. Результаты и их обсуждение

Аутофагия и воспаление – два фундаментальных биологических процесса. Благодаря своей решающей роли в поддержании клеточного гомеостаза, аутофагия участвует в модуляции клеточного метаболизма, выживании клеток и защите. Дефектная аутофагия связана с такими патологическими состояниями, как аутоиммунные, онкологические и нейродегенеративные заболевания, старение [11].

В условиях «голодания» клетки гомеостаз внутри нее в первое время поддерживается аутофагией. Поэтому в эксперименте использована обедненная питательными веществами среда, что позволило оценить процесс аутофагии в мононуклеарах при АИТ и выяснить, какие изменения, связанные с этим процессом, происходят в иммунных клетках пациентов по сравнению с клетками группы здоровых доноров. Хотя распределение лимфоцитов и моноцитов во фракции мононуклеарных клеток у разных людей может варьироваться, лимфоциты обычно составляют от 70 до 90 % (70–85 % CD3⁺ Т-клеток, 5–10 % В-клеток) [19]. Поэтому дальнейшую очистку фракции лимфоцитов не проводили.

Для определения степени накопления аутофагосом в клетке оценено содержание липидированной формы белка LC3 (LC3-II) [20]. Для мониторинга стадий аутофагии и измерения активности аутофагического процесса мононуклеары обрабатывали хлорохином, который, благодаря изменению рН лизосом, ингибирует стадию терминации аутофагии, препятствуя тем самым слиянию аутофагосом с лизосомами, предотвращая формирование аутофаголизосом и, как следствие, распад их содержимого, что приводит к накоплению аутофагосом в клетках [21].

На основе данных проточной цитометрии установлено, что уровень аутофагосом в свежевыделенных мононуклеарах пациентов с АИТ (рис. 1, б3) достоверно выше по сравнению с контрольной группой (рис. 1, в). В процессе куль-

тивирования образцов в обедненной питательной среде в течение 72 ч в группе здоровых доноров наблюдался достоверный рост уровня клеток (рис. 1, *б*), содержащих аутофагосомы (рис. 1, *б2*). В группе пациентов с АИТ в процессе 72 ч культивирования (рис. 1, *б4*) наметились изменения в количестве клеток с аутофагосомами, но различие не достигло статистической значимости (рис. 1, *в*).

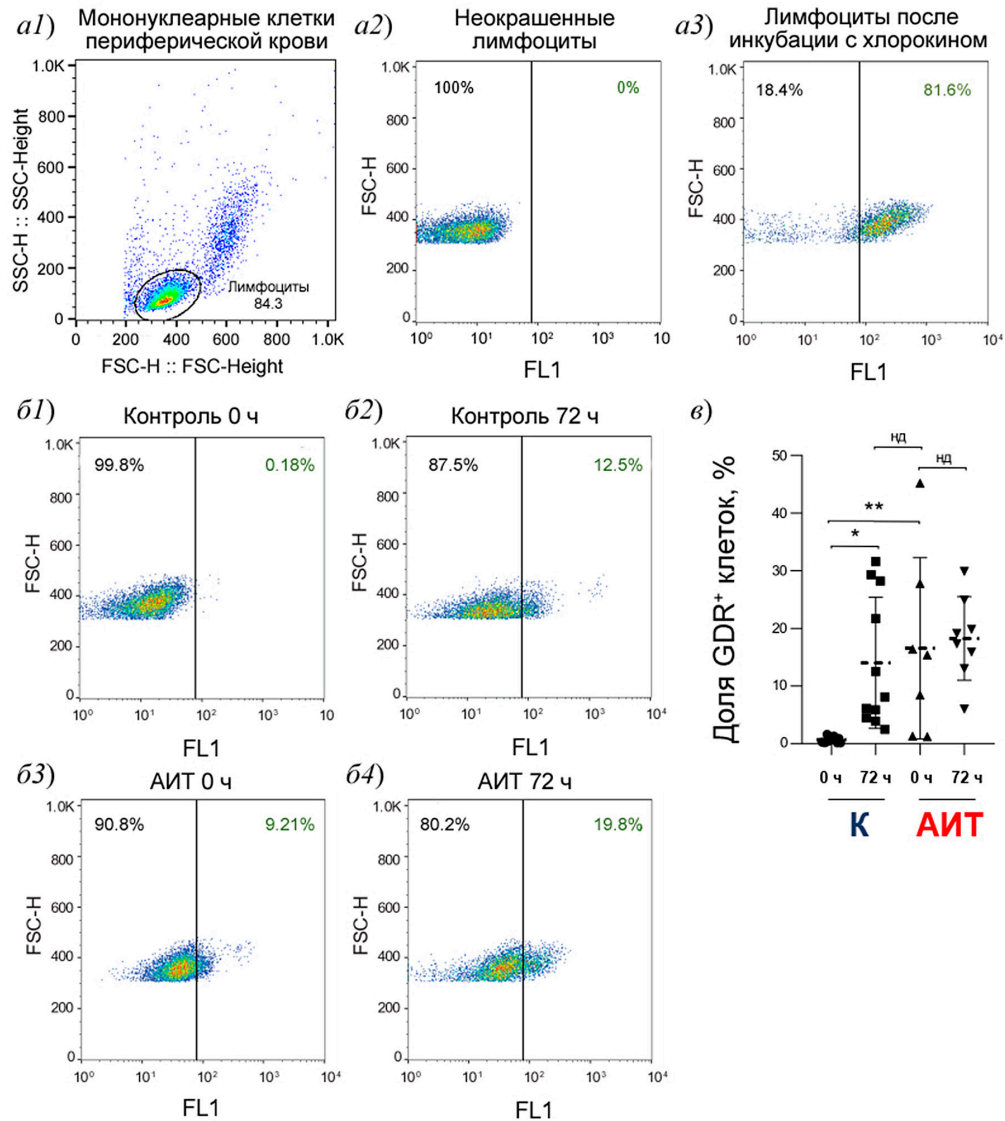


Рис. 1. Оценка относительного количества мононуклеаров, содержащих аутофагосомы, методом проточной цитометрии в процессе культивирования: *а*) стратегия гейтирования лимфоцитов пациентов с АИТ (*а1*), отрицательный (*а2*) и положительный (*а3*) контроль накопления аутофагосом; *б*) накопление клеток с аутофагосомами у здоровых доноров (*б2*) и пациентов с АИТ (*б4*) через 72 ч по сравнению со свежесыведенными образцами (*б1* и *б3* соответственно, зеленая флуоресценция); *в*) доля лимфоцитов с аутофагосомами, культивированных в течение 72 ч в условиях с низким содержанием сыворотки, у здоровых доноров (**К**) и пациентов с АИТ (**АИТ**) по результатам денситометрии (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, нд – недостоверное различие)

Процесс аутофагии делится на несколько стадий: инициацию, элонгацию, формирование аутофагосомы и – на выходе – формирование аутолизосомы. В работе М. D’Arcy [22] представлена общая схема процесса аутофагии и, в частности, образования аутолизосомы. Активация комплексов ULK1 и PI3K класса III стимулирует образование аутофагофора (рис. 2). Комплекс, состоящий из ATG5, ATG12 и ATG16L, вместе с LC3-II стимулирует удлинение двумембранного фагофора, который необходим для формирования аутофагосомы. Белок p62, взаимодействуя с LC3-II и белками, направляемыми на деградацию, поглощается аутофагосомой, которая затем сливается с лизосомой [10, 22].

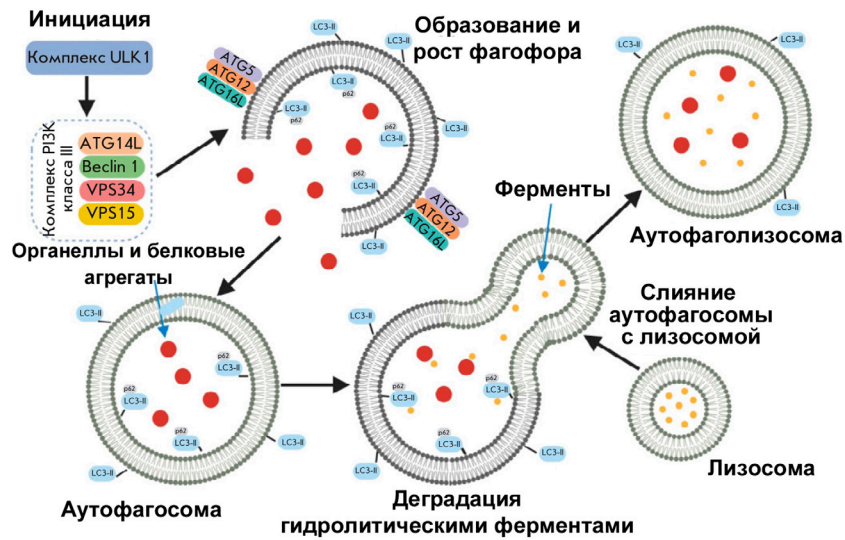


Рис. 2. Общая схема процесса аутофагии. Цит. по [10]

Как следует из данных рис. 3, иницирующий комплекс аутофагосомной мембраны состоит из Beclin-1, белков семейства Bcl-2, везикулярного белка Vps 34 (vacuolar protein sorting) и Atg14L [10, 23]. Поэтому сначала проведена оценка экспрессии везикулярного белка, который катализирует образование важного компонента аутофагосомы PI3P на этапе инициации аутофагии.

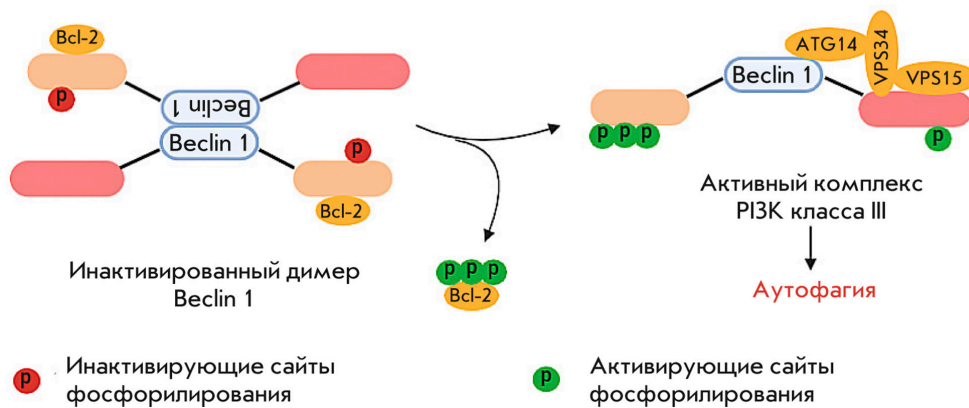


Рис. 3. Схема превращения инактивированного комплекса Bcl-2–Beclin-1 в активный PI3K-комплекс. Цит. по [10]

Проведенные исследования показали, что уровень киназы Vps34 в свежeweделенных клетках пациентов с АИТ достоверно выше по сравнению с контрольной группой (рис. 4, а). Голодание в течение 72 ч приводит к повышению уровня Vps34 в группе пациентов с АИТ, что указывает на активацию аутофагии (рис. 4, б).

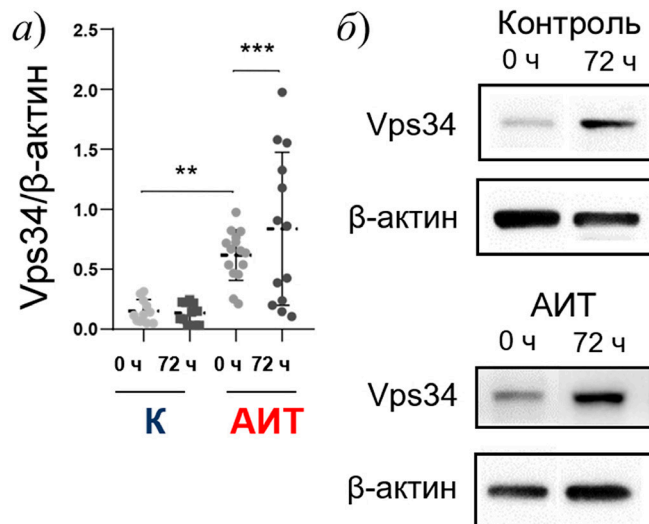


Рис. 4. Уровень белка-инициатора аутофагии Vps34 в мононуклеарных клетках здоровых доноров (**К**) и пациентов с АИТ (**АИТ**): а) нормализованная по β-актину интенсивность сигнала Vps34; б) оценка экспрессии белка Vps34 методом иммуноблоттинга (** – $p < 0.005$, *** – $p < 0.0005$)

На этапе элонгации аутофагии методом вестерн-блоттинга с помощью моноклональных антител и флуорохрома GFP выявляют превращение комплекса GFP-LC3-I в комплекс GFP-LC3-II [24]. В дополнение к LC3 при оценке этого процесса рекомендуется использовать в качестве белкового маркера SQSTM1/p62, который принимает участие в регуляции аутофагии и формировании аутофагосомы [25], находясь в тесном взаимодействии с митохондриальными белками и участвуя в индукции конститутивной митофагии.

Таким образом, для оценки инициации аутофагического процесса в мононуклеарах пациентов с АИТ определен уровень p62 методом иммуноблоттинга. Установлено, что в мононуклеарах пациентов с АИТ, культивируемых в течение 72 ч в обедненной питательной среде, достоверно увеличивается количество этого белка по сравнению с образцами свежeweделенных клеток пациентов (рис. 5).

В работе [26] показано, что p62 – это белок, который, обладая убиквитин-связывающим доменом, способен связываться с полиубиквитинированными белками. Доставляя такие белковые агрегаты в аутофагосомы, он связывается с мембранным липидированным белком LC3-II. В норме белок p62 активно диссоциирует в процессе аутофагии, и снижение уровня p62 связывают с активацией аутофагии [27]. Определение уровня p62 используют для мониторинга аутофагического процесса. В работе Бьерка с соавторами [28] на примере млекопитающих и дрозофилы установлено, что p62 может накапливаться в клетках при ингибировании макроаутофагии, и это подтверждает, что устойчивые уровни этого белка отражают аутофагический статус.

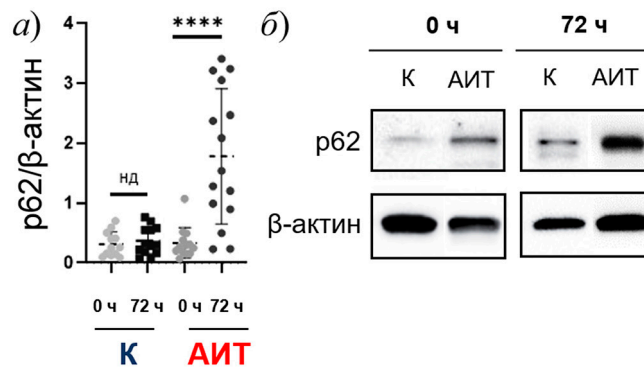


Рис. 5. Уровень белка-адаптера p62 (SQSTM1) в мононуклеарных клетках здоровых доноров (К) и пациентов с АИТ (АИТ): а) нормализованная по β-актину интенсивность экспрессии белка; б) репрезентативное изображение вестерн-блоттинга с использованием антител против SQSTM1 (**** – $p < 0.0001$, нд – недостоверное различие)

Таким образом, можно предположить, что повышенный уровень p62 в мононуклеарах пациентов с АИТ по данным вестерн-блоттинга может указывать или на ингибирование стадии слияния аутофагосомы и лизосомы, или на нарушение стадии деградации и, как следствие, накопление аутофагосом.

Белок LC3, также являющийся убиквитин-подобным белком, кодируется геном *Map1lc3* (LC3) и представляет собой надежный маркер аутофагии, так как его содержание в исследуемом биологическом материале положительно коррелирует с количеством активных аутофагосом [29]. LC3 синтезируется на рибосоме в форме предшественника proLC3, который затем расщепляется под действием цистеиновой протеазы Atg4b, формируя цитоплазматическую форму LC3-I. Эта форма активируется Atg7, переносится с помощью Atg3 на мембрану растущей аутофагосомы, конъюгируется с фосфатидилэтаноламином мембраны с образованием липидированной формы LC3-II. Именно накопление LC3-II внутри клеток рассматривают как индикатор повышения интенсивности аутофагии или нарушения процесса аутофагического потока и деградации, проявляющийся в накоплении аутофагических структур.

Таким образом, мониторинг аутофагии основан на наблюдении, что в клетках LC3 существует в цитоплазматической и липидированной формах, т. е. в виде LC3-I и LC3-II. Их соотношение коррелирует с изменениями в процессе аутофагии и может дать более точную оценку аутофагического потока, чем соотношения, основанные на общем уровне липидированного белка LC3-II в составе аутофагосомы. Валидность этого метода ранее была показана путем сравнения аутофагического протеолитического потока в гепатоцитах крысы, клетках гепатомы и миобластах [30]. Одним из преимуществ этого подхода является то, что он не требует присутствия аутофагических или лизосомальных ингибиторов для блокирования деградации LC3-II.

Поэтому на следующем этапе исследований оценен уровень белка LC3 в цитоплазматической (LC3-I) и липидированной (LC3-II) формах (рис. 6). Подобно паттерну экспрессии белков (рис. 5, а), уровень LC3-I, нормализованного по β-актину, в группе здоровых доноров не изменился даже через 72 ч культивиро-

вания (рис. 6, а). Уровень LC3-I у пациентов с АИТ (рис. 6, а) как в свежесыведенных клетках, так и в клетках после культивирования в течение 72 ч, достоверно выше, чем в группе здоровых доноров, что может свидетельствовать об увеличении активности процессов аутофагии при АИТ.

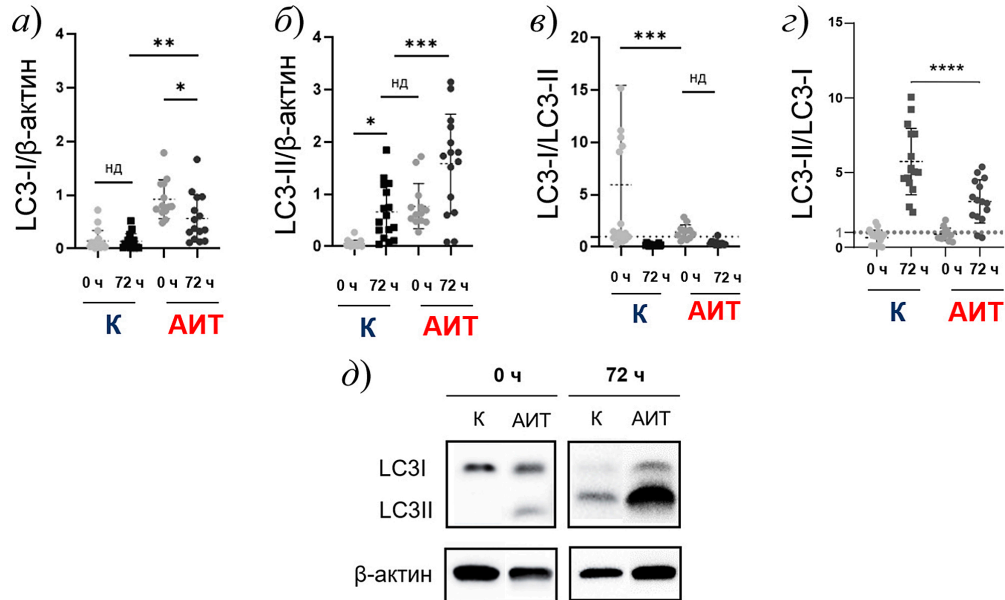


Рис. 6. Аутофагический поток в мононуклеарных клетках здоровых доноров (К) и пациентов с АИТ (АИТ) по уровню экспрессии цитоплазматического (LC3-I) и липидированного (LC3-II) белков: а) нормализованная по β-актину интенсивность сигнала белка LC3-I; б) нормализованная по β-актину интенсивность сигнала белка LC3-II; в) уровень инициации аутофагии по соотношению LC3-I/LC3-II; г) аутофагическая активность по соотношению LC3-II/LC3-I; д) репрезентативные изображения вестерн-блоттинга экспрессии LC3-I, LC3-II и β-актина в свежесыведенных или культивированных в течение 72 ч мононуклеарных клетках. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.005$, *** – $p < 0.0005$, **** – $p < 0.0001$, нд – недостоверное различие

Полученное соотношение LC3-I/LC3-II в свежесыведенных мононуклеарах здоровых доноров (рис. 6, в) свидетельствует о высоком уровне инициации процесса аутофагии и нормальном протекании дальнейших стадий этого процесса – везикулярного транспорта, слияния аутофагосом с лизосомами и протеолитической деградации содержимого аутолизосом. Снижение соотношения LC3-I/LC3-II (рис. 6, в) как в свежесыведенных мононуклеарах пациентов с АИТ, так и через 72 ч культивирования свидетельствует о снижении инициации аутофагии в этих клетках на фоне повышения уровня LC3-II (рис. 6, б).

Общее количество LC3-II (рис. 6, б) напрямую коррелирует с активностью аутофагии в клетках [20]. Увеличение соотношения LC3-II/LC3-I предполагает активацию аутофагии или накопление аутофагосом из-за нарушений на более поздних стадиях аутофагии (например, из-за лизосомальной деградации) [23]. Поэтому отношение LC3-II к LC3-I использовано как индикатор аутофагической активности (рис. 6, г). Показано, что соотношение LC3-II/LC3-I повышено как в группе здоровых доноров, так и в группе пациентов с АИТ, в том числе в клетках, культивированных в течение 72 ч в среде с низким содержанием сы-

воротки (рис. 6, з). Но если в случае здоровых доноров величина соотношения LC3-II/LC3-I через 72 ч культивирования (рис. 6, з) может свидетельствовать об активации аутофагии, что подтверждается высоким соотношением LC3-I/LC3-II в свежeweделенных мононуклеарных клетках здоровых доноров (рис. 6, в), то снижение соотношения LC3-II/LC3-I в группе пациентов с АИТ (рис. 6, з) может говорить о нарушении слияния аутофагосом и лизосом и, следовательно, о незавершенной аутофагии, приводящей к накоплению аутофагосом внутри клетки, как это было показано на рис. 1, б и в.

В работе Бартлетт с соавторами [30, 31] показано, что, в отличие от белка LC3, уровень p62 путем обратной связи также коррелирует с активностью аутофагии. При мутациях в генах *ATG* или при нарушении процесса связывания аутофагосомы и лизосомы происходит накопление p62-положительных агрегатов, что расценивается как признак снижения активности аутофагии [32]. Поэтому активность процесса аутофагии можно оценивать и по соотношению LC3-II/p62 [33].

По нашим данным, через 72 ч культивирования в мононуклеарах здоровых доноров выраженных изменений в уровне белка p62 не выявлено (рис. 7, а) на фоне достоверно повышенного уровня белка LC3-II (рис. 7, а). У пациентов с АИТ происходит достоверное накопление белка p62 на фоне высокого уровня LC3-II белка (рис. 7, б).

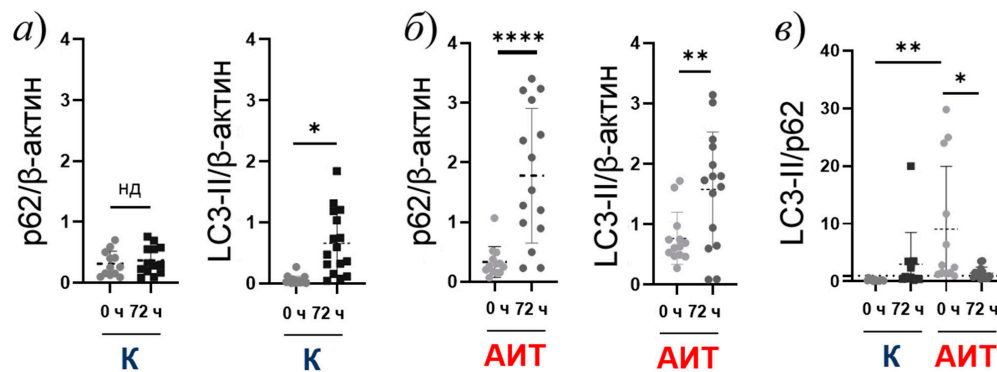


Рис. 7. Активность аутофагического потока в мононуклеарах здоровых доноров (К) и пациентов с АИТ (АИТ): а) нормализованная по β -актину интенсивность сигнала белков p62 и LC3-II в клетках здоровых доноров; б) нормализованная по β -актину интенсивность сигнала белков LC3-II и p62 в клетках пациентов с АИТ; в) активность аутофагического потока по соотношению LC3-II/p62 (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.005$, **** – $p < 0.0001$, нд – недостоверное различие)

Обычно при усилении аутофагического потока повышается соотношение LC3-II/LC3-I, а уровень p62 снижается. При оценке этого параметра в свежeweделенных мононуклеарах пациентов с АИТ выявлено достоверно повышенное соотношение LC3-II/p62 по сравнению с контрольной группой (рис. 7, в) и низкий уровень p62 (рис. 7, б), что говорит об активации аутофагии. Через 72 ч культивирования в обедненной среде соотношение LC3-II/p62 снижается (рис. 7, в), а уровень p62 остается высоким (рис. 7, б), что свидетельствует о нарушении слияния аутофагосом с лизосомами в мононуклеарах пациентов с АИТ [30].

Заключение

Таким образом, установлено, что мононуклеарные клетки, выделенные из периферической крови пациентов с АИТ, показывают, в отличие от клеток здоровых доноров, значительное накопление аутофагосом как на базальном уровне, так и после 72-часового культивирования с низким содержанием сыворотки. Мы предполагаем, что эти данные указывают на нарушения аутофагического процесса в мононуклеарах при АИТ. Накопление клеток с аутофагосомами, свидетельствующее об усилении активации процесса аутофагии, говорит о попытке клеток справиться со стрессом, что особенно заметно в клетках пациентов с АИТ в условиях пониженного содержания сыворотки. Наши наблюдения дополнили знания об аутофагии при АИТ: изучение белков-маркеров (Vps34, p62 и LC3) выявило значительные изменения их количества в мононуклеарах пациентов с АИТ. Белок Vps34 имеет критическое значение для формирования аутофагосом [34], и его повышенная экспрессия предполагает увеличение аутофагической активности у пациентов с АИТ, что соответствует усилению инициации аутофагии. Высокие уровни белка p62 в клетках при АИТ на фоне высокого уровня липидированного белка LC3-II, особенно после 72-часового культивирования, могут свидетельствовать о нарушении аутофагического процесса, в частности слиянии аутофагосом с лизосомами, и, как следствие, замедлении процессов деградации аутофагосом [35].

При невозможности полноценного протекания всех стадий аутофагии активация данного процесса приводит лишь к чрезмерному накоплению аутофагосом в цитоплазме мононуклеаров, что, в свою очередь, способствует активации апоптоза и последующей гибели клетки.

В будущих исследованиях предстоит выяснить, в какой субпопуляции лимфоцитов происходит нарушение аутофагии – в клетках-хелперах с маркером CD4⁺, в цитотоксических CD8⁺-Т-лимфоцитах или в В-лимфоцитах, участвующих в разрушении тироцитов при АИТ. «Правильная» аутофагия в этих клетках имеет решающее значение для поддержания иммунной толерантности и предотвращения чрезмерных иммунных реакций [36]. Другим примером является популяция CD4⁺CD25⁺ Т-клеток человека, которая гетерогенна по своим функциональным свойствам и фенотипическим признакам. Она включает в себя популяции пролиферирующих CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺CD25^{low} Т-клеток и «регуляторных» (T_{reg}) CD4⁺CD45RO⁺CD25^{high} Т-лимфоцитов. Являясь реальными супрессорами, они играют ведущую роль во многих иммунологических процессах, например, регулируют Т-клеточный гомеостаз, предотвращают аутоиммунные заболевания, аллергии, гиперчувствительность [37].

Аутофагия T_{reg} необходима для контроля чрезмерных иммунных реакций и предотвращения аутоиммунитета [38]. Понимание того, как нарушение аутофагии в этих подтипах лимфоцитов может влиять на прогрессирование аутоиммунного тиреоидита, представляет большой интерес.

Восстановление нормальных механизмов клеточного клиренса может оказаться многообещающим методическим подходом в решении проблемы поврежденных, связанных с возникновением и развитием аутоиммунного тиреоидита.

Заключение Комитета по этике. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации и одобрено ло-

кальным этическим комитетом Республиканской онкологической клинической больницы и Казанского (Приволжского) федерального университета (протокол № 8 от 13.02.2018).

Информированное согласие. Информированное согласие было получено от всех субъектов, участвовавших в исследовании.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. *Трошина Е.А.* Хронический аутоиммунный тиреоидит – «сигнальное заболевание» в составе мультиорганный аутоиммунного синдрома // Проблемы эндокринологии. 2023. Т. 69, № 4. С. 4–10. <https://doi.org/10.14341/probl13361>.
2. *Лукьянчиков В.С.* Аутоиммунный тиреоидит. Связь с тиреоидными и неэндокринными метаплазиями // РМЖ. 2013. Т. 21, № 12. С. 657–659.
3. *Ragusa F., Fallahi P., Elia G., Gonnella D., Paparo S.R., Giusti C., Churilov L.P., Ferrari S.M., Antonelli A.* Hashimoto's thyroiditis: Epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy // Best Pract. Res., Clin. Endocrinol. Metab. 2019. V. 33, No 6. Art. 101367. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2019.101367>.
4. *Radetti G.* Clinical aspects of Hashimoto's thyroiditis // G. Szinnai (Ed.) Paediatric Thyroidology. Ser.: Endocrine Development. V. 26. Basel: S. Karger AG, 2014. P. 158–170. <https://doi.org/10.1159/000363162>.
5. *Caturegli P., De Remigis A., Rose N.R.* Hashimoto thyroiditis: Clinical and diagnostic criteria // Autoimmun. Rev. 2014. V. 13, Nos 4–5. P. 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.007>.
6. *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. V. 2015, No 1. Art. 979167. <https://doi.org/10.1155/2015/979167>.
7. *Salmaso C., Bagnasco M., Pesce G., Montagna P., Brizzolara R., Altrinetti V., Richiusa P., Galluzzo A., Giordano C.* Regulation of apoptosis in endocrine autoimmunity: Insights from Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2002. V. 996, No 1. P. 496–501. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04253.x>.
8. *Vukovic R., Zeljkovic A., Bufan B., Spasojevic-Kalimanovska V., Milenkovic T., Vekic J.* Hashimoto thyroiditis and dyslipidemia in childhood: A review // Front. Endocrinol. 2019. V. 10. Art. 868. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00868>.
9. *Yang Z., Goronzy J.J., Weyand C.M.* Autophagy in autoimmune disease // J. Mol. Med. 2015. V. 93, No 7. P. 707–717. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1297-8>.
10. *Шляпина В.Л., Юртаева С.В., Рубцова М.П., Донцова О.А.* На распутье: механизмы апоптоза и аутофагии в жизни и смерти клетки // Acta Nat. 2021. Т. 13, № 2 (49). С. 106–115. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11208>.
11. *Netea-Maier R.T., Plantinga T.S., van de Veerdonk F.L., Smit J.W., Netea M.G.* Modulation of inflammation by autophagy: Consequences for human disease // Autophagy. 2016. V. 12, No 2. P. 245–260. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1071759>.
12. *Denton D., Kumar S.* Autophagy-dependent cell death // Cell Death Differ. 2019. V. 26, No 4. P. 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0252-y>.

13. Wu Z.-Z., Zhang J.-J., Gao C.-C., Zhao M., Liu S.-Y., Gao G.-M., Zheng Z.-H. Expression of autophagy related genes mTOR, Becline-1, LC3 and p62 in the peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus // *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* 2017. V. 6, No 1. P. 1–8.
14. Liang P., Le W. Role of autophagy in the pathogenesis of multiple sclerosis // *Neurosci. Bull.* 2015. V. 31, No 4. P. 435–444. <https://doi.org/10.1007/s12264-015-1545-5>.
15. Wua D.J., Adamopoulos I.E. Autophagy and autoimmunity // *Clin. Immunol.* 2017. V. 176. P. 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.01.007>.
16. Wang W., Zhang B.-T., Jiang Q.-L., Zhao H.-Q., Xu Q., Zeng Y., Xu J.-Y., Jiang J. Leptin receptor antagonist attenuates experimental autoimmune thyroiditis in mice by regulating Treg/Th17 cell differentiation // *Front. Endocrinol.* 2022. V. 13. Art. 1042511. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1042511>.
17. Jia X., Zhai T., Qu C., Ye J., Zhao J., Liu X., Zhang J.-a., Qian Q. Metformin reverses Hashimoto's thyroiditis by regulating key immune events // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9. Art. 685522. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.685522>.
18. Recktenwald D., Radbruch A. (Eds.) *Cell Separation Methods and Applications*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1998. 352 p. <https://doi.org/10.1201/9781482273649>.
19. Kleiveland C.R. Peripheral blood mononuclear cells // *Verhoeckx K., Cotter P., López-Expósito I., Kleiveland C., Lea T., Mackie A., Requena T., Swiatecka D., Wichers H.* (Eds.). *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*. Cham: Springer, 2015. P. 161–167. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_15.
20. Klionsky D.J., Abdalla F.C., Abeliovich H., Abaraham R.T., Acevedo-Arozena A., Adeli K., Agholme L., Agnello M., Agostinis P., Aguirre-Ghiso J.A., Ahn H.J., Ait-Mohamed O., Ait-Si-Ali S., Akematsu T., Akira S., Al-Younes H.M., Al-Zeer M.A., Albert M.L., Albin R.L., Alegre-Abarrategui J., Aleo M.F., Alirezaei M., Almasan A., Almonte-Becerril M., Amano A., Amaravadi R.K., Amarnath S., Amer A.O., Andrieu-Abadie N., Anantharam V., Ann D.K., Anoopkumar-Dukie S., Aoki H., Apostolova N., Arancia G., Aris J.P., Asanuma K., Asare N.Y.O., Ashida H., Askanas V., Askew D.S., Auberger P., Baba M., Backues S.K., Baehrecke E.H., Bahr B.A., Bai X.-Y., Bailly Y., Baiocchi R., Baldini G., Balduini W., Ballabio A., Bamber B.A., Bampton E.T.W., Juhász G., Bartholomew C.R., Bassham D.C., Bast R.C., Batoko H., Bay B.-H., Beau I., Béchet D.M., Begley T.J., Behl C., Behrends C., Bekri S., Bellaire B., Bendall L.J., Benetti L., Berliocchi L., Bernardi H., Bernassola F., Besteiro S., Bhatia-Kissova I., Bi X., Biard-Piechaczyk M., Blum J.S., Boise L.H., Bonaldo P., Boone D.L., Bornhauser B.C., Bortoluci K.R., Bossis I., Bost F., Bourquin J.-P., Boya P., Boyer-Guittaut M., Bozhkov P.V., Brady N.R., Brancolini C., Brech A., Brenman J.E., Brennand A., Bresnick E.H., Brest P., Bridges D., Bristol M.L., Brookes P.S., Brown E.J., Brumell J.H., Brunetti-Pierri N., Brunk U.T., Bulman D.E., Bultman S.J., Bultynck G., Burbulla L.F., Bursch W., Butchar J.P., Buzgariu W., Bydlowski S.P., Cadwell K., Cahová M., Cai D., Cai J., Cai Q., Calabretta B., Calvo-Garrido J., Camougrand N., Campanella M., Campos-Salinas J., Candi E., Cao L., Caplan A.B., Carding S.R., Cardoso S.M., Carew J.S., Carlin C.R., Carmignac V., Carneiro L.A.M., Carra S., Caruso R.A., Casari G., Casas C., Castino R., Cebollero E., Cecconi F., Celli J., Chaachouay H., Chae H.-J., Chai C.-Y., Chan D.C., Chan E.Y., Chang R.C.-C., Che C.-M., Chen C.-C., Chen G.-C., Chen G.-Q., Chen M., Chen Q., Chen S.S.-L., Chen W., Chen X., Chen X., Chen Y.-G., Chen Y., Chen Y., Chen Y.-J., Chen Z., Cheng A., Cheng C.H.K., Cheng Y., Cheong H., Cheong J.-H., Cherry S., Chess-Williams R., Cheung Z.H., Chevet E., Chiang H.-L., Chiarelli R., Chiba T., Chin L.-S., Chiou S.-H., Chisari F.V., Cho C.H., Cho D.-H., Choi A.M.K., Choi D., Choi K.S., Choi M.E., Chouaib S., Choubey D., Choubey V., Chu C.T., Chuang T.-H., Chueh S.-H., Chun T., Chwae Y.-J., Chye M.-L., Ciarcia R., Ciriolo M.R., Clague M.J., Clark R.S.B.,

Clarke P.G.H., Clarke R., Codogno P., Collier H.A., Colombo M.I., Comincini S., Condello M., Condorelli F., Cookson M.R., Coombs G.H., Coppens I., Corbalan R., Cossart P., Costelli P., Costes S., Coto-Montes A., Couve E., Coxon F.P., Cregg J.M., Crespo J.L., Cronjé M.J., Cuervo A.M., Cullen J.J., Czaja M.J., D'Amelio M., Darfeuille-Michaud A., Davids L.M., Davies F.E., De Felici M., de Groot J.F., de Haan C.A.M., De Martino L., De Milito A., De Tata V., Debnath J., Degterev A., Dehay B., Delbridge L.M.D., Demarchi F., Deng Y.Z., Dengjel J., Dent P., Denton D., Deretic V., Desai S.D., Devenish R.J., Di Gioacchino M., Di Paolo G., Di Pietro C., Diaz-Araya G., Diaz-Laviada I., Diaz-Meco M.T., Diaz-Nido J., Dikic I., Dinesh-Kumar S.P., Ding W.-X., Distelhorst C.W., Diwan A., Djavaheri-Mergny M., Dokudovskaya S., Dong Z., Dorsey F.C., Dosenko V., Dowling J.J., Doxsey S., Dreux M., Drew M.E., Duan Q., Duchosal M.A., Duff K.E., Dugail I., Durbeej M., Duszenko M., Edelstein C.L., Edinger A.L., Egea G., Eichinger L., Eissa N.T., Ekmekcioglu S., El-Deiry W.S., Elazar Z., Elgendy M., Ellerby L.M., Eng K.E., Engelbrecht A.-M., Engelender S., Erenpreisa J., Escalante R., Esclatine A., Eskelinen E.-L., Espert L., Espina V., Fan H., Fan J., Fan Q.-W., Fan Z., Fang S., Fang Y., Fanto M., Fanzani A., Farkas T., Farre J.-C., Faure M., Fechtmeier M., Feng C.G., Feng J., Feng Q., Feng Y., Fésüs L., Feuer R., Figueiredo-Pereira M.E., Fimia G.M., Fingar D.C., Finkbeiner S., Finkel T., Finley K.D., Fiorito F., Fisher E.A., Fisher P.B., Flajolet M., Florez-McClure M.L., Florio S., Fon E.A., Fornai F., Fortunato F., Fotedar R., Fowler D.H., Fox H.S., Franco R., Frankel L.B., Fransen M., Fuentes J.M., Fueyo J., Fujii J., Fujisaki K., Fujita E., Fukuda M., Furukawa R.H., Gaestel M., Gailly P., Gajewska M., Galliot B., Galy V., Ganesh S., Ganetzky B., Ganley I.G., Gao F.-B., Gao G.F., Gao J., Garcia L., Garcia-Manero G., Garcia-Marcos M., Garmyn M., Gartel A.L., Gatti E., Gautel M., Gawriluk T.R., Gegg M.E., Geng J., Germain M., Gestwicki J.E., Gewirtz D.A., Ghavami S., Ghosh P., Giammarioli A.M., Giatromanolaki A.N., Gibson S.B., Gilkerson R.W., Ginger M.L., Ginsberg H.N., Golab J., Goligorsky M.S., Golstein P., Gomez-Manzano C., Goncu E., Gongora C., Gonzalez C.D., Gonzalez R., González-Estévez C., González-Polo R.A., Gonzalez-Rey E., Gorbunov N.V., Gorski S., Goruppi S., Gottlieb R.A., Gozuacik D., Granato G.E., Grant G.D., Green K.N., Gregorc A., Gros F., Grose C., Grunt T.W., Gual P., Guan J.-L., Guan K.-L., Guichard S.M., Gukovskaya A.S., Gukovsky I., Gunst J., Gustafsson Å.B., Halayko A.J., Hale A.N., Halonen S.K., Hamasaki M., Han F., Han T., Hancock M.K., Hansen M., Harada H., Harada M., Hardt S.E., Harper J.W., Harris A.L., Harris J., Harris S.D., Hashimoto M., Haspel J.A., Hayashi S.-i., Hazelhurst L.A., He C., He Y.-W., Hébert M.-J., Heidenreich K.A., Helfrich M.H., Helgason G.V., Henske E.P., Herman B., Herman P.K., Hetz C., Hilfiker S., Hill J.A., Hocking L.J., Hofman P., Hofmann T.G., Höhfeld J., Holyoake T.L., Hong M.-H., Hood D.A., Hotamisligil G.S., Houwerzijl E.J., Høyer-Hansen M., Hu B., Hu C.-a.A., Hu H.-M., Hua Y., Huang C., Huang J., Huang S., Huang W.-P., Huber T.B., Huh W.-K., Hung T.-H., Hupp T.R., Hur G.M., Hurley J.B., Hussain S.N.A., Hussey P.J., Hwang J.J., Hwang S., Ichihara A., Ilkhanizadeh S., Inoki K., Into T., Iovane V., Iovanna J.L., Ip N.Y., Isaka Y., Ishida H., Isidoro C., Isobe K.-i., Iwasaki A., Izquierdo M., Izumi Y., Jaakkola P.M., Jäättelä M., Jackson G.R., Jackson W.T., Janji B., Jendrach M., Jeon J.-H., Jeung E.-B., Jiang H., Jiang H., Jiang J.X., Jiang M., Jiang Q., Jiang X., Jiang X., Jiménez A., Jin M., Jin S.V., Joe C.O., Johansen T., Johnson D.E., Johnson G.V.W., Jones N.L., Joseph B., Joseph S.K., Joubert A.M., Juhász G., Juillerat-Jeanneret L., Jung C.H., Jung Y.-K., Kaarniranta K., Kaasik A., Kabuta T., Kadowaki M., Kågedal K., Kamada Y., Kaminskyy V.O., Kampinga H.H., Kanamori H., Kang C., Kang K.B., Kang K.I., Kang R., Kang Y.-A., Kanki T., Kanneganti T.-D., Kanno H., Kanthasamy A.G., Kanthasamy A., Karantza V., Kaushal G.P., Kaushik S., Kawazoe Y., Ke P.-Y., Kehrl J.H., Kelekar A., Kerkhoff C., Kessel D.H., Khalil H., Kiel J.A.K.W., Kiger A.A., Kihara A., Kim D.R., Kim D.-H., Kim D.-H., Kim E.-K., Kim H.-R., Kim J.-S., Kim J.H., Kim J.C., Kim J.K., Kim P.K.,

Kim S.W., Kim Y.-S., Kim Y., Kimchi A., Kimmelman A.C., King J.S., Kinsella T.J., Kirkin V., Kirshenbaum L.A., Kitamoto K., Kitazato K., Klein L., Klimecki W.T., Klucken J., Knecht E., Ko B.C.B., Koch J.C., Koga H., Koh J.-Y., Koh Y.H., Koike M., Komatsu M., Kominami E., Kong H.J., Kong W.-J., Korolchuk V.I., Kotake Y., Koukourakis M.I., Kouri Flores J.B., Kovács A.L., Kraft C., Krainc D., Krämer H., Kretz-Remy C., Krichevsky A.M., Kroemer G., Krüger R., Krut O., Ktistakis N.T., Kuan C.-Y., Kucharczyk R., Kumar A., Kumar R., Kumar S., Kundu M., Kung H.-J., Kurz T., Kwon H.J., La Spada A.R., Lafont F., Lamark T., Landry J., Lane J.D., Lapaquette P., Laporte J.F., László L., Lavandero S., Lavoie J.N., Layfield R., Lazo P.A., Le W., Le Cam L., Ledbetter D.J., Lee A.J.X., Lee B.-W., Lee G.M., Lee J., Lee J.-h., Lee M., Lee M.-S., Lee S.H., Leeuwenburgh C., Legembre P., Legouis R., Lehmann M., Lei H.-Y., Lei Q.-Y., Leib D.A., Leiro J., Lemasters J.J., Lemoine A., Lesniak M.S., Lev D., Levenson V.V., Levine B., Levy E., Li F., Li J.-L., Li L., Li S., Li W., Li X.-J., Li Y.-B., Li Y.-P., Liang C., Liang Q., Liao Y.-F., Liberski P.P., Lieberman A., Lim H.J., Lim K.-L., Lim K., Lin C.-F., Lin F.-C., Lin J., Lin J.D., Lin K., Lin W.-W., Lin W.-C., Lin Y.-L., Linden R., Lingor P., Lippincott-Schwartz J., Lisanti M.P., Liton P.B., Liu B., Liu C.-F., Liu K., Liu L., Liu Q.A., Liu W., Liu Y.-C., Liu Y., Lockshin R.A., Lok C.-N., Lonial S., Loos B., Lopez-Berestein G., López-Otín C., Lossi L., Lotze M.T., Low P., Lu B., Lu B., Lu B., Lu Z., Luciano F., Lukacs N.W., Lund A.H., Lynch-Day M.A., Ma Y., Macian F., MacKeigan J.P., Macleod K.F., Madeo F., Maiuri L., Maiuri M.C., Malagoli D., Malicdan M.C.V., Malorni W., Man N., Mandelkow E.-M., Manon S., Manov I., Mao K., Mao X., Mao Z., Marambaud P., Marazziti D., Marcel Y.L., Marchbank K., Marchetti P., Marciniak S.J., Marcondes M., Mardi M., Marfe G., Mariño G., Markaki M., Marten M.R., Martin S.J., Martinand-Mari C., Martinet W., Martinez-Vicente M., Masini M., Matarrese P., Matsuo S., Matteoni R., Mayer A., Mazure N.M., McConkey D.J., McConnell M.J., McDermott C., McDonald C., McInerney G.M., McKenna S.L., McLaughlin B., McLean P.J., McMaster C.R., McQuibban G.A., Meijer A.J., Meisler M.H., Meléndez A., Melia T.J., Melino G., Mena M.A., Menendez J.A., Menna-Barreto R.F.S., Menon M.B., Menzies F.M., Mercer C.A., Merighi A., Merry D.E., Meschini S., Meyer C.G., Meyer T.F., Miao C.-Y., Miao J.-Y., Michels P.A.M., Michiels C., Mijaljica D., Milojkovic A., Minucci S., Miracco C., Miranti C.K., Mitroulis I., Miyazawa K., Mizushima N., Mograbi B., Mohseni S., Molero X., Mollereau B., Mollinedo F., Momoi T., Monastyrska I., Monick M.M., Monteiro M.J., Moore M.N., Mora R., Moreau K., Moreira P.I., Moriyasu Y., Moscat J., Mostowy S., Mottram J.C., Motyl T., Moussa C.E.-H., Müller S., Muller S., Münger K., Münz C., Murphy L.O., Murphy M.E., Musarò A., Mysorekar I., Nagata E., Nagata K., Nahimana A., Nair U., Nakagawa T., Nakahira K., Nakano H., Nakatogawa H., Nanjundan M., Naqvi N.I., Narendra D.P., Narita M., Navarro M., Nawrocki S.T., Nazarko T.Y., Nemchenko A., Netea M.G., Neufeld T.P., Ney P.A., Nezis I.P., Nguyen H.P., Nie D., Nishino I., Nislow C., Nixon R.A., Noda T., Noegel A.A., Nogalska A., Noguchi S., Notterpek L., Novak I., Nozaki T., Nukina N., Nürnberger T., Nyfeler B., Obara K., Oberley T.D., Oddo S., Ogawa M., Ohashi T., Okamoto K., Oleinick N.L., Oliver F.J., Olsen L.J., Olsson S., Opota O., Osborne T.F., Ostrander G.K., Otsu K., Ou J.-h.J., Ouimet M., Overholtzer M., Ozpolat B., Paganetti P., Pagnini U., Pallet N., Palmer G.E., Palumbo C., Pan T., Panaretakis T., Pandey U.B., Papackova Z., Papassideri I., Paris I., Park J., Park O.K., Parys J.B., Parzych K.R., Patschan S., Patterson C., Pattingre S., Pawelek J.M., Peng J., Perlmutter D.H., Perrotta I., Perry G., Pervaiz S., Peter M., Peters G.J., Petersen M., Petrovski G., Phang J.M., Piacentini M., Pierre P., Pierrefite-Carle V., Pierron G., Pinkas-Kramarski R., Piras A., Piri N., Plataniias L.C., Pöggeler S., Poirot M., Poletti A., Poüs C., Pozuelo-Rubio M., Prætorius-Ibba M., Prasad A., Prescott M., Priault M., Produit-Zengaffinen N., Progulske-Fox A., Proikas-Cezanne T., Przedborski S., Przyklenk K., Puertollano R., Puyal J., Qian S.-B., Qin L., Qin Z.-H., Quaggin S.E., Raben N., Rabinowich H., Rabkin S.W., Rahman I.,

Rami A., Ramm G., Randall G., Randow F., Rao V.A., Rathmell J.C., Ravikumar B., Ray S.K., Reed B.H., Reed J.C., Reggiori F., Régnier-Vigouroux A., Reichert A.S., Reiners J.J., Jr, Reiter R.J., Ren J., Revuelta J.L., Rhodes C.J., Ritis K., Rizzo E., Robbins J., Roberge M., Roca H., Roccheri M.C., Rocchi S., Rodemann H.P., Rodríguez de Córdoba S., Rohrer B., Roninson I.B., Rosen K., Rost-Roszkowska M.M., Rouis M., Rouschop K.M.A., Rovetta F., Rubin B.P., Rubinsztejn D.C., Ruckdeschel K., Rucker E.B., Rudich A., Rudolf E., Ruiz-Opazo N., Russo R., Rusten T.E., Ryan K.M., Ryter S.W., Sabatini D.M., Sadoshima J., Saha T., Saitoh T., Sakagami H., Sakai Y., Salekdeh G.H., Salomoni P., Salvaterra P.M., Salvesen G., Salvioli R., Sanchez A.M.J., Sánchez-Alcázar J.A., Sánchez-Prieto R., Sandri M., Sankar U., Sansanwal P., Santambrogio L., Saran S., Sarkar S., Sarwal M., Sasakawa C., Sasnauskiene A., Sass M., Sato K., Sato M., Schapira A.H.V., Scharl M., Schätzl H.M., Scheper W., Schiaffino S., Schneider C., Schneider M.E., Schneider-Stock R., Schoenlein P.V., Schorderet D.F., Schüller C., Schwartz G.K., Scorrano L., Sealy L., Seglen P.O., Segura-Aguilar J., Seiliez I., Seleverstov O., Sell C., Seo J.B., Separovic D., Setaluri V., Setoguchi T., Settembre C., Shacka J.J., Shanmugam M., Shapiro I.M., Shaulian E., Shaw R.J., Shelhamer J.H., Shen H.-M., Shen W.-C., Sheng Z.-H., Shi Y., Shibuya K., Shidoji Y., Shieh J.-J., Shih C.-M., Shimada Y., Shimizu S., Shintani T., Shirihai O.S., Shore G.C., Sibirny A.A., Sidhu S.B., Sikorska B., Silva-Zacarin E.C.M., Simmons A., Simon A.K., Simon H.-U., Simone C., Simonsen A., Sinclair D.A., Singh R., Sinha D., Sinicrope F.A., Sirko A., Siu P.M., Sivridis E., Skop V., Skulachev V.P., Slack R.S., Smaili S.S., Smith D.R., Soengas M.S., Soldati T., Song X., Sood A.K., Soong T.W., Sotgia F., Spector S.A., Spies C.D., Springer W., Srinivasula S.M., Stefanis L., Steffan J.S., Stendel R., Stenmark H., Stephanou A., Stern S.T., Sternberg C., Stork B., Strålfors P., Subauste C.S., Sui X., Sulzer D., Sun J., Sun S.-Y., Sun Z.-J., Sung J.J.Y., Suzuki K., Suzuki T., Swanson M.S., Swanton C., Sweeney S.T., Sy L.-K., Szabadkai G., Tabas I., Taegtmeier H., Tafani M., Takács-Vellai K., Takano Y., Takegawa K., Takemura G., Takeshita F., Talbot N.J., Tan K.S.W., Tanaka K., Tanaka K., Tang D., Tang D., Tanida I., Tannous B.A., Tavernarakis N., Taylor G.S., Taylor G.A., Taylor J.P., Terada L.S., Terman A., Tettamanti G., Thevissen K., Thompson C.B., Thorburn A., Thumm M., Tian F., Tian Y., Tocchini-Valentini G., Tolkovsky A.M., Tomino Y., Tönges L., Tooze S.A., Tournier C., Tower J., Towns R., Trajkovic V., Travassos L.H., Tsai T.-F., Tschan M.P., Tsubata T., Tsung A., Turk B., Turner L.S., Tyagi S.C., Uchiyama Y., Ueno T., Umekawa M., Umemiya-Shirafuji R., Unni V.K., Vaccaro M.I., Valente E.M., Van den Berghe G., van der Klei I.J., van Doorn W., van Dyk L.F., van Egmond M., van Grunsven L.A., Vandenabeele P., Vandenbergh W.P., Vanhorebeek I., Vaquero E.C., Velasco G., Vellai T., Vicencio J.M., Vierstra R.D., Vila M., Vindis C., Viola G., Viscomi M.T., Voitsekhovskaja O.V., von Haefen C., Votruba M., Wada K., Wade-Martins R., Walker C.L., Walsh C.M., Walter J., Wan X.-B., Wang A., Wang C., Wang D., Wang F., Wang F., Wang G., Wang H., Wang H.-G., Wang H.-D., Wang J., Wang K., Wang M., Wang R.C., Wang X., Wang X.J., Wang Y.-J., Wang Y., Wang Z.-B., Wang Z.C., Wang Z., Wansink D.G., Ward D.M., Watada H., Waters S.L., Webster P., Wei L., Wehl C.C., Weiss W.A., Welford S.M., Wen L.-P., Whitehouse C.A., Whitton J.L., Whitworth A.J., Wileman T., Wiley J.W., Wilkinson S., Willbold D., Williams R.L., Williamson P.R., Wouters B.G., Wu C., Wu D.-C., Wu W.K.K., Wyttenbach A., Xavier R.J., Xi Z., Xia P., Xiao G., Xie Z., Xie Z., Xu D.-z., Xu J., Xu L., Xu X., Yamamoto A., Yamamoto A., Yamashina S., Yamashita M., Yan X., Yanagida M., Yang D.-S., Yang E., Yang J.-M., Yang S.Y., Yang W., Yang W.Y., Yang Z., Yao M.-C., Yao T.-P., Yeganeh B., Yen W.-L., Yin J.-j., Yin X.-M., Yoo O.-J., Yoon G., Yoon S.-Y., Yorimitsu T., Yoshikawa Y., Yoshimori T., Yoshimoto K., You H.J., Youle R.J., Younes A., Yu L., Yu S.-W., Yu W.H., Yuan Z.-M., Yue Z., Yun C.-H., Yuzaki M., Zabirnyk O., Silva-Zacarin E., Zacks D., Zacksenhaus E., Zaffaroni N., Zakeri Z., Zeh H.J., 3rd, Zeitlin S.O., Zhang H., Zhang H.-L., Zhang J., Zhang J.-P., Zhang L., Zhang L., Zhang M.-Y., Zhang X.D., Zhao M., Zhao Y.-F., Zhao Y., Zhao Z.J., Zheng X., Zhivotovsky B., Zhong Q., Zhou C.-Z., Zhu C., Zhu W.-G.,

- Zhu X.-F., Zhu X., Zhu Y., Zoladek T., Zong W.-X., Zorzano A., Zschocke J., Zuckerbraun B. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy // *Autophagy*. 2012. V. 8, No 4. P. 445–544. <https://doi.org/10.4161/auto.19496>.
21. Mauthe M., Orhon I., Rocchi C., Zhou X., Luhr M., Hijlkema K.-J., Coppes R.P., Engedal N., Mari M., Reggiori F. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion // *Autophagy*. 2018. V. 14, No 8. P. 1435–1455. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>.
 22. D'Arcy M.S. Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy // *Cell Biol. Int.* 2019. V. 43, No 6. P. 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.
 23. Menon M.B., Dhamija S. Beclin 1 phosphorylation – at the center of autophagy regulation // *Front. Cell Dev. Biol.* 2018. V. 6. Art. 137. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00137>.
 24. Li W., He P., Huang Y., Li Y.-F., Lu J., Li M., Kurihara H., Luo Z., Meng T., Onishi M., Ma C., Jiang L., Hu Y., Gong Q., Zhu D., Xu Y., Liu R., Liu L., Yi C., Zhu Y., Ma N., Okamoto K., Xie Z., Liu J., He R.-R., Feng D. Selective autophagy of intracellular organelles: Recent research advances // *Theranostics*. 2021. V. 11, No 1. P. 222–226. <https://doi.org/10.7150/thno.49860>.
 25. Lamark T., Kirkin V., Dikic I., Johansen T. NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets // *Cell Cycle*. 2009. V. 8, No 13. P. 1986–1990. <https://doi.org/10.4161/cc.8.13.8892>.
 26. Nezis I.P., Simonsen A., Sagona A.P., Finley K., Gaumer S., Contamine D., Rusten T.E., Stenmark H., Brech A. Ref(2)P, the *Drosophila melanogaster* homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain // *J. Cell Biol.* 2008. V. 180, No 6. P. 1065–1071. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711108>.
 27. Jara O., Mysliwiec H., Minogue P.J., Berthoud V.M., Beyer E.C. p62/Sequestosome 1 levels increase and phosphorylation is altered in Cx50D47A lenses, but deletion of p62/sequestosome 1 does not improve transparency // *Mol. Vision*. 2020. V. 26. P. 204–215.
 28. 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. V. 171, No 4. P. 603–614. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507002>.
 29. Karim M.R., Kanazawa T., Daigaku Y., Fujimura S., Miotto G., Kadowaki M. Cytosolic LC3 ratio as a sensitive index of macroautophagy in isolated rat hepatocytes and H4-II-E cells // *Autophagy*. 2007. V. 3, No 6. P. 553–560. <https://doi.org/10.4161/auto.4615>.
 30. Bartlett B.J., Isakson P., Lewerenz J., Sanchez H., Kotzebue R.W., Cumming R.C., Harris G.L., Nezis I.P., Schubert D.R., Simonsen A., Finley K.D. p62, Ref(2)P and ubiquitinated proteins are conserved markers of neuronal aging, aggregate formation and progressive autophagic defects // *Autophagy*. 2011. V. 7, No 6. P. 572–583. <https://doi.org/10.4161/auto.7.6.14943>.
 31. Луговая А.В., Эмануэль В.С., Артемова А.В., Митрейкин В.Ф. Современные подходы к оценке биологических маркеров аутофагии и апоптоза при остром ишемическом инсульте // *Современные проблемы науки и образования*. 2020. № 4. С. 159–174. <https://doi.org/10.17513/spno.30017>.
 32. Kadowaki M., Karim M.R. Chapter 13 Cytosolic LC3 ratio as a quantitative index of macroautophagy. Ser.: *Methods in Enzymology*. V. 452: *Autophagy in mammalian systems, part B* / Klionsky D.J. (Ed.). San Diego, CA: Acad. Press, 2009. P. 199–213. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03613-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03613-6).
 33. Jaber N., Zong W.-X. Class III PI3K Vps34: Essential roles in autophagy, endocytosis, and heart and liver function // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2013. V. 1280, No 1. P. 48–51. <https://doi.org/10.1111/nyas.12026>.

34. 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. V. 10. Art. 793328. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.793328>.
35. Bronietzki A.W., Schuster M., Schmitz I. Autophagy in T-cell development, activation and differentiation // *Immunol. Cell Biol.* 2015. V. 93, No 1. P. 25–34. <https://doi.org/10.1038/icb.2014.81>.
36. Shevryev D., Tereshchenko V. Treg heterogeneity, function, and homeostasis // *Front. Immunol.* 2020. V. 10. Art. 3100. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03100>.
37. Kabat A.M., Harrison O.J., Riffelmacher T., Moghaddam A.E., Pearson C.F., Laing A., Abeler-Dörner L., Forman S.P., Grecis R.K., Sattentau Q., Simon A.K., Pott J., Maloy K.J. The autophagy gene *Atg16/1* differentially regulates T_{reg} and T_H2 cells to control intestinal inflammation // *eLife*. 2016. V. 5. Art. e12444. <https://doi.org/10.7554/eLife.12444>.
38. Zhang J., Chen L., Xiong F., Zhang S., Huang K., Zhang Z., Wang C.-Y. Autophagy in regulatory T cells: A double-edged sword in disease settings // *Mol. Immunol.* 2019. V. 109. P. 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.02.004>.

Поступила в редакцию 06.05.2024

Принята к публикации 28.06.2024

Бурцева Анастасия Владимировна, магистрант кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: renardtriste00@gmail.com

Смирнова Элина Владимировна, студент кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: smirnova.290331@gmail.com

Абрамов Сергей Николаевич, младший научный сотрудник НИЛ «OpenLab Генные и клеточные технологии» Научно-клинического центра прецизионной и регенеративной медицины Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: 007abramov@mail.ru

Тихомирова Мария Владимировна, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: mary20011994@mail.ru

Афанасьева Зинаида Александровна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры онкологии, радиологии и паллиативной медицины

Казанская государственная медицинская академия
ул. Муштари, д. 11, г. Казань, 420012, Россия
E-mail: z-afanasieva@mail.ru

Абрамова Зинаида Ивановна, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: ziabramova@mail.ru

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2024.4.658-682

Autophagy in Mononuclear Cells from Patients with Autoimmune Thyroiditis*A.V. Burtseva^{a*}, E.V. Smirnova^{a**}, S.N. Abramov^{a***}, M.V. Tikhomirova^{a****},
Z.A. Afanasyeva^{b*****}, Z.I. Abramova^{a*****}*^aKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia^bKazan State Medical Academy, Kazan, 420012 RussiaE-mail: *renardtriste00@gmail.com, **smirnova.290331@gmail.com, ***007abramov@mail.ru,
****mary20011994@mail.ru, *****z-afanasieva@mail.ru, *****ziabramova@mail.ru

Received May 6, 2024; Accepted June 28, 2024

Abstract

Autoimmune thyroiditis (AIT) is a chronic thyroid disorder wherein overstimulated CD4⁺T lymphocytes activate CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes, thereby inducing Fas-mediated apoptosis of thyrocytes and reducing the hormonal activity of the thyroid gland. Recent studies suggest that autophagy, a process vital for maintaining cellular homeostasis through the degradation of damaged proteins and organelles in autolysosomes, is involved in the pathogenesis of autoimmune diseases. This article examines autophagy in peripheral blood mononuclear cells and the expression of key autophagy proteins (Vps34, p62, and LC3) in patients with AIT. The number of autophagosomes in the cells was tracked and assessed using flow cytometry. The expression of the protein markers was measured by western blotting. It was demonstrated that the levels of Vps34, LC3-II, and p62 increased significantly in the lymphocytes of all patients with AIT. The high level of the autophagosome protein LC3-II correlated with that of the ubiquitin-binding protein p62, which may indicate a disruption in the late stage of autophagy, i.e., in the fusion of autophagosomes with lysosomes. Impaired autophagy promotes excessive accumulation of autophagosomes in the cytoplasm, which, in turn, triggers apoptotic or necrotic cell death. Therefore, understanding the mechanisms of impaired autophagy in lymphocytes could be a promising avenue for slowing and limiting the damage associated with the onset and development of AIT.

Keywords: lymphocytes, autophagy, autoimmune thyroiditis, flow cytometry**Institutional Review Board Statement.** The study was conducted in accordance with the WMA Declaration of Helsinki and approved by the Local Ethics Committee of Republican Clinical Oncological Dispensary and Kazan Federal University (protocol no. 8 dated February 13, 2018).**Informed Consent Statement.** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.**Acknowledgements.** This study was supported by Russian Science Foundation (project no. 23-25-00443).**Conflicts of Interest.** The authors declare no conflicts of interest.**Figure Captions**

Fig. 1. Assessment of the relative number of mononuclear cells containing autophagosomes by flow cytometry during culturing: *a*) gating strategy for lymphocytes from patients with AIT (*a1*), as well as negative (*a2*) and positive controls (*a3*) for the accumulation of autophagosomes; *b*) accumulation of autophagosomes in cells from healthy donors (*b2*) and patients with AIT (*b4*) after 72 h, compared to freshly isolated samples (*b1* and *b3*, respectively; green fluorescence); *c*) percentage of lymphocytes with autophagosomes cultured for 72 h in low-serum conditions, from healthy donors (**C**) and patients with AIT (**AIT**), as shown by densitometry (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, ns – not significant).

- Fig. 2. Schematic outline of autophagy, as cited in [10].
- Fig. 3. Schematic conversion of the inactive Bcl-2–Beclin-1 complex into the active PI3K complex, as cited in [10].
- Fig. 4. Levels of the autophagy initiator Vps34 in mononuclear cells from healthy donors (C) and patients with AIT (AIT): a) Vps34 signal intensity normalized to β -actin; b) Vps34 expression, as assessed by immunoblotting (** – $p < 0.005$, *** – $p < 0.0005$).
- Fig. 5 Levels of the adaptor protein p62 (SQSTM1) in mononuclear cells from healthy donors (C) and patients with AIT (AIT): a) p62 expression intensity normalized to β -actin; b) representative western blotting with antibodies against SQSTM1 (**** – $p < 0.0001$, ns – not significant).
- Fig. 6. Autophagic flux in mononuclear cells from healthy donors (C) and patients with AIT (AIT) based on the expression of cytoplasmic (LC3-I) and lipidated (LC3-II) proteins: a) LC3-I signal intensity normalized to β -actin; b) LC3-II signal intensity normalized to β -actin; c) autophagy initiation assessed by the ratio LC3-I/LC3-II; d) autophagic activity assessed by the ratio LC3-II/LC3-I; e) representative western blotting of LC3-I, LC3-II, and β -actin expression in mononuclear cells, either freshly isolated or cultured for 72 h. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.005$, *** – $p < 0.0005$, **** – $p < 0.0001$, ns – not significant.
- Fig. 7. Autophagic flux activity in mononuclear cells from healthy donors (C) and patients with AIT (AIT): a) p62 and LC3-II signal intensity normalized to β -actin in the cells of healthy donors; b) p62 and LC3-II signal intensity normalized to β -actin in the cells of patients with AIT; c) autophagic flux activity assessed by the ratio LC3-II/p62 (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.005$, **** – $p < 0.0001$, ns – not significant).

References

1. Troshina E.A. Chronic autoimmune thyroiditis is a “signal disease” in the multiorgan autoimmune syndrome. *Probl. Endokrinol.*, 2023, vol. 69, no. 4, pp. 4–10. <https://doi.org/10.14341/probl13361>. (In Russian)
2. Luk'yanchikov V.S. Autoimmune thyroiditis. A correlation with thyroid and non-endocrine metaplasias. *RMZh*, 2013, vol. 21, no. 12, pp. 657–659. (In Russian)
3. Ragusa F., Fallahi P., Elia G., Gonnella D., Paparo S.R., Giusti C., Churilov L.P., Ferrari S.M., Antonelli A. Hashimotos' thyroiditis: Epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy. *Best Pract. Res., Clin. Endocrinol. Metab.*, 2019, vol. 33, no. 6, art. 101367. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2019.101367>.
4. Radetti G. Clinical aspects of Hashimoto's thyroiditis. In: G. Szinnai (Ed.) *Paediatric Thyroidology*. Ser.: Endocrine Development. Vol. 26. Basel, S. Karger AG, 2014. pp. 158–170. <https://doi.org/10.1159/000363162>.
5. Caturegli P., De Remigis A., Rose N.R. Hashimoto thyroiditis: Clinical and diagnostic criteria. *Autoimmun. Rev.*, 2014, vol. 13, nos. 4–5, pp. 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.007>.
6. 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, art. 979167. <https://doi.org/10.1155/2015/979167>.
7. Salmaso C., Bagnasco M., Pesce G., Montagna P., Brizzolara R., Altrinetti V., Richiusa P., Galluzzo A., Giordano C. Regulation of apoptosis in endocrine autoimmunity: Insights from Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2002, vol. 996, no. 1, pp. 496–501. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04253.x>.
8. Vukovic R., Zeljkovic A., Bufan B., Spasojevic-Kalimanovska V., Milenkovic T., Vekic J. Hashimoto thyroiditis and dyslipidemia in childhood: A review. *Front. Endocrinol.*, 2019, vol. 10, art. 868. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00868>.
9. Yang Z., Goronzy J.J., Weyand C.M. Autophagy in autoimmune disease. *J. Mol. Med.*, 2015, vol. 93, no. 7, pp. 707–717. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1297-8>.
10. Shliapina V.L., Yurtaeva S.V., Rubtsova M.P., Dontsova O.A. At the crossroads: Mechanisms of apoptosis and autophagy in cell life and death. *Acta Nat.*, 2021, vol. 13, no. 2(49), pp. 106–115. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11208>.

11. Netea-Maier R.T., Plantinga T.S., van de Veerdonk F.L., Smit J.W., Netea M.G. Modulation of inflammation by autophagy: Consequences for human disease. *Autophagy*, 2016, vol. 12, no. 2, pp. 245–260. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1071759>.
12. Denton D., Kumar S. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ.*, 2019, vol. 26, no. 4, pp. 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0252-y>.
13. Wu Z.-Z., Zhang J.-J., Gao C.-C., Zhao M., Liu S.-Y., Gao G.-M., Zheng Z.-H. Expression of autophagy related genes mTOR, Becline-1, LC3 and p62 in the peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.*, 2017, vol. 6, no. 1, pp. 1–8.
14. Liang P., Le W. Role of autophagy in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurosci. Bull.*, 2015, vol. 31, no. 4, pp. 435–444. <https://doi.org/10.1007/s12264-015-1545-5>.
15. Wua D.J., Adamopoulos I.E. Autophagy and autoimmunity. *Clin. Immunol.*, 2017, vol. 176, pp. 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.01.007>.
16. Wang W., Zhang B.-T., Jiang Q.-L., Zhao H.-Q., Xu Q., Zeng Y., Xu J.-Y., Jiang J. Leptin receptor antagonist attenuates experimental autoimmune thyroiditis in mice by regulating Treg/Th17 cell differentiation. *Front. Endocrinol.*, 2022, vol. 13, art. 1042511. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1042511>.
17. Jia X., Zhai T., Qu C., Ye J., Zhao J., Liu X., Zhang J.-a., Qian Q. Metformin reverses Hashimoto's thyroiditis by regulating key immune events. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, vol. 9, art. 685522. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.685522>.
18. Recktenwald D., Radbruch A. (Eds.) *Cell Separation Methods and Applications*. Boca Raton, FL, CRC Press, 1998. 352 p. <https://doi.org/10.1201/9781482273649>.
19. Kleiveland C.R. Peripheral blood mononuclear cells. Verhoeckx K., Cotter P., López-Expósito I., Kleiveland C., Lea T., Mackie A., Requena T., Swiatecka D., Wichers H. (Eds.). *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*. Cham, Springer, 2015, pp. 161–167. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_15.
20. Klionsky D.J., Abdalla F.C., Abeliovich H., Abaraham R.T., Acevedo-Arozena A., Adeli K., Agholme L., Agnello M., Agostinis P., Aguirre-Ghiso J.A., Ahn H.J., Ait-Mohamed O., Ait-Si-Ali S., Akematsu T., Akira S., Al-Younes H.M., Al-Zeer M.A., Albert M.L., Albin R.L., Alegre-Abarrategui J., Aleo M.F., Alirezai M., Almasan A., Almonte-Becerril M., Amano A., Amaravadi R.K., Amarnath S., Amer A.O., Andrieu-Abadie N., Anantharam V., Ann D.K., Anoopkumar-Dukie S., Aoki H., Apostolova N., Arancia G., Aris J.P., Asanuma K., Asare N.Y.O., Ashida H., Askanas V., Askew D.S., Auberger P., Baba M., Backues S.K., Baehrecke E.H., Bahr B.A., Bai X.-Y., Bailly Y., Baiocchi R., Baldini G., Balduini W., Ballabio A., Bamber B.A., Bampton E.T.W., Juhász G., Bartholomew C.R., Bassham D.C., Bast R.C., Batoko H., Bay B.-H., Beau I., Béchet D.M., Begley T.J., Behl C., Behrends C., Bekri S., Bellaire B., Bendall L.J., Benetti L., Berliocchi L., Bernardi H., Bernassola F., Besteiro S., Bhatia-Kissova I., Bi X., Biard-Piechaczyk M., Blum J.S., Boise L.H., Bonaldo P., Boone D.L., Bornhauser B.C., Bortoluci K.R., Bossis I., Bost F., Bourquin J.-P., Boya P., Boyer-Guittaut M., Bozhkov P.V., Brady N.R., Brancolini C., Brech A., Brenman J.E., Brennan A., Bresnick E.H., Brest P., Bridges D., Bristol M.L., Brookes P.S., Brown E.J., Brumell J.H., Brunetti-Pierri N., Brunk U.T., Bulman D.E., Bultman S.J., Bultynck G., Burbulla L.F., Bursch W., Butchar J.P., Buzgariu W., Bydlowski S.P., Cadwell K., Cahová M., Cai D., Cai J., Cai Q., Calabretta B., Calvo-Garrido J., Camougrand N., Campanella M., Campos-Salinas J., Candi E., Cao L., Caplan A.B., Carding S.R., Cardoso S.M., Carew J.S., Carlin C.R., Carmignac V., Carneiro L.A.M., Carra S., Caruso R.A., Casari G., Casas C., Castino R., Cebollero E., Cecconi F., Celli J., Chaachouay H., Chae H.-J., Chai C.-Y., Chan D.C., Chan E.Y., Chang R.C.-C., Che C.-M., Chen C.-C., Chen G.-C., Chen G.-Q., Chen M., Chen Q., Chen S.S.-L., Chen W., Chen X., Chen X., Chen X., Chen Y.-G., Chen Y., Chen Y., Chen Y.-J., Chen Z., Cheng A., Cheng C.H.K., Cheng Y., Cheong H., Cheong J.-H., Cherry S., Chess-Williams R., Cheung Z.H., Chevet E., Chiang H.-L., Chiarelli R., Chiba T., Chin L.-S., Chiou S.-H., Chisari F.V., Cho C.H., Cho D.-H., Choi A.M.K., Choi D., Choi K.S., Choi M.E., Chouaib S., Choubey D., Choubey V., Chu C.T., Chuang T.-H., Chueh S.-H., Chun T., Chwae Y.-J., Chye M.-L., Ciarcia R., Ciriolo M.R., Clague M.J., Clark R.S.B., Clarke P.G.H., Clarke R., Codogno P., Coller H.A., Colombo M.I., Comincini S., Condello M., Condorelli F., Cookson M.R., Coombs G.H., Coppens I., Corbalan R., Cossart P., Costelli P., Costes S., Coto-Montes A., Couve E., Coxon F.P., Cregg J.M., Crespo J.L., Cronjé M.J., Cuervo A.M., Cullen J.J., Czaja M.J., D'Amelio M., Darfeuille-Michaud A., Davids L.M.,

Davies F.E., De Felici M., de Groot J.F., de Haan C.A.M., De Martino L., De Milito A., De Tata V., Debnath J., Degterev A., Dehay B., Delbridge L.M.D., Demarchi F., Deng Y.Z., Dengjel J., Dent P., Denton D., Deretic V., Desai S.D., Devenish R.J., Di Gioacchino M., Di Paolo G., Di Pietro C., Díaz-Araya G., Díaz-Laviada I., Diaz-Meco M.T., Diaz-Nido J., Dikic I., Dinesh-Kumar S.P., Ding W.-X., Distelhorst C.W., Diwan A., Djavaheri-Mergny M., Dokudovskaya S., Dong Z., Dorsey F.C., Dosenko V., Dowling J.J., Doxsey S., Dreux M., Drew M.E., Duan Q., Duchosal M.A., Duff K.E., Dugail I., Durbeej M., Duszenko M., Edelstein C.L., Edinger A.L., Egea G., Eichinger L., Eissa N.T., Ekmekcioglu S., El-Deiry W.S., Elazar Z., Elgendy M., Ellerby L.M., Eng K.E., Engelbrecht A.-M., Engelender S., Erenpreisa J., Escalante R., Esclatine A., Eskelinen E.-L., Espert L., Espina V., Fan H., Fan J., Fan Q.-W., Fan Z., Fang S., Fang Y., Fanto M., Fanzani A., Farkas T., Farre J.-C., Faure M., Fechheimer M., Feng C.G., Feng J., Feng Q., Feng Y., Fésüs L., Feuer R., Figueiredo-Pereira M.E., Fimia G.M., Fingar D.C., Finkbeiner S., Finkel T., Finley K.D., Fiorito F., Fisher E.A., Fisher P.B., Flajolet M., Florez-McClure M.L., Florio S., Fon E.A., Fornai F., Fortunato F., Fotedar R., Fowler D.H., Fox H.S., Franco R., Frankel L.B., Fransen M., Fuentes J.M., Fueyo J., Fujii J., Fujisaki K., Fujita E., Fukuda M., Furukawa R.H., Gaestel M., Gailly P., Gajewska M., Galliot B., Galy V., Ganesh S., Ganetzky B., Ganley I.G., Gao F.-B., Gao G.F., Gao J., Garcia L., Garcia-Manero G., Garcia-Marcos M., Garmyn M., Gartel A.L., Gatti E., Gautel M., Gawriluk T.R., Gegg M.E., Geng J., Germain M., Gestwicki J.E., Gewirtz D.A., Ghavami S., Ghosh P., Giammarioli A.M., Giatromanolaki A.N., Gibson S.B., Gilkerson R.W., Ginger M.L., Ginsberg H.N., Golab J., Goligorsky M.S., Golstein P., Gomez-Manzano C., Goncu E., Gongora C., Gonzalez C.D., Gonzalez R., González-Estévez C., González-Polo R.A., Gonzalez-Rey E., Gorbunov N.V., Gorski S., Goruppi S., Gottlieb R.A., Gozuacik D., Granato G.E., Grant G.D., Green K.N., Gregore A., Gros F., Grose C., Grunt T.W., Gual P., Guan J.-L., Guan K.-L., Guichard S.M., Gukovskaya A.S., Gukovsky I., Gunst J., Gustafsson Å.B., Halayko A.J., Hale A.N., Halonen S.K., Hamasaki M., Han F., Han T., Hancock M.K., Hansen M., Harada H., Harada M., Hardt S.E., Harper J.W., Harris A.L., Harris J., Harris S.D., Hashimoto M., Haspel J.A., Hayashi S.-i., Hazelhurst L.A., He C., He Y.-W., Hébert M.-J., Heidenreich K.A., Helfrich M.H., Helgason G.V., Henske E.P., Herman B., Herman P.K., Hetz C., Hilfiker S., Hill J.A., Hocking L.J., Hofman P., Hofmann T.G., Höhfeld J., Holyoake T.L., Hong M.-H., Hood D.A., Hotamisligil G.S., Houwerzijl E.J., Høyer-Hansen M., Hu B., Hu C.-a.A., Hu H.-M., Hua Y., Huang C., Huang J., Huang S., Huang W.-P., Huber T.B., Huh W.-K., Hung T.-H., Hupp T.R., Hur G.M., Hurlley J.B., Hussain S.N.A., Hussey P.J., Hwang J.J., Hwang S., Ichihara A., Ilkhanizadeh S., Inoki K., Into T., Iovane V., Iovanna J.L., Ip N.Y., Isaka Y., Ishida H., Isidoro C., Isobe K.-i., Iwasaki A., Izquierdo M., Izumi Y., Jaakkola P.M., Jäättelä M., Jackson G.R., Jackson W.T., Janji B., Jendrach M., Jeon J.-H., Jeung E.-B., Jiang H., Jiang H., Jiang J.X., Jiang M., Jiang Q., Jiang X., Jiang X., Jiménez A., Jin M., Jin S.V., Joe C.O., Johansen T., Johnson D.E., Johnson G.V.W., Jones N.L., Joseph B., Joseph S.K., Joubert A.M., Juhász G., Juillerat-Jeanneret L., Jung C.H., Jung Y.-K., Kaarniranta K., Kaasik A., Kabuta T., Kadowaki M., Kågedal K., Kamada Y., Kaminsky V.O., Kampinga H.H., Kanamori H., Kang C., Kang K.B., Kang K.I., Kang R., Kang Y.-A., Kanki T., Kanneganti T.-D., Kanno H., Kanthasamy A.G., Kanthasamy A., Karantza V., Kaushal G.P., Kaushik S., Kawazoe Y., Ke P.-Y., Kehrl J.H., Kelekar A., Kerkhoff C., Kessel D.H., Khalil H., Kiel J.A.K.W., Kiger A.A., Kihara A., Kim D.R., Kim D.-H., Kim D.-H., Kim E.-K., Kim H.-R., Kim J.-S., Kim J.H., Kim J.C., Kim J.K., Kim P.K., Kim S.W., Kim Y.-S., Kim Y., Kimchi A., Kimmelman A.C., King J.S., Kinsella T.J., Kirkin V., Kirshenbaum L.A., Kitamoto K., Kitazato K., Klein L., Klimecki W.T., Klucken J., Knecht E., Ko B.C.B., Koch J.C., Koga H., Koh J.-Y., Koh Y.H., Koike M., Komatsu M., Kominami E., Kong H.J., Kong W.-J., Korolchuk V.I., Kotake Y., Koukourakis M.I., Kouri Flores J.B., Kovács A.L., Kraft C., Krainc D., Krämer H., Kretz-Remy C., Krichevsky A.M., Kroemer G., Krüger R., Krut O., Ktistakis N.T., Kuan C.-Y., Kucharczyk R., Kumar A., Kumar R., Kumar S., Kundu M., Kung H.-J., Kurz T., Kwon H.J., La Spada A.R., Lafont F., Lamark T., Landry J., Lane J.D., Lapaquette P., Laporte J.F., László L., Lavandro S., Lavoie J.N., Layfield R., Lazo P.A., Le W., Le Cam L., Ledbetter D.J., Lee A.J.X., Lee B.-W., Lee G.M., Lee J., Lee J.-h., Lee M., Lee M.-S., Lee S.H., Leeuwenburgh C., Legembre P., Legouis R., Lehmann M., Lei H.-Y., Lei Q.-Y., Leib D.A., Leiro J., Lemasters J.J., Lemoine A., Lesniak M.S., Lev D., Levenson V.V., Levine B., Levy E., Li F., Li J.-L., Li L., Li S., Li W., Li X.-J., Li Y.-B., Li Y.-P., Liang C., Liang Q., Liao Y.-F., Liberski P.P., Lieberman A., Lim H.J., Lim K.-L., Lim K., Lin C.-F., Lin F.-C., Lin J., Lin J.D., Lin K., Lin W.-W., Lin W.-C., Lin Y.-L., Linden R., Lingor P., Lippincott-Schwartz J., Lisanti M.P., Liton P.B., Liu B., Liu C.-F., Liu K., Liu L., Liu Q.A., Liu W., Liu Y.-C., Liu Y.

Lockshin R.A., Lok C.-N., Lonial S., Loos B., Lopez-Berestein G., López-Otín C., Lossi L., Lotze M.T., Low P., Lu B., Lu B., Lu B., Lu Z., Luciano F., Lukacs N.W., Lund A.H., Lynch-Day M.A., Ma Y., Macian F., MacKeigan J.P., Macleod K.F., Madeo F., Maiuri L., Maiuri M.C., Malagoli D., Malicdan M.C.V., Malorni W., Man N., Mandelkow E.-M., Manon S., Manov I., Mao K., Mao X., Mao Z., Marambaud P., Marazziti D., Marcel Y.L., Marchbank K., Marchetti P., Marciniak S.J., Marcondes M., Mardi M., Marfe G., Mariño G., Markaki M., Marten M.R., Martin S.J., Martinand-Mari C., Martinet W., Martinez-Vicente M., Masini M., Matarrese P., Matsuo S., Matteoni R., Mayer A., Mazure N.M., McConkey D.J., McConnell M.J., McDermott C., McDonald C., McInerney G.M., McKenna S.L., McLaughlin B., McLean P.J., McMaster C.R., McQuibban G.A., Meijer A.J., Meisler M.H., Meléndez A., Melia T.J., Melino G., Mena M.A., Menendez J.A., Menna-Barreto R.F.S., Menon M.B., Menzies F.M., Mercer C.A., Merighi A., Merry D.E., Meschini S., Meyer C.G., Meyer T.F., Miao C.-Y., Miao J.-Y., Michels P.A.M., Michiels C., Mijaljica D., Milojkovic A., Minucci S., Miracco C., Miranti C.K., Mitroulis I., Miyazawa K., Mizushima N., Mograbi B., Mohseni S., Molero X., Mollereau B., Mollinedo F., Momoi T., Monastyrska I., Monick M.M., Monteiro M.J., Moore M.N., Mora R., Moreau K., Moreira P.I., Moriyasu Y., Moscat J., Mostowy S., Mottram J.C., Motyl T., Moussa C.E.-H., Müller S., Muller S., Münger K., Münz C., Murphy L.O., Murphy M.E., Musarò A., Mysorekar I., Nagata E., Nagata K., Nahimana A., Nair U., Nakagawa T., Nakahira K., Nakano H., Nakatogawa H., Nanjundan M., Naqvi N.I., Narendra D.P., Narita M., Navarro M., Nawrocki S.T., Nazarko T.Y., Nemchenko A., Netea M.G., Neufeld T.P., Ney P.A., Nezis I.P., Nguyen H.P., Nie D., Nishino I., Nislow C., Nixon R.A., Noda T., Noegel A.A., Nogalska A., Noguchi S., Notterpek L., Novak I., Nozaki T., Nukina N., Nürnberger T., Nyfeler B., Obara K., Oberley T.D., Oddo S., Ogawa M., Ohashi T., Okamoto K., Oleinick N.L., Oliver F.J., Olsen L.J., Olsson S., Opota O., Osborne T.F., Ostrand G.K., Otsu K., Ou J.-h.J., Ouimet M., Overholtzer M., Ozpolat B., Paganetti P., Pagnini U., Pallet N., Palmer G.E., Palumbo C., Pan T., Panaretakis T., Pandey U.B., Papackova Z., Papassideri I., Paris I., Park J., Park O.K., Parys J.B., Parzych K.R., Patschan S., Patterson C., Pattingre S., Pawelek J.M., Peng J., Perlmutter D.H., Perrotta I., Perry G., Pervaiz S., Peter M., Peters G.J., Petersen M., Petrovski G., Phang J.M., Piacentini M., Pierre P., Pierrefite-Carle V., Pierron G., Pinkas-Kramarski R., Piras A., Piri N., Platanius L.C., Pöggeler S., Poirot M., Poletti A., Poüs C., Pozuelo-Rubio M., Prætorius-Ibba M., Prasad A., Prescott M., Priault M., Produit-Zengaffinen N., Progulske-Fox A., Proikas-Cezanne T., Przedborski S., Przyklenk K., Puertollano R., Puyal J., Qian S.-B., Qin L., Qin Z.-H., Quaggin S.E., Raben N., Rabinowich H., Rabkin S.W., Rahman I., Rami A., Ramm G., Randall G., Randow F., Rao V.A., Rathmell J.C., Ravikumar B., Ray S.K., Reed B.H., Reed J.C., Reggiori F., Régnier-Vigouroux A., Reichert A.S., Reiners J.J., Jr, Reiter R.J., Ren J., Revuelta J.L., Rhodes C.J., Ritis K., Rizzo E., Robbins J., Roberge M., Roca H., Roccheri M.C., Rocchi S., Rodemann H.P., Rodríguez de Córdoba S., Rohrer B., Roninson I.B., Rosen K., Rost-Roszkowska M.M., Rouis M., Rouschop K.M.A., Rovetta F., Rubin B.P., Rubinsztein D.C., Ruckdeschel K., Rucker E.B., Rudich A., Rudolf E., Ruiz-Opazo N., Russo R., Rusten T.E., Ryan K.M., Ryter S.W., Sabatini D.M., Sadoshima J., Saha T., Saitoh T., Sakagami H., Sakai Y., Salekdeh G.H., Salomoni P., Salvaterra P.M., Salvesen G., Salvioli R., Sanchez A.M.J., Sánchez-Alcázar J.A., Sánchez-Prieto R., Sandri M., Sankar U., Sansanwal P., Santambrogio L., Saran S., Sarkar S., Sarwal M., Sasakawa C., Sasnauskiene A., Sass M., Sato K., Sato M., Schapira A.H.V., Scharl M., Schätzl H.M., Scheper W., Schiaffino S., Schneider C., Schneider M.E., Schneider-Stock R., Schoenlein P.V., Schorderet D.F., Schüller C., Schwartz G.K., Scorrano L., Sealy L., Seglen P.O., Segura-Aguilar J., Seiliez I., Selevstov O., Sell C., Seo J.B., Separovic D., Setaluri V., Setoguchi T., Settembre C., Shacka J.J., Shanmugam M., Shapiro I.M., Shaulian E., Shaw R.J., Shelhamer J.H., Shen H.-M., Shen W.-C., Sheng Z.-H., Shi Y., Shibuya K., Shidoji Y., Shieh J.-J., Shih C.-M., Shimada Y., Shimizu S., Shintani T., Shirihai O.S., Shore G.C., Sibirny A.A., Sidhu S.B., Sikorska B., Silva-Zacarin E.C.M., Simmons A., Simon A.K., Simon H.-U., Simone C., Simonsen A., Sinclair D.A., Singh R., Sinha D., Sinicrope F.A., Sirko A., Siu P.M., Sivridis E., Skop V., Skulachev V.P., Slack R.S., Smaili S.S., Smith D.R., Soengas M.S., Soldati T., Song X., Sood A.K., Soong T.W., Sotgia F., Spector S.A., Spies C.D., Springer W., Srinivasula S.M., Stefanis L., Steffan J.S., Stendel R., Stenmark H., Stephanou A., Stern S.T., Sternberg C., Stork B., Strålfors P., Subauste C.S., Sui X., Sulzer D., Sun J., Sun S.-Y., Sun Z.-J., Sung J.J.Y., Suzuki K., Suzuki T., Swanson M.S., Swanton C., Sweeney S.T., Sy L.-K., Szabadkai G., Tabas I., Taegtmeier H., Tafani M., Takács-Vellai K., Takano Y., Takegawa K., Takemura G., Takeshita F., Talbot N.J., Tan K.S.W., Tanaka K., Tanaka K., Tang D., Tang D., Tanida I.,

- Tannous B.A., Tavernarakis N., Taylor G.S., Taylor G.A., Taylor J.P., Terada L.S., Terman A., Tettamanti G., Thevissen K., Thompson C.B., Thorburn A., Thumm M., Tian F., Tian Y., Tocchini-Valentini G., Tolkovsky A.M., Tomino Y., Tönges L., Tooze S.A., Tournier C., Tower J., Towns R., Trajkovic V., Travassos L.H., Tsai T.-F., Tschan M.P., Tsubata T., Tsung A., Turk B., Turner L.S., Tyagi S.C., Uchiyama Y., Ueno T., Umekawa M., Umemiya-Shirafuji R., Unni V.K., Vaccaro M.I., Valente E.M., Van den Berghe G., van der Klei I.J., van Doorn W., van Dyk L.F., van Egmond M., van Grunsven L.A., Vandenabeele P., Vandenberghe W.P., Vanhorebeek I., Vaquero E.C., Velasco G., Vellai T., Vicencio J.M., Vierstra R.D., Vila M., Vindis C., Viola G., Viscomi M.T., Voitsekhovskaja O.V., von Haefen C., Votruba M., Wada K., Wade-Martins R., Walker C.L., Walsh C.M., Walter J., Wan X.-B., Wang A., Wang C., Wang D., Wang F., Wang F., Wang G., Wang H., Wang H.-G., Wang H.-D., Wang J., Wang K., Wang M., Wang R.C., Wang X., Wang X.J., Wang Y.-J., Wang Y., Wang Z.-B., Wang Z.C., Wang Z., Wansink D.G., Ward D.M., Watada H., Waters S.L., Webster P., Wei L., Weihl C.C., Weiss W.A., Welford S.M., Wen L.-P., Whitehouse C.A., Whitton J.L., Whitworth A.J., Wileman T., Wiley J.W., Wilkinson S., Willbold D., Williams R.L., Williamson P.R., Wouters B.G., Wu C., Wu D.-C., Wu W.K.K., Wytenbach A., Xavier R.J., Xi Z., Xia P., Xiao G., Xie Z., Xie Z., Xu D.-z., Xu J., Xu L., Xu X., Yamamoto A., Yamamoto A., Yamashina S., Yamashita M., Yan X., Yanagida M., Yang D.-S., Yang E., Yang J.-M., Yang S.Y., Yang W., Yang W.Y., Yang Z., Yao M.-C., Yao T.-P., Yeganeh B., Yen W.-L., Yin J.-j., Yin X.-M., Yoo O.-J., Yoon G., Yoon S.-Y., Yorimitsu T., Yoshikawa Y., Yoshimori T., Yoshimoto K., You H.J., Youle R.J., Younes A., Yu L., Yu L., Yu S.-W., Yu W.H., Yuan Z.-M., Yue Z., Yun C.-H., Yuzaki M., Zabirnyk O., Silva-Zacarin E., Zacks D., Zacksenhaus E., Zaffaroni N., Zakeri Z., Zeh H.J., 3rd, Zeitlin S.O., Zhang H., Zhang H.-L., Zhang J., Zhang J.-P., Zhang L., Zhang L., Zhang M.-Y., Zhang X.D., Zhao M., Zhao Y.-F., Zhao Y., Zhao Z.J., Zheng X., Zhivotovsky B., Zhong Q., Zhou C.-Z., Zhu C., Zhu W.-G., Zhu X.-F., Zhu X., Zhu Y., Zoladek T., Zong W.-X., Zorzano A., Zschocke J., Zuckerbraun B. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 2012, vol. 8, no. 4, pp. 445–544. <https://doi.org/10.4161/auto.19496>.
21. Mauthe M., Orhon I., Rocchi C., Zhou X., Luhr M., Hijlkema K.-J., Coppes R.P., Engedal N., Mari M., Reggiori F. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 2018, vol. 14, no. 8, pp. 1435–1455. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>.
22. D'Arcy M.S. Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.*, 2019, vol. 43, no. 6, pp. 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.
23. Menon M.B., Dhamija S. Beclin 1 phosphorylation – at the center of autophagy regulation. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2018, vol. 6, art. 137. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00137>.
24. Li W., He P., Huang Y., Li Y.-F., Lu J., Li M., Kurihara H., Luo Z., Meng T., Onishi M., Ma C., Jiang L., Hu Y., Gong Q., Zhu D., Xu Y., Liu R., Liu L., Yi C., Zhu Y., Ma N., Okamoto K., Xie Z., Liu J., He R.-R., Feng D. Selective autophagy of intracellular organelles: Recent research advances. *Theranostics*, 2021, vol. 11, no. 1, pp. 222–226. <https://doi.org/10.7150/thno.49860>.
25. Lamark T., Kirkin V., Dikic I., Johansen T. NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle*, 2009, vol. 8, no. 13, pp. 1986–1990. <https://doi.org/10.4161/cc.8.13.8892>.
26. Nezis I.P., Simonsen A., Sagona A.P., Finley K., Gaumer S., Contamine D., Rusten T.E., Stenmark H., Brech A. Ref(2)P, the *Drosophila melanogaster* homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain. *J. Cell Biol.*, 2008, vol. 180, no. 6, pp. 1065–1071. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711108>.
27. Jara O., Mysliwiec H., Minogue P.J., Berthoud V.M., Beyer E.C. p62/Sequestosome 1 levels increase and phosphorylation is altered in Cx50D47A lenses, but deletion of p62/sequestosome 1 does not improve transparency. *Mol. Vision*, 2020, vol. 26, pp. 204–215.
28. 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. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507002>.

29. Karim M.R., Kanazawa T., Daigaku Y., Fujimura S., Miotto G., Kadowaki M. Cytosolic LC3 ratio as a sensitive index of macroautophagy in isolated rat hepatocytes and H4-II-E cells. *Autophagy*, 2007, vol. 3, no. 6, pp. 553–560. <https://doi.org/10.4161/auto.4615>.
30. Bartlett B.J., Isakson P., Lewerenz J., Sanchez H., Kotzebue R.W., Cumming R.C., Harris G.L., Nezis I.P., Schubert D.R., Simonsen A., Finley K.D. p62, Ref(2)P and ubiquitinated proteins are conserved markers of neuronal aging, aggregate formation and progressive autophagic defects. *Autophagy*, 2011, vol. 7, no. 6, pp. 572–583. <https://doi.org/10.4161/auto.7.6.14943>.
31. Lugovaya A.V., Emanuel V.S., Artemova A.V., Mitreikin V.F. Modern approaches to assessing biological markers of autophagy and apoptosis in acute ischemic stroke. *Sovrem. Probl. Nauki Obraz.*, 2020, no. 4, pp. 159–174. <https://doi.org/10.17513/spno.30017>. (In Russian)
32. Kadowaki M., Karim M.R. Chapter 13 Cytosolic LC3 ratio as a quantitative index of macroautophagy. Ser: Methods in Enzymology. Vol. 452: Autophagy in mammalian systems, part B. D.J. Klionsky (Ed.). San Diego, CA, Acad. Press, 2009, pp. 199–213. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03613-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03613-6).
33. Jaber N., Zong W.-X. Class III PI3K Vps34: Essential roles in autophagy, endocytosis, and heart and liver function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2013, vol. 1280, no. 1, pp. 48–51. <https://doi.org/10.1111/nyas.12026>.
34. 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, art. 793328. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.793328>.
35. Bronietzki A.W., Schuster M., Schmitz I. Autophagy in T-cell development, activation and differentiation. *Immunol. Cell Biol.*, 2015, vol. 93, no. 1, pp. 25–34. <https://doi.org/10.1038/icb.2014.81>.
36. Shevyrev D., Tereshchenko V. Treg heterogeneity, function, and homeostasis. *Front. Immunol.*, 2020, vol. 10, art. 3100. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03100>.
37. Kabat A.M., Harrison O.J., Riffelmacher T., Moghaddam A.E., Pearson C.F., Laing A., Abeler-Dörner L., Forman S.P., Grecis R.K., Sattentau Q., Simon A.K., Pott J., Maloy K.J. The autophagy gene *Atg16/1* differentially regulates T_{reg} and T_H2 cells to control intestinal inflammation. *eLife*, 2016, vol. 5, art. e12444. <https://doi.org/10.7554/eLife.12444>.
38. Zhang J., Chen L., Xiong F., Zhang S., Huang K., Zhang Z., Wang C.-Y. Autophagy in regulatory T cells: A double-edged sword in disease settings. *Mol. Immunol.*, 2019, vol. 109, pp. 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.02.004>.

Для цитирования: Бурцева А.В., Смирнова Э.В., Абрамов С.Н., Тихомирова М.В., Афанасьева З.А., Абрамова З.И. Особенности аутофагии в мононуклеарных клетках пациентов с аутоиммунным тиреоидитом // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2024. Т. 166, кн. 4. С. 658–682. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.4.658-682>.

For citation: Burtseva A.V., Smirnova E.V., Abramov S.N., Tikhomirova M.V., Afanasyeva Z.A., Abramova Z.I. Autophagy in mononuclear cells from patients with autoimmune thyroiditis. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2024, vol. 166, no. 4, pp. 658–682. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2024.4.658-682>. (In Russian)