

Индукция апоптоза и аутофагии в Т-лимфоцитах пациентов с системной красной волчанкой

Юлия Валерьевна Скибо^{1*}, Алия Ринатовна Фатхуллина¹,
Булат Рафисович Ибрагимов¹, Сергей Николаевич Абрамов¹,
Резида Ринатовна Исмагилова², Эльнара Маутетовна Биктагирова¹,
Изабелла Александровна Андриanova¹, Аделя Наильевна Максудова²,
Зинаида Ивановна Абрамова¹

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

²Казанский государственный медицинский университет,
г. Казань, Россия

Реферат

Цель. Анализ экспрессии ключевых белков регуляторов апоптоза (Bcl-2, каспазы-3) и аутофагии (Beclin 1, Vps34, p62 и LC3) в Т-лимфоцитах периферической крови больных системной красной волчанкой.

Методы. Объектом исследования были Т-лимфоциты периферической крови здоровых доноров и больных системной красной волчанкой. Для получения Т-клеток использовали метод иммуномагнитной сепарации. Для анализа экспрессии белков применяли метод вестерн-блот. Обработку результатов проводили в статистической среде R. Для представления данных использовали боксплоты. Группы сравнивали с использованием критерия Манна–Уитни.

Результаты. По результатам исследования апоптотических белков мы установили повышенное содержание каспазы-3 и отсутствие значимого изменения в содержании антиапоптотического белка Bcl-2 у больных системной красной волчанкой, что свидетельствует об активной апоптотической деятельности. Сравнительный анализ Beclin 1 и Vps34 показал их повышенное содержание в клетках больных, что указывает на активацию аутофагии. Проведённый анализ двух изоформ белка LC3 выявил их низкое содержание в группе больных. Поскольку разброс показателей сильно отличался от среднего значения, мы проанализировали эти показатели в зависимости от тяжести заболевания. В группе с острым течением выявлено высокое содержание белка LC3-I, содержание II формы было ниже. В группе с подострым течением количество обеих изоформ ниже, чем в других группах. В группе с хроническим течением установлено значительное повышение количества белка LC3-II и снижение соотношения LC3-I/LC3-II.

Вывод. Проведённое исследование показало, что в зависимости от характера течения системной красной волчанки меняется содержание изоформ белка LC3, что можно использовать для дифференциальной диагностики форм заболевания.

Ключевые слова: Bcl-2, каспаза-3, Beclin 1, Vps34, LC3, апоптоз, аутофагия, системная красная волчанка.

Для цитирования: Скибо Ю.В., Фатхуллина А.Р., Ибрагимов Б.Р. и др. Индуциция апоптоза и аутофагии в Т-лимфоцитах пациентов с системной красной волчанкой. *Казанский мед. ж.* 2020; 101 (3): 347–355. DOI: 10.17816/KMJ2020-347.

Induction of apoptosis and autophagy in T-lymphocytes of patients with Systemic Lupus Erythematosus

Y.V. Skibo¹, A.R. Fathullina¹, B.R. Ibragimov¹, S.N. Abramov¹, R.R. Ismagilova², E.M. Biktagirova¹, I.A. Andrianova¹, A.N. Maksudova², Z.I. Abramova¹

¹Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia;

²Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Abstract

Aim. To analyze the expression of key apoptosis (Bcl-2, caspase-3) and autophagy (Beclin 1, Vps34, p62 and LC3) proteins regulators in peripheral blood T-lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus.

Methods. The object of the study was peripheral blood T-lymphocytes of healthy donors and patients with systemic lupus erythematosus. To obtain T cells, we used the immunomagnetic separation method. Protein expression was analyzed using the Western blot method. Statistically analyzing the results was performed using the R software environment. The data was represented using boxplots. Groups were compared using the Mann–Whitney test.

Results. According to the results of the study of the apoptotic proteins, we found an increased content of caspase-3 and the absence of significant changes in the content of the anti-apoptotic protein Bcl-2 in patients with lupus, which indicates active apoptotic activity. A comparative analysis of Beclin 1 and Vps34 showed their increased content in the cells of patients, which indicates the activation of autophagy. The analysis of two isoforms of LC3 protein revealed their low content in the group of patients. Since the scatter of indicators was very different from the average value, we analyzed these indicators depending on the severity of the disease. In the acute course group, high content of protein LC3-I was detected, the content of form II was lower. In the group with the subacute course, the number of both isoforms is lower than in the other groups. In the group with a chronic course, significant increases of protein LC3-II and a decrease in the ratio of LC3-I/LC3-II were found.

Conclusion. The study showed that depending on the severity of systemic lupus erythematosus, the content of protein LC3 isoforms changes, which can be used for differential diagnosis of disease forms.

Keywords: Bcl-2, caspase-3, Beclin 1, Vps34, LC3, apoptosis, autophagy, systemic lupus erythematosus.

For citation: Skibo Y.V., Fathullina A.R., Ibragimov B.R. et al. Induction of apoptosis and autophagy in T-lymphocytes of patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Kazan medical journal*. 2020; 101 (3): 347–355. DOI: 10.17816/KMJ2020-347.

Актуальность. Системная красная волчанка (СКВ) — системное аутоиммунное заболевание неизвестной этиологии. Клинические проявления, видимые в большинстве органов, инициируются синтезом аутоантител к ядерным антигенам, сывороточным белкам и белкам клеточной поверхности [1–3]. Одним из наиболее часто встречающихся патогенетических механизмов при СКВ бывает нарушение гомеостаза Т-лимфоцитов [4, 5]. Апоптоз регулирует и поддерживает гомеостаз периферических лимфоцитов. Следовательно, нарушения иммунитета, такие как иммунодефицит и аутоиммунитет, возникают из-за неправильной регуляции апоптоза лимфоцитов. Аберрантный апоптоз при СКВ, особенно повышенный апоптоз лимфоцитов, был доказан в ряде экспериментов [2, 6, 7]. Кроме того, хроническая лимфопения [2] и компартментализированное высвобождение аутоантисera [8] при СКВ могут быть результатом усиления апоптоза циркулирующих Т-клеток.

Помимо апоптоза, в недавних исследованиях была показана роль аутофагии в поддержании гомеостаза лимфоцитов [9–11]. Аутофагия — катаболический процесс, опосредованный лизосомами, участвующий как в базальном обороте клеточных компонентов, так и в ответе на стрессовые состояния. Во время аутофагии часть цитоплазмы с поврежденными белками или органеллами изолируется с помощью двухмембранных везикул (аутофагосом), которые деградируют после слияния с лизосомами

для последующей рециркуляции [9–12]. Неблагоприятные условия окружающей среды, такие как истощение питательных веществ и окислительный стресс, могут вызвать аутофагию, активируя белки Atg, такие как микротрубочковый белок 1 LC3, гомолог млекопитающих дрожжей Atg8 [13–16].

Дисрегуляция аутофагии была обнаружена при ряде заболеваний, включая аутоиммунные расстройства [17, 18]. В генетических исследованиях выявлены мутации в регуляторах аутофагии [12, 19], а также в Т-клетках мышей, склонных к волчанке, и у пациентов с аномальной аутофагией при СКВ [18, 20].

Тем не менее, точная роль аутофагии в судьбе клеток остаётся противоречивой, отчасти из-за сложного функционального и молекулярного пересечения аутофагии и апоптоза. Взаимодействие молекулярных путей между аутофагией и апоптозом — сложный процесс, регуляторы апоптоза способны активировать аутофагию. К примеру, в цитоплазме белок HMGB1 взаимодействует с комплексом двух белков: Bcl-2–Beclin 1. HMGB1 связывается с белком Bcl-2, и комплекс распадается. Происходит это благодаря внутримолекулярному дисульфидному мостику между цистеином в положениях 23 и 45 (C23 и C45). После этого Bcl-2 блокирует апоптоз, а Beclin 1 запускает аутофагию [21–23]. Однако то, как эти взаимодействия влияют на клетки, остаётся спорным, и существует необходимость определения роли аутофагии и апоптоза в Т-лимфоцитах у пациентов с СКВ.

Цель. Целью проведённого исследования стал анализ экспрессии ключевых белков-регуляторов апоптоза и аутофагии в Т-лимфоцитах периферической крови больных СКВ. Эти результаты дают новое понимание патогенной роли аутофагии в нарушении регуляции гомеостаза Т-лимфоцитов при СКВ.

Материал и методы исследования. В качестве объекта исследования были использованы Т-лимфоциты периферической крови здоровых доноров и больных СКВ. Образцы периферической крови больных СКВ были получены у 10 пациентов с хроническим, острым и подострым течением заболевания, получающих иммуносупрессивную терапию: 2 мужчины и 8 женщин в возрасте от 22 до 55 лет (средний возраст $42 \pm 12,41$ года). Длительность заболевания составила от 1 до 30 лет (в среднем $9,14 \pm 10,9$ года). Степень активности СКВ была минимальной у 1 (10%) больного, умеренной — у 4 (40%), высокой — у 5 (50%) человек. Всем пациентам диагноз СКВ был установлен в соответствии с критериями Американской ревматологической ассоциации (1997). Клинические данные, включая возраст, пол, длительность заболевания, а также результаты иммунологического анализа, были получены при опросе пациентов и изучении медицинской документации.

Контрольную группу составили 10 практически здоровых человек: 3 (30%) мужчины и 7 (70%) женщин. Минимальный возраст в группе добровольцев составил 22 года, максимальный — 58 лет.

Критериями исключения были жалобы и объективные признаки острых заболеваний, хронические заболевания в фазе обострения, данные о ревматологических и аутоиммунных заболеваниях в семейном анамнезе.

Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет». От испытуемых было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Т-лимфоциты выделяли по стандартной методике на градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho=1,077$). Для получения популяции Т-лимфоцитов использовали метод иммуномагнитной сепарации (Dynabeads Untouched Human T cells, Dynal, Invitrogen). Подсчёт клеток проводили в камере Горяева, окрашивали 0,1% раствором трипанового синего.

Проводили вестерн-блот анализ белков. К клеточному осадку добавляли 50 мкл RIPA буфера с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз (Thermo Scientific). Полученные

клеточные лизаты замораживали, хранили при температуре -20°C и размораживали непосредственно перед электрофорезом.

Определение концентрации белка в образцах проводили с использованием набора BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Перед нанесением на гель в образцы добавляли 0,5 мкл 1% бромфенолового синего. Образцы лизатов, содержащие ~ 20 мкг белка, были разделены в 4–12% градиенте SDS-PAGE. После окончания электрофореза гель помещали в трансфер-буфер (25 мМ Трис, 192 мМ глицин, 20% метанол, pH=8,3) и переносили белки на PVDF мембрану (Merck Millipore) в течение 1 ч при напряжении 350 В.

После трансфера мембрану инкубировали последовательно с первичными и вторичными антителами и визуализировали с применением ECL-набора на основе хемилюминесцентного субстрата (Bio-Rad). Были использованы такие первичные антитела, как антитела мыши к Bcl-2 (Cell Signaling Technology), антитела кролика к LC3 (Cell Signaling Technology), антитела кролика к каспазе-3 (Invitrogen), антитела к p62 (Invitrogen), антитела кролика к VPS34, антитела мыши к Beclin 1 (Invitrogen), антитела к GAPDH (Invitrogen). В качестве вторичных были использованы антитела, коньюгированные с пероксидазой (Life Technologies). В качестве белкового маркёра применяли MagicMark XP (Invitrogen, Molecular Probes).

Математический анализ полученных результатов проведён на персональном компьютере с использованием пакета программ Excel (Microsoft office 2007). Поскольку медианы (Me) выборок отличались от их средних значений, это означало, что варьирование индивидуальных показателей не подчиняется закону нормального распределения. Это делает некорректным использование для характеристики выборки таких статистических параметров, как среднее и стандартное отклонение. Обработку результатов проводили в статистической среде R. Для представления данных использовали боксплоты. Для сравнения трёх групп применяли критерий Краскела–Уоллиса с последующими парными сравнениями с поправкой Бонферрони и Бенджамина–Хохберга. Две группы сравнивали с использованием критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при значениях двустороннего $p < 0,05$.

Результаты. На первом этапе исследования был проведён анализ двух основных белков-регуляторов апоптоза: Bcl-2 и каспазы-3. Биохимическим маркёром активации апоптоза

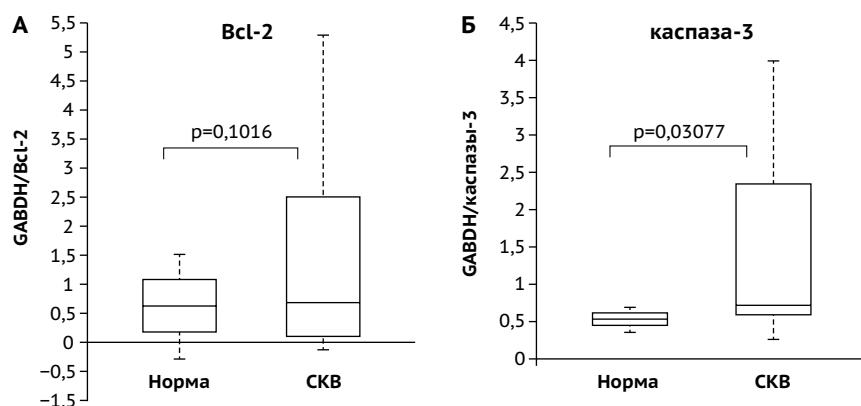


Рис. 1. Анализ содержания белков Bcl-2 (А) и каспазы-3 (Б) в лизатах Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров, а также больных системной красной волчанкой (СКВ)

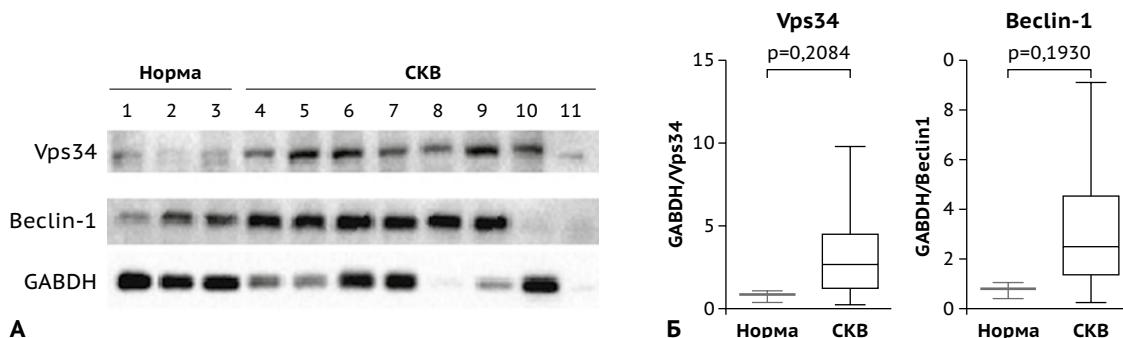


Рис. 2. Анализ содержания белков Vps34 и Beclin 1 в лизатах Т-лимфоцитов. А. Репрезентативный анализ вестерн-блота содержания белков Vps34 и Beclin 1 в лизатах Т-клеток. На иммунограммах представлены контрольные лизаты клеток, а также образцы лизатов, полученных из клеток больных системной красной волчанкой (СКВ). В качестве «загрузочного» контроля использован GAPDH. Б. Результаты статистического анализа данных экспрессии белка Beclin 1 (А) и Vps34 (Б) в Т-лимфоцитах, полученных от здоровых доноров, а также больных СКВ

в клетках служит протеолитическое расщепление прокаспазы-3 с образованием эффекторной каспазы-3. Активность фермента приводит к деградации хромосомной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), вызывая конденсацию хроматина [24]. Сравнительный анализ между группами показал достоверное повышение содержания белка в группе больных СКВ ($p\text{-value}=0,03077$), что свидетельствует об активации апоптоза и согласуется с результатами других исследований (рис. 1).

Белок Bcl-2 ингибирует множественные формы апоптоза и играет ключевую роль в его регуляции в разных типах клеток, включая Т-лимфоциты. Экспрессия Bcl-2 строго регулируется в моноцитах, нейтрофилах и Т-клетках, что свидетельствует о критической роли этого белка в гибели клеток. В проведённом исследовании мы установили, что содержание Bcl-2 у здоровых доноров и пациентов с СКВ не имеет значимого различия ($p\text{-value}=0,1016$; см. рис. 1, А).

На следующем этапе исследования был проведён анализ содержания ключевых белков аутофагии (Beclin 1, Vps34, p62 и LC3) в Т-лимфоцитах больных СКВ и здоровых доноров (рис. 2). Ген Beclin 1 (Atg6) играет ключевую роль в процессе аутофагии. Белок, кодируемый этим геном, активно участвует в инициации аутофагии: присоединяясь к комплексу Vps34-PI3K-СИП, он даёт начало формированию аутофагосом. Он также тесно взаимодействует с другими белками аутофагии, такими как Ambra1, ULK1, Vps15. Мы показали, что содержание Beclin 1 достоверно значительно выше в Т-клетках больных СКВ по отношению к здоровым донорам ($p\text{-value}=0,1930$; см. рис. 2, Б).

На следующем этапе была поставлена задача оценить содержание белка Vps34 в обеих исследуемых группах. Результаты показали, что содержание данного белка, так же как и Beclin-1, выше в группе больных СКВ ($p\text{-value}=0,2084$; см. рис. 2).

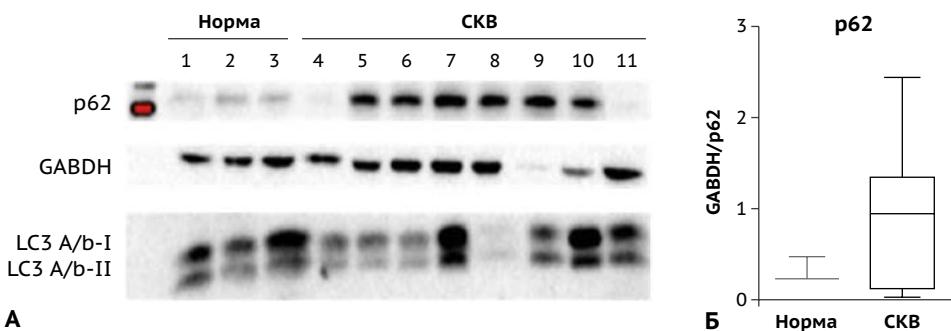


Рис. 3. Анализ содержания белка p62 в лизатах Т-лимфоцитов. А. Репрезентативный анализ вестерн-блот содержания белка p62 в лизатах Т-клеток. На иммунограммах представлены контрольные лизаты клеток, а также образцы лизатов, полученных из клеток больных системной красной волчанкой (СКВ). В качестве «загрузочного» контроля использован GAPDH. Б. Результаты статистического анализа данных экспрессии p62 в Т-лимфоцитах здоровых доноров, а также больных СКВ

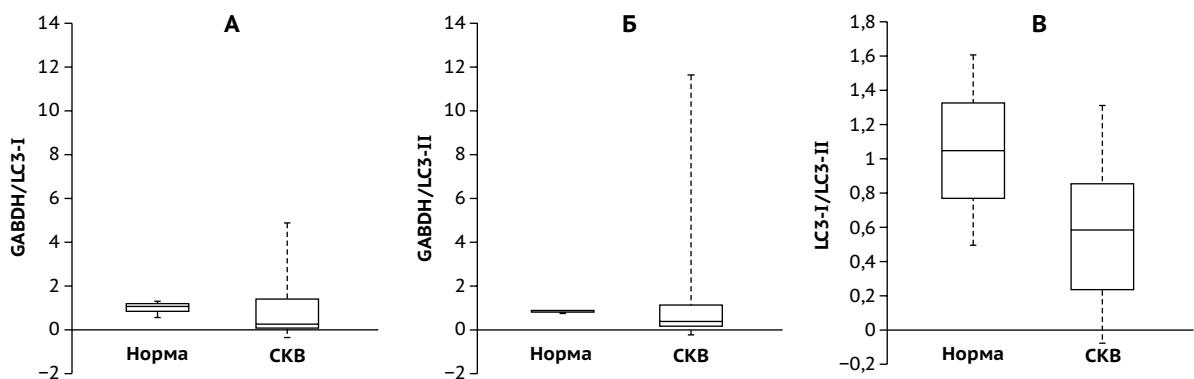


Рис. 4. Анализ содержания изоформ белка LC3 (I и II формы), а также их соотношения в лизатах Т-лимфоцитов здоровых доноров и больных системной красной волчанкой (СКВ)

Белок p62 служит центральным маркёром аутофагической деградации и играет роль в индукции аутофагии. Потеря Atg или факторов, необходимых для слияния аутофагосом с лизосомами, приводит к значительному увеличению p62-позитивных агрегатов. Наше исследование показало, что экспрессия p62 у больных СКВ выше, чем в контроле ($p\text{-value}=0,0097$; рис. 3). Поскольку содержание этого белка при нормальном течении процесса должно снижаться, это может свидетельствовать о блокировке нижестоящих членов семейства белков аутофагии. По этой причине на заключительном этапе исследования был проведён анализ содержания белка LC3 — его изоформ.

Белок LC3 присутствует в цитозоле большинства типов клеток. При запуске аутофагии он протеолитически разрушается, образуя форму LC3-II. Отщеплённый белок LC3-I активируется и переносится к белку Atg3 до его конъюгации с фосфатидилэтаноламином и образования формы LC3-II. Белок LC3-II вовлека-

ется в растущую фагофору и располагается на внутренней и внешней мембранах аутофагосомы, поэтому его количество хорошо коррелирует с числом аутофагосом. Эту характеристику преобразования LC3 можно использовать для мониторинга аутофагии.

В нашем исследовании мы обнаружили, что содержание изоформ белка LC3, а также их соотношение ниже в группе больных СКВ по сравнению с контрольной группой (рис. 4). Однако в группе больных заметно значительное отклонение от среднего значения. По этой причине мы провели анализ данных показателей в зависимости от характера течения заболевания — острого, подострого и хронического.

Анализ показал, что есть различия в соотношении изоформ белка LC3 в зависимости от течения СКВ. В группе с острым течением наиболее высоким оказалось значение I формы белка по отношению к контролю. Содержание II формы также было выше по отношению к контролю, но ниже по отношению к I форме.

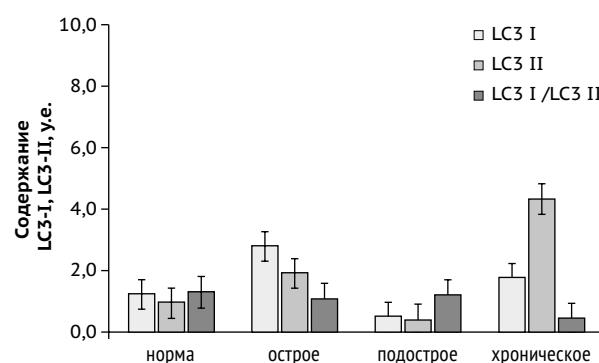


Рис. 5. Анализ содержания изоформ белка LC3 (I и II формы), а также их соотношение в Т-лимфоцитах здоровых доноров и больных системной красной волчанкой с острым, подострым и хроническим течением заболевания

В группе с подострым течением содержание I и II форм LC3 белка было практически одинаковым, и оно оказалось ниже по отношению к контролю. В группе с хроническим течением изменение в содержании двух форм белка LC3 было противоположно по отношению к группе с острым течением заболевания: содержание II формы оказалось значительно выше, чем I формы. То есть происходит нарастание содержания II формы белка, который локализован на мембране аутофагосом. Соотношение LC3-I/LC3-II при остром и подостром течении заболевания статистически не отличалось от контроля. И лишь в группе с хроническим течением было ниже, чем у здоровых доноров (рис. 5).

Обсуждение. Аутофагия — процесс, который отвечает за деградацию повреждённых либо подлежащих удалению белков. Если этот процесс неэффективен, происходит их накопление. Есть данные, подтверждающие взаимосвязь нарушения клиренса апоптотических белков с увеличением количества ядерных антигенов, представляемых к Т-клеткам [25], что сопровождается аутоиммунными реакциями, которые могут привести к развитию СКВ.

В представленной работе был проведён анализ содержания некоторых ключевых белков апоптотического и аутофагического путей в Т-лимфоцитах периферической крови больных СКВ. По результатам исследования двух основных апоптотических белков — Bcl-2 и каспазы-3 — мы установили повышенное содержание каспазы-3 (фермента, индуцирующего конденсацию хроматина и фрагментацию ДНК), что свидетельствует об активной апоптотической деятельности. Кроме того, это подтверждает отсутствие значимого изменения в содержании антиапоптотического белка Bcl-2 у больных по сравнению со здоровыми донорами. Результат

согласуется с ранее полученными данными в работе Rastin и соавт., в которой содержание этого белка также оставалось на уровне контроля [26]. Таким образом, мы установили, что в Т-лимфоцитах больных СКВ апоптоз более интенсивный, чем у здоровых доноров.

Существует значительное количество данных о том, что нарушение или задержка клиренса апоптотических тел при СКВ, приводящие к накоплению апоптотического «мусора», коррелирует с персистенцией аутоантигенов [27]. Свободный апоптотический дебрис, прикреплённый к дендритным клеткам, который представляет антигенные сигналы В-клеткам, способствует их дифференцировке в высокоаффинные плазматические клетки, секретирующие антитела. Эмбрионы Atg5^{-/-} с дефицитом аутофагии имеют более выраженное воспаление в тканях, в которых нарушен клиренс апоптотических клеток [28]. Это свидетельствует о том, что отсутствие эффективного клиренса апоптотических клеток может преодолеть толерантность к аутоантигенам и привести к СКВ.

Опираясь на полученные в нашей работе данные, мы можем говорить о том, что нарушений в самом апоптотическом процессе не выявлено, и, вероятно, аутоиммунная отягощённость вызвана недостаточной деятельностью макрофагов.

Взаимосвязь апоптоза и аутофагии показана в ряде исследований. Установлено, что при нарушении в одном из них может активироваться другой путь, либо оба процесса могут параллельно протекать в одной клетке. По этой причине на следующем этапе нашей работы была проведена оценка аутофагии путём определения содержания её ключевых белков: Beclin 1, Vps34, p62 и LC3. Сравнительный анализ Beclin 1 и Vps34 показал повышенное содержание белков в Т-клетках больных СКВ. Ген Beclin 1 (Atg6) играет ключевую роль в процессе аутофагии у млекопитающих. Белок, кодируемый этим геном, активно участвует в инициации аутофагии: присоединяясь к комплексу Vps34-PI3K-СП1, он даёт начало формированию аутофагосом. Поскольку оба этих белка входят в состав комплекса Beclin 1-Vps34-Atg14-PI3P, ответственного за элонгацию преаутофагосомы, можно сделать вывод, что в Т-клетках больных СКВ активируется аутофагия.

Белок p62 взаимодействует с аутофагическими субстратами и доставляет их в аутофагосомы для деградации. При этом количество p62 само по себе снижается, и когда индуцируется аутофагия, происходит соответствующее снижение уровня p62. Анализ содержания данного

белка в группах показал не снижение, а, наоборот, значительное увеличение количества p62 у больных СКВ.

Интересно, но сам p62 считают необязательным для канонической аутофагии. В отличие от почти всех основных белков ATG, потеря которых у мышей приводит к эмбриональной или неонатальной летальности, единственным неблагоприятным исходом, проявляющимся у мышей p62^{-/-}, бывает ожирение зрелого возраста [29]. В ряде недавних публикаций было показано, что p62 представляет собой многофункциональный каркасный белок, который взаимодействует с разными белками для регуляции различных процессов, включая апоптоз и другие формы гибели клеток, таких как некротоз. Было показано, что p62 взаимодействует с ERK1 для регуляции адипогенеза и с протеинкиназой С (PKC zeta) для регуляции передачи сигналов NF-кВ [30]. По этой причине наряду с определением содержания p62 необходимо проводить мониторинг другого важного маркёрового белка аутофагии — LC3.

Проведённый анализ содержания двух изоформ белка LC3 показал низкое содержание как изоформ, так и соотношения LC3-I/LC3-II в группе с СКВ. Поскольку разброс показателей сильно отличался от среднего значения, мы решили проанализировать эти показатели в зависимости от характера течения заболевания.

В группе с острым течением было установлено высокое содержание I изоформы белка. Содержание II формы было ниже, но по сравнению с контрольной группой его значение было выше. Соотношение форм белка оставалось на уровне контроля. В группе с подострым течением содержание обеих изоформ ниже по сравнению с другими исследуемыми группами, но соотношение LC3-I/LC3-II находится на уровне контроля. В группе с хроническим течением установлено значительное повышение белка LC3-II по сравнению с I формой. При этом отмечено значительное снижение отношения LC3-I/LC3-II. LC3-II постоянно присутствует в аутофагосоме и считается самым надёжным маркёром аутофагии. Однако не менее значимо определение содержания изоформы LC3-I. Увеличение уровня LC3-I свидетельствует об увеличении активности процессов аутофагии, а нарастание соотношения LC3-I/LC3-II может указывать на высокий уровень инициации аутофагии при нормальном протекании дальнейших стадий этого процесса, таких как везикулярный транспорт, слияние с лизосомами и протеолитическая деградация содержащего аутолизосом.

Повышение уровня LC3-II, а также уменьшение отношения LC3-I/LC3-II могут свидетельствовать о нарушении слияния аутофагосом и лизосом и, следовательно, незавершённой аутофагии, приводящей к накоплению большого количества аутофагосом внутри клетки [31,32]. При излишнем накоплении аутофагосом внутри клеток активируются процессы образования экзосом. В результате этого агрегаты белков, обладающих прионоподобной активностью, могут быть экскретированы в межклеточное пространство и захвачены здоровыми клетками, что способствует дальнейшему распространению патологического процесса и увеличивает скорость прогрессирования заболевания.

В нашей работе тенденция к увеличению уровня LC3-II и снижению показателя LC3-I/LC3-II отмечена у пациентов с хронической формой. На основании полученных данных в группе с острой формой заболевания можно говорить о высоком уровне инициации аутофагии. А в группе с подострым течением, поскольку значения I и II форм белка были низкими, аутофагия, вероятно, малоактивна.

Результаты проведённого нами исследования впервые выявили, что в Т-лимфоцитах пациентов с острой формой СКВ есть тенденция к более высокому уровню активности аутофагии, чем у здоровых людей. В группе с подострым формой заболевания, наоборот, степень активности аутофагии оказалась незначительной. В группе с хронической формой заболевания, несмотря на высокий уровень содержания белка LC3-II, вероятно, есть нарушения на стадии слияния аутофагосом с лизосомами. Для подтверждения этой гипотезы, необходимо проведение дальнейших исследований.

ВЫВОД

Полученные данные позволяют предложить использовать мониторинг содержания изоформ белка LC3 для дифференциальной диагностики форм системной красной волчанки.

Участие авторов. Ю.В.С., З.И.А. разработали исследование, отвечали за общее руководство и планирование; Р.Р.И., Б.Р.И. и С.Н.А. — подбор доноров для включения в исследование, подготовка образцов, выделение Т-лимфоцитов из периферической крови; Ю.В.С., А.Р.Ф. — проведение экспериментов по определению содержания белков p62, LC3 методом Western blot, статистическая обработка результатов; Б.Р.И. и С.Н.А. — проведение экспериментов по определению содержания белков Beclin 1 и Vps34 методом Western blot,

статистическая обработка результатов; Э.М.Б., И.А.А. — проведение экспериментов по определению содержания белков Bcl-2, каспазы-3 методом Western blot, статистическая обработка результатов; Ю.В.С., А.Н.М. и З.И.А. способствовали интерпретации результатов; Ю.В.С. подготовила рукопись с участием всех авторов. Все авторы предоставили критическую обратную связь и помогли сформировать исследование, анализ и рукопись.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-34-00739.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Меснякина А.А. Клеточные и молекулярные биомаркёры и потенциальные терапевтические мишени при системной красной волчанке. *Науч.-практ. рефматол.* 2016; 54 (2): 206–218. [Mesnyankina A.A. Cellular and molecular biomarkers and potential therapeutic targets in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology Science and Practice.* 2016; 54 (2): 206–218. (In Russ.)] DOI: 10.14412/1995-4484-2016-206-218.
2. Ревматология. Национальное руководство. Под ред. Е.Л. Насонова, В.А. Насоновой. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2008; 720 с. [Reumatologiya. Natsional'noe rukovodstvo. (Rheumatology. National guidelines.) Ed. by E.L. Nasonov, V.A. Nasonova. M.: GEOTAR-Media. 2008; 720 p.]
3. Ivanova V.V., Khaiboullina S.F., Cherenkova E.E. et al. Differential immuno-reactivity to genomic DNA, RNA and mitochondrial DNA is associated with auto-immunity. *Cell. Physiol. Biochem.* 2014; 34 (6): 2200–2208. DOI: 10.1159/000369663.
4. Katsuyama T., Tsokos G.C., Moulton V.R. Aberrant T cell signaling and subsets in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol.* 2018; 9: 1088. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01088.
5. Moulton V.R., Tsokos G.C. Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 2011; 13: 207. DOI: 10.1186/ar3251.
6. Wang H., Xu J., Ji X. et al. The abnormal apoptosis of T cell subsets and possible involvement of IL-10 in systemic lupus erythematosus. *Cell. Immunol.* 2005; 235: 117–121. DOI: 10.1016/j.cellimm.2005.08.031.
7. Yang F., Yi H., Zhai Z., Sun E. Programmed cell death pathways in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J. Immunol. Res.* 2019; (6): 1–13. DOI: 10.1155/2019/3638562.
8. Gaipl U.S., Munoz L.E., Grossmayer G. et al. Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J. Autoimmun.* 2007; 28: 114–121. DOI: 10.1016/j.jaut.2007.02.005.
9. Pua H.H., He Y.W. Maintaining T lymphocyte homeostasis: another duty of autophagy. *Autophagy.* 2007; 3: 266–267. DOI: 10.4161/auto.3908.
10. Li C., Capan E., Zhao Y. et al. Autophagy is induced in CD4⁺ T cells and important for the growth factor-withdrawal cell death. *J. Immunol.* 2006; 177: 5163–5168. DOI: 10.4049/jimmunol.177.8.5163.
11. Walsh C.M., Edinger A.L. The complex interplay between autophagy, apoptosis, and necrotic signals promotes T-cell homeostasis. *Immunol. Rev.* 2010; 236: 95–109. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00919.x.
12. Gerland L.M., Genestier L., Peyrol S. et al. Autolysosomes accumulate during in vitro CD8⁺ T-lymphocyte aging and may participate in induced death sensitization of senescent cells. *Exp. Gerontol.* 2004; 39: 789–800. DOI: 10.1016/j.exger.2004.01.013.
13. Kuma A., Hatano M., Matsui M. et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature.* 2004; 432: 1032–1036. DOI: 10.1038/nature03029.
14. Kamada Y., Sekito T., Ohsumi Y. Autophagy in yeast: ATOR-mediated response to nutrient starvation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2004; 279: 73–84. DOI: 10.1007/978-3-642-18930-2_5.
15. Lum J.J., Bauer D.E., Kong M. et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell.* 2005; 120: 237–248. DOI: 10.1016/j.cell.2004.11.046.
16. Tanida I., Ueno T., Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36: 2503–2518. DOI: 10.1016/j.biocel.2004.05.009.
17. Levine B., Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008; 132: 27–42. DOI: 10.1016/j.cell.2007.12.018.
18. Gros F., Arnold J., Page N. et al. Macroautophagy is deregulated in murine and human lupus T lymphocytes. *Autophagy.* 2012; 8: 1113–1123. DOI: 10.4161/auto.20275.
19. Zhou X.J., Lu X.L., Lv J.C. et al. Genetic association of PRDM1-ATG5 intergenic region and autophagy with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Ann. Rheum. Dis.* 2011; 70: 1330–1337. DOI: 10.1136/ard.2010.140111.
20. Perl A. Systems biology of lupus: mapping the impact of genomic and environmental factors on gene expression signatures, cellular signaling, metabolic pathways, hormonal and cytokine imbalance, and selecting targets for treatment. *Autoimmunity.* 2010; 43: 32–47. DOI: 10.3109/08916930903374774.
21. Debnath J., Bachrecke E.H., Kroemer G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy.* 2005; 1: 66–74. DOI: 10.4161/auto.1.2.1738.
22. Kroemer G., Jaattela M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer.* 2005; 5: 886–897. DOI: 10.1038/nrc1738.
23. Wang Y., Singh R., Massey A.C. et al. Loss of macroautophagy promotes or prevents fibroblast apoptosis depending on the death stimulus. *J. Biol. Chem.* 2008; 283: 4766–4777. DOI: 10.1074/jbc.M706666200.
24. Скибо Ю.В., Фатхуллина А.Р., Романова Е.В., Литвинов Р.И. Влияние тромбоцитарного фактора 4 на морфологические и биохимические проявления апоптоза Т-лимфоцитов. *Гены и клетки.* 2014; 9 (3): 118–124. [Skibo Y.V., Fathullina A.R., Romanova E.V., Litvinov R.I. Effects of platelet factor 4 on morphological and biochemical signs of apoptosis in T-lymphocytes. *Geny i kletki.* 2014; 9 (3): 118–124. (In Russ.)]
25. Xue C., Lan-Lan W., Bei C. et al. Abnormal Fas/FasL and caspase-3-mediated apoptotic signaling pathway of T-lymphocyte subset in patients with systemic lupus erythematosus. *Cell. Immunol.* 2006; 239: 121–128. DOI: 10.1016/j.cellimm.2006.05.003.
26. Rastin M., Mahmoudi M., Hatef M. et al. T lymphocyte apoptosis in systemic lupus erythematosus patients. *Iran J. Basic Med. Sci.* 2013; 16 (8): 936–941. PMID: 24106599.
27. Ren Y., Tang J., Mok M.Y. et al. Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic

- lupus erythematosus. *Arthr. Rheum.* 2003; 48 (10): 2888–2897. DOI: 10.1002/art.11237.
28. Qu X., Zou Z., Sun Q. et al. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell.* 2007; 128 (5): 931–946. DOI: 10.1016/j.cell.2006.12.044.
29. Kuma A., Komatsu M., Mizushima N. Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice. *Autophagy.* 2017; 13 (10): 1619–1628. DOI: 10.1080/15548627.2017.1343770.
30. Sánchez-Martín P., Komatsu M. p62/SQSTM1 — steering the cell through health and disease. *J. Cell Sci.* 2018; 131 (21): jcs222836. DOI: 10.1242/jcs.222836.
31. Klionsky D.J., Abdelmohsen K., Abe A. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016; 12 (1): 1–222. DOI: 10.1080/15548627.2015.1100356.
32. Кочергин И.А., Тухватулин А.И., Логунов Д.Ю., Захарова М.Н. Активация аутофагии в периферических мононуклеарных клетках при боковом амиотрофическом склерозе. *Анн. клин. и эксперим. неврол.* 2016; 10 (4): 26–31. [Kochergin I.A., Tukhvatulin A.I., Logunov D.Yu., Zakharova M.N. Autophagy activation in peripheral mononuclear cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Annaly klinicheskoy i eksperimentalnoy nevrologii.* 2016; 10 (4): 26–31. (In Russ.)]