На правах рукописи

САВЕЛЬЕВА
Ольга Евгеньевна

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЦИТОКИНОПОСРЕДОВАННОЙ ДИЗРЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ

14.03.03 – патологическая физиология
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Томск – 2011

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор — **Рязанцева Наталья Владимировна**

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, заслуженный деятель науки РФ — **Новицкий Вячеслав Викторович**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФГБУ НИИ фармакологии СО РАМН — **Агафонов Владимир Иванович**

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздравсоцразвития России — **Салмина Алла Борисовна**

доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России — **Потапов Алексей Валерьевич**

Ведущая организация: Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии Российской академии медицинских наук (г. Москва)

Защита состоится «_____» _____ 2012 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 Сибирского государственного медицинского университета (634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2)

С диссертацией можно ознакомиться в Научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета.

Автореферат разослан «___»_____ 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета И.В. Петрова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Цитокины представляют собой биологически активные пептиды, оказывающие плейотропные эффекты на различные типы клеток, главным образом, участвуя в поддержании тканевого гомеостаза путем формирования и регуляции защитных реакций организма [Ярилин А.А., 1997; Кадагидзе З.Г., 2003; Ben-Sasson S.Z. et al., 2009]. В условиях формирования иммунного ответа они осуществляют взаимосвязь между неспецифическим и специфическим иммунитетом. Одним из важнейших событий в специфическом иммунном ответе является дифференцировка и поддержание баланса между Т-хелперами I и II типов [Moreau J.F. et al., 2000; Симбирцев А.С., 2004; Paul W.E., Zhu J., 2010]. Известно, что активация Th1-лимфоцитов, сопряженная с продукцией таких ключевых цитокинов как IFNγ и IL-2, усиливает Т-клеточный иммунитет. В то время как Th2-лимфоциты, синтезируя IL-4 и IL-10, обеспечивают дифференцировку В-клеток, стимулируя тем самым гуморальное звено иммунного ответа [Петров Р.В., Хаитов Р.М., 2001; Fantini M.C. et al., 2007; Kushibiki S., 2011; Mueller L. et al., 2011].

Согласно современным представлениям, одним из ведущих аспектов патогенеза ряда заболеваний является обусловленная дисбалансом ключевых цитокинов поляризация иммунного ответа по Th1- или Th2-пути [Кетлинский С.А., 2002; Sanarico N. et al., 2006; Bosque A. et al., 2007, 2008]. Чрезмерная активация Th1-лимфоцитов, сопряженная с усилением клеточного иммунитета, приводит к нарушению элиминации аутореактивных клонов лимфоцитов и развитию аутоиммунных процессов [Кетлинский С.А., 2002; Fanzo J.C. et al., 2006]. Детерминация иммунного ответа по Th2-пути приводит к угнетению Т-клеточного звена и ускользанию патологически измененных клеток от уничтожения, обеспечивая тем самым формирование и поддержание таких патологических состояний как опухолевый рост и хронические инфекции [Букринская А.Г., Жданов В.М., 1991; Железникова Г.Ф., 2006; Dominguez-Villar M. et al., 2008; Jerome K.R., 2008].

Одной из основных причин нарушения существующего в норме баланса Th1- и Th2-лимфоцитов может являться нарушение реализации программы гибели иммунных клеток [Hedrick S.M. et al., 2010; Hernandez J.B. et al., 2010]. Цитокины считаются наиболее многочисленной группой биологически активных веществ, влияние которых на процесс пролиферации, дифференцировки и гибели клетки интенсивно изучается и считается доказанным. Выявлена большая группа цитокинов (IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IFN-α, факторы роста), при действии которых запускается эндогенная программа защиты клеток от апоптоза, опосредованная через протеины Bcl-2, Bcl-x_L и др. [Белушкина Н.Н., 2000; Потапнев М.П., 2002; Michalek R.D., Rathmell J.C., 2010]. Ряд других цитокинов (IFN-γ, TNF, IL-1, IL-10), напротив, обладает способностью индуцировать апоптоз [Фильченков А.А., Стойка Р.С., 1995; Bosque A. et al., 2007; Sharma V. et al., 2008]. Эффект некоторых цитокинов (например, IFN-γ, IL-10) может быть разнонаправленным и зависеть как от типа клеток, так и от их функционального состояния [Dardalhon V. et al.,

2008; Wilke C.M. et al., 2011]. Однако механизмы выбора клетки между жизнью и смертью до сих пор не ясны.

Среди множества факторов, опосредующих эффекты цитокинов, выделяют редокс-состояние клетки-мишени, которое определяется, главным образом, интенсивностью внутриклеточной продукции АФК, а также участием некоторых митохондриальных факторов. АФК выполняют функцию вторичных посредников при реализации лиганд-рецепторных взаимодействий гормонов, цитокинов, факторов роста и их рецепторов [Скулачев В.П., 2001; Tansey M.G., Szymkowski D.E., 2009]. Кроме того, они изменяют экспрессию ряда генов, в том числе и факторов транскрипции, участвующих в регуляции клеточного цикла, дифференцировки и программированной гибели клетки, таких как NF-kB и p53 [Рыжов С.В., 2007; Rivas M.A., 2008; Boyd M.T., et al. 2011].

Митохондриям принадлежит одна из ведущих ролей в развитии и регуляции апоптоза клеток. Установлено, что изменения митохондрий, такие как уменьшение трансмембранной разности потенциалов, высвобождение некоторых митохондриальных белков, разрушение электрон-транспортной цепи и торможение синтеза АТФ, определяют некоторые аспекты клеточной гибели [Бра М. и соавт., 2005; Jeong S.Y., 2008]. Большую роль в регуляции митохондрий-зависимого апоптоза играют белки семейства Bcl-2, обеспечивающие контроль за выходом митохондриальных факторов. Данные белки находятся в постоянном динамическом равновесии, поэтому считается, что соотношение активных форм этих белков определяет «реостат» жизни или смерти клетки [Мураков С.В., 2006; Belizario J.E. et al., 2007; Skommer J. et al., 2010].

Таким образом, цитокины в качестве сигнальных веществ регулируют активацию апоптотического каскада. Цитокины не оказывают строго специфичного действия на клетку. Вся система данных регуляторных факторов организована по принципу неустойчивого равновесия, что обусловливает высокую чувствительность клеточных элементов к факторам межклеточной сигнализации и обеспечивает интегральный клеточный ответ. Поэтому выраженный дисбаланс регуляторных цитокинов является причиной развития многих патологических процессов, таких как опухоли, хронические инфекции и аутоиммунные расстройства. В связи с этим изучение молекулярных механизмов нарушения цитокиновой регуляции программы гибели иммунокомпетентных клеток позволит расширить представления о патогенезе заболеваний, сопряженных с дисбалансом Th1- и Th2-цитокинов, создав тем самым основу для разработки новых подходов для коррекции многих патологических состояний.

Цель исследования: установить роль цитокинов (TNFα, IL-2 и IL-4) в молекулярных механизмах нарушения регуляции апоптоза лимфоцитов крови.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи исследования:**

1. Установить закономерности нарушения реализации программированной гибели лимфоцитов крови в условиях воздействия in vitro рекомбинантных форм TNFα, IL-2 и IL-4 человека в зависимости от концентрации

указанных цитокинов и условий клеточного культивирования (полная/бессывороточная среда, добавление в среду индуктора апоптоза – дексаметазона).

2. Оценить роль митохондриального пути в регуляции апоптоза лимфоцитов крови, индуцированного in vitro рекомбинантными TNFα, IL-2 и IL-4.
3. Выявить закономерности изменения баланса проапоптотических (Bax, Bad) и антиапоптотических (Bcl-2, Bcl-x_L) белков-регуляторов апоптоза в лимфоцитах крови при действии in vitro рекомбинантных форм TNFα, IL-2 и IL-4.
4. Оценить роль факторов транскрипции NF-kB, p53 и pRb и ингибитора циклинзависимых киназ $p21^{WAF1/CIP1}$ в регуляции апоптоза лимфоцитов крови при действии рекомбинантных форм TNFα, IL-2 и IL-4 in vitro.
5. Установить молекулярные механизмы нарушения регуляции апоптоза лимфоцитов крови при остром клещевом энцефалите и длительной антигенемии вируса клещевого энцефалита, сопровождающихся дисбалансом Th1- и Th2-цитокинов.
6. Дать сравнительную оценку молекулярных механизмов цитокин-опосредованного нарушения регуляции апоптоза лимфоцитов крови в условиях in vitro и при клещевом энцефалите, сопровождающемся дисбалансом Th1- и Th2-цитокинов.

Научная новизна. Впервые установлены цитокинопосредованные механизмы дизрегуляции апоптоза лимфоцитов крови. Показано, что влияние рекомбинантных TNFα, IL-2 и IL-4 человека in vitro на программированную гибель лимфоцитов определяется условиями культивирования клеток. Так, рекомбинантный TNFα оказывает проапоптотическое действие на лимфоциты крови в полной культуральной среде, в то время как рекомбинантные формы IL-2 и IL-4 индуцируют апоптоз лимфоцитарных клеток в бессывороточной инкубационной среде. Установлено, что для рекомбинантных IL-2 и IL-4 человека характерна двойственность эффектов в отношении апоптоза лимфоцитов крови: указанные цитокины на фоне действия индуктора апоптоза дексаметазона оказывают антиапоптотический эффект. Впервые показано, что про- и антиапоптотические эффекты указанных цитокинов в отношении лимфоцитов крови носят дозозависимый характер.

Получены новые знания о роли митохондрий, активных форм кислорода, транскрипционных факторов NF-kB, p53, pRb, ингибитора циклинзависимых киназ $p21^{WAF1/CIP1}$, а также о характере изменения баланса протеинов семейства Bcl-2 при реализации апоптоза иммунокомпетентных клеток, индуцированного TNFα, IL-2 и IL-4.

Впервые на модели клещевого энцефалита показана роль нарушения регуляции программированной гибели лимфоцитарных клеток в иммунопатогенезе заболеваний, сопровождающихся дисбалансом Th1- и Th2-цитокинов. Получены новые данные об участии митохондрий и активных форм кислорода в реализации апоптоза лимфоцитов крови при инфекции, вызванной вирусом клещевого энцефалита, на фоне дисбаланса Th1- (IL-2, IL-12) и Th2-

цитокинов (IL-4, IL-10). Впервые показано, что молекулярные механизмы нарушения реализации апоптоза лимфоцитов крови при клещевом энцефалите, характеризующегося дисбалансом Th1- и Th2-цитокинов, сопряжены с активацией транскрипционных факторов NF-kB и p53, а также с нарушением соотношения про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2.

Впервые установлено, что дизрегуляция апоптоза лимфоцитов крови как при действии рекомбинантных TNFα, IL-2 и IL-4 in vitro в проапоптотической дозе, так и при клещевом энцефалите, сопровождающемся нарушениями в системе Th1- и Th2-цитокинов, обусловлена запуском митохондриального и p53-опосредованного путей реализации танатогенной программы.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в ходе проведенного исследования фактические данные носят фундаментальный характер и раскрывают молекулярные механизмы регуляции апоптоза лимфоцитов крови в условиях дисбаланса цитокинов TNFα, IL-2 и IL-4. Установлено, что влияние цитокинов на реализацию программированной гибели лимфоцитов крови зависит от условий культивирования клеток и носит дозозависимый характер. Установлена роль транскрипционных факторов NF-kB, p53 и pRb, ингибитора циклинзависимых киназ $p21^{WAF1/CIP1}$ и белков семейства Bcl-2 в цитокинопосредованной регуляции программированной гибели лимфоцитов в условиях in vitro с применением рекомбинантных форм TNFα, IL-2 и IL-4. Показана роль данных участников внутриклеточного сигналинга в дизрегуляции апоптоза иммунокомпетентных клеток при остром клещевом энцефалите и длительной антигенемии вируса клещевого энцефалита, сопровождающихся дисбалансом Th1- и Th2-цитокинов. Результаты настоящего исследования в дальнейшем могут способствовать раскрытию механизмов побочных эффектов цитокиновой и анти-цитокиновой терапии, а также послужить основой для разработки новых технологий коррекции нарушений программы клеточной гибели при заболеваниях, характеризующихся изменениями продукции данных цитокинов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Влияние рекомбинантных TNFα, IL-2 и IL-4 человека in vitro на программированную гибель лимфоцитов определяется условиями культивирования клеток и носит дозозависимый характер. Для рекомбинантных IL-2 и IL-4 человека характерна двойственность эффектов в отношении апоптоза лимфоцитов крови.
2. Механизмы регуляторного влияния рекомбинантных форм TNFα, IL-2 и IL-4 на апоптоз лимфоцитов крови сопряжены со снижением трансмембранного потенциала митохондрий, изменением внутриклеточной продукции активных форм кислорода, баланса про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2.
3. Апоптотическая гибель лимфоцитов крови при действии рекомбинантных TNFα, IL-2 и IL-4 реализуется с участием транскрипционных факторов NF-kB, p53 и pRb, а также ингибитора циклинзависимых киназ $p21^{WAF1/CIP1}$.

4. Механизмы нарушения апоптоза лимфоцитов крови при клещевом энцефалите, сопровождающемся дисбалансом Th1- и Th2-цитокинов, и при действии in vitro рекомбинантных форм TNFα, IL-2 и IL-4 в апоптогенной концентрации сопряжены с инициацией митохондриального и p53-зависимого путей реализации программированной клеточной гибели.

Апробация и реализация работы. Результаты проведенных исследований доложены и обсуждены на VIII Международном конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2007), Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2007), Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы клещевых нейроинфекций» (Кемерово, 2008), XIII Всероссийском форуме «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2008), VII Съезде аллергологов и иммунологов СНГ (Санкт-Петербург, 2009), X Международном конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2009), IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2009), X Международном конгрессе «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии» (Казань, 2009), Международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пущино, 2009), 6-ом Международном Конгрессе патофизиологов «Gene-environment interaction in health and disease» (Монреаль, Канада, 2010).

Исследования выполнены в рамках проекта РФФИ «Разработка способов направленной коррекции дизрегуляции пролиферации и апоптоза нормальных и патологически измененных клеток с помощью регуляторных молекул» (09-04-99025-р_офи); гранта Совета при Президенте РФ «Молекулярные механизмы цитокинопосредованной дизрегуляции апоптоза лимфоцитов при поляризации иммунного ответа по Th1- или Th2-пути» (государственный контракт № 02.120.11.3842-МД от 24.09.2009 г.); а также в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» по теме: «Работы по проведению проблемно-ориентированных поисковых исследований и созданию научно-технического задела в области живых систем с участием научных организаций Японии» (государственный контракт № 02.512.11.2285 от 10.03.2009 г.); ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы по теме: «Разработка технологической платформы молекулярной диагностики и лечения социально значимых заболеваний и подготовка на ее основе научно-исследовательских кадров для молекулярной медицины» (государственный контракт № 02.740.11.0311 от 07.07.2009 г.), «Разработка и внедрение методов долгосрочного прогноза научно-технологического развития в области молекулярной медицины для аналитического обеспечения реализации государственной политики в сфере

инновационного развития экономики» (государственный контракт № 16.740.11.0360 от 03.12.2010 г.), «Роль внутриклеточных газовых трансмиттеров в регуляции гомеостаза клетки» (государственный контракт № П1311 от 09.06.2010 г.), «Селективная модуляция внутриклеточной коммуникации как основа молекулярных технологий управления функциями клеток» (государственный контракт № 14.740.11.0932 от 29.04.2011 г.), «Разработка технологических основ управления дифференцировкой, межклеточной кооперацией и программированной гибелью Th-лимфоцитов с использованием рекомбинантных галектинов» (государственный контракт № 16.740.11.0636 от 02.06.2011 г.).

Основные положения и выводы диссертационной работы используются в учебном процессе кафедр патофизиологии (разделы «Роль иммунной системы в патологии», «Патофизиология клетки»), фундаментальных основ клинической медицины (разделы «Современные проблемы медико-биологической науки», «Молекулярные основы патологии»), морфологии и общей патологии (разделы «Функциональная морфология элементов белой крови. Гуморальный и клеточный иммунитет», «Старение и смерть клетки. Стадии гибели клетки. Некроз и апоптоз») ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России.

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 37 работ, из них 16 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 246 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы, включающего 423 источника, из которых 71 отечественный и 252 иностранных. Работа иллюстрирована 15 таблицами и 42 рисунками.

Личный вклад автора. Анализ данных литературы по теме диссертации, планирование исследования, определение цели, задач, выбор методов исследования, проведение экспериментального и клинического блоков настоящей работы, статистический анализ результатов и написание диссертации выполнены лично автором.

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО И КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для достижения поставленной цели в диссертационной работе были выделены два блока исследования: экспериментальный и клинический. Экспериментальный блок включал в себя изучение про- и антиапоптотических эффектов TNFα, IL-2 и IL-4 путем воздействия их рекомбинантными формами in vitro на лимфоциты, полученные у здоровых доноров. В качестве клинической модели для исследования особенностей реализации апоптоза лимфоцитов в условиях различной продукции эндогенных TNFα, IL-2 и IL-4 были выбраны острая форма клещевого энцефалита и хроническая антигенемия вируса клещевого энцефалита.

В основу экспериментальной части работы положены результаты исследования лимфоцитов, полученных у 61 здорового донора (21 мужчина и 40 женщин, средний возраст − 24 года). В основу клинического блока положены данные комплексного обследования 134 человек (60 мужчин и 74 женщины, средний возраст − 32 года): 61 здорового донора и 73 пациентов с клещевым энцефалитом. Критериями исключения из исследования явились: возраст менее 18 или более 55 лет, наличие в анамнезе фактов злоупотребления алкоголем, наркотической зависимости, психических расстройств; обострение хронических соматических заболеваний, наличие инфекционных болезней другой этиологии. Обследование проводилось до назначения специфической противовирусной, иммунокоррегирующей, а также иной фармакотерапии.

Обследованные пациенты находились на диспансерном учете или стационарном лечении в терапевтическом отделении МЛПУ МСЧ «Строитель» (главный врач − И.Н. Бартфельд), инфекционном отделении госпитальных клиник ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (главный врач – Заслуженный врач РФ, канд. мед. наук В.М. Шевелёв) и инфекционном отделении МЛПУ «Городская больница №3» (главный врач − М.А. Лукашов). Клинические группы были сформированы при непосредственном участии профессора кафедры неврологии и нейрохирургии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России, д-ра мед. наук Н.Г. Жуковой.

У всех обследованных лиц было получено добровольное информированное согласие на проведение необходимых для исследования манипуляций (протокол заседания этического комитета СибГМУ от 22.01.2007 г., регистрационный № 558).

Материалом для исследования служила венозная кровь, взятая утром натощак из локтевой вены в количестве 10 мл и стабилизированная гепарином (25 Ед/мл).

Исследование проводилось на базе Научно-образовательного центра молекулярной медицины ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России (научный руководитель – д-р мед. наук, профессор Н.В. Рязанцева) и лаборатории клинической иммунологии ФГУЗ КБ № 81 ЗАТО Северск (зав. лабораторией – д-р мед. наук Т.Т. Радзивил).

На первом этапе в условиях культивирования лимфоцитов in vitro с рекомбинантными TNFα, IL-2 и IL-4 была идентифицирована заинтересованность в реализации цитокинопосредованной апоптотической гибели митохондрий, активных форм кислорода, транскрипционных факторов, белков семейства Bcl-2.

На втором этапе была проведена оценка молекулярных механизмов дизрегуляции апоптоза на модели клещевого энцефалита, сопровождавшегося изменением продукции вышеуказанных цитокинов. Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

Лимфоциты выделяли в стерильных условиях из цельной венозной крови методом градиентного центрифугирования [Натвиг Дж. и соавт., 1980]. Венозную гепаринизированную кровь (25 Ед/мл) выдерживали при 37°С в течение 40-60 мин для отделения плазмы и эритроцитов. Полученную плазму

наслаивали на градиент плотности Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) (ρ=1,077 г/см^3) в соотношении 2:1 и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 мин.

Рис. 1. Дизайн исследования

Образовавшееся на границе раздела фаз кольцо из смеси мононуклеарных клеток собирали в стерильную центрифужную пробирку, дважды отмывали средой RPMI-1640 («Вектор-Бест», Новосибирск), последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз по 10 мин при 1500 об/мин. При проведении экспериментального блока в инкубационную среду добавляли рекомбинантный TNFα в концентрациях 0,015-1,0 нг/мл, либо рекомбинантный IL-2, либо IL-4 в диапазоне доз от 0,015 до 1,0 нг/мл. Кроме того, для оценки

антиапоптотического действия цитокинов проводилось культивирование лимфоцитов с rIL-2 либо rIL-4 при одновременном добавлении 10^{-4} моль/мл дексаметазона («KRCA», Словения) в качестве индуктора апоптоза.

Оценку количества лимфоцитов, вступивших в апоптоз, проводили с использованием FITC-меченного аннексина V и пропидиума йодида (PI) («Beckman Coulter», Франция) на проточном цитофлюориметре Epics XL («Beckman Coulter», Франция) (Pepper A. et al., 1998). Количество клеток со сниженным мембранным митохондриальным потенциалом ($\Delta\psi$) регистрировали с помощью набора реагентов «MitoScreen» («BD Pharmigen», США). Продукцию АФК в клетках оценивали методом проточной цитофлюориметрии с использованием красителя с заблокированной флюоресценцией – дихлорфлюоресцеина диацетата («Sigma Aldrich», США).

Продукцию TNFα, IL-2, IL-4, IL-10 и IL-12 определяли путем оценки их концентрации в супернатантах культур лимфоцитов методом твердофазного иммуноферментного анализа по инструкции, предлагаемой производителем тест-систем («Протеиновый контур», Россия).

Регистрацию количества лимфоцитов, несущих рецепторы к фактору некроза опухоли-α I типа (TNF-RI) либо рецепторы к интерлекину-2 (IL-2Rα, CD25), либо рецепторы к интерлекину-4 (IL-4Rα, CD124), либо рецепторы к интерлекину-10 (IL-10R), либо рецепторы к интерлекину-12 (IL-12Rβ1), проводили на проточном цитофлюориметре Epics XL («Beckman Coulter», Франция) с помощью стандартных моноклональных антител (МКАТ) к рецепторам, меченных фикоэритрином (PE) («R&D», США).

Определение содержания белков-регуляторов апоптоза (Bcl-2, Bcl-x_L, Bax, Bad) и транскрипционных факторов (NF-kB, p53, pRb), а также ингибитора циклинзависимых киназ $p21^{WAF1/CIP1}$ в лимфоцитах крови проводили методом вестерн-блоттинга.

Образцы для анализа получали путем лизирования клеток. Белки разделяли по молекулярной массе методом электрофореза в SDS-полиакриламидном геле – 5%-ом концентрирующем (0,13 мМ Tris-HCl, pH=6,8) и 10%-ом разделяющем (375 мМ Tris-HCl, pH=8,8) под действием электрического поля (10 В/см пути). Далее белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) в течение 80-90 мин при силе тока 50-60 мА на дорожку. Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали с первичными антителами к NF-kB RelA (p65), фосфорилированному pRb, нефосфорилированному p53, $p21^{WAF1/CIP1}$, Bax, Bad, Bcl-2 и Bcl-x_L («Sigma-Aldrich», США) в разведении 1:300, визуализировали зоны с помощью прицепитирующего субстрата пероксидазы на основе тетраметилбензидина (НПО «БиоТест Системы», Москва). Полученные блоты сканировали, изображение обрабатывали с помощью программного обеспечения («Carl Zeiss», Германия). В качестве стандарта и внутреннего контроля использовали глицеро-3-фосфат-дегидрогеназу (G3PDH) («Chemicon», США). Результаты выражали в усл. ед., рассчитывая содержание исследуемых протеинов как отношение сигнала определяемого белка к сигналу белка глицеро-3-фосфат-дегидрогеназы в исследуемых образцах.

Результаты исследования были оценены с использованием методов статистического анализа. Характер распределения данных оценивали по статистическим критериям Колмогорова-Смирнова. Для каждой выборки вычисляли характеристики: медиану (Me), 25% и 75% квартили (Q1 и Q3). Поскольку отмечалось отсутствие согласия данных с нормальным распределением, для оценки достоверности различий независимых выборок использовали ранговый критерий Манна-Уитни (U-тест), для множественного сравнения нескольких групп использовали критерий Крускала-Уоллиса. Различия считались достоверными при уровне значимости $p<0,05$ (5%). Для выявления функциональных взаимосвязей между группами изученных параметров вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости $p<0,05$ [Лакин Г.Ф., 1980; Гланц С., 1998; Голева О.П., 2001].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярные механизмы регуляции апоптоза лимфоцитов крови рекомбинантными TNFα, IL-2 и IL-4

В настоящее время накоплены достаточно противоречивые факты о влиянии цитокинов на программированную гибель клеток. Так, установлено, что апоптоз реализуется при цитокиновом дефиците, когда клетка испытывает недостаток тех или иных факторов роста, которые в обычных условиях активируют соответствующие рецепторы. Эффект ростовых факторов обусловлен их действием на специфические рецепторы, что приводит к синтезу подавляющих апоптоз агентов и ингибированию стимуляторов апоптоза. Кроме того, показано, что ряд цитокинов может оказывать как про-, так и антиапоптотические эффекты на клетку. Конечный результат действия цитокина может определяться его дозой, типом клетки-мишени, их функциональным состоянием, а также условиями микроокружения. Несмотря на активное исследование роли отдельных цитокинов в реализации апоптоза, остаются неизвестными многие механизмы этого явления [Gewies A., 2003; Krammer et al. P.H., 2007; Sirisinha S., Asian Pac, 2011]. Важность решения данной проблемы сопряжена со вскрытием молекулярных основ реализации биологической функции цитокинов и неоднозначностью клеточных реакций в ответ на их присутствие либо отсутствие, а также с недостаточным на сегодняшний день пониманием путей вовлечения цитокиновых молекул и связанных с ними интрацеллюлярных событий в возникновение и развитие различных патологических процессов и состояний [Ярилин А.А., 1997; Strom T.B., Koulmanda M., 2008; Agostini M. et al., 2011].

Все вышесказанное и определило наш интерес к изучению молекулярных механизмов регуляции апоптоза лимфоцитов крови в условиях дисбаланса Th1- и Th2-цитокинов. Для достижения поставленной цели исследования проводились в два этапа. На первом этапе (экспериментальном) осуществлялось изучение in vitro про- и антиапоптотических эффектов рекомбинантных TNFα, IL-2 и IL-4 в отношении лимфоцитов крови,

полученных у здоровых доноров. Второй этап (клинический) на модели клещевого энцефалита позволил вскрыть молекулярные механизмы регуляции апоптоза лимфоцитов при дисбалансе эндогенных Th1- (IL-2, IL-12) и Th2-цитокинов (IL-4, IL-10).

Первоначально нами был проведен эмпирический подбор концентраций рекомбинантных цитокинов (rTNFα, rIL-2 и rIL-4), которые далее были использованы в эксперименте in vitro для выявления молекулярных механизмов реализации цитокин-опосредованного апоптоза лимфоцитов крови.

Культивирование лимфоцитов крови в полной питательной среде с добавлением рекомбинантного TNFα в диапазоне доз 0,015-0,150 нг/мл, а также в чистой среде RPMI-1640 с добавлением rIL-2 и rIL-4 в концентрациях от 0,015 до 1,0 нг/мл позволило установить дозозависимый характер влияния цитокинов на реализацию программированной гибели указанных клеток (рис. 2-4).

Добавление в инкубационную среду rTNFα в конечной концентрации 0,015 нг/мл и 0,025 нг/мл не приводило к каким-либо значимым изменениям относительного количества клеток, вовлеченных в процессы апоптоза и некроза (рис. 2). Возможно, что данные дозы rTNFα недостаточны для возникновения необходимого количества эффективных столкновений лиганда и рецептора, лимитированных концентрацией участников реакции в единице объема и способствующих их взаимодействию [Бауков Ю.И., Тюкавкина Н.А., 2008]. Дальнейшее увеличение содержания rTNFα в инкубационной среде до 0,050 нг/мл приводило к статистически значимому увеличению числа лимфоцитов в апоптозе. Культивирование лимфоцитов в среде, содержащей рекомбинантную форму TNFα в концентрации от 0,100 до 0,150 нг/мл, сопровождалось вовлечением в апоптоз еще большего количества указанных клеток (рис. 2).

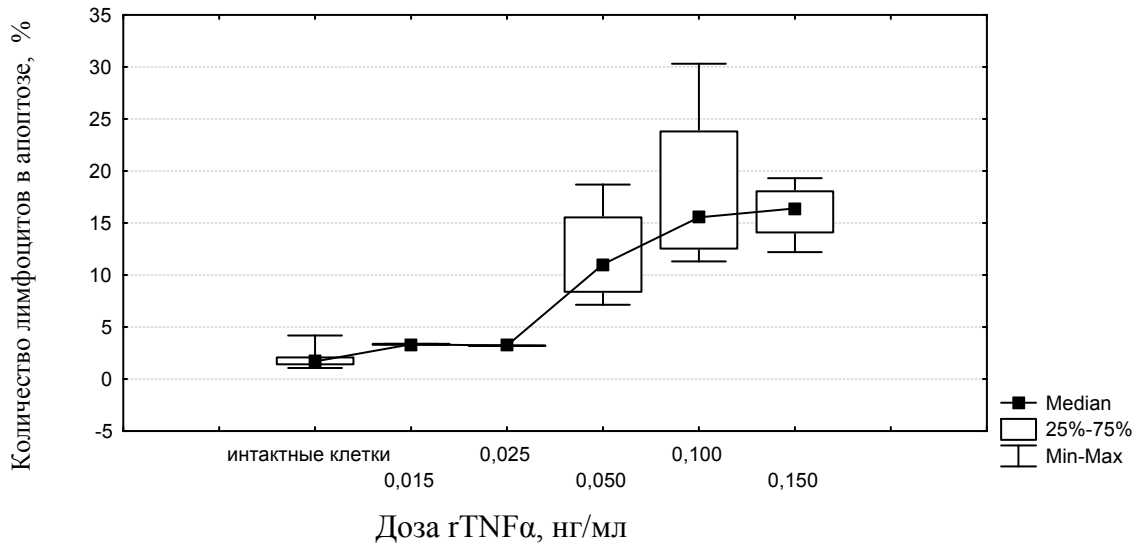
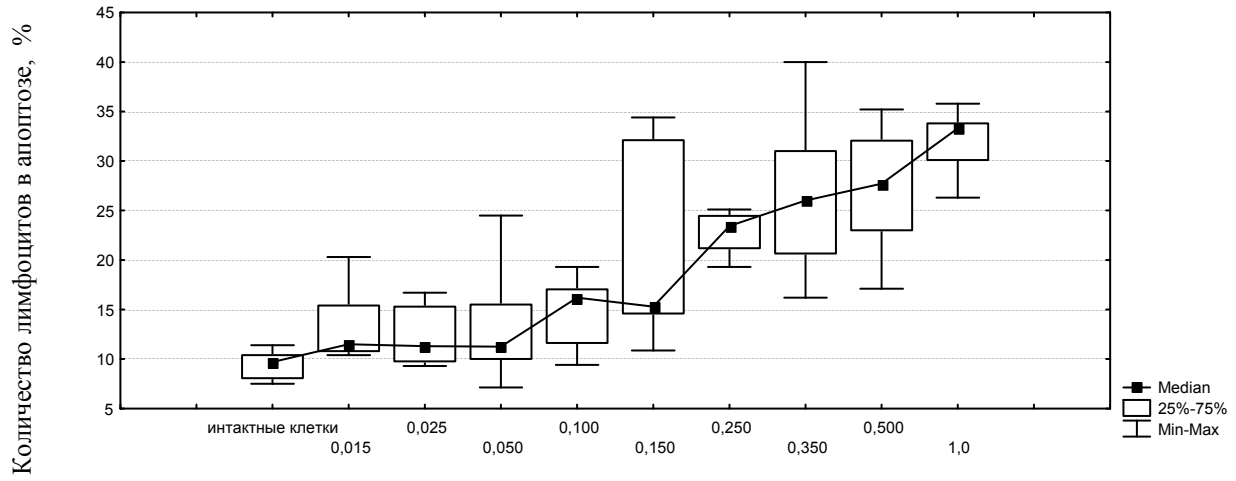


Рис. 2. Влияние различных доз рекомбинантного TNFα на реализацию апоптоза лимфоцитов

Изучение эффектов других иммунорегуляторных цитокинов (IL-2 и IL-4) позволило выявить аналогичные изменения. Проведенное in vitro исследование влияния на лимфоцитарные клетки rIL-2 и rIL-4 показало, что rIL-2 начинал проявлять своё проапоптотическое действие, когда его уровень в

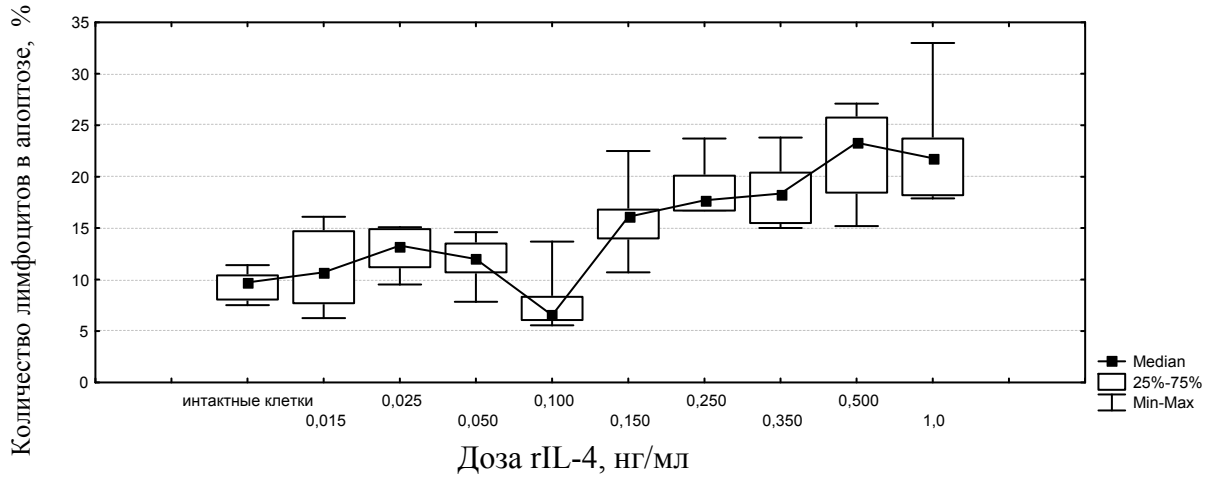
среде культивирования составлял 0,100 нг/мл, rIL-4 индуцировал апоптоз в культуре лимфоцитов, начиная с концентрации 0,150 нг/мл. При последующем увеличении дозы медиаторов отмечалось повышение числа лимфоцитов в апоптозе (рис. 3 и 4).

Таким образом, в настоящем исследовании было показано, что для реализации апоптозиндуцирующего действия цитокинов на лимфоциты крови в условиях in vitro необходим определенный порог концентрации цитокинов. D.J. Stauber et al. [2000] высказывали гипотезу о наличии определенного количества активированных цитокиновых рецепторов на поверхности лимфоцитов, необходимых для индукции пролиферации клеток. Наличие подобного «барьера» действия IL-2 и IL-4 также может быть объяснено строением специфических рецепторов и работой внутриклеточных сигнальных путей [Boytim M.L. et al., 2000; Villarino A.V., 2007; Kaminski A. et al., 2010; Black S.M. et al., 2011].



Доза rIL-2, нг/мл

Рис. 3. Влияние различных доз рекомбинантного IL-2 на реализацию апоптоза лимфоцитов



Доза rIL-4, нг/мл

Рис. 4. Влияние различных доз рекомбинантного IL-4 на реализацию апоптоза лимфоцитов

Исследование антиапоптотического эффекта IL-2 и IL-4 проводилось на модели глюкокортикоид-индуцированного апоптоза. Добавление в среду инкубации синтетического глюкокортикоида (ГК) дексаметазона в концентрации 10^{-4} моль/мл приводило к обогащению апоптотической фракции лимфоцитов. При одновременном воздействии дексаметазона в указанной дозе и rIL-2 либо rIL-4 в диапазоне концентраций от 0,025 до 0,150 нг/мл на лимфоциты было показано протективное действие указанных цитокинов в отношении ГК-индуцированного апоптоза (рис. 5 и 6).

Антиапоптотический эффект исследуемых цитокинов известен еще с начала 90-х годов XX века и хорошо описан в литературе [Nieto M.A., Lopez-Rivas A., 1992; Kam J.C. et al., 1993; Estaquier J., Ameisen J.C., 1997]. Однако в нашей работе был впервые показан дозозависимый характер этого явления, механизм которого может быть связан с увеличением количества активированных IL-2R и IL-4R при повышении дозы цитокинов и инициации антиапоптотических сигнальных путей в клетке.

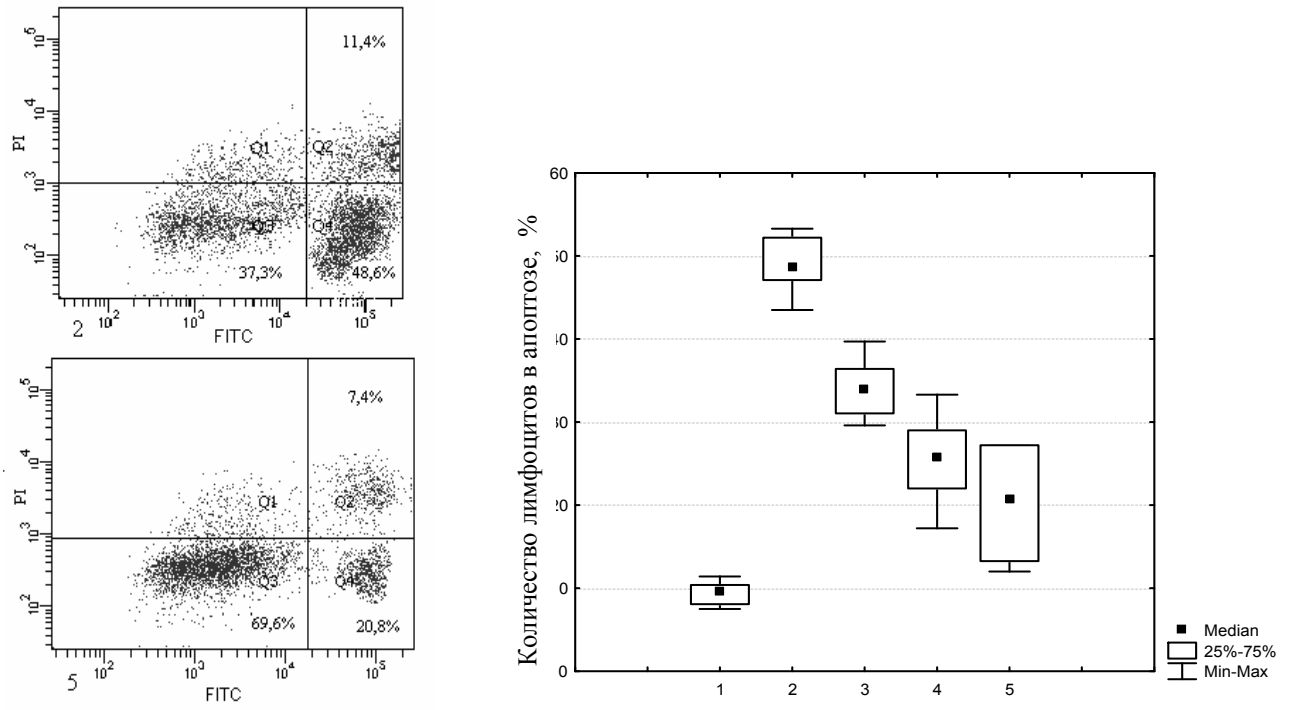


Рис. 5. Количество апоптотически измененных лимфоцитов в условиях культивирования в среде, содержащей дексаметазон и rIL-2 в различных концентрациях (Q_2 – популяция погибших клеток; Q_3 – популяция живых клеток; Q_4 – популяция клеток в процессе апоптоза)

Примечание: 1 – интактные клетки; 2 – лимфоциты, культивированные в среде с добавлением дексаметазона; 3 – лимфоциты, культивированные в среде с дексаметазоном и rIL-2 в концентрации 0,025 нг/мл; 4 – лимфоциты, культивированные в среде с дексаметазоном и rIL-2 в концентрации 0,050 нг/мл; 5 – лимфоциты, культивированные в среде с дексаметазоном и rIL-2 в концентрации 0,100 нг/мл

Феномен зависимости реализации программированной клеточной гибели от дозы цитокинов в целом малоизучен; вскрытие его молекулярных основ является предметом отдельного исследования. Анализ результатов

проведенного нами исследования лишь указывает на факт дозозависимого эффекта rTNFα, rIL-2 и rIL-4 в отношении программированной клеточной гибели и позволяет заключить, что использование конечной концентрации rTNFα 0,050 нг/мл, rIL-2 0,100 нг/мл, rIL-4 0,150 нг/мл целесообразно для изучения молекулярных механизмов проапоптотического эффекта цитокинов.

Рассматривая механизмы реализации апоптоза клетки, особое внимание следует уделить митохондриям, которые, образуя сложную систему взаимовлияний, являются как мишенями, так и продуцентами активных форм кислорода [Бра М., 2005; Меньшикова Е.Б. и соавт., 2006; Circu M.L. et al., 2010; Apostolova N. et al., 2011]. Так, показано, что под действием различных цитокинов, в том числе и TNFα, IL-2 и IL-4, в клетках эукариот активируются ферменты, стимулирующие образование активных форм кислорода [Matsuzawa A. et al., 2005]. Сигнал поступает на митохондрии, что ведет к повышению неспецифической проницаемости мембран органеллы. Повреждающее последствие индукции неспецифической проницаемости – избыточная генерация АФК [Зоров Д.Б. и соавт., 2005; Daiber A., 2010].

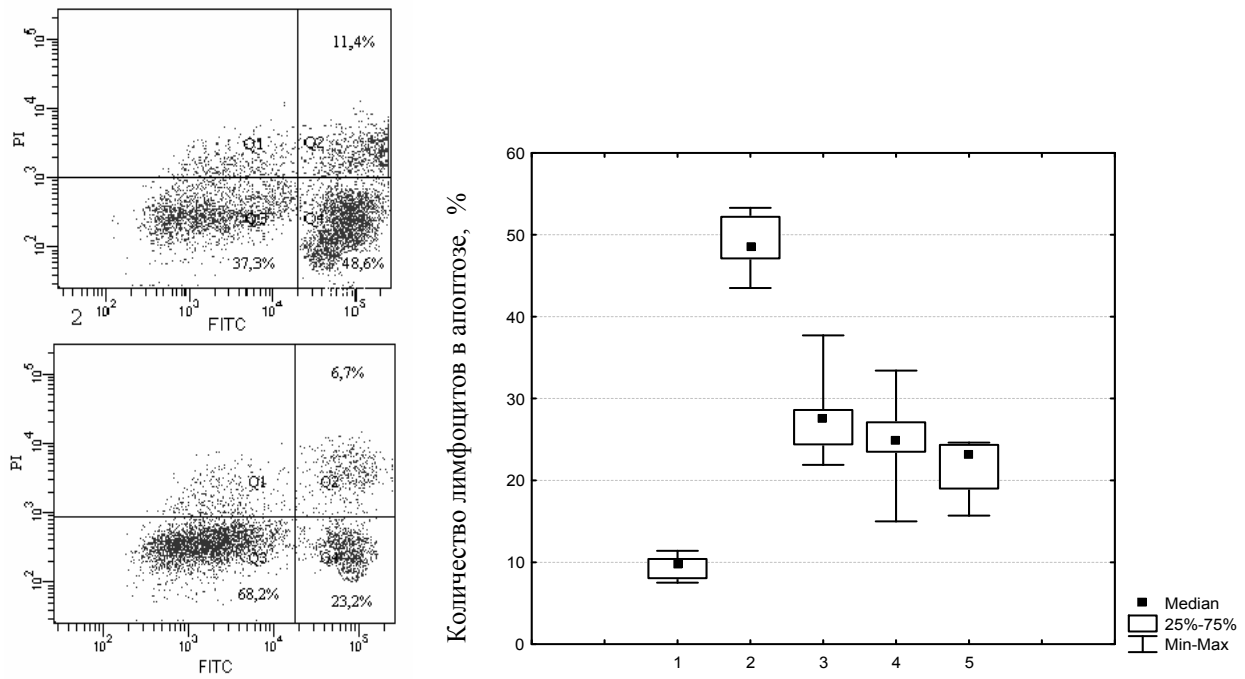


Рис. 6. Количество лимфоцитов в апоптозе в условиях культивирования в среде, содержащей дексаметазон и rIL-4 в различных концентрациях (Q_2 – популяция погибших клеток; Q_3 – популяция живых клеток; Q_4 – популяция клеток в процессе апоптоза)

Примечание: 1 – интактные клетки; 2 – лимфоциты, культивированные в среде с добавлением дексаметазона; 3 – лимфоциты, культивированные в среде с дексаметазоном и rIL-4 в концентрации 0,050 нг/мл; 4 – лимфоциты, культивированные в среде с дексаметазоном и rIL-4 в концентрации 0,100 нг/мл; 5 – лимфоциты, культивированные в среде с дексаметазоном и rIL-4 в концентрации 0,150 нг/мл

В связи с тем, что реализация цитокин-опосредованного апоптоза может быть сопряжена с перфорацией митохондриальной мембраны, нами была

выполнена оценка количества лимфоцитарных клеток с деполяризованной мембраной митохондрий с помощью индикатора целостности митохондриальной мембраны – JC-1. Проведенное исследование позволило выявить увеличение доли лимфоцитов с нарушением целостности митохондриальной мембраны после инкубации с рекомбинантной формой TNFα, IL-2 и IL-4 в апоптогенной концентрации (рис. 7).

Снижение трансмембранного потенциала митохондрий (ΔΨ) обычно рассматривают как одно из ведущих и первых проявлений апоптоза. Кроме того, такой специфичный для апоптоза процесс, как фрагментация ДНК, по всей видимости, происходит именно в клетках со сниженной величиной мембранного потенциала митохондрий [Бойчук С.В., Мустафин И.Г., 2001].

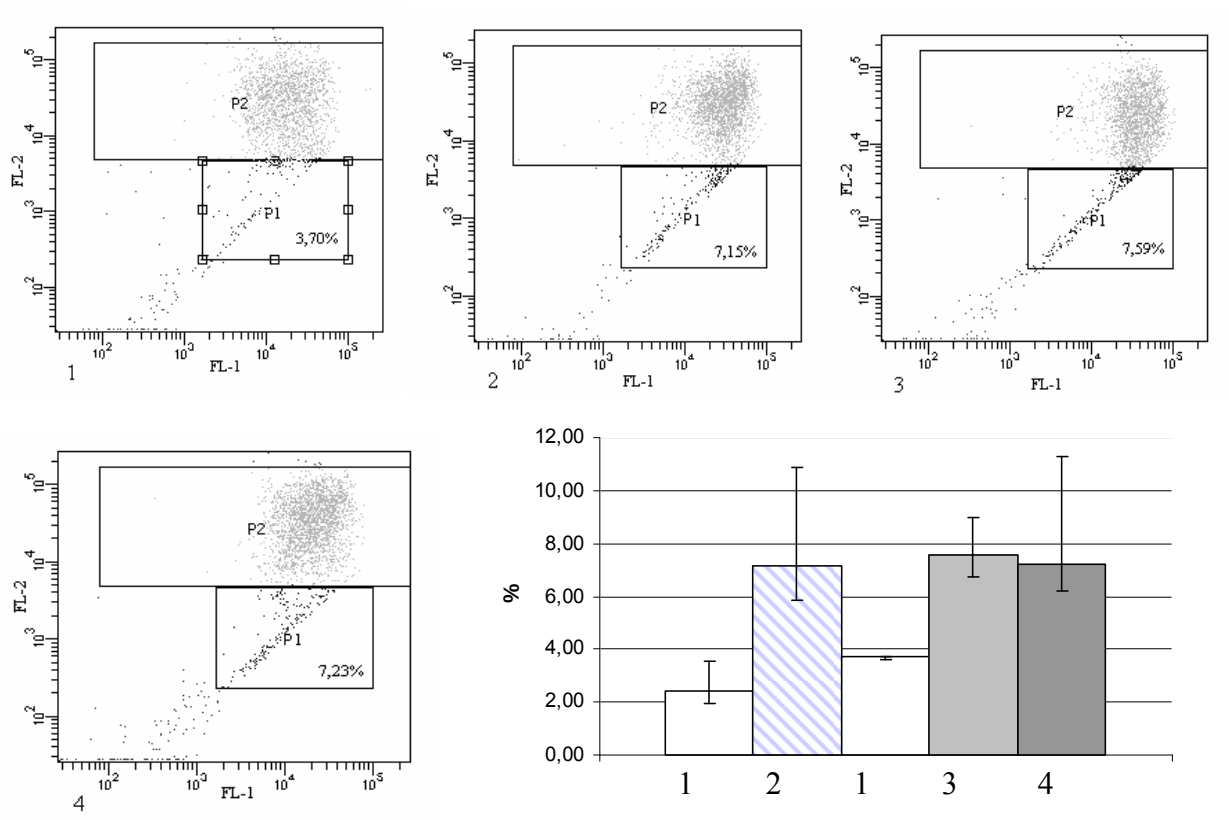


Рис. 7. Количество лимфоцитов со сниженным трансмембранным митохондриальным потенциалом в условиях культивирования с проапоптотической концентрацией рекомбинантных TNFα, IL-2 и IL-4 in vitro (P1 – популяция клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий; P2 – популяция клеток с нормальным трансмембранным потенциалом митохондрий)

Примечание (здесь и на рис. 8): 1 – интактные лимфоциты; 2 – лимфоциты, инкубированные с rTNFα в дозе 0,050 нг/мл; 3 – лимфоциты, инкубированные с 0,100 нг/мл rIL-2; 4 – лимфоциты, инкубированные с 0,150 нг/мл rIL-4; здесь и на рис. 8-10, 14-16: на гистограмме для каждой группы представлены медиана, 25% и 75% квартили

Митохондрии способны модулировать танатогенную программу, изменяя продукцию окислительных эквивалентов в виде АФК [Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В., 2007; Daiber A., 2010; Apostolova N. et al., 2011]. Некоторое

количество супероксид-аниона и перекиси водорода постоянно генерируется в электронно-транспортной цепи митохондрий путем «утечки» электронов на кислород при их переносе от первого дыхательного комплекса (NADH-убихинон оксидоредуктаза) к третьему (убихинол-цитохром С оксидоредуктаза) [Бра М. и соавт., 2005]. Нарушение структуры митохондриальной мембраны совместно с выходом цитохрома С в цитоплазму (при этом происходит угнетение переноса электронов с третьего на четвертый дыхательный комплекс) снижает электрохимический градиент протонов, создаваемый на внутренней мембране митохондрий цепью переноса электронов [Марри Р. и соавт., 1993]. Подобные события вызывают в клетках, с одной стороны, «энергетический голод» путем уменьшения скорости образования АТР, а, с другой, – усиливают переход электронов на кислород, повышая тем самым количество внутриклеточных АФК [Бра М. и соавт., 2005; Circu M.L., Aw T.Y., 2010].

Возможность реализации данных механизмов повышенной продукции АФК при цитокинопосредованном апоптозе подтверждается выявленным нами с помощью цитофлюориметрического исследования фактом накопления АФК в лимфоцитах крови, инкубированных с rTNFα, rIL-2 и rIL-4 в апоптогенной концентрации (рис. 8).

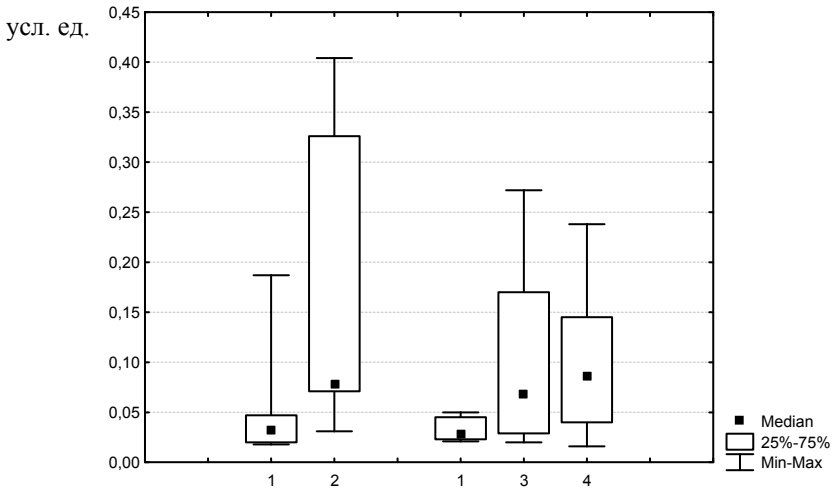


Рис. 8. Уровень активных форм кислорода в лимфоцитах в условиях культивирования с проапоптотической концентрацией рекомбинантных TNFα, IL-2 и IL-4 in vitro

Важно подчеркнуть, что полученные нами данные сопоставимы с результатами других исследователей, свидетельствующих о том, что взаимодействие IL-4 со своим рецептором, имеющим общую с IL-2 γ-цепь, приводит к PI3K-зависимой активации NAD(P)H оксидаз NOX1 и NOX5 через рецепторассоциированные тирозинкиназы и тирозинфосфатазы, результатом чего является генерация АФК [Matsuzawa A. et al., 2005; Kinter A.L. et al., 2008; Kaminski A. et al., 2009].

При сравнительном анализе показателей, характеризующих трансмембранный потенциал митохондрий и наработку активных форм кислорода при действии на лимфоцитарные клетки рекомбинантных TNFα, IL-2

или IL-4, статистически значимых отличий между изучаемыми параметрами обнаружено не было.

Таким образом, анализ результатов цитофлюориметрического исследования лимфоцитов, культивированных с апоптозиндуцирующей дозой рекомбинантных TNFα, IL-2 и IL-4, позволил обнаружить признаки нарушения целостности мембраны митохондрий. Обращало на себя внимание также выраженное изменение редокс-состояния клетки, вызванное накоплением в ней активных форм кислорода.

Для изучения механизмов митохондриального пути реализации апоптоза, индуцированного цитокинами TNFα, IL-2 и IL-4, было проведено исследование содержания про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2, регулирующих проницаемость мембраны митохондрий и осуществляющих контроль за выходом митохондриальных факторов.

Исследование, выполненное методом вестерн-блоттинга, показало, что при действии проапоптотической дозы rTNFα наблюдалось значительное снижение содержания в лимфоцитах белков Bcl-2 и Bcl-x_L, а также проапоптотического протеина Bax по сравнению с величиной данных показателей в интактных клетках. Аналогичные изменения были зарегистрированы и при действии апоптогенных концентраций rIL-2 и rIL-4 (рис. 9).

К настоящему времени в регуляции апоптоза наиболее хорошо изучена роль белка Bcl-2, который представляет собой продукт протоонкогена bcl-2. Существует несколько механизмов, с помощью которых происходит модуляция состояния Bcl-2. Первый связан со способностью белка формировать гомо- и гетеродимеры с Bax, Bad, Bak и Bcl-x_L. Второй механизм основывается на изменении степени фосфорилирования белка Bcl-2. Третий механизм возможного ингибирования Bc1-2 обусловлен его взаимодействием с белком Bag-1, который способен соединяться с Bc1-2 и цитоплазматическим доменом рецептора для гепатоцеллюлярного и тромбоцитарного факторов роста.

Другой антиапоптотический белок Bcl-x_L также оказывает антиапоптогенное действие, регулируя проницаемость внешней мембраны митохондрий через взаимодействие с VDAC [Shoshan-Barmatz V. et al., 2010].

Однако антиапоптотическая функция протеина Bcl-x_L в условиях TNFα-, IL-2- и IL-4-опосредованного апоптоза является недостаточной по ряду причин, связанных, вероятно, прежде всего, с функционированием проапоптотического белка Bad [Chiang C.-W. et al., 2003], увеличение количества которого было обнаружено нами в лимфоцитах при действии на них апоптогенной дозы рекомбинантных форм указанных цитокинов (рис. 9). Подобные изменения могут быть опосредованы действием серин/треониновых фосфатаз, обусловливающих высвобождение белка Bad из связи со своим ингибитором 14-3-3 [Gardino A.K., et al. 2011].

Кроме того, нарушение функции белка Bcl-x_L может быть связано с образованием комплекса с проапоптотическим белком Bax, что подтверждает обнаруженная нами положительная корреляционная зависимость между

содержанием данных белков в лимфоцитах, инкубированных с rTNFα, rIL-2 или rIL-4 (R=0,86, p=0,011; R=0,89, p=0,033; R=1,00, p=0,017, соответственно).

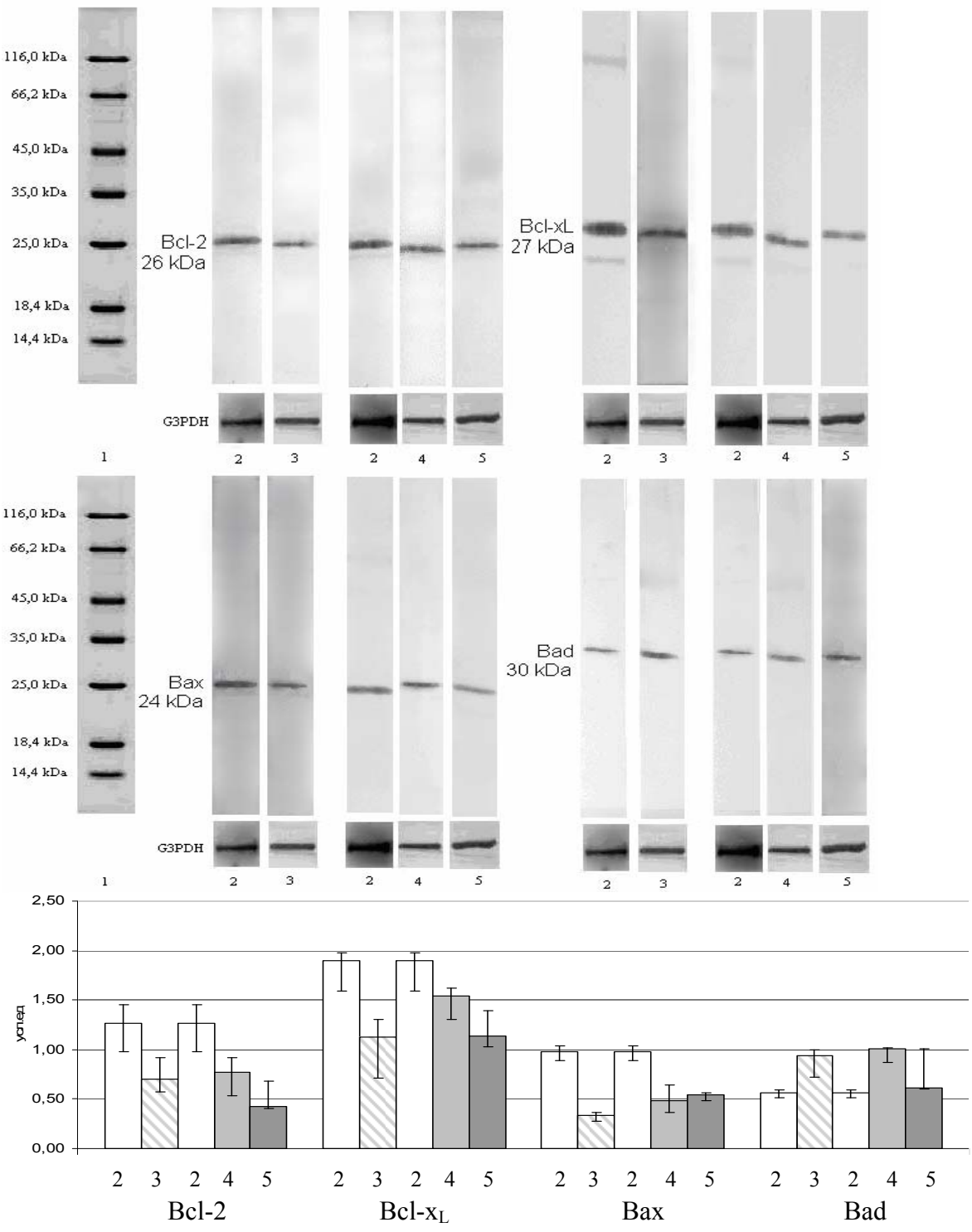


Рис. 9. Содержание белков семейства Bcl-2 в лимфоцитах при их культивировании с проапоптотической дозой рекомбинантных TNFα, IL-2 и IL-4 in vitro

Примечание (здесь и на рис. 10): 1 – маркер молекулярного веса; 2 – интактные лимфоциты; 3 – лимфоциты, инкубированные с rTNFα в дозе 0,050 нг/мл; 4 – лимфоциты, инкубированные с 0,100 нг/мл rIL-2; 5 – лимфоциты, инкубированные с 0,150 нг/мл rIL-4; G3PDH – глицеро-3-фосфат-дегидрогеназа

Таким образом, результаты настоящего исследования позволяют предположить, что сдвиг равновесия между уровнем про- и антиапоптотических Bcl-2-белков в сторону проапоптотических лежит в основе индукции митохондриального пути программированной гибели и апоптозиндуцирующего действия цитокинов. Данный факт кажется парадоксальным, учитывая то, что, по многочисленным литературным сведениям, IL-2 и IL-4 стимулируют экспрессию антиапоптотических и подавляют экспрессию проапоптотических белков семейства Bcl-2 [Akbar A.N. et al., 1996; Feischer A. et al., 2002; S. Fujimura S. et al., 2004; Dessauge F. et al., 2006; Bosque A. et al., 2007; Abdulamir A.S. et al., 2009; Kazi A. et al., 2011]. Такое кардинальное различие в результатах только подтверждает факт двойственности эффектов цитокинов и зависимость их от физиологического состояния клеток.

Изменения содержания белков семейства Bcl-2 в лимфоцитах при действии цитокинов может быть обусловлено изменением экспрессии генов данных белков. Необходимо добавить, что конкретные механизмы регуляции Bcl-2-системы на транскрипционном уровне пока мало изучены. Изменение экспрессии может быть как первичным (под влиянием белков сигнальных путей от цитокиновых рецепторов), так и вторичным. Механизм вторичного изменения экспрессии генов анализируемых белков может быть реализован при участии факторов NF-kB и p53 [Fridman J. S., Lowe S.W., 2003; Plesnila N. et al., 2008; Gurzov E.N. et al., 2010].

Транскрипционный фактор p53 имеет чрезвычайно высокое значение для нормального клеточного функционирования. Важнейшим средством регуляции апоптоза протеином p53 является его контроль количества в клетке белков семейства Bcl-2 [Fridman J.S., Lowe S.W., 2003; Yoshida K. et al., 2010]. В качестве опухолевого супрессора p53 определяет в организме поддержание клеточного и тканевого гомеостаза. При генотоксическом стрессе p53 останавливает клеточный цикл на время репарации ДНК, включает программы апоптоза и сенесенса. Нарушения p53-опосредованных процессов приводят к иммортализации клеток и накоплению в них различных повреждений [Моргункова А.А., 2005; Molchadsky A. et al., 2010].

Фактор транскрипции NF-kB занимает ключевую позицию в регуляции процессов пролиферации и программированной клеточной гибели [Kucharczak J. et al., 2003; Wu Z.H. et al., 2008]. Активация NF-kB опосредована классом MAP-киназ JNK. Редокс-зависимые JNK, участвующие в реализации TNFα-индуцированного апоптоза, воздействуют на киназу, фосфорилирующую ингибитор NF-kB, что приводит к высвобождению активной формы транскрипционного фактора [Perkins N.D., 2007; Kizilay G. et al., 2008; Rivas M.A. et al., 2008]. После транслокации в ядро NF-kB связывается со специфическими kB-сайтами ДНК и активирует транскрипцию различных генов-мишеней [Saccani S. et al., 2003; Sabatel H. et al., 2011].

Опираясь на вышеописанные теоретические данные о возможной заинтересованности факторов транскрипции p53 и NF-kB в реализации цитокинопосредованного апоптоза, мы провели оценку их содержания в

лимфоцитах крови, культивированных в среде с rTNFα, rIL-2 и rIL-4 в апоптогенной дозе.

Было установлено, что при инкубировании лимфоцитов в среде, содержащей апоптозиндуцирующую концентрацию rTNFα, rIL-2 и rIL-4, в указанных клетках, по сравнению с интактными, увеличивается количество свободного фактора транскрипции NF-kB (рис. 10), определяемое содержанием в клетках белка, специфически связавшегося с антителами к p65 RelA-субъединице NF-kB, что говорит о цитокин-зависимой активации NF-kB. Помимо этого, воздействие на лимфоциты крови рекомбинантных TNFα, IL-2 и IL-4 приводило к снижению уровня нефосфорилированного белка p53 (рис. 10).

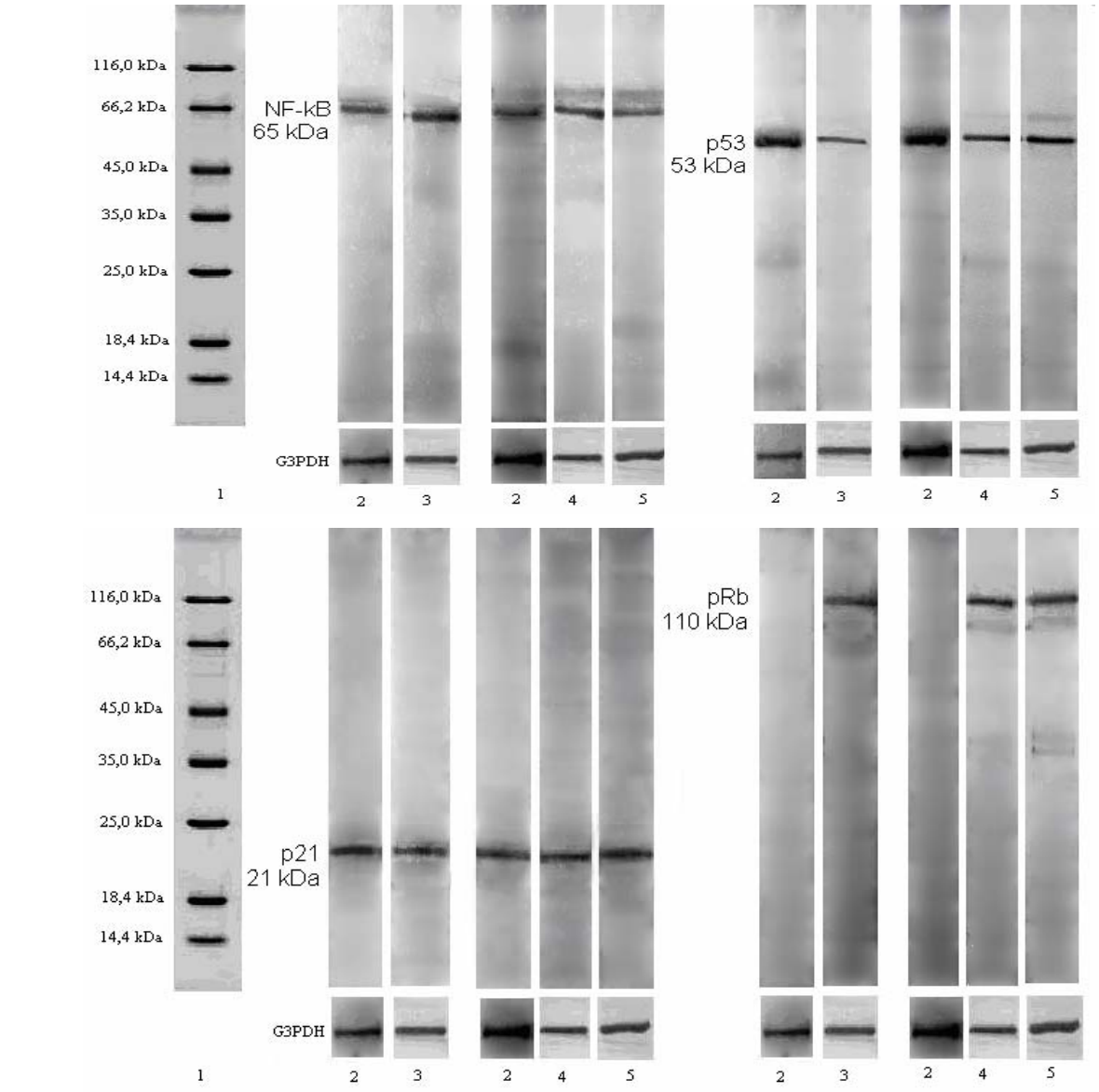
Интересны, с точки зрения регуляции апоптоза, взаимоотношения p53 с транскрипционным фактором NF-kB [Октябрьский О.Н., Смирнова Г.В., 2007; Plesnila N. et al., 2007]. Существуют две гипотезы относительно эффектов одновременного присутствия в клетке активированных NF-kB и p53. Первая подразумевает параллельные события, описанные нами ранее и связанные с деятельностью ферментов MAP-киназного каскада [Webster G.A., Perkins N.D., 1999; Rivas M.A. et al., 2008]. Альтернативная же гипотеза предполагает последовательную активацию факторов транскрипции. В данном случае один из активированных транскрипционных факторов выполняет роль инициатора, а другой – эффектора в реализации апоптозмодулирующего стимула. В исследовании, проведенном K.M. Ryan et al. [2000], было показано, что p53 может активировать NF-kB через МЕК-1-киназу, при этом NF-kB выступает в качестве витального компонента p53-индуцированного апоптоза.

Ранее рядом авторов была продемонстрирована способность NF-kB, активированного белком p53, сенсибилизировать клетки к апоптозу путем повышения экспрессии генов Fas, FasL и TNFα [Campbell, K.J., Perkins N.D., 2006; Perkins N.D., 2007; Gurzov E.N. et al., 2010]. Некоторые экспериментальные работы показали возможность NF-kB-опосредованной активации p53, ведущей к транскрипции генов проапоптотических белков Bax и Bcl-x_S [Kucharczak J. et al., 2003; Danilova N. et al., 2008].

Однако в случае цитокин-инициированного апоптоза, несмотря на возможность разрушения связи между NF-kB и его ингибитором IkB-α и обнаруженного нами повышения содержания свободного NF-kB, выполнение им своих функций в качестве транскрипционного фактора может быть весьма затруднено вследствие взаимной внутриядерной конкуренции с p53 [Webster G.A., Perkins N.D., 1999; Kuribayashi K., El-Deiry W.S., 2008].

Белок p53 в качестве транскрипционного фактора имеет возможность запускать апоптоз путем «выключения» гена, кодирующего белковый продукт Bcl-2 [Моргункова А.А., 2005]. Данный факт подтвердился обнаруженной нами корреляционной зависимостью между содержаниями нефосфорилированного p53 и Bcl-2 (R=0,93, p=0,027; R=0,75, p=0,005; R=0,67, p=0,030) в лимфоцитах, инкубированных с апоптогенной дозой TNFα, IL-2 или IL-4 (рис. 9, 10). Помимо этого, p53 позитивно регулирует образование белкового продукта гена bad [Jiang P. et al., 2006; Molchadsky A. et al., 2010], о чем косвенно свидетельствует обнаруженная активация p53 и корреляционная зависимость

между количеством нефосфорилированного p53 и Bad в лимфоцитах, инкубированных с рекомбинантными формами TNFα, IL-2 или IL-4 (R= - 0,93, p=0,017; R= - 0,93, p=0,016; R= - 0,74, p=0,046).



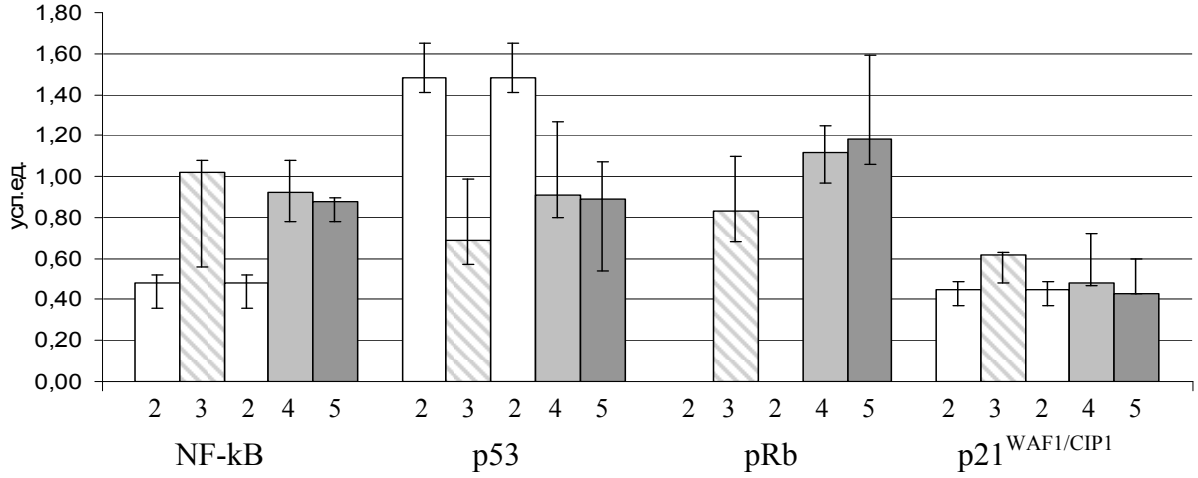


Рис. 10. Содержание транскрипционных факторов NF-kB, p53, pRb и ингибитора циклинзависимых киназ $p21^{WAF1/CIP1}$ в лимфоцитах крови, культивированных с проапоптотической концентрацией рекомбинантных TNFα и IL-2 и IL-4 in vitro

Существует несколько путей утилизации нефосфорилированного p53, связанных, прежде всего, с его фосфорилированием, убиквитинилированием, ацетилированием и метилированием [Liu B. et al., 2008]. Поэтому для оценки перехода p53 в его транскрипционно активное фосфорилированное состояние необходимо было исследовать изменение количества какого-либо белка, ген которого находится под контролем p53. Предъявляемым требованиям удовлетворяет белок $p21^{WAF1/CIP1}$, относящийся к Cip1/Kip1-семейству белков-регуляторов клеточного цикла [Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л., 2003; Weiss R.H., 2003; Garner E. et al., 2007; Hill R. et al., 2008].

Протеин $p21^{WAF1/CIP1}$ обладает способностью связываться с комплексом циклин D–циклинзависимая киназа и является ингибитором последней, что ведет к аресту клеточного цикла. Транскрипция гена $p21^{WAF1/CIP1}$ специфически находится под контролем p53 [Weiss R.H., 2003; Sperka T. et al., 2011]. Поэтому нами было предпринято исследование количества белка $p21^{WAF1/CIP1}$ в клетках, инкубированных с апоптогенной дозой rTNFα, rIL-2 и rIL-4.

Выявленное увеличение содержания данного протеина в лимфоцитах при действии рекомбинантных цитокинов, по сравнению с интактными клетками (рис. 10), по всей видимости, свидетельствуют о том, что зарегистрированное снижение количества нефосфорилированного p53 в ответ на апоптогенное действие rTNFα, rIL-2 и rIL-4 является следствием его фосфорилирования. Кроме того, изменение количества белка $p21^{WAF1/CIP1}$ при цитокин-индуцированном апоптозе имеет и самостоятельное значение, указывающее на вовлеченность данного протеина в реализацию клеточной гибели [Chau B.N. et al., 2004; Arpa L. et al., 2010].

Белок $p21^{WAF1/CIP1}$ избирательно подавляет активность циклин D1/Cdk4- и циклин E/Cdk2-комплексов, приводя к задержке перехода клетки из фазы G_1 в фазу S, что блокирует нормальное прохождение клетки по циклу. Основным субстратом комплексов циклин D-Cdk4 и циклин D-Cdk6 является опухолевый супрессор pRb, который регулирует вступление клетки в клеточный цикл. Связывание белков семейства E2F с pRb ингибирует их транскрипционную активность. При митогенных сигналах, вызываемых ростовыми факторами, pRb в середине G_1-фазы фосфорилируется комплексом циклин D-Cdk4 (или циклин D-Cdk6), что вызывает высвобождение транскрипционных факторов E2F-DP из комплекса с pRb и их активацию [Garner E., Raj K., 2008; Hallenborg P. et al., 2009; Bremner R, Zacksenhaus E., 2010].

При инкубации лимфоцитов с апоптозиндуцирующей дозой rTNFα, rIL-2 и rIL-4, было зафиксировано появление в клетках pRb, в то время как в культуре интактных клеток этот белок отсутствовал (рис. 10).

Подводя итог проведенного экспериментального исследования, следует отметить двойственность эффектов Th1- (IL-2) и Th2-цитокинов (IL-4) в отношении апоптоза лимфоцитов крови. Направленность действия указанных цитокинов определяется, по-видимому, функциональным состоянием клеток, а также условиями культивирования клеток (в нашем эксперименте использование бессывороточной инкубационной среды, классического индуктора апоптоза иммунокомпетентных клеток – дексаметазона). Кроме того,

влияние цитокинов (TNFα, IL-2 и IL-4) на реализацию программированной гибели лимфоцитов крови носит дозозависимый характер.

TNFα, IL-2 и IL-4 опосредуют свое действие через специфические рецепторные пути, однако на определенном этапе передачи апоптогенного сигнала запускаются универсальные механизмы, связанные с участием митохондрий, АФК, транскрипционных факторов NF-kB, p53 и pRb, ингибитора циклинзависимых киназ $p21^{WAF1/CIP1}$, а также представителей семейства белков Bcl-2 – Bcl-2, Bcl-x_L, Bax и Bad, реализующиеся в конечном итоге в виде стандартного эффекторного каскада (рис. 11).

Молекулярные механизмы регуляции апоптоза при дисбалансе Th1- и Th2-цитокинов (на модели клещевого энцефалита)

Исследование участия белков-регуляторов апоптоза, индуцированного цитокинами, при заболеваниях, сопровождающихся дисбаласом Th1- и Th-2-цитокинов, а также проверка гипотезы об их становлении в качестве мишеней, способствующих цитокинопосредованной дизрегуляции танатогенной программы, явилось следующим этапом нашего исследования.

Для решения поставленной задачи выбор нозологической единицы осуществлялся по следующему критерию – присутствие болезнетворного агента должно сочетаться с нарушениями в системе Th1- и Th2-цитокинов.

Данному требованию в полной мере отвечают инфекционные заболевания, вызванные различными лимфотропными вирусами семейства Flaviviridae, в том числе и вирусом клещевого энцефалита (КЭ). Изучение молекулярных аспектов реализации программированной гибели клетки в условиях вирусной инфекции является достаточно актуальным вопросом. Внедрение вируса в клетку макроорганизма активизирует врожденные механизмы, направленные на элиминацию инфекта. Участие апоптоза в удалении вируссодержащих клеток имеет важное биологическое значение, так как от его индукции во многом зависит исход инфекционного процесса [Рязанцева Н.В. и соавт., 2005; Février M. et al., 2011].

Известно, что флавивирусы способны изменять реализацию апоптоза путем связывания каспазы-8 [Prikhod'ko G.G. et al., 2002]. Помимо этого, острая форма КЭ, как любая вирусная инфекция, характеризуется смещением баланса в сторону Th1-цитокинов, регулирующих Т-клеточный иммунитет, в то время как при длительной антигенемии вируса КЭ происходит сдвиг в пользу Th2-цитокинов, контролирующих гуморальный иммунитет.

Для точного установления характера секреции и рецепции цитокинов у пациентов с ОКЭ и хронической антигенемией вируса КЭ нами была проведена оценка содержания TNFα, IL-2, IL-4, IL-10 и IL-12 в культуральной жидкости лимфоцитарных клеток методом иммуноферментного анализа.

У обследованных больных острым клещевым энцефалитом было выявлено усиление наработки Th1-цитокинов (IL-2 и IL-12), что, на наш взгляд, является проявлением адекватной защитной реакции организма, направленной на элиминацию возбудителя (рис. 12).

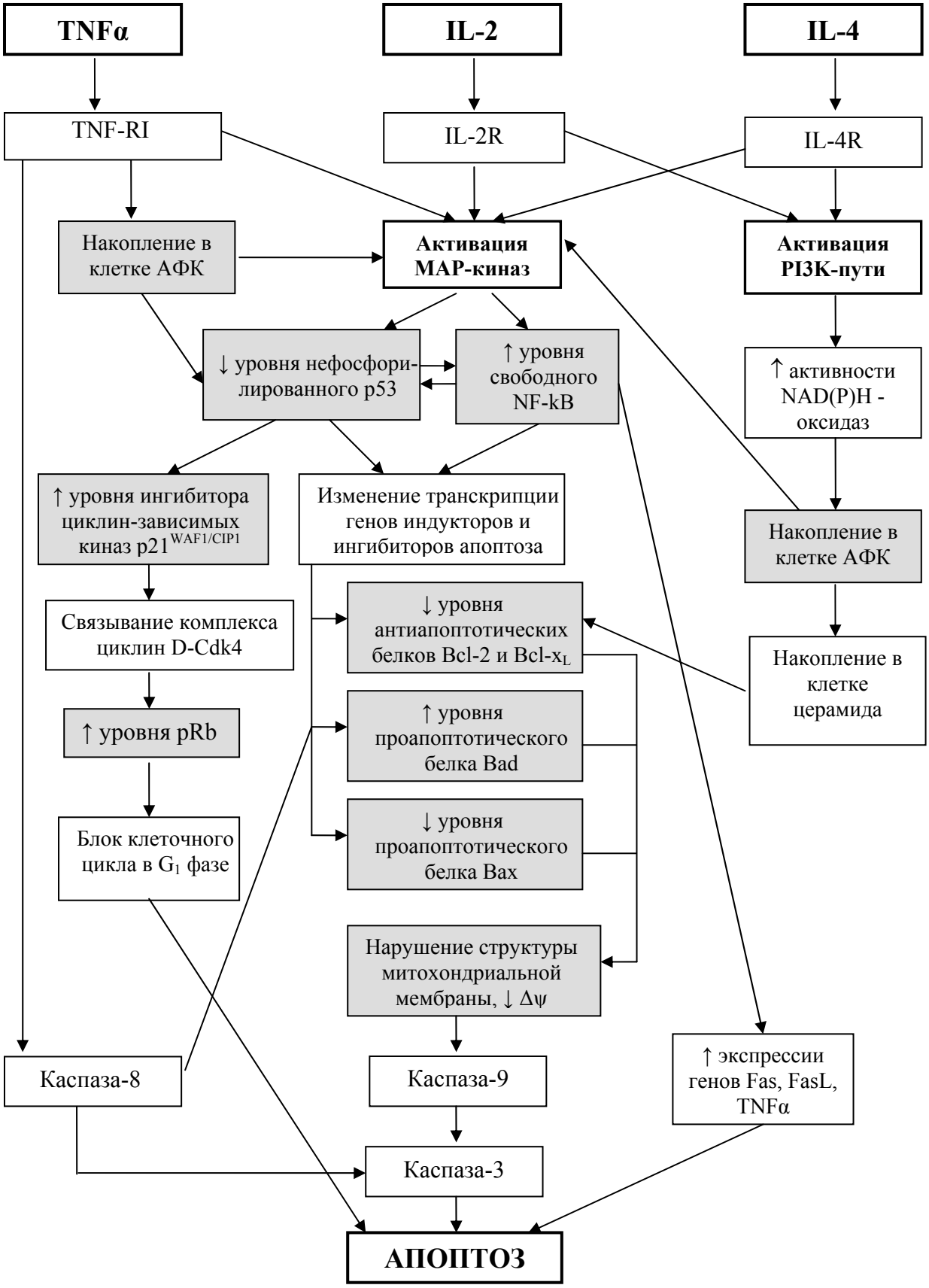


Рис. 11. Молекулярные механизмы проапоптотического эффекта цитокинов (по данным J.S. Fridman, S.W. Lowe, 2003; А.А. Фильченкова, 2003; J. Kucharczak et al., 2003; S. Gupta et. al., 2008; P. Jiang et al., 2008; Н.Ю. Часовских и соавт., 2009 и результатам собственных исследований (выделено цветом))

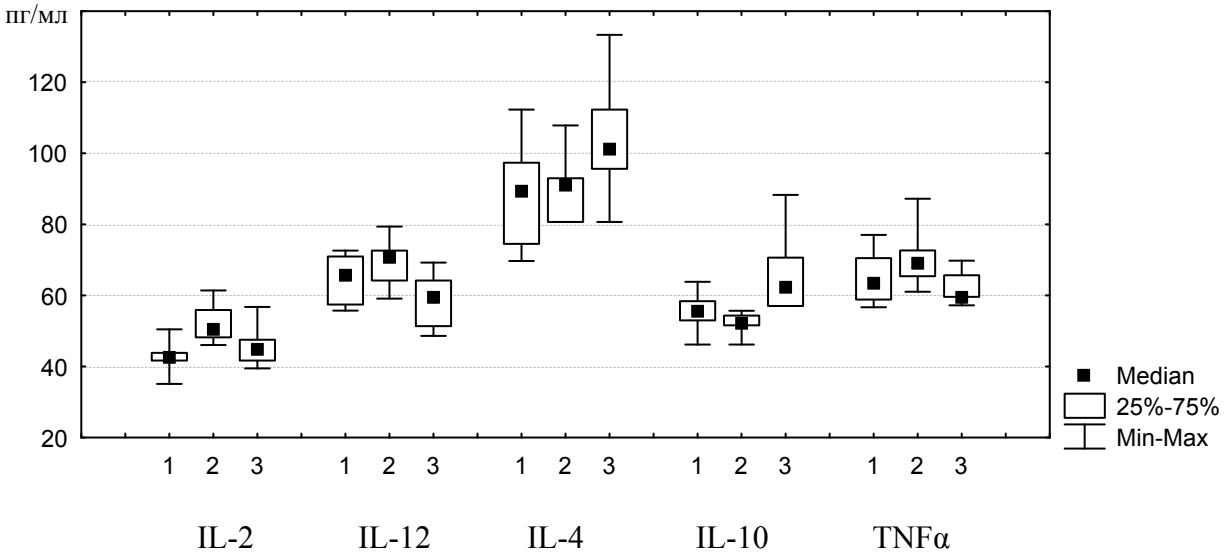


Рис. 12. Концентрация Th1- и Th2-цитокинов в супернатантах культур лимфоцитов, полученных у пациентов с клещевым энцефалитом

Примечание (здесь и на рис. 13-14): 1 – здоровые доноры; 2 – больные острым клещевым энцефалитом; 3 – пациенты с хронической антигенемией вируса клещевого энцефалита

Изучение содержания провоспалительного цитокина TNFα у больных ОКЭ показало, что клетки пациентов по сравнению с клетками здоровых доноров секретировали в условиях культивирования in vitro достоверно большее количество TNFα. У лиц с длительным носительством антигена вируса КЭ секреция TNFα лимфоцитами in vitro не отличалась от контрольных значений (рис. 12).

Найденные особенности секреции TNFα лимфоцитами крови при ОКЭ и хроническом носительстве антигена вируса КЭ являются закономерными. Повышенная наработка TNFα лимфоцитами при ОКЭ соответствует картине острого периода инфекционного процесса и представляет собой адекватный ответ на результат взаимодействия вирусного паттерна или эндогенных лигандов (белки теплового шока, фибриноген, домен А фибронектина и др.) с представителями семейства Toll-подобных рецепторов (TLR) [Tsan M.F., Gao B., 2009]. Данные события запускают каскад, зависимый от адаптерного белка MyD88 и ранней активации транскрипционного фактора NF-kB, что сопровождается экспрессией генов провоспалительных цитокинов, в том числе и TNFα [Ковальчук Л.В. и соавт., 2005; Rivas M.A. et al., 2008].

Отсутствие изменения наработки TNFα лимфоцитами крови у пациентов с хронической антигенемией вируса КЭ, вероятно, связано с обнаруженной повышенной секрецией данными клетками IL-4 и IL-10, а также других цитокинов, например, IL-6. Отмечено, что IL-6, являясь типичным провоспалительным цитокином, может также оказывать и контрвоспалительное действие, в частности, путем снижения уровня продукции TNFα [Наследникова И.О. и соавт., 2005; Зима А.П. и соавт., 2009]. Более детально изучен механизм анти-TNFα-направленного эффекта IL-10. Установлено, что IL-10, редуцируя

экспрессию белка MyD88, способен ингибировать синтез TNFα [Dagvadorj J. et al., 2008].

При взаимодействии цитокина со своим рецептором сигнал передается на внутриклеточный протеинкиназный комплекс, каскадная активация которого проявляется в апоптогенном или митогенном влиянии цитокина на клетку. В нашем исследовании у всех пациентов с клещевой нейроинфекцией было выявлено снижение количества лимфоцитов, несущих рецепторы как к Th-1-, так и к Th-2-цитокинам (рис. 13).

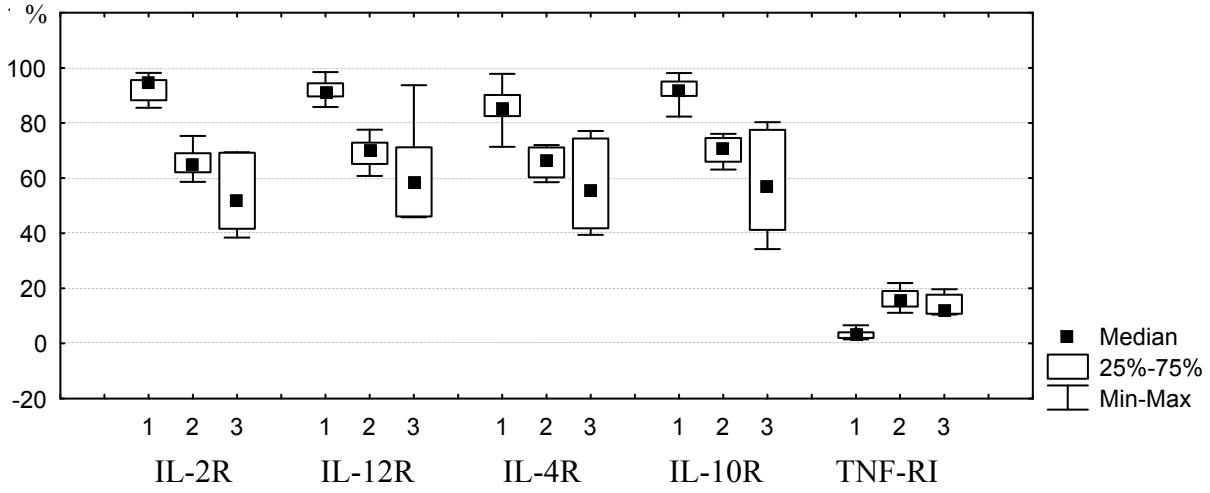


Рис. 13. Количество лимфоцитов, несущих на своей поверхности цитокиновые рецепторы, у пациентов с клещевым энцефалитом

Необходимым условием для реализации TNFα-опосредованного апоптоза является наличие на плазматической мембране клеток специфических высокоаффинных рецепторов, поэтому с помощью проточной лазерной цитометрии нами был проведен подсчет TNF-RI-положительных лимфоцитов. Данное исследование позволило зафиксировать увеличение доли несущих на своей поверхности TNF-RI лимфоцитарных клеток и у больных ОКЭ, и у пациентов с хронической антигенемией вируса КЭ (рис. 13). Биологический смысл выявленных закономерностей, возможно, связан с адаптивной реакцией клеток в ответ на изменение продукции цитокина, в данном случае TNFα. Указанное предположение может быть в некоторой степени подтверждено результатами корреляционного анализа. При ОКЭ была выявлена положительная связь между концентрацией цитокина в культуральной жидкости и количеством TNF-RI-позитивных лимфоцитов ($R=0,61$, $p<0,05$), а у пациентов с длительным носительством вируса КЭ – отрицательная ($R=-0,89$, $p<0,05$).

Полученные в нашей лаборатории фактические данные свидетельствуют, что течение острого КЭ и длительная антигенемия вируса КЭ характеризуются одновременным изменением функционирования системы Th1- и Th2-цитокинов и усилением вовлечения лимфоцитов в апоптоз.

Так, нами была проведена оценка доли претерпевающих апоптоз лимфоцитов в условиях дисбаланса в пользу Th1-цитокинов (при ОКЭ), установившая увеличение количества данных клеток более чем в 10 раз.

Аналогичные изменения имели место и при дисбалансе в пользу Th2-цитокинов (длительная антигенемия вируса КЭ), хотя и в меньшей степени (рис. 14).

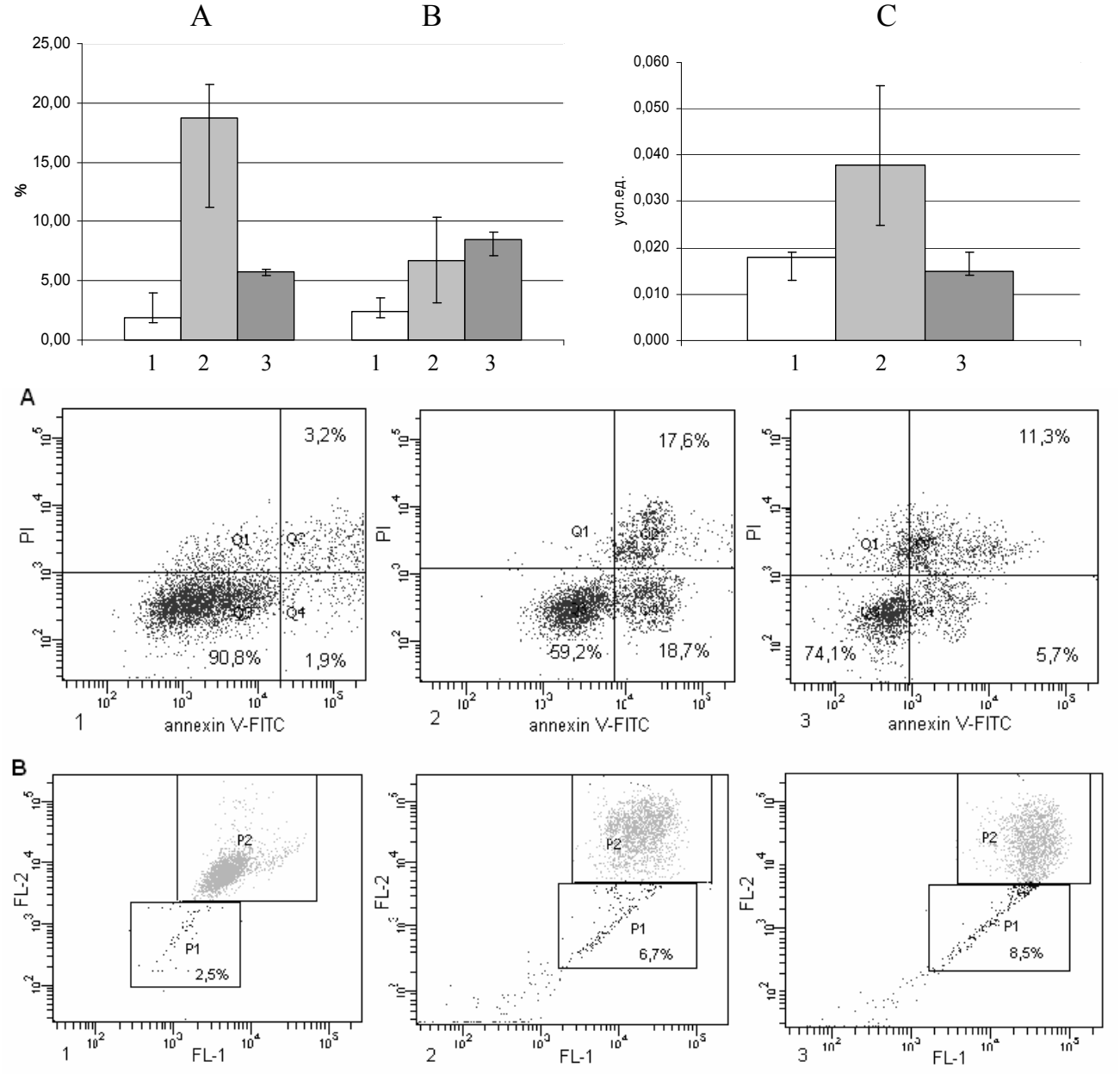


Рис. 14. Количество апоптотически измененных лимфоцитов (А), лимфоцитов со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий (В) и уровень активных форм кислорода (С) в лимфоцитах у пациентов с клещевым энцефалитом

Примечание: Q_2 – популяция погибших клеток; Q_3 – популяция живых клеток; Q_4 – популяция клеток в процессе апоптоза; P1 – популяция клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий; P2 – популяция клеток с нормальным трансмембранным потенциалом митохондрий

В случае острой формы КЭ полученные результаты могут являться следствием проапоптотического эффекта TNFα, на что указывает выявленная корреляционная зависимость между количеством TNF-RI-несущих лимфоцитов и процентом клеток в апоптозе ($R=0,77$, $p<0,05$), то есть, чем больше клеток имеет на своей поверхности рецепторы, связывающие мощный активатор запуска танатогенной программы TNFα, тем вероятнее их вовлечение в

апоптоз. Однако стоит учитывать и возможность некоторого вклада инфекта в инициацию апоптоза [Galluzzi L. et al., 2008].

Установление особенностей поведения внутриклеточных участников цитокин-инициированного апоптоза на клинической модели явилось следующим шагом нашей работы.

Первоначально было проверено предположение о заинтересованности митохондрий и АФК в реализации апоптоза лимфоцитов, отмеченного в условиях дисбаланса Th-1- и Th-2-цитокинов. Нами было установлено, что у больных ОКЭ по сравнению со здоровыми донорами статистически значимо увеличено количество клеток со сниженным трансмембранным потенциалом митохондрий и повышена продукция АФК (рис. 14). Выявленные особенности апоптоза лимфоцитов при ОКЭ могут являться следствием действия различных факторов. В частности, как ранее обсуждалось, TNFα, активируя каспазу-8, способствует образованию пор в наружной мембране митохондрий и пор пермеабилизационного перехода, что ведет к нарушению работы дыхательных комплексов и накоплению АФК, опосредуя запуск апоптогенной программы [Фильченков А.А., 2003; Tansey M.G., Szymkowski D.E., 2009]. Помимо этого, накопление в лимфоцитах АФК при острой вирусной инфекции может быть обусловлено развертыванием острофазной реакции.

При хронической антигенемии вируса КЭ проведенная оценка количества лимфоцитов с деполяризованной митохондриальной мембраной позволила установить уровень данного показателя, сопоставимый с его значениями в культуре лимфоцитов у больных ОКЭ. Выявленные изменения доли клеток с пермеабилизированной митохондриальной мембраной при длительном носительстве антигена вируса КЭ не сопровождалось повышением содержания в них АФК (как в лимфоцитах у пациентов с ОКЭ) (рис. 14). Отсутствие избыточного количества АФК в лимфоцитах у лиц с длительной персистенцией вируса КЭ, по всей вероятности, обусловлено особенностями продукции цитокинов данными клетками. IL-4 угнетает синтез мононуклеарными лейкоцитами провоспалительных TNFα, IL-1 и IL-12, что блокирует образование АФК в фагоцитирующих клетках и снижает их поступление в лимфоциты, с одной стороны [Paludan S.R., 1998; Плетюшкина О.Ю. и соавт., 2006; Paul, W.E., Zhu J., 2010], а, с другой, – дефицит секреции TNFα способствует ингибированию находящейся под контролем эйкозаноидов генерации АФК [Кулинский В.И., 2007; Rivas M.A. et al., 2008].

Полученные нами результаты и данные литературы позволяют заключить, что отмеченная при КЭ пермеабилизация мембраны митохондрий лимфоцитов, по всей видимости, обусловлена действием на клетки как самих цитокинов, так и непосредственным воздействием возбудителя вследствие способности флавивирусов к чрезмерной активации каспазы-8, что приводит к запуску апоптоза [Prikhod'ko G.G. et al., 2002].

Отмеченное при КЭ нарушение целостности митохондриальной мембраны и увеличение содержания в лимфоцитах АФК соответствуют обнаруженным в результате экспериментального исследования внутриклеточным событиям в ответ на действие рекомбинантных форм TNFα,

IL-2 и IL-4. В связи с этим можно предположить, что в условиях повышенной наработки указанных цитокинов лимфоцитами крови реализация апоптотической гибели клеток связана, прежде всего, с выходом апоптогенных факторов из митохондрий через поры, регулируемые белками семейства Bcl-2.

При проведении вестерн-блоттинга было установлено, что лимфоциты у пациентов с ОКЭ и длительной персистенцией вируса КЭ содержат сниженное количество белков-ингибиторов клеточной гибели Bcl-2 и Bcl-x_L, однако уровень способствующих реализации танатогенной программы Bax и Bad не отличался от такового у здоровых доноров. Обнаруженные различия в содержании указанных выше протеинов имеют неоднозначную интерпретацию, при этом они могут свидетельствовать о смещении баланса анти- и проапоптотических белков в сторону последних (рис. 15).

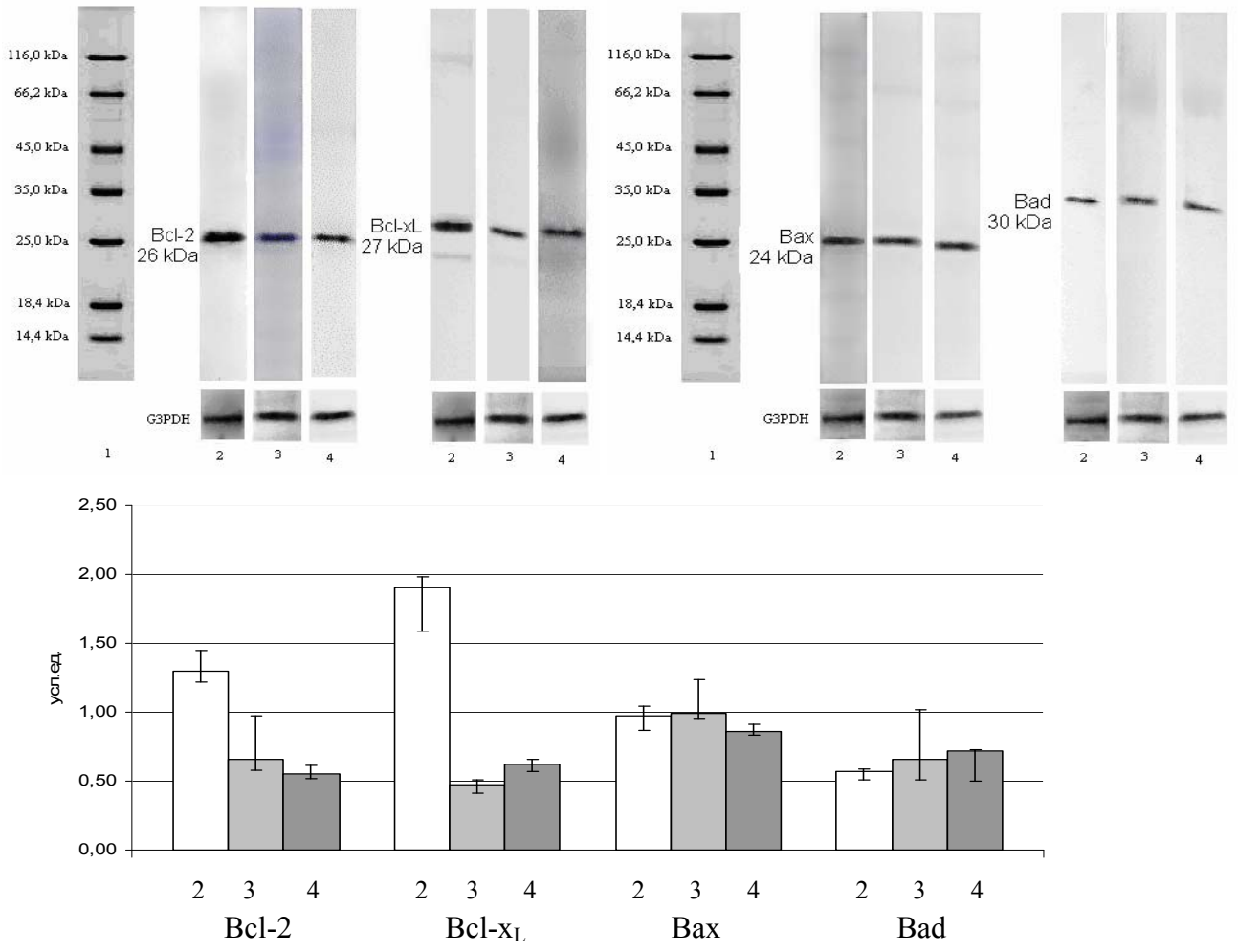


Рис. 15. Содержание белков семейства Bcl-2 в лимфоцитах крови пациентов с клещевым энцефалитом

Примечание (здесь и на рис. 16): 1 – маркер молекулярного веса; 2 – здоровые доноры; 3 – больные острым клещевым энцефалитом; 4 – пациенты с хронической антигенемией вируса клещевого энцефалита; G3PDH – глицеро-3-фосфат-дегидрогеназа

Преобладание промотирующих апоптоз представителей семейства Bcl-2, по всей вероятности, и определяет формирование пор пермеабилизационного перехода и выход в цитоплазму активаторов апоптоза, потенцирующих

эффекты каспазного каскада [Фильченков А.А., 2003; Skommer J. et al., 2010]. С другой стороны, нельзя исключать возможность вирусного вмешательства в танатогенную программу.

Выявленное нами отсутствие изменения белка Bax может быть сопряжено с действием IL-2 при острой вирусной инфекции и IL-4 при длительной антигенемии вируса КЭ [Ройт А., 2000; Хаитов Р.М., 2001; 2006]. Так, установлено, что IL-2 способен через активацию киназ МЕК1 и Akt высвобождать Bax из комплекса с антиапоптотическими протеинами Bcl-2 и Bcl-x_L и тем самым опосредовать пополнение пула несвязанных проапоптотических белков [Parikh N. et al., 2004]. И, наконец, изменения внутриклеточного содержания белков семейства Bcl-2 могут являться следствием нарушения экспрессии их генов под действием активированных вирусным агентом транскрипционных факторов [Webster G.A., Perkins N.D., 1999].

В проведенном нами исследовании было установлено, что культивирование лимфоцитов пациентов с ОКЭ и длительной антигенемией вируса клещевого энцефалита в полной питательной среде сопровождается статистически значимым повышением содержания свободной субъединицы RelA транскрипционного фактора NF-kB (рис. 16).

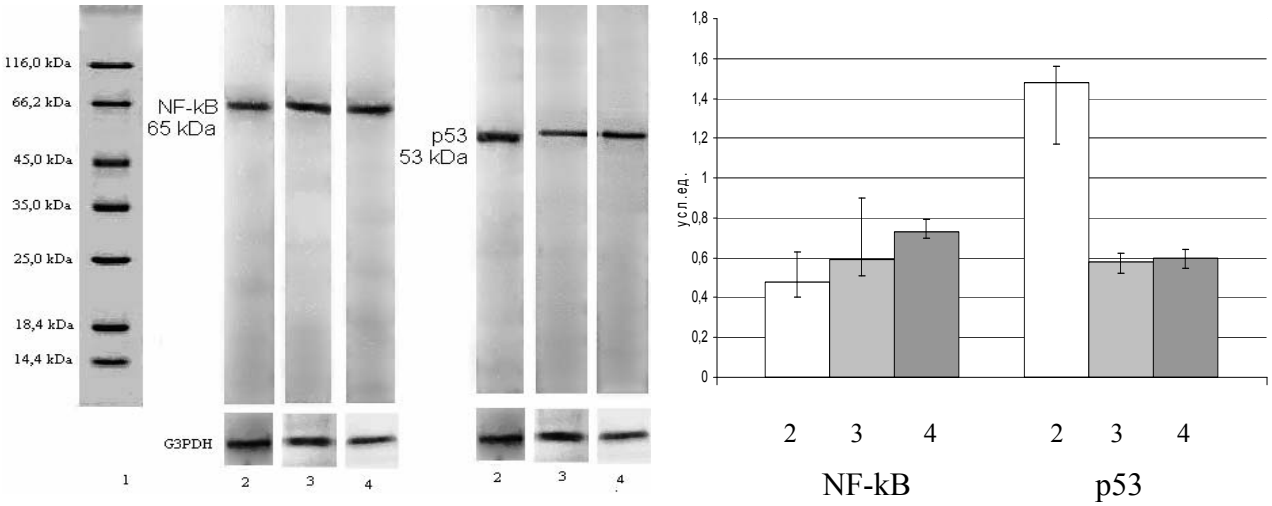


Рис. 16. Содержание транскрипционных факторов в лимфоцитах крови пациентов с клещевым энцефалитом

На наш взгляд, выявленные изменения количества свободного NF-kB в лимфоцитах в условиях различной продукции TNFα, IL-2 и IL-4 имеют разную природу. Так, при ОКЭ отщепление от NF-kB ингибитора IκB-α может быть опосредовано действием MAP-киназ при TNFα-индуцированном апоптозе, что подтверждается результатами проведенного нами эксперимента и данными необходимости активации NF-kB при TLR-зависимом образовании цитокиновых молекул, в том числе и самого TNFα. Выполнение NF-kB своих функций по отношению к генам цитокинов обладает чрезвычайной важностью, так как именно данный транскрипционный фактор отвечает за формирование адекватной реакции иммунитета на вирусные агенты путем экспрессии генов

интерферонов и IL-12, необходимых для становления противовирусного Th1-ответа [Beutler B. et. al., 2003; Schindler C. et. al.2007].

Активация NF-kB в условиях хронической антигенемии вируса КЭ является следствием его заинтересованности в регуляции транскрипции генов, кодирующих цитокины неэффективного в отношении вирусов Th2-ответа – IL-4 и IL-10 [Ройт А., 2000; Хаитов Р.М., 2001; 2006].

Большинство авторов рассматривает данный транскрипционный фактор в качестве внутриклеточного вторичного мессенджера, опосредующего передачу пролиферативного сигнала от IL-2 и IL-4 с плазматической мембраны к ядру клетки [Yamamoto Y., Gaynor R.B., 2001; Beyaert R., 2004; Perkins N.D., 2007; Abdulamir A.S. et al., 2009]. Так, показана способность NF-kB стимулировать гены белков − ингибиторов каспаз c-IAP1, c-IAP2 и IXAP, а также Bcl-x_L и гомологов Bcl-2 A1/Bfl-1 и IEX-IL, задействованных в закрытии митохондриальных каналов [Yamamoto Y., Gaynor R.B., 2001; Skommer J. et al., 2010]. Однако ряд экспериментальных работ показал возможность NF-kB-опосредованной активации онкосупрессора p53, ведущей к транскрипции генов проапоптотических белков [Kelly E. et al., 2002; Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л., 2003; Plesnila N. et al. 2007; Prasad T.S. et al., 2009].

В ходе проведенного исследования нами было выявлено снижение содержания нефосфорилированной формы белка p53 в лимфоцитах крови, полученных у пациентов с клещевой нейроинфекцией (рис. 16). Это можно объяснить, по-видимому, переходом данного белка в активное, а именно фосфорилированное состояние, поскольку транскрипционный фактор p53 функционирует только в такой модификации. Обнаруженные изменения уровня p53 соответствуют картине экспериментального апоптоза, индуцированного rTNFα, rIL-2 и rIL-4, что позволяет сделать предположение о существовании связи между эндогенной продукцией данных цитокинов у пациентов с КЭ и активацией p53.

При активации белок p53 способен инициировать стимуляцию апоптоза путем индукции синтеза проапоптотических белков и подавления антиапоптотических. Так, с одной стороны, описана способность данной регуляторной молекулы ингибировать антиапоптотические белки семейства Bcl-2, что позволяет объяснить сниженное содержание Bcl-2 и Bcl-x_L в данном эксперименте. К примеру, p53, активируя puma (p53 upregulated modulator apoptosis), приводит к связыванию антиапоптотических протеинов (Bcl-2, Bcl-x_L) [Letai A. et al., 2002; Kuwana T. et al., 2005; Gallenne T. et al., 2009; Gurzov E.N. et al., 2010], индуцируя таким образом выход цитохрома С [Prives C., 1999; Kuribayashi K., El-Deiry W.S., 2008; Yoshida K., Miki Y., 2010]. С другой стороны, p53 усиливает экспрессию гена bad и формирует на наружной митохондриальной мембране комплексы Bad/p53, способные активировать мультидоменный проапоптотический белок Bak и запускать митохондриальный путь апоптоза [Владимирская Е.Б., 2002; Daiber A., 2010; Shoshan-Barmatz V. et al., 2010].

Таким образом, второй этап исследования позволил установить, что при дисбалансе Th1- (на модели острого КЭ) и Th2-цитокинов (на модели

длительной антигенемии вируса КЭ) в реализации программированной гибели лимфоцитов участвуют те же элементы апоптотического каскада, что и при апоптозе, индуцированном рекомбинантными TNFα, IL-2 и IL-4 (рис. 17).

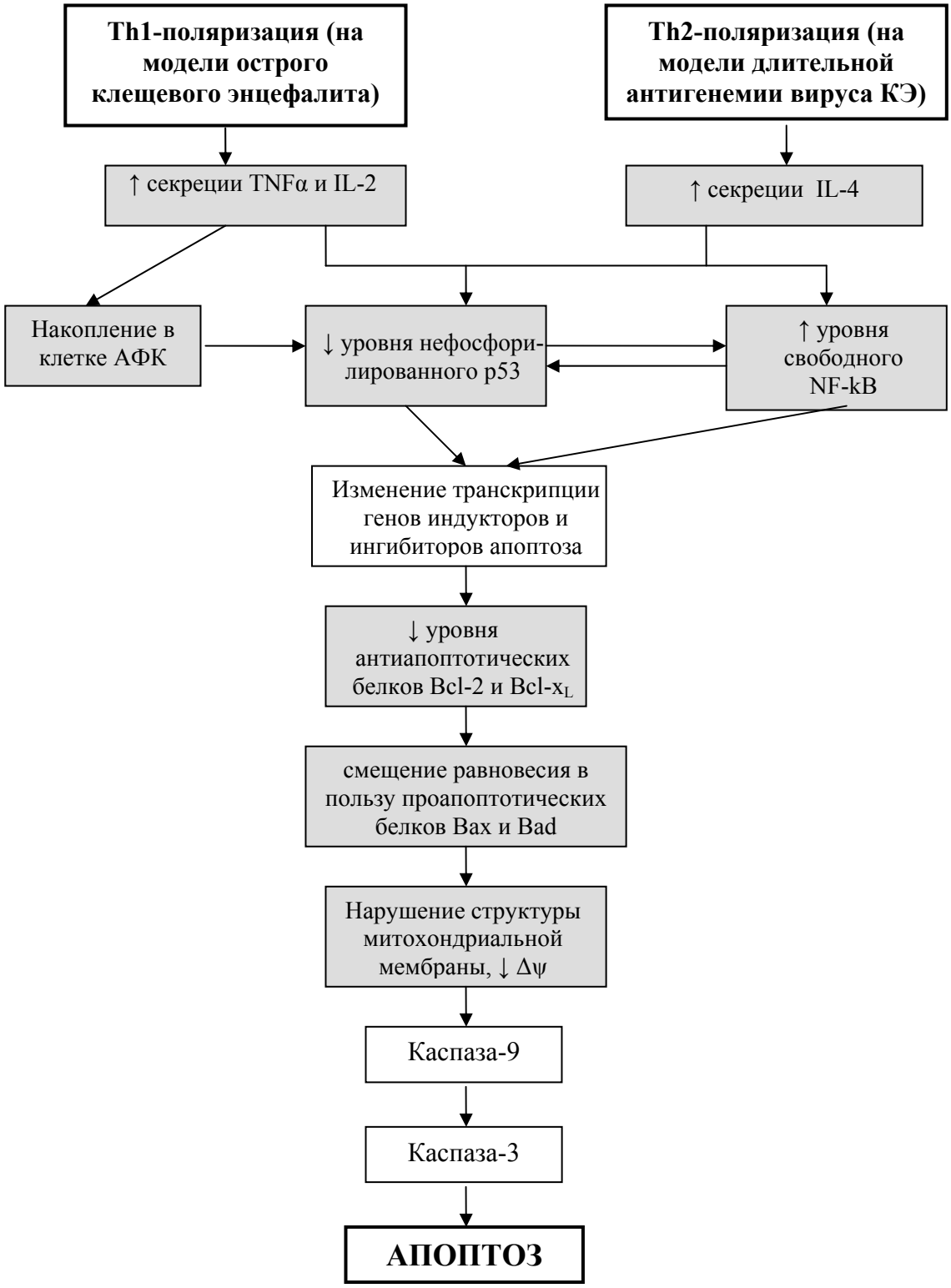


Рис. 17. Молекулярные механизмы регуляции апоптоза при дисбалансе Th1- и Th2-цитокинов (по данным E. Kelly et al., 2002; N. Parikh et al., 2004; L. Galluzzi et al., 2008; V. Shoshan-Barmatz et al., 2010; и результатам собственных исследований (выделено цветом))

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современная медико-биологическая наука находится на этапе накопления знаний о механизмах повреждения и адаптации клеток при различных патологических процессах. Одним из основных условий поддержания клеточного гомеостаза макроорганизма является адекватное функционирование иммунных клеток.

Получение знаний об общих закономерностях функционирования клеточных компонентов иммунной системы важно не только для понимания патогенеза социально-значимых заболеваний инфекционной (хронические вирусные и бактериальные) и неинфекционной (аутоиммунные, онкологические и др.) природы, но и для разработки патогенетически оправданных подходов к их коррекции. При этом приоритетным направлением биомедицинских исследований в обсуждаемом аспекте в настоящий период является изучение молекулярных механизмов регуляции жизненного цикла и функций иммунокомпетентных клеток (пролиферация, дифференцировка, программированная гибель).

Цитокины считаются наиболее многочисленной группой биологически активных веществ, влияющих на процессы пролиферации, дифференцировки и гибели иммунных клеток. Предполагают, что действие цитокинов, может носить дозозависимый характер, определяться типом клеток-мишеней и их функциональным статусом (степенью дифференцировки, функциональной активностью, состоянием рецепторного аппарата клетки). Вероятно, в зависимости от этого одни и те же цитокины могут проявлять про- и антиапоптотический эффекты.

Действительно, проведенный нами эксперимент с использованием рекомбинантных форм TNFα, IL-2 и IL-4 подтвердил предположение о дозозависимости эффектов цитокинов на реализацию программы клеточной гибели лимфоцитов путем апоптоза. При этом важно, на наш взгляд, отметить, что IL-2 и IL-4 обнаружили двойственность эффектов в отношении апоптоза лимфоцитов крови: на фоне глюкокортикоид-индуцированного апоптоза они оказывали антиапоптотическое действие на лимфоциты крови. Следует подчеркнуть, что устранение апоптозиндуцирующего действия IL-2 и IL-4 в присутствии дексаметазона и проявление их антиапоптотического влияния подтверждает гипотезу о том, что эффект данных цитокинов определяется функциональным состоянием клеток. В организме на лимфоциты, помимо IL-2 и IL-4, действуют множество различных сигнальных молекул, состав и интенсивность действия которых зависит от степени зрелости клеток, их фенотипа и стадии иммунного ответа. В разных физиологических состояниях в клетках активируются различные сигнальные пути, и меняется состав белков-регуляторов, благодаря чему IL-2 и IL-4 способны оказывать противоположные эффекты на апоптоз лимфоцитов. Конкретные внутриклеточные механизмы двойственности эффектов IL-2 и IL-4 требуют дальнейшего изучения. Это, в свою очередь, позволит понять процессы, лежащие в основе гомеостаза иммунной системы, что даст возможность для разработки новых методов

лечения и диагностики заболеваний, связанных с дизрегуляцией апоптоза иммунокомпетентных клеток.

Изучение молекулярных механизмов проапоптотического действия TNFα, IL-2 и IL-4 показало, что указанные цитокины способны вызывать активацию митохондриального и p53-опосредованного пути танатогенной программы. Важнейшую роль в данных интрацеллюлярных событиях играют вторичные мессенджеры передачи сигнала – активные формы кислорода, благодаря которым осуществляется регуляция образования функциональных форм транскрипционных факторов NF-kB, p53 и pRb. Однако апоптозиндуцирующее действие TNFα, IL-2 и IL-4 во многом предопределяется белком p53, стимулирующего накопление проапоптотического белка Bad и препятствующего синтезу ингибирующих апоптоз Bcl-2 и Bcl-x_L, что способствует нарушению целостности мембраны митохондрий (рис. 11 и 17).

Выявленные в экспериментальном блоке исследования механизмы цитокин-опосредованного апоптоза сохраняются и в условиях in vivo при дисбалансе Th1- и Th2-цитокинов. Однако их реализация обусловлена не только действием указанных цитокинов, но и наличием ряда факторов, являющихся неотъемлемой частью реакций организма и связанных как с присутствием болезнетворного агента, так и эффектами на клетку других регуляторных молекул.

Дальнейшее исследование механизмов апоптогенного действия цитокинов на клетки, на наш взгляд, может быть сопряжено с изучением их влияния на регуляцию других транскрипционных факторов и в условиях изменения активности различных участников цитокин-индуцированной танатогенной программы.

Полученные знания могут быть положены в основу разработки технологии коррекции патологических процессов и состояний, характеризующихся изменением продукции Th1- и Th2-цитокинов и модуляцией внутриклеточных сигналпередающих систем, участвующих в регуляции апоптоза.

ВЫВОДЫ

1. Особенности влияния цитокинов TNFα, IL-2 и IL-4 на реализацию апоптоза лимфоцитов крови in vitro определяются условиями культивирования клеток и носят дозозависимый характер: действие рекомбинантного TNFα в дозах от 0,050 до 0,150 нг/мл в полной культуральной среде приводит к увеличению количества апоптотически измененных лимфоцитов, в то время как рекомбинантные IL-2 и IL-4 в концентрациях от 0,050 до 1,0 нг/мл оказывают проапоптотический эффект в бессывороточной инкубационной среде.
2. Для рекомбинантных IL-2 и IL-4 характерна двойственность эффектов в отношении регуляции апоптоза лимфоцитов крови. На фоне влияния in vitro индуктора апоптоза дексаметазона rIL-2 и rIL-4 оказывают антиапоптотическое действие на лимфоциты, которое также зависит от дозы медиатора.

3. Действие рекомбинантных TNFα, IL-2 и IL-4 в проапоптотических дозах сопровождается снижением трансмембранного потенциала митохондрий на фоне накопления в клетках активных форм кислорода, что приводит к запуску митохондриального пути апоптоза лимфоцитов крови.
4. Молекулярные механизмы влияния TNFα, IL-2 и IL-4 на апоптоз лимфоцитов крови сопряжены с нарушением баланса белков семейства Bcl-2: рекомбинантные TNFα, IL-2 и IL-4 в апоптогенных концентрациях снижают внутриклеточное содержание протеинов с антисуицидальной активностью Bcl-2 и Bcl-x_L и увеличивают в клетке содержание проапоптотического белка Bad.
5. Рекомбинантные TNFα, IL-2 и IL-4 в проапоптотических дозах in vitro вызывают активацию транскрипционных факторов NF-kB, p53 и pRb и ингибитора циклинзависимых киназ $p21^{WAF1/CIP1}$ в лимфоцитах, что свидетельствует об инициации p53-зависимого пути апоптоза.
6. Увеличение количества апоптотически измененных лимфоцитов крови при остром клещевом энцефалите и длительной антигенемии вируса клещевого энцефалита, характеризующихся дисбалансом Th1- и Th2-цитокинов, сопряжено со снижением трансмембранного потенциала митохондрий. При острой форме клещевого энцефалита в лимфоцитах крови имеет место накопление активных форм кислорода.
7. Молекулярные механизмы нарушения регуляции апоптоза лимфоцитов крови при клещевом энцефалите, сопровождающемся дисбалансом Th1- и Th2-цитокинов, сопряжены со снижением уровня антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-x_L и активацией транскрипционных факторов NF-kB и p53.
8. При остром клещевом энцефалите и длительной антигенемии вируса клещевого энцефалита, характеризующихся дисбалансом Th1- и Th2-цитокинов, и при действии in vitro на лимфоцитарные клетки рекомбинантных форм TNFα, IL-2 и IL-4 в проапоптотической концентрации запускаются митохондриальный и p53-зависимый пути реализации апоптоза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Вирусиндуцированная дизрегуляция программируемой клеточной гибели иммунокомпетентных клеток: адаптация или патология? / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, О.Б. Жукова, М.М. Литвак, С.Л. Михеев, О.Е. Чечина // **Успехи физиологических наук**. – 2005. – Т. 36, №3. – С. 33-44.
2. Роль изменения экспрессии цитокинов и их рецепторов мононуклеарными лейкоцитами в условиях формирования противовирусного иммунитета / Ю.В. Миноченко, А.П. Зима, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, О.Б. Жукова, О.Е. Чечина, О.В. Килина, В.С. Козырева, Е.А. Пигузова, Р.Ф. Насырова, Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова // Тезисы докладов V Сибирского физиологического съезда, г. Томск, 29 июня-1 июля 2005 г. – Бюллетень сибирской медицины. – 2005. – Т.4, Приложение 1. – С. 95.
3. Разработка технологии прогнозирования течения и исходов вирусных инфекций на основе идентификации молекулярных мишеней повреждения

ключевых систем гомеостаза человека / О.Б. Жукова, Н.В. Рязанцева, А.П. Зима, В.В. Новицкий, Т.Т. Радзивил, М.М. Литвак, С.Л. Михеев, О.Е. Чечина, Е.А. Мороз, Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова // Материалы II Международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность», г. Москва, 20-21 октября 2005 г. – Москва, 2005. – С.132-133.

4. Роль нарушения регуляции апоптотической гибели в механизмах развития вирусиндуцированной цитогенетической нестабильности лимфоцитов крови / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, О.Б. Жукова, Т.Т. Радзивил, С.Л. Михеев, О.Е. Чечина, А.П. Зима, Б.В. Шилов // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2006. – Т. 141, № 5. – С. 544-548.

5. Молекулярные и клеточные основы патогенеза клещевого энцефалита / Р.Ф. Насырова, Н.В. Рязанцева, Н.Г. Жукова, А.П. Зима, О.Б. Жукова, О.Е. Чечина // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – Т.5, №1.– С. 42-51.

6. Состояние TNFα-опосредованного пути регуляции апоптоза лимфоцитов периферической крови при длительной антигенемии вируса клещевого энцефалита / А.К. Биктасова, О.Б. Жукова, О.Е. Чечина, Е.В. Сазонова // Науки о человеке: Материалы VII Конгресса молодых ученых и специалистов г.Томск, 17-18 мая 2007. – Томск, 2007. – С. 168.

7. TNF-опосредованная регуляция программированной гибели лимфоцитов при антигенемии вируса клещевого энцефалита / А.К. Биктасова, О.Б. Жукова, О.Е. Чечина, Е.В. Сазонова, Т.С. Прохоренко, А.Н. Вайс, Н.В. Кочакова // Актуальные проблемы патофизиологии: Материалы Межгородской конференции молодых ученых– г. Санкт-Петербург, 24-25 апреля 2007. – Санкт-Петербург, 2007. – С. 13-14.

8. Клинико-иммунологическая характеристика клещевого энцефалита / И.Н. Удинцева, О.Е. Чечина, Н.Г. Жукова, Л.В. Лукашова, Н.В. Рязанцева, А.М. Попонина, Л.А. Малышева, Н.Н. Бартфельд, З.С. Кемерова, А.К. Биктасова, Е.В. Сазонова // Медицина в Кузбассе: Материалы Межрегиональной научно-практическая конференции с международным участием «Актуальные проблемы клещевых нейроинфекций» – 2008. – № 5. – С. 152-156.

9. Панавир – Новое в этиотропном лечении клещевого энцефалита / И.Н. Удинцева, О.Е. Чечина, Н.Г. Жукова, Л.В. Лукашова, Н.В. Рязанцева, А.М. Попонина, Н.Н. Бартфельд, Л.А. Малышева, З.С. Кемерова // Медицина в Кузбассе: Материалы Межрегиональной научно-практическая конференции с международным участием «Актуальные проблемы клещевых нейроинфекций» – 2008. – № 5. – С.157-159.

10. Молекулярные механизмы дизрегуляции апоптоза лимфоцитов при дисбалансе Th1- и Th2-цитокинов / Н.В. Рязанцева, О.Е. Чечина, В.В. Новицкий, А.К. Биктасова, Е.В. Сазонова, Т.Т. Радзивил // Российский иммунологический журнал: Материалы Объединенного иммунологического форума – г. Санкт-Петербург, 30 июня-5 июля 2008. – 2008. – Т. 2(11), №2-3. – С. 259.

11. Дисбаланс программированной гибели CD4+- и CD8+-лимфоцитов при хронической вирусной инфекции / О.Е. Чечина, О.Б. Жукова, Н.В. Рязанцева,

В.В. Новицкий, С.Б. Ткаченко // **Гематология и трансфузиология**. – 2008. – № 2. – С. 38-41.

12. Клинико-иммунологические аспекты клещевого энцефалита / И.Н. Удинцева, О.Е. Чечина, Н.Г. Жукова, Л.В. Лукашова, Н.В. Рязанцева, А.М. Попонина, Л.А. Малышева, Н.Н. Бартфельд, С.А. Першина // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2008. – Т. 7, № 5-2. – С. 438-443.

13. Дисбаланс белков семейства Bcl-2 в модуляции апоптоза лимфоцитов / А.Н. Марошкина, О.Е. Чечина, О.Б. Жукова, Н.В. Рязанцева, Т.С. Прохоренко, А.К. Биктасова, М.В. Белкина, Е.В. Сазонова, А.П. Зима, Т.Т. Радзивил // Рецепция и внутриклеточная сигнализация: Сборник статей. – Пущино, 2009. – Т.2 – С. 457-461.

14. Дозозависимые эффекты IL-2 на программированную гибель лимфоцитарных клеток / Е.В. Сазонова, О.Е. Чечина, А.К. Биктасова, О.Б. Жукова // Актуальные проблемы патофизиологии: Материалы Межгородской конференции молодых ученых – г. Санкт-Петербург, 22-23 апреля 2009. – Санкт-Петербург, 2009. – С. 96-97.

15. Изменение содержания транскрипционных факторов при TNFα-опосредованном апоптозе лимфоцитов крови / А.К. Биктасова, О.Б. Жукова, Н.В. Рязанцева, О.Е. Чечина, В.В. Новицкий // Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии: Материалы X Международного конгресса – г. Казань, 20-23 мая 2009. – Казань, 2009.– С. 278.

16. Молекулярные механизмы цитокиновой регуляции апоптоза лимфоцитов / О.Е. Чечина, А.К. Биктасова, Е.В. Сазонова, О.Б. Жукова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // Аллергология и иммунология: Материалы VII съезда аллергологов и иммунологов СНГ – г. Санкт-Петербург, 25-28 апреля 2009. – 2009. – Т. 10, №2.- С. 176.

17. Молекулярные мишени проапоптотического действия ИЛ-2, ИЛ-4 и ФНОα при поляризации иммунного ответа по Th1- и Th2 пути / Н.В. Рязанцева, О.Е. Чечина, В.В. Новицкий, Е.В. Сазонова, А.К. Биктасова // Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием г. Новосибирск, 27-29 октября 2009. – Новосибирск, 2009.– С. 226-227.

18. Нарушение TNFα-опосредованного апоптоза лимфоцитов как механизм формирования хронической персистенции вируса клещевого энцефалита / А.К. Биктасова, О.Е. Чечина, Е.В. Сазонова, О.Б. Жукова // Актуальные проблемы патофизиологии: Материалы Межгородской конференции молодых ученых – г. Санкт-Петербург, 22-23 апреля 2009. – Санкт-Петербург, 2009. – С. 18-19.

19. Роль белков семейства Bcl-2 в регуляции IL-2-опосредованного апоптоза лимфоцитов крови / Е.В. Сазонова, А.К. Биктасова, О.Б. Жукова, О.Е. Чечина, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии: Материалы X Международного конгресса – г. Казань, 20-23 мая 2009. – Казань, 2009.– С. 308.

20. Роль p53 и NFkB в реализации IL-2-опосредованного апоптоза лимфоцитов / Е.В. Сазонова, О.Е. Чечина, А.К. Биктасова, О.Б. Жукова, И.С. Лосенков, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // Медицинская иммунология: Материалы XIII

всероссийского форума «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге 2009» – г. Санкт-Петербург, 8-11 июня 2009. – 2009. – № 4-5. – С. 334.

21. Роль цитокинов в редокс-зависимой регуляции апоптоза / О.Е. Чечина, А.К. Биктасова, Е.В. Сазонова, О.Б. Жукова, Т.С. Прохоренко, И.В. Крат, Н.Ю. Часовских, В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 67-71.

22. Система TNFα-TNF-RI и апоптоз лимфоцитов крови при хронической антигенемии вируса клещевого энцефалита / А.К. Биктасова, О.Б. Жукова, О.Е. Чечина, Е.В. Сазонова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, И.С. Лосенков // Медицинская иммунология: Материалы XIII всероссийского форума «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге 2009» – г. Санкт-Петербург, 8-11 июня 2009. – 2009. – № 4-5. – С. 380.

23. Участие транскрипционных факторов и белков семейства Bcl-2 в TNFα-опосредованном апоптозе лимфоцитов / А.К. Биктасова, О.Б. Жукова, О.Е. Чечина, Е.В. Сазонова // Науки о человеке: Материалы X Конгресса молодых ученых и специалистов г. Томск, 28-29 мая 2009.– Томск, 2009.– С. 71-72.

24. Состояние системы MAP-киназ JNK и P38 в мононуклеарных лейкоцитах крови при воспалении / Н.Ю. Часовских, Н.В. Рязанцева, Е.В. Кайгородова, О.Е. Чечина, Е.Г. Соколович, В.В. Новицкий // **Медицинская иммунология**. – 2009. – Т. 11, № 6. – С. 515-522.

25. P53 и NFkB – сигнальные трансдукторы IL-2-опосредованного апоптоза лимфоцитов / Е.В. Сазонова, О.Е. Чечина, А.К. Биктасова, О.Б. Жукова, И.С. Лосенков, З.К. Хаитова // Науки о человеке: Материалы X конгресса молодых ученых и специалистов г. Томск, 28-29 мая 2009. – Томск, 2009. – С. 101-102.

26. Молекулярные механизмы влияния интерлейкина-2 на апоптоз лимфоцитов крови / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, О.Б. Жукова, Е.В. Сазонова, О.Е. Чечина, А.К. Биктасова, А.Н. Байков // **Клеточные технологии в биологии и медицине**. – 2010. – № 2. – С. 116-120.

27. Нарушение апоптотической реакции лимфоцитов при атопическом дерматите на фоне персистирующих вирусных и бактериальных инфекций / И.В. Крат, Н.В. Рязанцева, Т.Т. Радзивил, О.Е. Чечина, Е.В. Сазонова, Л.Л. Шубин // **Военно-медицинский журнал**. – 2010. – Т. 31, № 1. – с. 64-65.

28. Особенности продукции цитокинов при хронизации иксодового клещевого боррелиоза / А.С. Бараулина, Е.Н. Кологривова, О.Б. Жукова, О.Е. Чечина // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 21-25.

29. Редокс-зависимые изменения продукции IL-8, IL-10 и апоптоза мононуклеарных лейкоцитов / Е.В. Кайгородова, Е.Г. Старикова, О.Е. Чечина, Н.Ю. Часовских, Т.В. Жаворонок, А.К. Биктасова, Е.В. Сазонова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // **Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук**. – 2010. – Т. 30, № 5. – С. 6-10.

30. Роль активных форм кислорода и белков семейства Bcl-2 в реализации ФНО-α-опосредованного апоптоза лимфоцитов / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, О.Б. Жукова, А.К. Биктасова, О.Е. Чечина, Е.В. Сазонова, М.В. Белкина, Н.Ю. Часовских, З.К. Хаитова / **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2010. – Т. 149, № 2. – С. 139-142.

31. Роль NF-kB, P53 и P21 в регуляции ФНО-α-опосредованного апоптоза лимфоцитов / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, О.Б. Жукова, А.К. Биктасова, О.Е. Чечина, Е.В. Сазонова, Т.Т. Радзивил, А.Н. Вайс, Н.Ю. Часовских // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2010. – Т. 149, № 1. – С. 56-59.
32. The molecular mechanisms of lymphocyte apoptosis regulation at Th1- and Th2-cytokine disbalance / N. Ryazantseva, O. Chechina, E. Sazonova, A. Biktasova, V. Novitsky // The 6th International Congress of Pathophysiology «Gene-environment interaction in health and disease» Montreal, 22-25 September 2010. – Montreal (Canada), 2010. – С. 69.
33. Белки семейства Bcl-2 – молекулярные мишени проапоптотического действия ИЛ-2 и ИЛ-4 / О.Е. Чечина, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, Е.В. Сазонова, А.К. Биктасова, О.Б. Жукова, А.Н. Марошкина, М.В. Белкина, Е.В. Кайгородова, Т.С. Прохоренко // **Иммунология**. – 2011. – Т. 32, № 3. – С. 127-130.
34. Клинико-иммунологическая характеристика больных клещевым энцефалитом в острый период в Томской области / И.Н. Удинцева, Н.Г. Жукова, О.Е. Чечина, А.М. Попонина, Т.Н. Полторацкая, А.В. Шихин, Т.М. Панкина, А.П. Зима, Т.С. Пинегина // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2011. – Т. 10, № 2. – С. 44-49.
35. Механизмы реализации апоптоза лимфоцитов при клещевом энцефалите / О.Е. Чечина, Н.В. Рязанцева, Е.В. Сазонова, Н.Г. Жукова, И.Н. Удинцева, В.В. Новицкий // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2011. – Т.10, № 6. – С. 61-65.
36. Система цитокинов и их рецепторов при хронических вирусных инфекциях: молекулярные механизмы дизрегуляции Тезисы докладов XVI научно-практической конференции / А.П. Зима, Н.В. Рязанцева, О.Е. Чечина, Н.Г. Жукова, Т.С. Прохоренко // «Высокие технологии и модернизация в лабораторной медицине» 29-30 марта 2011 г. – Москва, 2011. – С. 12.
37. Суперсемейство рецептора фактора некроза опухоли и белок теплового шока 90кДа: молекулярные основы взаимоотношения / Н.В. Рязанцева, Е.В. Кайгородова, М.В. Белкина, А.Н. Марошкина, О.Е. Чечина, А.П. Зима, В.В. Новицкий // **Медицинская иммунология**. – 2011. – Т.13, №2-3. – С. 247-252.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода
ГК – глюкокортикоиды
КЭ – клещевой энцефалит
ОКЭ – острый клещевой энцефалит
IkB − ингибитор ядерного фактора kB
FITC – флюоресцеинизотиоцианат
IL – interleukin, интерлейкин
rIL-2 – recombinant interleukin-2, рекомбинантный интерлейкин-2
rIL-4 – recombinant interleukin-4, рекомбинантный интерлейкин-4
JNK – c-Jun N-terminal kinase, c-Jun N-терминальная киназа
MAP-киназы – mitogen-activated protein kinases, митоген-активируемые протеинкиназы
NF-kB – nuclear factor κB, ядерный фактор kB
PI – propidium iodide, пропидий иодид
pRb – белок ретинобластомы
PTP – permeability transition pore, пора повышенной проницаемости
rTNFα – рекомбинантный фактор некроза опухоли альфа человека
TNF-RI – рецептор к фактору некроза опухоли альфа 1-го типа
TNF-RII – рецептор к фактору некроза опухоли альфа 2-го типа
Th – Т-хелпер
TNFα – фактор некроза опухоли альфа
VDAC – потенциал-зависимый анионный канал
Δψ – митохондриальный трансмембранный потенциал