

## ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ *bcl-2* И *mTOR* В Т-ЛИМФОЦИТАХ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

© А. Р. Фатхуллина, С. Н. Абрамов, Ю. В. Скибо,<sup>1</sup> З. И. Абрамова

Институт фундаментальной медицины и биологии  
Казанского (Приволжского) федерального университета;

<sup>1</sup> электронный адрес: [yuliya\\_ksu@mail.ru](mailto:yuliya_ksu@mail.ru)

Синтетические глюкокортикоиды способны активировать апоптоз в клетках путем регуляции транскрипции соответствующих генов. Влияние дексаметазона на апоптоз известно, однако его способность влиять на другую программу гибели клеток — аутофагию — в настоящий момент не доказана. Поэтому в настоящей работе анализировали влияние дексаметазона на экспрессию гена апоптотического пути *bcl-2* и гена аутофагии *mTOR* в Т-лимфоцитах здоровых доноров. Результаты показали, что под влиянием дексаметазона происходит снижение экспрессии как гена *bcl-2*, так и *mTOR*. Однако характеры влияния дексаметазона на *mTOR* и *bcl-2* различаются: если экспрессия гена *bcl-2* в процессе длительного культивирования поддерживается на одном и том же сниженном уровне, то экспрессия *mTOR* после снижения повышается.

Ключевые слова: апоптоз, аутофагия, Т-лимфоциты, дексаметазон, *bcl-2*, *mTOR*.

Глюкокортикоидный гормон дексаметазон относится к группе терапевтических веществ, способных снижать количество Т-лимфоцитов и других иммунокомпетентных клеток в крови посредством запуска программы гибели. Механизм действия глюкокортикоидов на молекулярном уровне до конца не выяснен. Считают, что их действие на клетки-мишени осуществляется главным образом на уровне регуляции транскрипции генов. Программированная клеточная гибель в настоящее время подразделяется на несколько типов, но основными являются апоптоз и аутофагия. Каждый из них находится под контролем различных сигнальных путей. Одним из ключевых белков апоптотического пути является *Bcl-2*, повышенная экспрессия которого ингибирует гибель клетки. С другой стороны, повышенная экспрессия белка *mTOR* подавляет аутофагию. Индукция апоптоза дексаметазоном подтверждена многочисленными экспериментальными данными (Reichardt, 2004; Bjelakovic, 2010). Однако информация относительно его влияния на аутофагический путь отсутствует. Поэтому комплексный анализ влияния дексаметазона на экспрессию ключевых сигнальных белков аутофагии и апоптоза позволит расширить представление о механизме его действия. В связи с этим цель настоящей работы заключалась в определении характера экспрессии генов *bcl-2* и *mTOR* под влиянием дексаметазона в Т-лимфоцитах здоровых доноров.

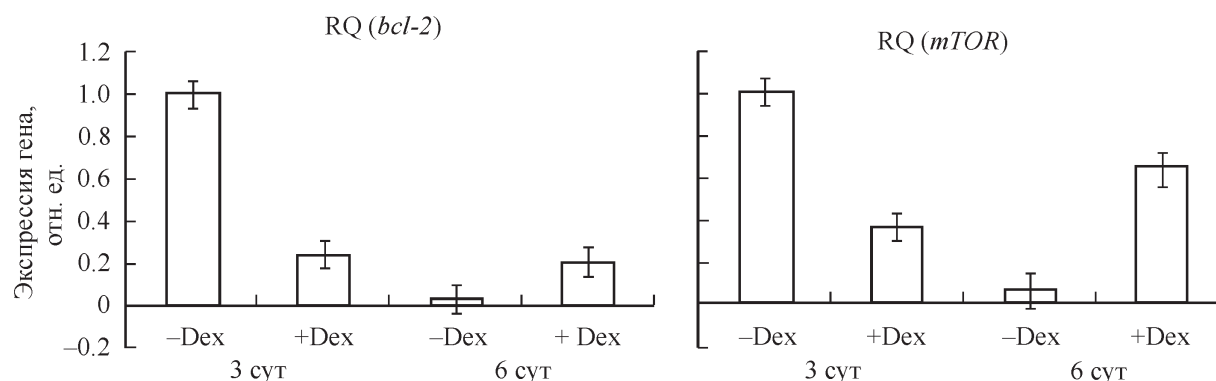
### Материал и методика

Для определения экспрессии генов *bcl-2* и *mTOR* из периферической крови здоровых доноров (10 человек) выделяли популяцию Т-лимфоцитов, используя метод

иммуномагнитной сепарации по прилагаемой инструкции. Полученные клетки ( $2 \cdot 10^6$  кл./мл) инкубировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе (5 %  $\text{CO}_2$ ) в питательной среде RPMI-1640, содержащей эмбриональную телячью сыворотку (10 %), пенициллин (5000 ед./мл), стрептомицин (5000 мкг/мл) и L-глутамин (1 %). Дексаметазон добавляли до конечной концентрации  $10^{-4}$  М на начальной стадии культивирования, после чего клетки оставляли в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе на 6 сут.

Тотальную клеточную РНК выделяли, используя Trizol LS согласно протоколу фирмы-производителя. Полученную РНК в количестве 11 нг использовали для синтеза кДНК методом обратной транскрипции (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) по прилагаемому протоколу фирмы-производителя. Реакцию амплификации, полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили в присутствии праймеров к кДНК генов человека *bcl-2*, *mTOR* и актину (в качестве эндогенного контроля). Условия амплификации: 50 °С (2 мин), 95 °С (10 мин), 95 °С (0.15 мин) и 60 °С (1 мин). Экспрессию генов оценивали, используя относительный количественный анализ по ddCt-методу с определением среднего значения RQ. В качестве калибратора было выбрано значение экспрессии исследуемых генов на 3-и сут культивирования без обработки дексаметазоном, значение RQ для которых принимали за 1 отн. ед.

Использовали следующие реактивы: набор для иммуномагнитной сепарации Т-клеток (Dynal T Cell Negative Isolation Kit, США), Trizol LS (Invitrogen, Life Technologies, США), набор для обратной транскрипции High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, США), реактивы для ПЦР — зонды TaqMan к *bcl-2*, *mTOR* и актину, 20×TaqMan Gene Expression Assay,



Изменение экспрессии генов *bcl-2* и *mTOR* в Т-лимфоцитах на 3-и и 6-е сут культивирования в присутствии дексаметазона (+Dex).

Экспрессию генов (RQ) оценивали ddCt-методом, определяя среднее значение RQ. Калибратором служило значение RQ, принятое за 1 отн. ед. на 3-и сут культивирования в отсутствие дексаметазона.

2×TaqMan Gene Expression Master Mix (Invitrogen, Life Technologies, США), RPMI-1640, эмбриональная телячья сыворотка, пенициллин, стрептомицин и L-глутамин (ПанЭко, Россия).

## Результаты и обсуждение

Определен уровень экспрессии генов апоптоза (*bcl-2*) и аутофагии (*mTOR*) в Т-лимфоцитах здоровых доноров в зависимости от времени культивирования и действия дексаметазона. Оказалось, что на 3-и сут культивирования в присутствии дексаметазона экспрессия гена *bcl-2* снижается по сравнению с необработанными клетками и составляет 0.235 отн. ед. На 6-е сут в необработанных клетках экспрессия гена *bcl-2* снижается максимально до значения 0.03 отн. ед., тогда как в клетках, обработанных дексаметазоном, уровень экспрессии более не менялся и оставался на уровне 3-х сут (см. рисунок).

Анализ экспрессии гена аутофагического пути *mTOR* в Т-лимфоцитах, обработанных дексаметазоном, показал, что на 3-и сут культивирования она снижается и составляет 0.358 отн. ед. по сравнению с необработанными клетками. Однако на 6-е сут экспрессия *mTOR* возрастает почти в 2 раза и составляет 0.67 отн. ед. При этом в необработанных клетках его экспрессия, так же как и гена *bcl-2*, снижается до минимального значения.

В ходе предыдущих работ было показано, что Т-лимфоциты здоровых доноров под влиянием стрессовых условий, возникающих в процессе культивирования при снижении содержания питательных веществ в среде, погибают по пути апоптоза (Vodounon, 2012). Известно, что сверхэкспрессия антиапоптотического белка Bcl-2 способна ингибировать апоптоз, индуцированный глюкокортикоидами, в то время как низкая экспрессия Bcl-2 способствует индукции апоптоза (Youle, Strasser, 2008). Опираясь на полученные результаты, можем предположить, что показанная в наших предыдущих работах активация апоптоза в Т-клетках сопровождается снижением экспрессии гена *bcl-2* как в контрольных клетках, так и в Т-лимфоцитах, обработанных дексаметазоном.

Белок mTOR — один из основных регуляторов метаболизма. В зависимости от условий он запускает процессы запасания или расходования энергии. Если mTOR активен, то аутофагия не запускается. Ранее проведенные исследования показали отсутствие активации аутофагии

в ответ на стресс (Скибо, 2012). Добавление дексаметазона стимулировало в клетках апоптоз, но не аутофагию. Проведенный в настоящей работе анализ экспрессии гена *mTOR* показал, что она снижается, как и в случае с геном *bcl-2*. Однако мы обнаружили разницу между степенью снижения экспрессии гена *mTOR* и с *bcl-2* при действии дексаметазона и показали тенденцию к повышению экспрессии *mTOR* с течением времени. Вероятно, это связано с тем, что в нормально функционирующих клетках предпочтительной является активация апоптоза, поэтому транскрипция гена *bcl-2* блокируется. В свою очередь активация апоптоза блокирует инициацию другого пути — аутофагии — путем повышения экспрессии *mTOR*.

Таким образом, в клетках здоровых доноров при снижении содержания питательных веществ дексаметазон снижает экспрессию гена *bcl-2*, а также *mTOR*, но менее выражено, активируя тем самым программу апоптоза. В связи с этим необходимо проведение дальнейшего комплексного анализа влияния дексаметазона на экспрессию генов *bcl-2* и *mTOR* в клетках с нарушенной программой апоптоза.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

## Список литературы

- Скибо Ю. В., Пономарева А. А., Решетникова И. Д., Абрамова З. И. 2012. Индукция аутофагии в Т-лимфоцитах периферической крови больных atopической бронхиальной астмой. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 7 (3): 146—150. (Skibo Y. V., Ponomareva A. A., Reshetnikova I. D., Abramova Z. I. 2012. Autophagy induction in T-lymphocytes of peripheral blood of patients with atopical asthma. Cell Transpl. Tis. Eng. 7 (3): 146—150.)
- Bjelaković G., Stojanovic I., Jevtovic Stoimenov T., Pavlović D., Kocić G., Rossi S., Tabolacci C., Nikolić J., Sokolović D., Bjelaković Ij. 2010. Metabolic correlations of glucocorticoids and polyamines in inflammation and apoptosis. Amino Acids. 39: 29—43.
- Reichardt H. M. 2004. Immunomodulatory activities of glucocorticoids: insights from transgenesis and gene targeting. Curr. Pharm. Des. 10: 2797—2805.
- Vodounon A. C., Skibo Y. V., Abramova Z. I. 2012. Morphological and biochemical characteristics of apoptosis lym-

phocytes of peripheral blood in the pathogenesis of bronchial and atopic asthma of light and serious severity. Res. Rev. BioSci. 6 : 210—220.

Youle R. J., Strasser A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9 : 47—59.

Поступила 4 II 2014

DEXAMETHASONE AFFECT ON THE EXPRESSION OF *bcl-2* AND *mTOR* GENES  
IN T-LYMPHOCYTES FROM HEALTHY DONORS

A. R. Fathullina, S. N. Abramov, Yu. V. Skibo,<sup>1</sup> Z. I. Abramova

Institute of Fundamental Medicine and Biology of the Kazan (Volga Region) Federal University;

<sup>1</sup> e-mail: yuliya\_ksu@mail.ru

Synthetic glucocorticoids are able to activate apoptosis in the cells by regulating the transcription of the respective genes. Effect of dexamethasone on apoptosis is an established fact. However, its influence on another program of cell death autophagy, is currently unproven. Therefore, in this paper we have analyzed the influence of dexamethasone on the expression of *bcl-2* and *mTOR* genes in T-lymphocytes from healthy donors. The results showed that dexamethasone reduced the expression of *bcl-2* and *mTOR* genes. However, the nature of the effect of dexamethasone on *mTOR* and *bcl-2* expression was different: the expression of *bcl-2* gene in the long-term cultivation was maintained at the same reduced level, while the expression of *mTOR* was first reduced and then increased.

Key words: apoptosis, autophagy, T-lymphocytes, dexamethasone, *bcl-2*, *mTOR*.