

Е.А. Блинова^{1,2}, А.И. Котикова¹, М.А. Янишевская^{1,2}, А.В. Аксеев^{1,2}**АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ И ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ РЕГУЛЯЦИИ АПОПТОЗА У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ**¹ ФГБУН Уральский научно-практический центр радиационной медицины ФМБА России, Челябинск² ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск

Контактное лицо: Блинова Евгения Андреевна, blinova@urcrtm.ru

РЕФЕРАТ

Цель работы: Исследование апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови в отдаленные сроки у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию и оценка связи аллельных вариаций rs4645878, rs2279115, rs28362491, rs664677, rs1042522, rs1801270, rs2279744 генов *BAX*, *BCL2*, *NFkB1*, *ATM*, *TP53*, *CDKN1A*, *MDM2* с частотой лимфоцитов, погибших путем апоптоза в крови у жителей прибрежных сел реки Течи.

Материал и методы: Исследование апоптоза и генотипирование проводилось в отдаленные сроки у 390 человек, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию в результате загрязнения жидкими радиоактивными отходами речной системы Теча–Исеть–Тобол производственным объединением «Маяк». Проточной цитометрией оценивалась ранняя стадия апоптоза по наличию фосфатидилсерина на поверхности мембран клеток методом Annexin V Apoptosis Detection Kit I и поздняя стадия апоптоза методом TUNEL. Методом ПЦР в реальном времени проводилось генотипирование аллельных вариаций rs4645878, rs2279115, rs28362491, rs664677, rs1042522, rs1801270, rs2279744 генов *BAX*, *BCL2*, *NFkB1*, *ATM*, *TP53*, *CDKN1A*, *MDM2* в группе облученных лиц.

Результаты: В результате исследования было установлено, что у лиц, облучение которых началось в период внутриутробного развития и продолжалось в постнатальном периоде, количество клеток на ранней стадии апоптоза статистически значимо выше, по сравнению с лицами, подвергшимися облучению только в постнатальном периоде. При этом количество лимфоцитов на стадии фрагментации ДНК в группе облученных *in utero*, наоборот, снижается как относительно группы облученных постнатально, так и не облученных лиц. Также у облученных *in utero* наблюдается слабая отрицательная корреляционная связь внутриутробных доз облучения красного костного мозга (ККМ), тимуса и вторичных лимфоидных органов с количеством клеток на поздней стадии апоптоза. Установлено влияние аллельной вариации rs4645878 гена *BAX* на количество лимфоцитов на ранней стадии апоптоза у жителей прибрежных сел реки Течи. У носителей генотипа С/С по аллельной вариации rs4645878 гена *BAX* регистрируется статистически значимое снижение количества клеток на ранней стадии апоптоза, по сравнению с носителями генотипов Т/Т и Т/С.

Заключение: У жителей прибрежных сел реки Течи, подвергшихся радиационному воздействию в период внутриутробного развития, наблюдается различия в частоте апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови по сравнению с необлученными лицами и лицами, облученными в постнатальном периоде. Наличие полиморфных вариантов генов, регулирующих апоптоз, может модифицировать ответ лимфоцитов крови на воздействие радиации в широком диапазоне доз на ККМ.

Ключевые слова: лимфоциты, апоптоз, однонуклеотидный полиморфизм, хроническое облучение

Для цитирования: Блинова Е.А., Котикова А.И., Янишевская М.А., Аксеев А.В. Апоптоз лимфоцитов и полиморфизм генов регуляции апоптоза у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020;65(4):36–42.

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-4-36-42

Введение

Индукция апоптоза является одним из вариантов клеточной реакции на генотоксическое действие ионизирующей радиации. При этом апоптоз реализуется не только в облученных клетках, но и способствует элиминации потомков облученных клеток, имеющих повреждения в генетическом аппарате [1, 2].

Процессы апоптотической гибели регулируются геномом, нарушения этой регуляции могут приводить к развитию патологических состояний. Ингибирование апоптоза и повышение выживаемости клеток, в том числе дефектных, может способствовать развитию опухолевых и аутоиммунных заболеваний, а усиление апоптоза вызывает развитие дистрофических процессов [3].

В процессе эволюции в человеческих популяциях закреплялись различные точечные мутации — однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП), не оказывающие существенного влияния на работу подконтрольных систем в нормальных условиях существования. Однако при воздействии различных неблагоприятных факто-

ров окружающей среды, в том числе ионизирующего излучения, такие аллельные вариации могут модифицировать нормальный ответ организма на внешнее воздействие, определяя его индивидуальную радиочувствительность, что наиболее выражено в диапазоне малых доз ионизирующей радиации.

На сегодняшний день установлена связь ОНП с радиационно-индуцированными изменениями в клетках [4, 5], с радиационно-индуцированными раками и индивидуальной радиочувствительностью человека [6, 7]. Однако несмотря на многочисленные исследования, на данный момент нельзя сделать однозначные выводы о наличии значимых генетических маркеров индивидуальной радиочувствительности человека.

Целью работы являлось исследование апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови в отдаленные сроки, у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, и оценка связи аллельных вариаций rs4645878, rs2279115, rs28362491, rs664677, rs1042522, rs1801270, rs2279744 генов *BAX*, *BCL2*, *NFkB1*, *ATM*, *TP53*, *CDKN1A*, *MDM2* с частотой

гибели лимфоцитов вследствие апоптоза у жителей прибрежных сел реки Течи.

Материал и методы

Характеристика обследованных лиц

Исследование проводилось у лиц, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию в результате загрязнения жидкими радиоактивными отходами речной системы Теча–Исеть–Тобол производственным объединением «Маяк».

Спустя более 60 лет после начала облучения было обследовано 390 человек, имеющих рассчитанные индивидуальные дозы облучения на красный костный мозг (ККМ), а также тимус и вторичные лимфоидные органы. Дозы были реконструированы и рассчитаны сотрудниками биофизической лаборатории УНПЦ РМ ФМБА России с использованием дозиметрической системы TRDS, версия 2016 [8]. Все лица, вошедшие в исследование, проходили наблюдение в клиническом отделении УНПЦ РМ ФМБА России в разные годы. Характеристики обследованных лиц представлены в табл. 1.

В группу облученных лиц вошли 265 человек, кумулятивные дозы облучения ККМ которых находились в диапазоне от 70 до 3393 мГр (средняя $952 \pm 52,3$ мГр). Группа облученных лиц включала 47 человек, хроническое облучение которых началось в период внутриутробного развития и продолжалось в период постнатального развития (далее облученные *in utero*). Средняя доза внутриутробного облучения ККМ у этих лиц составила $78,9 \pm 11,7$ мГр (0,01–358 мГр), средняя внутриутробная доза облучения тимуса и вторичных лимфоидных органов — $8,6 \pm 3,7$ мГр (0,01–165,3 мГр); средняя доза постнатального облучения ККМ — 528 ± 56 мГр (70–1721 мГр) и средняя постнатальная доза облучения тимуса и лимфоидных органов $57,5 \pm 10,3$ мГр (2,8–430 мГр). Также в группу облученных лиц вошли 218 человека, радиационное воздействие которых началось после рождения, средняя постнатальная доза облучения ККМ в этой выборке

составила 890 ± 42 мГр (73,4–3393 мГр), средняя постнатальная доза облучения тимуса и вторичных лимфоидных органов — $126 \pm 7,7$ мГр (5,9–695 мГр).

Группа сравнения состояла из 125 человек, проживающих в сходных социально-экономических условиях, с облучением ККМ, не превышавшим 1 мГр/год, и накопленной постнатальной дозой облучения ККМ менее 70 мГр за весь период жизни [9].

Из исследования исключались лица, имеющие аутоиммунные, онкологические, хронические заболевания в фазе обострения, принимающие цитостатические препараты и антибиотики, и проходившие диагностическое облучение в течение 6 предшествующих месяцев до момента взятия образца крови, а также имевшие контакты с химическими агентами в процессе профессиональной деятельности.

Сведения об образе жизни, возможных факторах профессиональной вредности и условиях труда обследованных лиц собирались при помощи анкетирования. Данные о состоянии здоровья исследуемых лиц были получены из амбулаторных карт и историй болезни пациентов клиники УНПЦ РМ ФМБА России.

Все обследованные подписывали добровольное информированное согласие на проведение исследования. Исследование было согласовано с этическим комитетом УНПЦ РМ ФМБА России.

Анализ апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови

Для исследования апоптоза лимфоцитов забиралась кровь в вакуумную пробирку с гепарином в объеме 5 мл. Выделение лимфоцитов проводилось центрифугированием на градиенте плотности Lymphoprep (1,077 г/мл, STEMCELL, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Ранняя стадия апоптоза определялась по наличию на поверхности мембран клеток фосфатидилсерина. Окраска производилась в соответствии с инструкцией к набору FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, США) с использованием двух маркеров — аннексина V, который связывается с фосфати-

Таблица 1

Общая характеристика обследованных лиц
General characteristics of the surveyed persons

Признак		Группа сравнения <i>n</i> = 125	Облученные <i>in utero</i> <i>n</i> = 47	Облученные в постнатальном периоде <i>n</i> = 218
Этническая группа, % (<i>n</i>)	Славяне	69 (86)	49 (23)	42 (91)
	Тюрки	31 (39)	51 (24)	58 (127)
Пол, % (<i>n</i>)	Мужчины	31 (39)	36 (17)	29 (63)
	Женщины	69 (86)	64 (30)	71 (155)
Средний возраст, лет, <i>M</i> ± <i>SE</i>		$64 \pm 0,6$ (54–83)	$64 \pm 0,4$ (56–69)	$70 \pm 0,4$ (58–88)
Кумулятивная доза постнатального облучения ККМ, мГр, <i>M</i> ± <i>SE</i>		$21,2 \pm 1,7$ (0,3–68)	528 ± 56 (70–1721)	890 ± 42 (73,4–3393)
Кумулятивная доза постнатального облучения тимуса и вторичных лимфоидных органов, мГр, <i>M</i> ± <i>SE</i>		$8,8 \pm 1,0$ (0,02–51,5)	$57,5 \pm 10,3$ (2,8–430)	$126 \pm 7,7$ (5,9–695)
Кумулятивная внутриутробная доза облучения ККМ, мГр, <i>M</i> ± <i>SE</i>		$4,8 \pm 0,7$ (0–35,1)	$78,9 \pm 11,7$ (0,01–358)	—
Кумулятивная внутриутробная доза облучения тимуса и вторичных лимфоидных органов, мГр, <i>M</i> ± <i>SE</i>		$0,8 \pm 0,1$ (0–6,2)	$8,6 \pm 3,7$ (0,01–165,3)	—

дилсерином, и пропиция йодида (PI), который является маркером жизнеспособности клеток. Окрашенные образцы анализировались методом проточной цитометрии. Результаты были представлены в виде процентного соотношения клеток, вступивших в апоптоз (аннексин V+/PI-).

Исследование поздней стадии апоптоза проводилось методом TUNEL — обнаружение фрагментированной ДНК, с использованием набора Apo-Direct Kit (BD Biosciences, США): при фрагментации ДНК высвобождаются 3'-ОН группы, это позволяет присоединить к ним флуоресцентно меченные нуклеотиды для детекции разрывов. Суспензия клеток окрашивалась в соответствии с инструкцией к набору.

Анализ ранней и поздней стадии апоптоза проводилось на проточном цитофлюориметре Navios (Beckman Coulter, США).

Выбор кандидатных аллельных вариаций для генотипирования

На основании литературных данных были отобраны гены *BAX*, *BCL2*, *NFkB1*, *ATM*, *TP53*, *CDKN1A*, *MDM2*, принимающие непосредственное участие в регуляции апоптотической гибели клетки.

При выборе конкретных однонуклеотидных полиморфных участков выбранных генов учитывалось расположение полиморфизма в кодирующей или регуляторной части гена, а также его ассоциация с клиническими признаками. Для этого проводился анализ базы данных полногеномных исследований [10]. Характеристики полиморфных участков представлены в табл. 2.

Образцы ДНК

Для генотипирования использовались замороженные при -80°C образцы ДНК, полученные из банка тканей УНПЦ РМ ФМБА России, которые ранее были выделены из цельной крови с использованием коммерческого набора реагентов GeneJet Genomic DNA

Purification Kit (ThermoFisher, США). Экстракция ДНК из образцов крови проводилась в соответствии с протоколом изготовителя к данному набору.

Генотипирование

Генотипирование образцов проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems, США) с использованием наборов реагентов «Флэш» (Test-Gen, Россия). Смесь реагентов для амплификации готовилась согласно инструкции производителя к конкретному набору. Нуклеотидные последовательности праймеров представлены в табл. 2.

Данные генотипирования анализировались с помощью программы StepOne Software (Applied Biosystems, США) и представлялись в виде графиков аллельной дискриминации. Аллель с наименьшей частотой встречаемости принимался как условно патологичный или минорный.

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакетов программ Statistica 10.0. Для сравнения частоты апоптоза в исследуемых группах применялся непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Данные представлены в виде медианы, 25-й и 75-й перцентилей. Изучение взаимосвязей между частотой апоптоза и дозиметрическими характеристиками осуществляли методом непараметрического корреляционного анализа по Спирмену. Нулевую гипотезу отклоняли при значимости равной или меньшей 0,05.

Результаты

Оценка частоты апоптоза

При оценке частоты апоптотической гибели лимфоцитов выявлено статистически значимое снижение количества клеток, находящихся на поздней стадии

Таблица 2

Характеристика полиморфных участков генов *BAX*, *BCL2*, *NFkB*, *ATM*, *TP53*, *CDKN1A*, *MDM2* и нуклеотидная последовательность праймеров

Characteristics of polymorphic regions of the *BAX*, *BCL2*, *NFkB*, *ATM*, *TP53*, *CDKN1A*, *MDM2* genes and the nucleotide sequence of primers

Ген, полиморфизм	Аллели	Расположение ¹	Праймеры (п.н.)
<i>BAX</i> rs4645878	T/C	3'UTR variant	F: 5'- GCACTTGCTAATTCCTTCTG- 3' (20) R: 5'- ACGTGACTGTCCAATGAG- 3' (18)
<i>BCL2</i> rs2279115	C/A	5'-UTR variant	F: 5'- TCTGCTATTCAAAGTCTGA- 3' (19) R: 5'- CCTACAAGCTCTGTATTAC- 3' (20)
<i>NFkB1</i> rs28362491	Del/ATTG	Intron Variant	F: 5'- TGGACCGCATGACTCTATC- 3' (19) R: 5'- GCTCTGGCTTCCTAGCAG- 3' (18)
<i>ATM</i> rs664677	C/T	Intron Variant	F: 5'- TCCACATAATGACAAATAAG- 3' (20) R: 5'- ATGCCTGAAATCAAGTAA- 3' (18)
<i>TP53</i> rs1042522	Pro/Arg	Missense variant	F: 5'- TGTCCCAGAATGCAAGAA- 3' (18) R: 5'- CCCAGGTCCAGATGAAG- 3' (17)
<i>CDKN1A</i> rs1801270	C/A	Missense variant	F: 5'- CGCCATGTCAGAACCG- 3' (16) R: 5'- CGAAGTCACCCTCCAG- 3' (16)
<i>MDM2</i> rs2279744	A/C	Intron Variant	F: 5'- GTTGGACTGGGGCTAG- 3' (16) R: 5'- CGATCATCCGGACCTC- 3' (16)

Примечание: ¹ — по данным полногеномной базы данных 1000Genomes, версия GRCh38.p12 (URL: www.ncbi.nlm.nih.gov)

Таблица 3

Частота апоптотической гибели лимфоцитов у облученных лиц, медиана (25–75 %)

The frequency of apoptotic death of lymphocytes in the exposed individuals, the median (25–75 %)

Показатель	Группа сравнения	Лица, облученные <i>in utero</i>	Лица, облученные в постнатальном периоде
Ранняя стадия апоптоза	6,26 (3,01–11,55)	8,93 (3,54–14,64) $p_1 = 0,008$	5,30 (3,42–8,82)
Поздняя стадия апоптоза	0,09 (0,02–0,22)	0,04 (0,01–0,12) $p = 0,01$ $p_1 = 0,001$	0,14 (0,04–0,40)

Примечание: p — уровень значимости по сравнению с группой необлученных лиц; p_1 — уровень значимости при сравнении облученных лиц в период постнатального развития с лицами, облученными *in utero*

апоптоза в группе лиц, облученных *in utero*, как по сравнению с группой необлученных лиц, так и с группой облученных в период постнатального развития. В то же время у лиц, облученных *in utero*, количество клеток на ранней стадии апоптоза статистически значимо выше относительно лиц, облучение которых началось в постнатальном периоде развития. Количество клеток на ранней и поздней стадиях апоптоза в группе лиц, облученных в постнатальном периоде, по сравнению с группой необлученных лиц статистически значимо не отличалось (табл. 3).

Взаимосвязь между частотой апоптоза и дозиметрическими характеристиками

Не было обнаружено корреляционных связей между показателями апоптотической гибели клеток и дозиметрическими характеристиками в группе облученных в период постнатального развития: доза облучения ККМ — ранняя стадия апоптоза ($r = -0,07$; $p > 0,05$); доза облучения ККМ — поздняя стадия апоптоза ($r = 0,1$; $p > 0,05$); доза облучения тимуса и вторичных лимфоидных органов — ранняя стадия апоптоза ($r = -0,04$; $p > 0,05$); доза облучения тимуса и вторичных лимфоидных органов — поздняя стадия апоптоза ($r = 0,1$; $p > 0,05$). В группе лиц, облученных *in utero*, также не выявлено корреляционных связей между показателями апоптоза и постнатальными дозами облучения: постнатальная доза облучения ККМ — ранняя стадия апоптоза ($r = 0,01$; $p > 0,05$); постнатальная доза облучения ККМ — поздняя стадия апоптоза ($r = -0,06$; $p > 0,05$); постнатальная доза облучения тимуса и вторичных лимфоидных органов — ранняя стадия апоптоза ($r = -0,01$; $p > 0,05$); постнатальная доза облучения тимуса и вторичных лимфоидных органов — поздняя стадия апоптоза ($r = -0,01$; $p > 0,05$).

Для внутриутробных доз также не обнаружено корреляционных связей с частотой клеток на ранней стадии апоптоза: внутриутробная доза облучения ККМ — ранняя стадия апоптоза ($r = -0,07$; $p > 0,05$); внутриутробная доза облучения тимуса и вторичных лимфоидных органов — ранняя стадия апоптоза ($r = -0,01$;

$p > 0,05$). Однако наблюдается слабая отрицательная корреляция с внутриутробными дозами облучения и поздней стадией апоптоза: внутриутробная доза облучения ККМ — поздняя стадия апоптоза ($r = -0,2$; $p < 0,05$); внутриутробная доза облучения тимуса и вторичных лимфоидных органов — поздняя стадия апоптоза ($r = -0,2$; $p < 0,05$).

Связь однонуклеотидных полиморфизмов с частотой апоптоза

Исследования влияния аллельных вариаций rs4645878, rs2279115, rs28362491, rs664677, rs1042522, rs1801270, rs2279744 генов *BAX*, *BCL2*, *NFkB1*, *ATM*, *TP53*, *CDKN1A*, *MDM2*, на частоту апоптоза проводилось у 330 человек из объединённой группы, в которую входили необлученные лица, облученные *in utero* и облученные только в постнатальном периоде развития. Было установлено, что у носителей доминантного генотипа C/C по аллельной вариации rs4645878 гена *BAX* наблюдается статистически значимое снижение количества клеток на ранней стадии апоптоза, по сравнению с носителями генотипов T/T и T/C. Постнатальные дозы облучения ККМ, а также тимуса и периферических лимфоидных органов у носителей генотипа C/C статистически значимо не отличались от носителей генотипов T/T и T/C (доза облучения ККМ у носителей генотипа C/C — 530 ± 48 мГр (1–2929 мГр), у носителей генотипов T/T и T/C — 355 ± 80 мГр (3–1291 мГр), доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов у носителей генотипа C/C — $74 \pm 7,6$ мГр (0,01–489 мГр), у носителей генотипов T/T и T/C — $27,8 \pm 5,9$ мГр (0,1–90 мГр). Для остальных изученных аллельных вариаций не выявлено связи с показателями апоптотической гибели клеток на ранней стадии апоптоза (табл. 4).

Также не выявлено влияния аллельных вариаций rs4645878, rs2279115, rs28362491, rs664677, rs1042522, rs1801270, rs2279744 на количество клеток, находящихся на поздней стадии апоптоза (табл. 5).

Обсуждение

В результате проведения исследования было установлено, что в отдаленные сроки у лиц, облучение которых началось в период внутриутробного развития и продолжалось в постнатальном периоде, количество клеток на ранней стадии апоптоза статистически значимо выше, по сравнению с лицами, подвергшимися облучению только в постнатальном периоде.

Ранняя стадия апоптоза характеризуется наличием фосфатидилсерина (PS) на внешней поверхности мембраны, что приводит к распознаванию апоптотических клеток фагоцитами [11]. Однако в ряде работ было показано, что клетки с PS на внешней мембране не всегда подвергаются фагоцитозу, такие клетки остаются жизнеспособными и сохраняют нормальную морфологию [12]. Это указывает на то, что PS сам по себе не является сигналом поглощения в процессе реализации апоптоза, большое значение имеет его концентрация, а также образование комплекса с белком [13]. Кроме того, он может принимать участие в других

Таблица 4

Связь однонуклеотидных полиморфизмов с количеством лимфоцитов на ранней стадии апоптоза у облученных лиц
Association of single-nucleotide polymorphisms with the number of lymphocytes at the early stage of apoptosis in irradiated individuals

Ген/ ОНП	Модель	Генотип	Частота апоптоза на ранней стадии	
			Медиана (25–75%)	p
BAX rs4645878	Доминантная	C/C (169) T/T+T/C (20)	5,29 (2,42–9,96) 10,8 (5,42–15,69)	0,002
	Кодоминантная	T/T (1) T/C (20) C/C (169)	14,5 10,1 (5,37–15,86) 5,29 (2,43–9,96)	0,007
BCL2 rs2279115	Доминантная	A/A (78) C/C+C/A (114)	5,59 (2,37–9,93) 5,92 (2,96–10,66)	0,44
	Кодоминантная	C/C (34) C/A (80) A/A (78)	5,61 (2,44–13,09) 5,92 (3,17–10,21) 5,59 (2,37–9,93)	0,74
NFkB rs28362491	Доминантная	ATTG/ATTG (41) Del/Del-Del/ATTG (116)	7,84 (3,11–13,21) 5,32 (2,19–9,09)	0,07
	Кодоминантная	Del/Del (36) Del/ATTG (80) ATTG/ATTG (41)	5,07 (2,71–8,97) 5,32 (2,11–9,24) 7,84 (3,11–13,21)	0,63
ATM rs664677	Рецессивная	T/T (48) C/C+C/T (146)	5,5 (1,7–8,88) 5,87 (2,96–10,99)	0,33
	Кодоминантная	C/C (54) C/T (92) T/T (48)	6,1 (3,21–11,6) 5,47 (2,55–10,21) 5,5 (1,7–8,88)	0,58
TP53 rs1042522	Доминантная	Arg/Arg (89) Pro/Pro+Pro/Arg (105)	5,86 (3,06–10,27) 5,41 (2,15–10,58)	0,53
	Кодоминантная	Pro/Pro (12) Pro/Arg (93) Arg/Arg (89)	9,47 (2,04–14,58) 5,38 (2,15–9,96) 5,86 (3,06–10,27)	0,39
CDKN1A rs1801270	Рецессивная	A/A (6) C/A+C/C (177)	3,72 (2,66–10,04) 5,41 (2,45–10,04)	0,65
	Кодоминантная	C/C (142) C/A (35) A/A (6)	5,56 (2,71–10,15) 4,86 (0,9–8,68) 3,72 (2,66–10,04)	0,42
MDM2 rs2279744	Рецессивная	C/C (27) A/C+C/A (110)	4,71 (2,44–6,82) 5,97 (2,79–11,06)	0,06
	Кодоминантная	A/A (56) A/C (54) C/C (27)	4,83 (2,89–9,8) 6,55 (2,64–12,09) 4,71 (2,44–6,82)	0,12

Таблица 5

Связь однонуклеотидных полиморфизмов с количеством лимфоцитов на поздней стадии апоптоза у облученных лиц
Association of single-nucleotide polymorphisms with the number of lymphocytes at the late stage of apoptosis in irradiated individuals

Ген/ ОНП	Модель	Генотип	Частота апоптоза на ранней стадии	
			Медиана (25–75%)	p
BAX rs4645878	Доминантная	C/C (235) T/T+T/C (33)	0,11 (0,03–0,29) 0,08 (0,025–0,3)	0,74
	Кодоминантная	T/T (3) T/C (30) C/C (235)	0,1 (0,01–1,1) 0,08 (0,03–0,28) 0,1 (0,03–0,29)	0,93
BCL2 rs2279115	Доминантная	A/A (110) C/C+C/A (159)	0,1 (0,02–0,37) 0,1 (0,03–0,240)	0,96
	Кодоминантная	C/C (46) C/A (113) A/A (110)	0,08 (0,02–0,3) 0,1 (0,04–0,22) 0,1 (0,02–0,38)	0,65
NFkB rs28362491	Доминантная	ATTG/ATTG (64) Del/Del-Del/ATTG (161)	0,1 (0,02–0,39) 0,11 (0,03–0,29)	0,78
	Кодоминантная	Del/Del (50) Del/ATTG (111) ATTG/ATTG (64)	0,1 (0,03–0,15) 0,13 (0,03–0,36) 0,1 (0,02–0,39)	0,34
ATM rs664677	Рецессивная	T/T (77) C/C+C/T (193)	0,1 (0,02–0,41) 0,1 (0,03–0,24)	0,92
	Кодоминантная	C/C (67) C/T (125) T/T (77)	0,09 (0,03–0,25) 0,11 (0,03–0,24) 0,1 (0,02–0,41)	0,69
TP53 rs1042522	Доминантная	Arg/Arg (137) Pro/Pro+Pro/Arg (136)	0,1 (0,03–0,36) 0,11 (0,03–0,24)	0,66
	Кодоминантная	Pro/Pro (18) Pro/Arg (118) Arg/Arg (137)	0,1 (0,02–0,24) 0,12 (0,03–0,23) 0,1 (0,03–0,36)	0,67
CDKN1A rs1801270	Рецессивная	A/A (2) C/A+C/C (249)	0,41 (0,08–0,74) 0,11 (0,03–0,34)	0,45
	Кодоминантная	C/C (201) C/A (48) A/A (2)	0,11 (0,03–0,35) 0,11 (0,04–0,32) 0,41 (0,08–0,74)	0,69
MDM2 rs2279744	Рецессивная	C/C (31) A/C+C/A (123)	0,11 (0,03–0,22) 0,09 (0,02–0,24)	0,52
	Кодоминантная	A/A (63) A/C (60) C/C (31)	0,11 (0,03–0,41) 0,09 (0,02–0,18) 0,11 (0,03–0,22)	0,24

физиологических процессах, например экспрессия PS наблюдалась на Т-лимфоцитах после стимуляции рецептора P2X7 молекулой АТФ. Считается, что это играет важную роль в миграции Т-клеток [14]. В целом PS является важным элементом в реализации разнообразных физиологических процессов, в том числе регулируя различные межклеточные взаимодействия [13]. Учитывая вышесказанное, мы не можем однозначно утверждать, что все клетки, экспрессирующие PS, подвергаются апоптотической гибели, поскольку его экспрессия на поверхности мембраны может быть вызвана разнообразными клеточными процессами.

Противоположные результаты наблюдаются при анализе поздней стадии апоптоза. В группе лиц, облученных *in utero*, регистрируется снижение количества

клеток на поздней стадии апоптоза относительно лиц как облученных постнатально, так и необлученных. Стоит заметить, что поздняя стадия апоптоза характеризуется фрагментацией ДНК и является необратимой фазой запрограммированной клеточной гибели [15]. Таким образом, рассматривая раннюю и позднюю стадии апоптоза как единый процесс реализации клеточной гибели, у лиц, облученных *in utero*, мы наблюдаем на ранней стадии активацию апоптотической гибели лимфоцитов, которая, в конечном итоге, у части клеток не завершается.

Следует отметить, что группа лиц, облученных *in utero*, наравне с группой постнатально облученных, также подвергалась постнатальному облучению, но в более низких дозах. Однако именно внутриутробное

облучение модифицирует апоптотическую гибель лимфоцитов в отдаленном периоде. На это указывает тот факт, что в группе лиц, облученных *in utero*, наблюдается слабая отрицательная корреляционная связь внутриутробных доз облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов с количеством клеток на поздней стадии апоптоза. При этом не было выявлено зависимости апоптотической гибели клеток от постнатальных доз облучения. Возможно, наблюдаемый эффект связан с тем, что в период внутриутробного развития облучению подвергались в основном стволовые клетки. Это могло привести к возникновению сублетальных повреждений, которые сохранялись в течение всей жизни в пуле покоящихся стволовых клеток.

Несомненно, ионизирующее излучение способствует активации апоптоза, однако его реализация регулируется геномом, а полиморфные варианты генов могут модифицировать ответ клетки на радиационное воздействие.

Нами было установлено влияние аллельной вариации rs4645878 гена *BAX* на количество лимфоцитов, экспрессирующих PS на поверхности мембраны. В объединенной группе обследованных лиц (необлученные лица, облученные *in utero*, облученные постнатально) у носителей генотипа C/C по аллельной вариации rs4645878 гена *BAX* наблюдается статистически значимое снижение количества клеток на ранней стадии апоптоза по сравнению с носителями генотипов T/T и T/C. При этом постнатальные дозы облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов у носителей разных генотипов были сопоставимы.

Ген *BAX* кодирует проапоптотический белок *baX*, который способствует выходу из митохондрий цитохрома C. В комплексе с белком APAF1 цитохром C при-

нимает участие в активации каспазы 9, запускающей апоптотический каскад. Снижение частоты апоптотической гибели клеток у носителей аллеля C может быть связано с тем, что полиморфизм rs4645878 расположен в 3' UTR некодирующей области (трейлерная последовательность) гена *BAX*. Однонуклеотидные полиморфизмы, локализованные в трейлерной последовательности, могут влиять на фенотип благодаря изменению сайтов связывания микроРНК, нарушая микроРНК-опосредованную репрессию трансляции, или приводить к возникновению нового сайта связывания микроРНК, а также могут вызывать изменение сродства определенных факторов инициации трансляции к их сайтам узнавания [16].

Заключение

Таким образом, в отдаленном периоде у жителей прибрежных сел реки Течи, подвергшихся радиационному воздействию во время внутриутробного развития, наблюдается различия в реализации апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови по сравнению с необлученными лицами и лицами, облученными в постнатальном периоде. Кроме того, в группе лиц, облученных *in utero*, регистрируется корреляционная связь внутриутробных доз облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов с количеством клеток на поздней стадии апоптоза.

Полиморфные варианты генов, регулирующих апоптоз, могут модифицировать ответ лимфоцитов крови на воздействие радиации в широком диапазоне доз на ККМ. Однако следует учитывать, что численность обследованных лиц по изученным полиморфным участкам была небольшой и полученные результаты являются предварительными и требуют дальнейшей проверки с увеличением объема выборки.

Apoptosis of Lymphocytes and Polymorphisms of Apoptosis Regulation Genes in Individuals Exposed to Chronic Radiation Exposure

E.A. Blinova^{1,2}, A.I. Kotikova¹, M.A. Yanishevskaya^{1,2}, A.V. Akleyev^{1,2}

¹ Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia

² Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

E-mail: blinova@urcrm.ru

ABSTRACT

Purpose: Study the apoptotic death of peripheral blood lymphocytes in long-term period in persons exposed to chronic radiation exposure, and analysis of association of the polymorphic regions rs4645878, rs2279115, rs28362491, rs664677, rs1042522, rs1801270, rs2279744 of the *BAX*, *BCL2*, *NFkB*, *ATM*, *TP53*, *CDKN1A*, *MDM2* genes with apoptotic lymphocytes frequency in residents of the coastal villages of the Techa River.

Material and methods: The study of apoptosis and genotyping was conducted in 390 persons exposed to chronic radiation exposure as a result of Mayak PA radioactive waste releases into the Techa–Isset–Tobol river system. The early stage of apoptosis was assessed on a flow cytometer by the presence of phosphatidylserine on the surface of the cell membranes using the Annexin V Apoptosis Detection Kit I and the late stage of apoptosis using the TUNEL method. Real-time PCR genotyping was performed of allelic variations of rs4645878, rs2279115, rs28362491, rs664677, rs1042522, rs1801270, rs2279744 of *BAX*, *BCL2*, *NFkB*, *ATM*, *TP53*, *CDKN1A*, *MDM2* genes in a group of irradiated individuals.

Results: The number of cells at the early stage of apoptosis is statistically significantly increased in individuals whose irradiation began during the period of intrauterine development and continued in the postnatal period compared to individuals exposed only in the postnatal period. At the same time, the number of lymphocytes at the stage of DNA fragmentation in the group irradiated *in utero* is lower than in the group irradiated postnatally and non-irradiated individuals. Also, a weak negative correlation between intrauterine doses of RBM irradiation and the doses of thymus and peripheral lymphoid organs with the

number of cells in the late stage of apoptosis in individuals irradiated *in utero*. The influence of allelic variation rs4645878 of the *BAX* gene was established on the number of lymphocytes at the early stage of apoptosis in residents of coastal villages of the Tcha River. A statistically significant decrease in the number of cells at an early stage of apoptosis is observed in C/C genotype carriers according to the allelic variation rs4645878 of the *BAX* gene compared with carriers of the T/T and T/C genotypes.

Conclusion: Residents of coastal villages of the Tcha River exposed to radiation during the period of prenatal development, there are differences in the frequency of apoptotic death of peripheral blood lymphocytes compared with non-irradiated persons and persons who were irradiated in the postnatal period. SNPs of apoptosis-regulating genes can modify the response of blood lymphocytes to radiation in a wide range of doses RBM.

Key words: *lymphocytes, apoptosis, single-nucleotide polymorphism, chronic irradiation*

For citation: Blinova EA, Kotikova AI, Yanishevskaya MA, Akleyev AV. Apoptosis of Lymphocytes and Polymorphisms of Apoptosis Regulation Genes in Individuals Exposed to Chronic Radiation Exposure. Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(4):36-42 (In Russ.).

DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-4-36-42

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Zhou L, Yuan R, Lanata S. Molecular mechanisms of irradiation-induced apoptosis. *Front Biosci*. 2003;8:9-19.
1. Schmitz A, Bayer J, Dechamps N, Goldin L, Thomas G. Heritability of susceptibility to ionizing radiation induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;68(4):1169-77.
2. Белушкина НН, Хомякова ТН, Хомяков Ю.Н. Заболевания, связанные с нарушением регуляции программируемой клеточной гибели. Молекулярная медицина. 2012;2:3-10. [Belushkina N N, Khomyakova T I, Khomyakov Yu N. Diseases associated with dysregulation of programmed cell death. *Molecular Medicine*. 2012;2:3-10. (In Russ.)].
3. Донов ПН, Уржумов ПВ, Блинова ЕА, Аклеев АВ. Связь полиморфизмов генов цитокинов, оксидативного стресса, клеточного цикла и репарации с хромосомными aberrациями у лиц, подвергшихся радиационному воздействию на реке Теча. Вопросы радиационной безопасности. 2014;3(75):61-8 [Donov PN, Urzhumov PV, Blinova EA, Akleyev AV. The Link Between Polymorphisms in Genes of Cytokines, Oxidative Response, Cell Cycle and Reparation, and Chromosome Aberrations in People Exposed to Chronic Radiation Exposure on the Tcha River. *Issues of Radiation Safety*. 2014;3(75):61-8 (In Russ.)].
4. Халюзова МВ, Литвяков НВ, Исубакова ДС. и др. Валидация связи геномного полиморфизма с повышенной частотой хромосомных aberrаций у работников радиационного производства. Радиационная биология. Радиоэкология. 2017;57(4):365-83. [Khalyuzova MV, Litviakov NV, Isubakova DS, Bronikovskaya EV, Usova TV, Albakh EN, et al. Validation of the Association between Gene Polymorphisms and the Frequency of Cytogenetic Abnormalities in the Cohort of Employees of Radiation Facilities. *Radiation Biology. Radioecology*. 2017;57(4):365-83. (In Russ.)].
5. Matsuura S, Royaba E, Akutsu SN, Yanagihara H, Ochiai Y, Kudo Y, et al. Analysis of individual differences in radiosensitivity using genome editing. *Annals of the ICRP* 45. 2016:290-6.
6. ICRP Proceedings. 2015, AGIR, 2013. Human Radiosensitivity. Report of the Independent Advisory Group on Ionising Radiation. Doc. HPA, RCE-21. Health Protection Agency.
7. Дегтева МО, Напье БА, Толстых ЕИ, Шишкина ЕА, Бугров НГ, Крестинина ЛЮ, Аклеев АВ. Распределение индивидуальных доз в когорте людей, облученных в результате радиоактивного загрязнения реки Течи. Мед. радиол. и радиац. безопасность. 2019;64(3):46-53. [Degteva MO, Napier BA, Tolstykh EI, Shishkina EA, Bougrov NG, Krestinina LYU, Akleyev AV. Individual dose distribution in cohort of people exposed as a result of radioactive contamination of the Tcha River. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2019;64(3):46-53. (In Russ.)].
8. Санитарные правила и нормативы СанПиН 2.6.1.2523-09. Нормы радиационной безопасности НРБ-99/2009. п. 3.1.4. [Sanitary rules and regulations SanPiN 2.6.1.2523-09. Radiation Safety Standards NRB-99/2009. Paragraph 3.1. (In Russ.)].
9. Single-nucleotide polymorphism database (SNP). URL: www.snpedia.com. Date of request: 28.05.2020.
10. Vermes I. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184(1):39-51.
11. Segawa K, Suzuki J, Nagata S. Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:19246-51.
12. Bevers EM, Williamson PL. Getting to the Outer Leaflet: Physiology of Phosphatidylserine Exposure at the Plasma Membrane. *Physiol Rev*. 2016;96(2):605-45. DOI: 10.1152/physrev.00020.2015.
13. Elliott MR, Ravichandran KS. Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol*. 2010;189:1059-70.
14. Crowley LC. Detection of DNA Fragmentation in Apoptotic Cells by TUNEL. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;10. DOI: 10.1101/pdb.prot087221.
15. Robert F, Pelletier J. Exploring the Impact of Single-Nucleotide Polymorphisms on Translation. *Frontiers in Genetics*. 2018;9:507. DOI: 10.3389/fgene.2018.00507.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Financing. The study had no sponsorship.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Поступила: 14.08.2020. **Принята к публикации:** 21.08.2020.

Article received: 14.08.2020. **Accepted for publication:** 21.08.2020.

Information about the authors:

Blinova E.A. <https://orcid.org/0000-0002-2567-7945>

Kotikova A.I. <https://orcid.org/0000-0002-1695-1340>

Yanishevskaya M. A. <https://orcid.org/0000-0002-2649-5123>

Akleyev A.V. <https://orcid.org/0000-0003-2583-5808>