

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Транскрипционная активность генов репарации, апоптоза и клеточного цикла (*TP53*, *MDM2*, *ATM*, *BAX*, *BCL-2*, *CDKN1A*, *OGG1*, *XPC*, *PADI4*, *MAPK8*, *NF-KB1*, *STAT3*, *GATA3*) у хронически облученных людей с различной интенсивностью апоптоза лимфоцитов периферической крови

В.С. Никифоров^{1,2}✉, Е.А. Блинова^{1,2}, А.И. Котикова^{1,2}, А.В. Аклеев^{1,2}

¹ Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства России, Челябинск, Россия

² Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

✉ nikiforovx@mail.ru

Аннотация. Исследовали транскрипционную активность генов, вовлеченных в поддержание генетического гомеостаза клетки (репарации, клеточного цикла и апоптоза: *TP53*, *MDM2*, *ATM*, *BAX*, *BCL-2*, *CDKN1A*, *OGG1*, *XPC*, *PADI4*, *MAPK8*, *NF-KB1*, *STAT3*, *GATA3*), у лиц, подвергшихся хроническому радиационному облучению, с повышенной интенсивностью раннего, позднего апоптоза и некроза лимфоцитов периферической крови. Объектом изучения служили мононуклеарные клетки периферической крови, полученные от 132 жителей прибрежных сел реки Течи, подвергшихся хроническому облучению. Доза облучения красного костного мозга составляла 426.4 ± 48.2 мГр (1.3–2930.0 мГр), доза облучения тимуса и периферических органов иммунной системы – 58.9 ± 7.9 мГр (0.1–489.0 мГр). Исследование проводили в отдаленные сроки (более 60 лет с начала облучения), возраст людей на время проведения обследования был 68 ± 0.6 года (55–86 лет). Анализ апоптотической и некротической гибели лимфоцитов периферической крови основывался на наличии на поверхности мембраны клеток фосфолипида фосфатидилсерина, а также ее проницаемости для интеркалирующего ДНК-красителя. Оценку относительного содержания мРНК генов репарации, клеточного цикла и апоптоза проводили с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени. В группе хронически облученных людей с повышенной интенсивностью раннего апоптоза отмечено увеличение относительного содержания мРНК гена *PADI4* ($p = 0.006$). Для хронически облученных людей с повышенной интенсивностью позднего апоптоза зафиксирована модуляция относительного содержания мРНК генов *TP53* ($p = 0.013$) и *BCL-2* ($p = 0.021$). В отдаленные сроки у хронически облученных людей с повышенной интенсивностью некроза лимфоцитов периферической крови отмечен статистически значимый рост транскрипционной активности гена *TP53* ($p = 0.015$). Установлено, что у облученных людей с повышенной интенсивностью апоптоза регистрируются в первую очередь изменения со стороны транскрипционной активности апоптотических генов, что согласуется с существующими представлениями об активации программированной гибели клеток.

Ключевые слова: мРНК; апоптоз; некроз; лимфоциты; хроническое облучение.

Для цитирования: Никифоров В.С., Блинова Е.А., Котикова А.И., Аклеев А.В. Транскрипционная активность генов репарации, апоптоза и клеточного цикла (*TP53*, *MDM2*, *ATM*, *BAX*, *BCL-2*, *CDKN1A*, *OGG1*, *XPC*, *PADI4*, *MAPK8*, *NF-KB1*, *STAT3*, *GATA3*) у хронически облученных людей с различной интенсивностью апоптоза лимфоцитов периферической крови. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(1):50-58. DOI 10.18699/VJGB-22-08

Transcriptional activity of repair, apoptosis and cell cycle genes (*TP53*, *MDM2*, *ATM*, *BAX*, *BCL-2*, *CDKN1A*, *OGG1*, *XPC*, *PADI4*, *MAPK8*, *NF-KB1*, *STAT3*, *GATA3*) in chronically exposed persons with different intensity of apoptosis of peripheral blood lymphocytes

V.S. Nikiforov^{1,2}✉, E.A. Blinova^{1,2}, A.I. Kotikova^{1,2}, A.V. Akleyev^{1,2}

¹ Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia

² Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

✉ nikiforovx@mail.ru

Abstract. Transcriptional activity of genes involved in maintaining genetic homeostasis (genes for repair, cell cycle and apoptosis: *TP53*, *MDM2*, *ATM*, *BAX*, *BCL-2*, *CDKN1A*, *OGG1*, *XPC*, *PADI4*, *MAPK8*, *NF-KB1*, *STAT3*, *GATA3*) was studied in chronically exposed persons with an increased intensity of early and late stages of apoptosis and necrosis of

peripheral blood lymphocytes. The object of this study was peripheral blood mononuclear cells obtained from 132 chronically exposed residents of the Techa riverside villages. The mean accumulated dose to red bone marrow was 426.4 ± 48.2 mGy (1.3–2930.0 mGy), to thymus and peripheral immune organs, 58.9 ± 7.9 mGy (0.1–489.0 mGy). The study was performed more than 60 years after the onset of exposure, the average age of exposed persons was 68 ± 0.6 years (55–86 years). The study of apoptotic and necrotic death of peripheral blood lymphocytes was based on the presence of phosphatidylserine on the cell membrane surface, as well as on its permeability for DNA-intercalating dye. Evaluation of the relative content of mRNA genes for repair, cell cycle, and apoptosis was carried out using real-time PCR. An increased relative content of *PADI4* gene mRNA was registered in the group of chronically exposed persons with the increased intensity of early apoptosis ($p = 0.006$). Modulation of the relative content of mRNA of the *TP53* ($p = 0.013$) and *BCL-2* ($p = 0.021$) genes was detected in the group of chronically exposed individuals with the increased intensity of the late stage of apoptosis. A statistically significant increase in the transcriptional activity of the *TP53* gene was observed in the group of chronically exposed persons with the increased intensity of peripheral blood lymphocyte necrosis in the long-term period ($p = 0.015$). In the course of the study it was noted that exposed people with increased intensity of apoptosis, first of all, demonstrate changes in the transcriptional activity of apoptotic genes. These data are consistent with current views on the activation of programmed cell death.

Key words: mRNA; apoptosis; necrosis; lymphocytes; chronic exposure.

For citation: Nikiforov V.S., Blinova E.A., Kotikova A.I., Akleyev A.V. Transcriptional activity of repair, apoptosis and cell cycle genes (*TP53*, *MDM2*, *ATM*, *BAX*, *BCL-2*, *CDKN1A*, *OGG1*, *XPC*, *PADI4*, *MAPK8*, *NF-KB1*, *STAT3*, *GATA3*) in chronically exposed persons with different intensity of apoptosis of peripheral blood lymphocytes. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1):50-58. DOI 10.18699/VJGB-22-08

Введение

Ионизирующее излучение – фактор, способный приводить к изменению транскрипционной активности генов, выполняющих ключевую роль в поддержании стабильности клеточного гомеостаза (Kabacik et al., 2011). Сложные молекулярные ответы на генотоксический стресс запускают множество регуляторных механизмов, включая апоптоз (Zeegers et al., 2017).

Процесс апоптоза играет важную роль в реализации как ранних, так и отдаленных эффектов действия ионизирующего излучения (Verheij, Bartelink, 2000). Его активация начинается с изменения экспрессии генов, регулирующих процессы репарации повреждений ДНК, контроля клеточного цикла, пролиферации и дифференцировки клеток и др. (Verheij, Bartelink, 2000). По мере реализации клеточной гибели разворачивается генетическая программа, регулирующая баланс внутриклеточных про- и антиапоптозных факторов. На ранней стадии апоптоза на внешней поверхности мембраны начинает экспрессироваться фосфатидилсерин, однако его наличие не является обязательным условием успешной реализации клеточной гибели, большое значение имеют его концентрация и образование комплекса с другими белками, что служит сигналом к распознаванию апоптотических клеток фагоцитами (Bevers, Williamson, 2016).

Важную роль в активации сигнального каскада, запускающего апоптотическую гибель клеток, играет белок p53, который регулирует апоптотические гены, кодирующие белки клеточной мембраны (CD95, DR5), белки цитоплазмы и белки, локализованные на мембране митохондрий (белки семейства BCL-2) (Chiruk, 2006). Кроме того, соотношение белков BAX/BCL-2 обуславливает реализацию апоптотической гибели клеток. Показано, что при ионизирующем излучении инициация апоптоза происходит на фоне ранней репрессии гена *BAX* и повышения активности *BCL-2* в клетках крови человека (Azimian et al., 2015).

В физиологических условиях поддерживается строгое равновесие про- и антиапоптотических белков, однако

после радиационного воздействия, а также при наличии различных патологических состояний наблюдается смещение этого баланса, обусловленное изменением экспрессии генов, принимающих участие в апоптозе. В связи с этим изучение транскрипционной активности генов, контролирующих пролиферацию и гибель клеток, – актуальная задача радиационной биологии, поскольку нарушения процесса апоптоза способствуют развитию патологических состояний, которые могут сопровождаться сохранением в облученном организме клеток с неограниченным пролиферативным потенциалом (Барышников, Шишкин, 2002) или развитием цитопенических состояний, связанных с повышенной гибелью клеток (Квачева, 2000).

В ранее проведенных исследованиях у хронически облученных жителей прибрежных сел реки Течи зарегистрированы изменения интенсивности апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови в отдаленные сроки (Блинова и др., 2020а). Кроме того, показано изменение транскрипционной активности со стороны апоптотических генов, которое сопровождалось снижением относительного содержания мРНК гена *BCL-2* и увеличением относительного содержания мРНК гена *BAX* у облученных лиц спустя более 60 лет после начала хронического радиационного воздействия (Никифоров и др., 2020).

Следующий этап работы – исследование относительного содержания мРНК генов, вовлеченных в клеточный гомеостаз, у жителей прибрежных сел р. Течи, которые отличаются нарушением механизма элиминации клеток, а именно повышенной интенсивностью апоптотической и некротической гибели клеток.

В связи с этим целью исследования заключалась в количественной оценке содержания мРНК генов *TP53*, *MDM2*, *ATM*, *BAX*, *BCL-2*, *CDKN1A*, *OGG1*, *XPC*, *PADI4*, *MAPK8*, *NF-KB1*, *STAT3* и *GATA3* в отдаленные сроки у хронически облученных жителей прибрежных сел р. Течи, имеющих повышенную частоту лимфоцитов периферической крови (ЛПК), находящихся на разных стадиях апоптоза и некроза.

Материалы и методы

Объектом исследования служили ЛПК 132 жителей прибрежных сел р. Течи, подвергшиеся хроническому радиационному воздействию в 1949–1950 гг. (Последствия..., 2016). Средняя накопленная доза облучения красного костного мозга всех обследованных людей составила 426.4 ± 48.2 мГр (1.3–2930.0 мГр), средняя накопленная доза облучения тимуса и периферических органов иммунной системы была 58.9 ± 7.9 мГр (0.1–489.0 мГр). Средний возраст людей на время проведения обследования составлял 68 ± 0.6 года (55–86 лет).

Облученные лица были условно разделены по принципу превышения критического значения интенсивности апоптоза и некроза ЛПК, которая была рассчитана по формуле (1), в контрольной группе лиц, не подвергавшихся аварийному радиационному воздействию (контрольная группа составила 32 человека, проживающих в сходных социально-экономических условиях, но не подвергавшихся хроническому радиационному воздействию). Средний возраст на момент обследования составил 67 ± 1.25 года (57–81 год).

$$\text{Интенсивность апоптоза} = \frac{\sum x}{n} + 2\sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}, \quad (1)$$

где $\frac{\sum x}{n}$ – среднее значение частоты апоптоза/некроза ЛПК;
 $\sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$ – стандартное отклонение.

Среднее значение частоты клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза в группе необлученных людей, составило 3.04, стандартное отклонение – 4.52. Среднее значение частоты клеток, находящихся на поздней стадии апоптоза в группе сравнения, было 0.03, стандартное отклонение – 0.06. Среднее значение частоты клеток, находящихся на стадии некроза в группе сравнения, было 0.02, стандартное отклонение – 0.04. Таким образом, критическое значение частоты клеток для раннего апоптоза составило 12.08, для позднего апоптоза – 0.15 и для некроза – 0.1. Облученные лица, у которых частоты клеток на

разных этапах апоптотической гибели превышали критические значения, попадали в группы людей с повышенной частотой апоптоза/некроза лимфоцитов периферической крови (табл. 1).

Кровь для исследования апоптотической/некротической гибели ЛПК брали из локтевой вены в объеме 6 мл в пробирки типа Vacuette с Li-гепарином (Improvacuter, Китай). Исследование проводили на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США) с использованием набора реагентов Annexin V FITC (BD, Франция). Выделение лейкоцитарной фракции из цельной крови проходило на градиенте плотности фиколл-урографина (плотность $1077\text{--}1078$ г/см³) в соответствии со стандартной методикой (Хейфец, Абалакин, 1973). К клеточной суспензии добавляли рекомбинантный человеческий Annexin-V, конъюгированный с FITC, и ДНК-связывающий краситель PI. В ходе анализа были выделены популяции клеток на ранней и поздней стадиях апоптоза, а также на стадии некроза. Данные в виде процентного соотношения клеток, вступивших на ту или иную стадию апоптоза и некроза, представлены в табл. 1.

Для оценки относительного содержания мРНК кровь брали из локтевой вены в объеме 3 мл в стерильные вакуумные пробирки Tempus Blood RNA Collection Tubes (Applied Biosystem, США). Выделение РНК осуществляли колоночным методом при помощи набора Tempus Spin RNA Isolation Kit (Applied Biosystem). Информацию о концентрации и чистоте выделенных образцов РНК получали с применением спектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США). Чистоту препарата оценивали по значениям поглощения на длинах волн 260 и 280 нм (A260/280). Отношение оптических плотностей, измеренных при A260/280 для очищенной РНК, выделенной из всех образцов крови, составило 2.1 ± 0.02 . Выход общей РНК был от 50 до 90 мкг/мл. Реакцию обратной транскрипции для синтеза кДНК проводили с использованием коммерческого набора реагентов High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem). Относитель-

Таблица 1. Характеристика обследованных людей

Группы хронически облученных людей с различной интенсивностью апоптоза и некроза		Кол-во человек	Частота апоптотических клеток, % M ± SD	Возраст на момент проведения обследования, лет M ± SD	Накопленная доза облучения ККМ, мГр M ± SE	Накопленная доза облучения тимуса и периферических органов иммунной системы, мГр
Ранний апоптоз	Нормальная интенсивность	104	5.69 ± 2.46 (0.1–11.75)	68.19 ± 0.6 (55–86)	427.6 ± 58.1 (1.3–2930.0)	62.7 ± 9.65 (0.15–489.0)
	Повышенная интенсивность	26	17.17 ± 4.25 (13.09–30.45)	67.69 ± 1.3 (58–85)	415.5 ± 75.4 (10.4–1226.3)	41.3 ± 10.5 (0.74–252.2)
Поздний апоптоз	Нормальная интенсивность	88	0.05 ± 0.04 (0–0.14)	68.00 ± 0.7 (56–86)	380.2 ± 47.3 (2.13–187.1)	52.9 ± 8.1 (0.15–456.2)
	Повышенная интенсивность	43	0.67 ± 0.75 (0.15–3.66)	68.61 ± 0.9 (55–82)	523.1 ± 109.6 (1.3–2930.0)	70.7 ± 17.7 (0.18–489.0)
Некроз	Нормальная интенсивность	106	0.02 ± 0.02 (0–0.09)	67.91 ± 0.6 (56–86)	395.4 ± 50.5 (1.3–2870.5)	59.5 ± 9.26 (0.2 – 489.0)
	Повышенная интенсивность	26	0.31 ± 0.36 (0.1–1.86)	69.31 ± 1.4 (55–82)	548.5 ± 130.4 (2.1–2930.0)	56.9 ± 14.5 (0.2–300.2)

Таблица 2. Относительное содержание мРНК (отн. ед.) генов в группах обследованных лиц с разной интенсивностью раннего апоптоза ЛПК ($M \pm SE$; min–max)

Ген	Облученные лица с частотой апоптоза ЛПК на ранней стадии		<i>p</i>
	нормальная, <i>N</i> = 106	повышенная, <i>N</i> = 26	
<i>TP53</i>	1.15 ± 0.04 (0.31–2.55)	1.05 ± 0.05 (0.59–1.46)	0.523
<i>MDM2</i>	1.06 ± 0.05 (0.37–2.27)	1.08 ± 0.08 (0.39–2.22)	0.629
<i>BCL-2</i>	1.06 ± 0.05 (0.28–2.48)	0.90 ± 0.08 (0.23–2.01)	0.106
<i>OGG1</i>	0.98 ± 0.03 (0.34–2.00)	0.94 ± 0.07 (0.42–1.69)	0.460
<i>ATM</i>	0.99 ± 0.02 (0.55–1.83)	1.00 ± 0.06 (0.32–1.67)	0.441
<i>BAX</i>	1.12 ± 0.03 (0.40–1.81)	1.17 ± 0.07 (0.61–1.96)	0.438
<i>XPC</i>	1.07 ± 0.02 (0.68–1.73)	1.10 ± 0.05 (0.70–1.66)	0.693
<i>CDKN1A</i>	0.99 ± 0.05 (0.43–1.51)	0.98 ± 0.05 (0.48–1.45)	0.756
<i>STAT3</i>	1.05 ± 0.06 (0.21–2.71)	1.08 ± 0.13 (0.28–2.60)	0.919
<i>GATA3</i>	1.05 ± 0.07 (0.27–2.82)	1.03 ± 0.10 (0.39–2.50)	0.664
<i>MAPK8</i>	1.17 ± 0.07 (0.26–2.85)	1.14 ± 0.13 (0.32–2.07)	0.864
<i>NF-KB1</i>	0.99 ± 0.07 (0.22–2.88)	0.94 ± 0.12 (0.32–2.39)	0.610
<i>PADI4</i>	0.93 ± 0.07 (0.18–2.79)	1.37 ± 0.14 (0.30–2.51)	0.006

ное количественное содержание мРНК определяли с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием амплификатора CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, США).

Определение относительного количества мРНК в исследуемых образцах выполняли $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -методом. Данные оценивали относительно уровня мРНК генов домашнего хозяйства *COMT* и *B2M* и усредненных значений группы сравнения. Анализ кривых амплификации осуществляли в программе Bio-Rad CFX Manager 2.1 (Bio-Rad Laboratories) методом пороговой линии. Расчет делали с учетом трех повторов для каждого гена и эффективности амплификации, полученной путем построения калибровочных кривых. Олигонуклеотидная последовательность праймеров, температурные условия ПЦР-РВ взяты из зарубежных работ и адаптированы к нашим экспериментам. Характеристика праймеров детально описана в работах (Блинова и др., 2020б; Никифоров и др., 2020).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов программ Statistica 10.0 и SigmaPlot. Проверку выборок на нормальность распределения данных осуществляли с применением критерия Колмогорова–Смирнова. Поскольку многие из исследованных показателей не имели нормального распределения, для сравнения групп использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни и H-критерий Краскела–Уоллиса. Результаты представлены в виде среднего значения, ошибки среднего значения и диапазона данных (*M*; min–max) в табл. 2–4.

С целью выявления зависимостей изменения относительного содержания мРНК исследуемых генов от радиационных факторов (дозы облучения красного костного мозга (ККМ), тимуса и периферических органов иммунной системы) использовали корреляционно-регрессионный анализ, который был проведен без учета измерений, выделяющихся из общей выборки (выбросов). Для исключения ошибки формулировки гипотезы уровень значимости брали $p \leq 0.05$ с учетом поправки на множественные сравнения.

Результаты

Транскрипционная активность генов у хронически облученных людей с повышенной интенсивностью раннего апоптоза

В рамках исследования зафиксировано статистически значимое увеличение (в 1.5 раза) относительного содержания мРНК гена *PADI4* в группе облученных людей с повышенной интенсивностью раннего апоптоза ЛПК по сравнению с облученными людьми, имеющими нормальную интенсивность раннего апоптоза ЛПК (см. табл. 2).

Увеличение относительного содержания мРНК гена *PADI4* обусловлено смещением медианных данных в область высоких значений в группе хронически облученных лиц с повышенной интенсивностью раннего апоптоза ЛПК, а не изменением транскрипционной активности этого гена у отдельных облученных людей (рис. 1).

Проверка связи относительного содержания мРНК с дозовыми характеристиками (накопленной дозой облучения ККМ и накопленной дозой облучения тимуса и периферических органов иммунной системы) в группе облученных людей с повышенной интенсивностью раннего апоптоза не выявила статистически значимых зависимостей.

Транскрипционная активность генов у хронически облученных людей с повышенной интенсивностью позднего апоптоза

При исследовании поздней стадии апоптоза показано, что у хронически облученных людей с повышенной интенсивностью позднего апоптоза наблюдается статистически значимое увеличение содержания мРНК генов *TP53* и *BCL-2* по сравнению с облученными лицами, имеющими нормальную частоту ЛПК на поздней стадии апоптоза (см. табл. 3). Распределение данных продемонстрировано на рис. 2.

В результате корреляционного анализа у хронически облученных лиц с повышенной частотой ЛПК на поздней стадии апоптоза зафиксированы отрицательные корреляционные связи относительного содержания мРНК генов

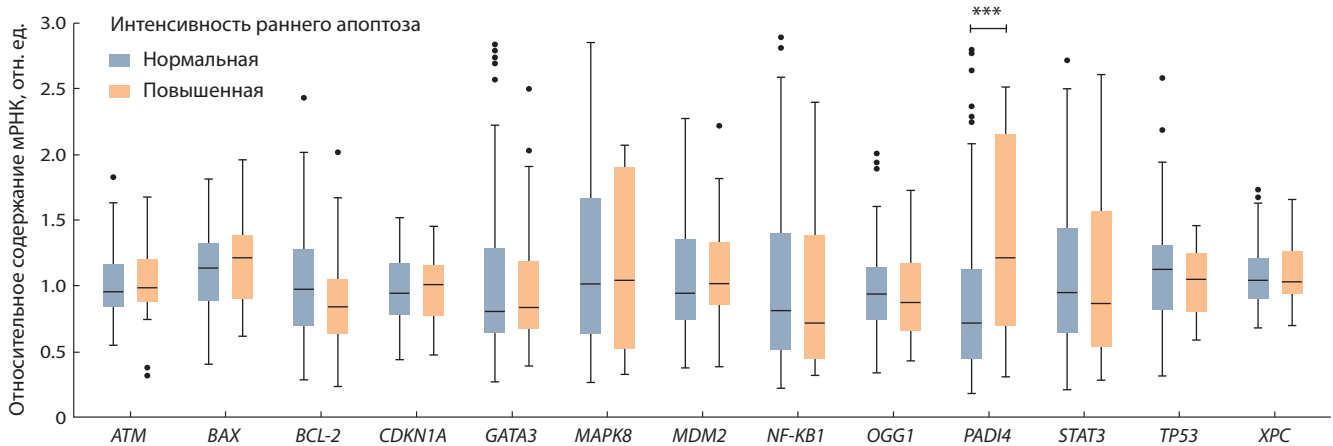


Рис. 1. Распределение относительного содержания мРНК исследуемых генов у хронически облученных людей с нормальной и повышенной интенсивностью раннего апоптоза ЛПК.

Здесь и на рис. 2 и 4 данные представлены в виде медианы (25 и 75-й процентиля) и диапазона (min–max); *** отличия между группами статистически значимы ($p < 0.05$).

Таблица 3. Относительное содержание мРНК (отн. ед.) генов в группах обследованных лиц с разной интенсивностью позднего апоптоза ЛПК (Me; Q1–Q3)

Ген	Облученные лица с частотой апоптоза ЛПК на поздней стадии		p
	нормальная, $N = 89$	повышенная, $N = 43$	
<i>MDM2</i>	1.01 ± 0.04 (0.37–2.27)	1.18 ± 0.09 (0.37–2.23)	0.140
<i>BCL-2</i>	0.94 ± 0.04 (0.23–2.01)	1.19 ± 0.09 (0.28–2.29)	0.021
<i>OGG1</i>	0.95 ± 0.03 (0.33–1.90)	1.02 ± 0.06 (0.53–2.00)	0.405
<i>ATM</i>	0.98 ± 0.03 (0.32–1.67)	1.02 ± 0.04 (0.58–1.82)	0.700
<i>BAX</i>	1.13 ± 0.03 (0.40–1.96)	1.14 ± 0.05 (0.59–1.81)	0.912
<i>XPC</i>	1.08 ± 0.03 (0.68–1.73)	1.08 ± 0.03 (0.74–1.51)	0.679
<i>CDKN1A</i>	0.95 ± 0.02 (0.43–1.51)	1.07 ± 0.12 (0.53–1.50)	0.940
<i>STAT3</i>	1.08 ± 0.07 (0.22–2.71)	0.99 ± 0.09 (0.21–2.17)	0.559
<i>GATA3</i>	1.06 ± 0.07 (0.27–2.83)	1.04 ± 0.11 (0.27–2.73)	0.902
<i>MAPK8</i>	1.13 ± 0.07 (0.29–2.84)	1.22 ± 0.13 (0.26–2.55)	0.699
<i>NF-KB1</i>	1.02 ± 0.07 (0.24–2.80)	0.95 ± 0.12 (0.22–2.89)	0.699
<i>PADI4</i>	1.06 ± 0.08 (0.18–2.77)	0.94 ± 0.12 (0.23–2.79)	0.345

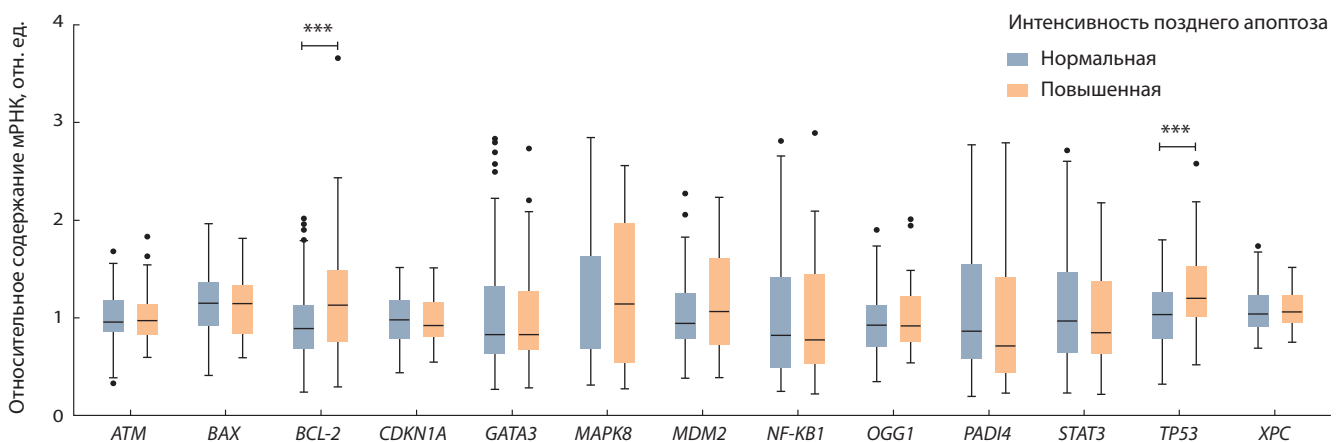


Рис. 2. Распределение относительного содержания мРНК исследуемых генов у хронически облученных людей с нормальной и повышенной интенсивностью позднего апоптоза ЛПК.

BCL-2 ($r = -0.6; p = 0.001$) и *ATM* ($r = -0.4; p = 0.02$) от дозы облучения ККМ. Дополнительно для гена *BCL-2* ($r = -0.4; p = 0.002$) отмечена отрицательная корреляционная связь содержания мРНК от величины дозы облучения тимуса и периферических органов иммунной системы. Полученные зависимости исследованы методом линейного регрессионного анализа (рис. 3).

Транскрипционная активность генов у хронически облученных людей с повышенной интенсивностью некроза

Статистически значимые различия между группами облученных людей с различной интенсивностью некроза ЛПК были показаны только для гена *TP53*. Так, у хронически облученных людей, имеющих повышенную интенсивность некроза ЛПК, отмечено увеличение относительного содержания мРНК гена *TP53* (почти в 1.5 раза) по сравнению с хронически облученными лицами, имеющими нормальную частоту ЛПК, вышедших в некроз (см. табл. 4). Распределение данных продемонстрировано на рис. 4.

В группе облученных людей с повышенной частотой ЛПК на стадии некроза зарегистрированы отрицательные корреляционные связи относительного содержания мРНК генов *BCL-2* ($r = -0.47; p = 0.02$) и *ATM* ($r = -0.6; p = 0.001$) от дозы облучения ККМ. Результаты линейного регрессионного анализа не позволили отметить достоверную зависимость изменения количества мРНК гена *BCL-2* от величины накопленной дозы облучения ККМ ($p = 0.13$), в то время как для гена *ATM* была показана статистически значимая отрицательная линейная зависимость содержания мРНК от дозы облучения ККМ в группе хронически облученных лиц, имеющих повышенную интенсивность некроза ЛПК (рис. 5).

Проверка связи относительного содержания мРНК с интенсивностью некротической гибели клеток выявила отрицательную корреляцию для гена *MAPK8* ($r = -0.62; p = 0.01$) у облученных людей, имеющих повышенную частоту ЛПК, вышедших в некроз.

Обсуждение

Проведенное исследование показало, что у хронически облученных людей с повышенной частотой ЛПК на ранней стадии апоптоза наблюдается увеличение содержания мРНК гена *PADI4* по сравнению с облученными людьми, имеющими нормальную интенсивность раннего апоптоза. Белок *PADI4* является Ca^{2+} -зависимым ферментом, который катализирует цитруллинирование белка в присутствии Ca^{2+} (Rogers et al., 1977). В частности, *PADI4* может опосредовать цитруллинирование гистонов H3 на промоторах генов-мишеней p53, таких как *CDKN1A*, *BAX*, *BCL-2* и др., а также связываться с C-концевым регуляторным доменом белка p53, что является причиной репрессии его активности (Tanikawa et al., 2012). В связи с этим можно предположить, что белок *PADI4* – важный медиатор сигнального пути p53, способный приводить к активации апоптоза.

В группе облученных людей с повышенной интенсивностью апоптотической гибели ЛПК на поздней стадии наблюдается модификация транскрипционной активности

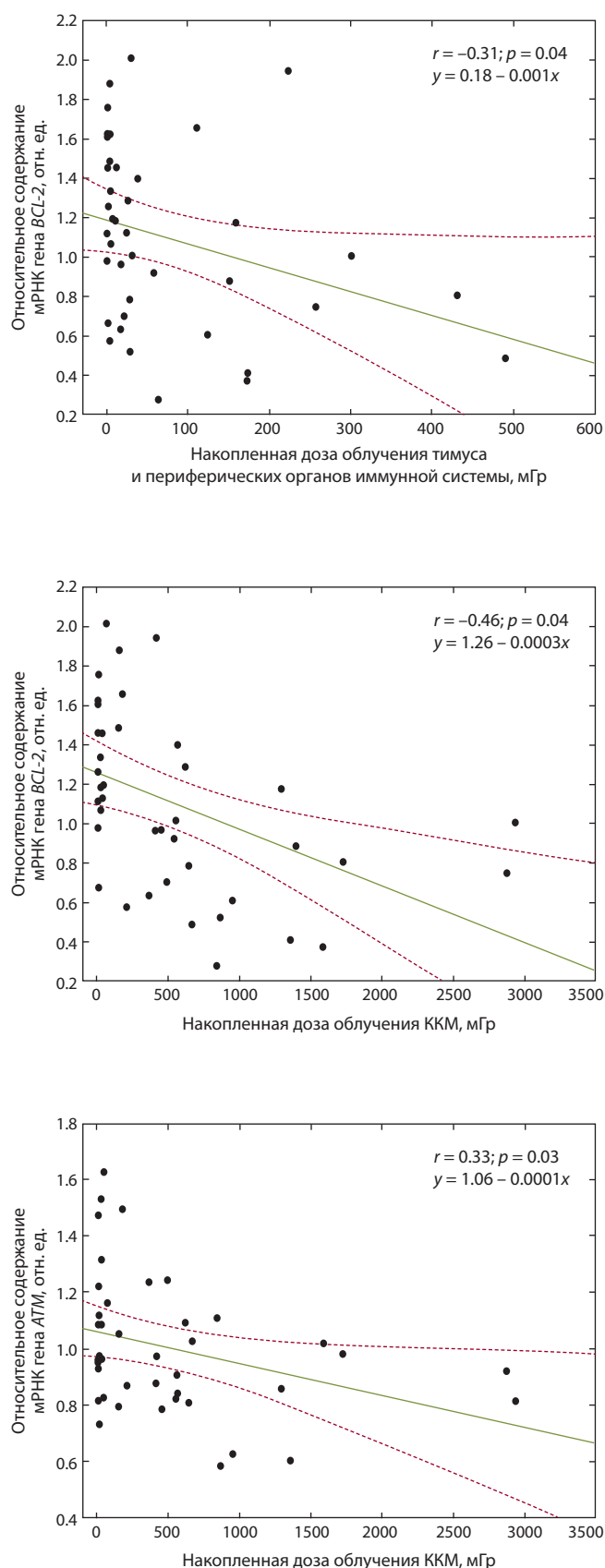


Рис. 3. Линейная зависимость изменения относительного содержания мРНК генов *ATM* и *BCL-2* от величины накопленной дозы облучения ККМ, тимуса и периферических органов иммунной системы в группе хронически облученных людей с повышенной интенсивностью позднего апоптоза ЛПК.

Таблица 4. Относительное содержание мРНК (отн. ед.) генов в группах обследованных лиц с разной интенсивностью некроза ЛПК ($M \pm SE$; min–max)

Ген	Облученные лица с частотой некроза ЛПК		p
	нормальная, N = 106	повышенная, N = 26	
<i>MDM2</i>	1.05 ± 0.04 (0.37–2.27)	1.12 ± 0.13 (0.37–2.23)	0.741
<i>BCL-2</i>	1.00 ± 0.04 (0.23–2.43)	1.10 ± 0.12 (0.41–1.73)	0.750
<i>OGG1</i>	0.95 ± 0.04 (0.33–2.00)	1.08 ± 0.08 (0.61–1.94)	0.150
<i>ATM</i>	1.01 ± 0.02 (0.32–1.83)	0.96 ± 0.06 (0.55–1.63)	0.151
<i>BAX</i>	1.12 ± 0.03 (0.40–1.95)	1.19 ± 0.07 (0.65–1.81)	0.390
<i>XPC</i>	1.07 ± 0.02 (0.68–1.73)	1.17 ± 0.05 (0.85–1.67)	0.079
<i>CDKN1A</i>	0.95 ± 0.02 (0.43–1.51)	1.18 ± 0.19 (0.59–1.50)	0.411
<i>STAT3</i>	1.08 ± 0.06 (0.21–2.71)	0.89 ± 0.12 (0.23–2.06)	0.220
<i>GATA3</i>	1.05 ± 0.07 (0.27–2.83)	1.06 ± 0.14 (0.27–2.56)	0.592
<i>MAPK8</i>	1.16 ± 0.07 (0.29–2.84)	1.15 ± 0.15 (0.27–2.04)	0.960
<i>NF-KB1</i>	1.04 ± 0.07 (0.22–2.89)	0.78 ± 0.11 (0.32–1.69)	0.185
<i>PADI4</i>	1.03 ± 0.07 (0.20–2.64)	1.03 ± 0.19 (0.18–2.79)	0.893

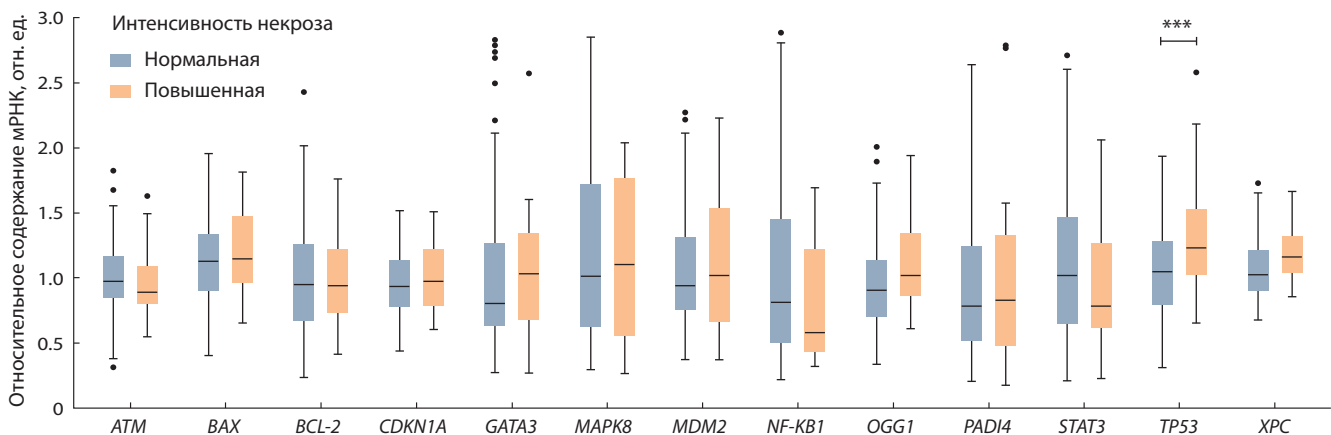


Рис. 4. Распределение относительного содержания мРНК исследуемых генов у хронически облученных людей с нормальной и повышенной интенсивностью некроза ЛПК.

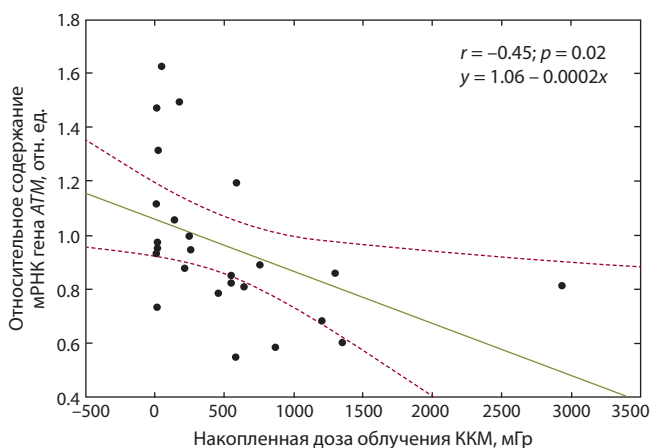


Рис. 5. Линейная зависимость изменения относительного содержания мРНК генов *ATM* от величины накопленной дозы облучения КМК в группе хронически облученных людей, имеющих повышенную интенсивность некротической гибели ЛПК.

генов *TP53* и *BCL-2*. В частности, показано достоверное увеличение относительного содержания мРНК этих генов.

Одна из главных функций белка p53 отведена индукции сигнальных механизмов, направленных на элиминацию потенциально опасных для организма клеток (Miyashita et al., 1994), однако на фоне увеличения транскрипционной активности *TP53* отмечается увеличение антиапоптогического гена *BCL-2* в группе облученных лиц с повышенной интенсивностью апоптоза. При этом с увеличением дозы облучения КМК, тимуса и периферических органов иммунной системы регистрируется снижение количества мРНК гена *BCL-2*. На этом этапе работы сложно объяснить данный феномен, вероятно, у части облученных людей с повышенной интенсивностью апоптоза происходит нарушение механизма элиминации клеток на фоне гиперэкспрессии антиапоптогических факторов. На это указывает и факт, что транскрипционная активность гена *TP53* увеличена у облученных лиц с повышенной интенсивностью некроза.

Кроме того, у облученных людей с повышенной интенсивностью позднего апоптоза зафиксирована отрицательная корреляционная связь относительного содержания мРНК генов *ATM* от дозы облучения красного костного мозга. Дисфункция гена *ATM* приводит к прогрессии нестабильности генома, которая в первую очередь сопровождается увеличением частоты хромосомных aberrаций (сокращение длины теломер, увеличение уровня парных и одиночных фрагментов хромосом, частоты транслокаций) (Hahn, Weinberg, 2002; Franco et al., 2006). Не исключено, что пониженная регуляция транскрипции этого гена, которая усиливается с увеличением дозы облучения красного костного мозга у жителей прибрежных сел р. Течи, связана с истощением внутриклеточных резервов для нейтрализации возникших повреждений ДНК, и тем самым является ведущей причиной повышенной интенсивности гибели клеток.

В группе хронически облученных людей, имеющих повышенную интенсивность некроза, на фоне увеличения транскрипционной активности гена *TP53* наблюдается снижение относительного содержания мРНК гена *MAPK8* с увеличением интенсивности некротической гибели ЛПК.

Белок *MAPK8* фосфорилирует сотни субстратов, ответственных за контроль стрессового ответа и регуляцию апоптоза, включая *p53* (Guimaraes, Hainaut, 2002). *MAPK8* фосфорилирует также *BMF* (фактор, модулирующий *BCL-2*) на специфических остатках серина, расположенных внутри и непосредственно прилегающих к связывающему домену *BMF*. Освобожденный от актлина *BMF* поступает в митохондрии, физически взаимодействует с белком *BCL-2*, что в последующем также запускает инициацию апоптоза (Puthalakath et al., 2001).

Заключение

Таким образом, выявлено, что у облученных людей с повышенной интенсивностью апоптоза регистрируются в первую очередь изменения со стороны транскрипционной активности апоптотических генов, что согласуется с текущими представлениями активации запрограммированной гибели клеток. Показано, что экспрессия генов зависит от стадии апоптоза ЛПК.

Необходимо продолжать исследование с расширенной выборкой обследуемых людей и изучаемых мишеней, что позволит определить значимость показателей транскрипционной активности некоторых генов как маркеров риска развития заболеваний опухолевого и неопухолевого генеза, связанных с апоптозом, которые регистрируются у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, в отдаленные сроки.

Список литературы / References

Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. М., 2002.
[Baryshnikov A.Yu., Shishkin Yu.V. Immunological Problems of Apoptosis. Moscow, 2002. (in Russian)]
Блинова Е.А., Котикова А.И., Янишевская М.А., Аклеев А.В. Апоптоз лимфоцитов и полиморфизм генов регуляции апоптоза у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2020a;65(4):36-42. DOI 10.12737/1024-6177-2020-65-4-36-42.

[Blinova E.A., Kotikova A.I., Yanishevskaya M.A., Akleyev A.V. Apoptosis of lymphocytes and polymorphisms of apoptosis regulation genes in individuals exposed to chronic radiation exposure. *Meditinskaya Radiologiya i Radiatsionnaya Bezopasnost' = Medical Radiology and Radiation Safety*. 2020a;65(4):36-42. DOI 10.12737/1024-6177-2020-65-4-36-42. (in Russian)]
Блинова Е.А., Никифоров В.С., Янишевская М.А., Аклеев А.А. Полиморфизм и экспрессия генов пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток у лиц, подвергшихся радиационному воздействию. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020b;24(4):399-406. DOI 10.18699/VJ20.632.
[Blinova E.A., Nikiforov V.S., Yanishevskaya M.A., Akleyev A.A. Single nucleotide polymorphism and expression of genes for immune competent cell proliferation and differentiation in radiation-exposed individuals. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020b;24(4):399-406. DOI 10.18699/VJ20.632. (in Russian)]
Квачева Ю.А. Восстановительные процессы и межпопуляционные клеточные взаимоотношения в костном мозге людей с острой лучевой болезнью: морфологическое исследование. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2000;40(1):5-9.
[Kvatcheva Yu.E. Human bone marrow repair processes and cell populations in acute radiation injury: morphological study. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya = Radiological Biology. Radioecology*. 2000;40(1):5-9. (in Russian)]
Никифоров В.С., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Транскрипционная активность генов клеточного цикла и апоптоза у хронически облученных лиц, имеющих повышенную частоту TCR-мутантных лимфоцитов. *Радиация и риск*. 2020;29(2):89-100. DOI 10.21870/0131-3878-2020-29-2-89-100.
[Nikiforov V.S., Blinova E.A., Akleyev A.V. The transcriptional activity of cell cycle and apoptosis genes in chronically exposed people with an increased frequency of TCR mutant lymphocytes. *Radiatsiya i Risk = Radiation and Risk*. 2020;29(2):89-100. DOI 10.21870/0131-3878-2020-29-2-89-100. (in Russian)]
Последствия радиоактивного загрязнения реки Течи. Под ред. д-ра мед. наук, проф. А.В. Аклеева. Челябинск: Книга, 2016.
[Akleyev A.V. (Ed.) Consequences of Radioactive Contamination of the Techa River. Chelyabinsk: Kniga Publ., 2016. (in Russian)]
Хейфец Л.Б., Абалакин В.А. Разделение форменных элементов крови человека в градиенте плотности верографин-фиколл. *Лабораторное дело*. 1973;10:579-581.
[Kheifets L.B., Abalakin V.A. Separation of human blood corpuscles in the verografin-ficoll density gradient. *Laboratornoye Delo = Laboratory Science*. 1973;10:579-581. (in Russian)]
Azimian H., Bahreini-Toossi M.T., Rezaei A.R., Rafatpanah H., Hamzehloei T., Fardid H. Up-regulation of Bcl-2 expression in cultured human lymphocytes after exposure to low doses of gamma radiation. *J. Med. Phys.* 2015;40(1):38-44. DOI 10.4103/0971-6203.152249.
Bever E.M., Williamson P.L. Getting to the outer leaflet: physiology of phosphatidylserine exposure at the plasma membrane. *Physiol. Rev.* 2016;96(2):605-645. DOI 10.1152/physrev.00020.2015.
Chipuk J.E. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.* 2006;13(6):994-1002. DOI 10.1038/sj.cdd.4401908.
Franco S., Alt F.W., Manis J.P. Pathways that suppress programmed DNA breaks from progressing to chromosomal breaks and translocations. *DNA Repair (Amst.)*. 2006;5(9-10):1030-1041. DOI 10.1016/j.dnarep.2006.05.024.
Guimaraes D.P., Hainaut P. TP53: a key gene in human cancer. *Biochimie*. 2002;84(1):83-93. DOI 10.1016/s0300-9084(01)01356-6.
Hahn W.C., Weinberg R.A. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2002;2(5):331-341. DOI 10.1038/nrc795.
Kabcak S., Mackay A., Tamber N., Manning G., Fannon P., Paillier F., Ashworth A., Bouffler S., Badie C. Gene expression following ionising radiation: identification of biomarkers for dose estimation and prediction of individual response. *Int. J. Radiat. Biol.* 2011;87(2):115-129. DOI 10.3109/09553002.2010.519424.

- Miyashita T., Krajewski S., Krajewska M., Wang H.G., Lin H.K., Liebermann D.A., Hoffman B., Reed J.C. Tumor suppressor p53 is a regulator of *bcl-2* and *bax* gene expression *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene*. 1994;9(6):1799-1805.
- Puthalakath H., Villunger A., O'Reilly L.A., Beaumont J.G., Coultas L., Cheney R.E., Huang D.C., Strasser A. BMF: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science*. 2001;293(5536):1829-1832. DOI 10.1126/science.1062257.
- Rogers G.E., Harding H.W., Llewellyn-Smith I.J. The origin of citrulline-containing proteins in the hair follicle and the chemical nature of trichohyalin, an intracellular precursor. *Biochim. Biophys. Acta*. 1977;495(1):159-175. DOI 10.1016/0005-2795(77)90250-1.
- Tanikawa C., Espinosa M., Suzuki A., Masuda K., Yamamoto K., Tsuchiya E., Ueda K., Daigo Y., Nakamura Y., Matsuda K. Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53-PADI4 pathway. *Nat. Commun.* 2012;3:676. DOI 10.1038/ncomms1676.
- Verheij M., Bartelink H. Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2000;301(1):133-142. DOI 10.1007/s004410000188.
- Zeegers D., Venkatesan S., Koh S.W., Low G.K., Srivastava P., Sundaram N., Sethu S., Banerjee B., Jayapal M., Belyakov O., Baskar R., Balajee A.S., Hande M.P. Biomarkers of ionizing radiation exposure: A multiparametric approach. *Genome Integr.* 2017;8:6. DOI 10.4103/2041-9414.198911.

ORCID ID

V.S. Nikiforov orcid.org/0000-0002-6685-1823
E.A. Blinova orcid.org/0000-0002-2567-7945
A.I. Kotikova orcid.org/0000-0002-1695-1340
A.V. Akleyev orcid.org/0000-0003-2583-5808

Благодарности. Исследование выполнено в рамках государственного контракта № 27.501.21.2 от 11.06.2021 «Модернизация высокотехнологичных методов, направленных на выявление медицинских последствий радиационных воздействий на персонал ПО «Маяк» и население Уральского региона».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 29.06.2021. После доработки 15.11.2021. Принята к публикации 16.11.2021.