

Полиморфизм и экспрессия генов пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток у лиц, подвергшихся радиационному воздействию

Е.А. Блинова^{1, 2}✉, В.С. Никифоров¹, М.А. Янишевская^{1, 2}, А.А. Аклеев^{1, 3}

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

² Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

³ Южно-Уральский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия

✉ e-mail: blinova@urcrm.ru

Аннотация. Известно, что ионизирующее излучение влияет на экспрессию генов, выполняющих ключевую роль в механизмах поддержания стабильности клеточного гомеостаза. Как правило, изменение в транскриптоме облученной клетки происходит в первые часы и сутки после радиационного воздействия, что обуславливает ее ранний ответ при повреждении генома. В отдаленном периоде также возможны модуляции в транскрипционной активности генов, приводящие к развитию канцерогенных эффектов облучения. Однако для установления роли экзогенных факторов (ионизирующего излучения) в модификации экспрессии генов клеточного гомеостаза необходимо учитывать и роль эндогенных факторов, способных модифицировать транскрипционную активность генов, что особенно актуально в отдаленном периоде после начала радиационного воздействия. К таким факторам могут относиться полиморфные варианты генов, расположенные в регуляторных областях. Цель настоящего исследования – анализ влияния ионизирующего излучения в отдаленном периоде на содержание мРНК генов *STAT3*, *GATA3*, *NFkB1*, *PADI4*, регулирующих процессы пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток человека, а также оценка связи аллельных вариаций rs1053023, rs4143094, rs28362491, rs874881 на количество мРНК генов *STAT3*, *GATA3*, *PADI4*, *NFkB1*. Исследование проведено у лиц, подвергшихся аварийному хроническому радиационному воздействию в результате сбросов радиоактивных отходов в реку Течу. Установлено, что спустя 60 лет после начала радиационного воздействия у лиц, имеющих кумулятивные дозы облучения ККМ в диапазоне от 78 до 3510 мГр, регистрируются изменения в транскрипционной активности генов *NFkB1* и *PADI4*. Не выявлено влияния аллельных вариаций rs1053023, rs4143094, rs28362491, rs874881 на количество мРНК генов *STAT3*, *GATA3*, *PADI4*, *NFkB1* у облученных лиц. Ключевые слова: облученные лица; мРНК; однонуклеотидный полиморфизм; ПЦР в реальном времени; модификация экспрессии генов.

Для цитирования: 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*. 2020;24(4):399-406. DOI 10.18699/VJ20.632

Single nucleotide polymorphisms and expression of genes for immune competent cell proliferation and differentiation in radiation-exposed individuals

Е.А. Blinova^{1, 2}✉, V.S. Nikiforov¹, M.A. Yanishevskaya^{1, 2}, A.A. Akleyev^{1, 3}

¹ Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia

² Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

³ South-Urals State Medical University of the Ministry of Healthcare of Russian Federation, Chelyabinsk, Russia

✉ e-mail: blinova@urcrm.ru

Abstract. It is known that ionizing radiation influences the expression of the genes that play a key role in the mechanisms of maintaining the stability of cellular homeostasis. As a rule, changes in the transcriptome of an exposed cell occur within the first 24 hours following radiation exposure. And it predetermines early response in the case of genome damage. Later on modulations in gene transcription activity are also possible and could result in a carcinogenic effect. However, in order to find the role of exogenous factors (ionizing radiation), it is also necessary to take into account the contribution of endogenous factors that are able to modify gene transcription activity. This is especially important for long after the onset of radiation exposure. Single nucleotide polymorphisms located in regulatory regions of the genes may belong to this group of factors. The objective of the current study was to analyze the influence of ionizing radiation on the transcription activity of the *STAT3*, *GATA3*, *NFkB1*, *PADI4* genes, which regulate proliferation and differentiation of immune competent human cells; and to assess the potential influence of single nucleotide polymorphisms located in regulatory regions of the genes on the amount of mRNA. The study involved

people who had been chronically exposed due to releases of radioactive waste into the Techa River. It was observed that 60 years after the onset of radiation exposure changes in the transcription activity of the *NFkB1* and *PADI4* genes were registered in people with cumulative doses to RBM within the range 78–3510 mGy. In people who had been chronically exposed, the effect of allelic variations in rs1053023, rs4143094, rs28362491, rs874881 on the level of mRNAs of the *STAT3*, *GATA3*, *PADI4*, *NFkB1* genes has not been established.

Key words: exposed persons; mRNA; single-nucleotide polymorphism; real-time PCR; modification of gene expression.

For citation: Blinova E.A., Nikiforov V.S., Yanishevskaya M.A., Akleyev A.A. Single nucleotide polymorphisms and expression of genes for immune competent cell proliferation and differentiation in radiation-exposed individuals. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(4):399-406. DOI 10.18699/VJ20.632

Введение

Ионизирующее излучение вызывает изменения транскрипционной активности генов, выполняющих ключевую роль в механизмах поддержания стабильности клеточного гомеостаза. Однако профиль экспрессии генов существенно отличается при облучении в диапазоне малых и больших доз (Ding et al., 2005). Показано, что при облучении в диапазоне малых и средних доз повышается экспрессия не только генов, вовлеченных в ответ на повреждение ДНК, но и генов, отвечающих за апоптоз (Azimian et al., 2015), элементы цитоскелета и перемещение секреторных везикул (Woloschak et al., 1990), пролиферацию и дифференцировку клеток (Amundson et al., 2003), а также активацию лимфоцитов, экспрессию цитокинов и хемокинов (Wyrobek et al., 2011). Хорошо известно, что изменение в транскриптом облученной клетки происходит в первые часы и сутки после радиационного воздействия, что обуславливает ранний ответ при повреждении генома.

В отдаленном периоде также регистрируется aberrantная экспрессия ряда генов. В исследованиях (Fachin et al., 2009; Iliencko, Vazyuka, 2016) показаны изменения транскрипционной активности генов, продукты которых регулируют внутриклеточный транспорт, репарацию ДНК, иммунный ответ клетки спустя 10–20 лет после начала радиационного воздействия. Ранее нами было установлено, что в отдаленные сроки (более 60 лет) у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в диапазоне средних и высоких доз (0.1–4.5 Гр), наблюдается снижение содержания мРНК антиапоптозного гена *BCL2* по сравнению с необлученными людьми (Никифоров и др., 2019).

Изменение экспрессии генов, кодирующих различные ферменты, а также регуляторные белки, может приводить на молекулярном уровне к изменению количества активных форм кислорода, нарушению баланса между про- и противовоспалительными цитокинами и хемокинами (Barnes, Karin, 1997). Однако следует учитывать, что помимо экзогенных факторов окружающей среды, в том числе ионизирующего излучения, на уровень транскрипционной активности генов могут влиять эндогенные (генетические) факторы. В связи с этим для установления роли ионизирующего излучения в изменении транскрипционной активности генов в отдаленном периоде необходимо учитывать вклад генетической компоненты.

В последние десятилетия однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) активно исследуется в качестве маркера, ассоциированного с различными заболеваниями (Visscher et al., 2012; Tan, 2017). Механизм, благодаря которому полиморфизм оказывает влияние на фенотип, определяется, в первую очередь, функциональной ролью последователь-

ности ДНК, в которой он расположен. Однонуклеотидный полиморфизм может влиять как на структуру и активность продукта гена, так и на его количество.

Из всех ОНП, расположенных в кодирующих последовательностях (экзонах) гена, порядка 58 % являются несинонимичными и могут влиять на ферментативную активность белка, его стабильность, средство лиганда к определенному белку; приводить к изменениям процесса фолдинга белка и, как следствие, к нарушениям формирования его четвертичной структуры (Bhattacharya et al., 2017). Остальные ОНП – синонимичные и могут модифицировать уровень экспрессии белка посредством влияния на вторичную структуру зрелой мРНК (Robert, Pelletier, 2018), способствовать нарушению микроРНК-опосредованной регуляции экспрессии генов (Brest et al., 2011). Помимо изменения уровня экспрессии, синонимичные ОНП могут воздействовать на стабильность и сплайсинг мРНК (Wang et al., 2015).

Фенотипическое проявление ОНП, расположенных в интронах, обусловлено по большей части модификациями, находящимися в различных регуляторных элементах (Shastry, 2009). Известно несколько возможных механизмов воздействия расположенных в интронах ОНП на фенотип. К ним относят изменения в регуляторных цис-элементах – модулях энхансеров и сайленсеров, приводящих к изменению средства транс-факторов к этим элементам и к соответствующей вариации уровня экспрессии (Campbell et al., 2016); влияние на дифференциальную экспрессию материнских и отцовских аллелей из-за вариаций в метилировании ДНК и ацетилировании гистонов, а также иные возможные механизмы воздействия интронных ОНП на уровень экспрессии генов, например за счет образования дополнительных хроматиновых петель (Wright et al., 2010).

Целью настоящего исследования были анализ воздействия ионизирующего излучения в отдаленном периоде на уровень мРНК генов *STAT3*, *GATA3*, *NFkB1*, *PADI4*, регулирующих процессы пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток человека, а также оценка связи аллельных вариаций rs1053023, rs4143094, rs28362491, rs874881 с количеством мРНК генов *STAT3*, *GATA3*, *PADI4*, *NFkB1*.

Материалы и методы

Исследование проводили у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в результате сбросов Производственного объединения «Маяк» жидких радиоактивных отходов в р. Течу в 1949–1956 гг. Население прибрежных сел подверглось сочетанному внешнему и внутреннему облучению. Источниками внешнего γ -об-

Таблица 1. Характеристика обследованных лиц

Признак	Группа сравнения <i>n</i> = 146	Облученные <i>in utero</i> <i>n</i> = 48	Облученные в постнатальном периоде <i>n</i> = 115
Этническая группа, % (<i>n</i>)	Славяне	66.4 (97)	52.2 (60)
	Тюрки	33.6 (49)	47.8 (55)
Пол, % (<i>n</i>)	Мужчины	30.8 (45)	37.4 (43)
	Женщины	69.2 (101)	62.6 (72)
Средний возраст, лет, <i>M</i> ± <i>SE</i>	62.4 ± 0.5 (57–81) ¹	65.1 ± 0.3 (60–68)	73.2 ± 0.8 (65–86)
Кумулятивная доза облучения ККМ, мГр, <i>M</i> ± <i>SE</i>	16 ± 1 (0–68) ²	506 ± 58 (78–1721)	799 ± 63 (80–3510)
Кумулятивная внутриутробная доза облучения ККМ, мГр, <i>M</i> ± <i>SE</i>	0	85 ± 12 (0–358)	0

Примечание. ККМ – красный костный мозг; *M* – средняя; *SE* – ошибка средней; *n* – количество человек; ¹ – возрастной диапазон; ² – диапазон индивидуальных значений доз.

лучения были донные отложения и пойменные почвы, загрязненные радионуклидами. Внутреннее облучение определялось радионуклидами, поступившими в организм с речной водой и продуктами питания местного производства. Основным дозообразующим радионуклидом являлся ⁹⁰Sr, который, будучи β-излучателем, избирательно накапливался в костной ткани и длительное время воздействовал на красный костный мозг (ККМ) (Последствия радиоактивного загрязнения..., 2016). Ранее в когорте облученных жителей прибрежных сел р. Течи были установлены повышенные риски развития лейкозов (Schüz et al., 2017) и злокачественных опухолей (Крестинина и др., 2017).

В исследовании приняло участие 309 человек, имеющих реконструированную дозу облучения ККМ по дозиметрической системе TRDS (Techa River Dosimetry System, версия 2016) (Degteva et al., 2019). В основную группу облученных лиц вошло 163 человека с индивидуальными накопленными дозами облучения ККМ, находящимися в диапазоне 78–3510 мГр. Среди этих лиц 48 человек подверглись хроническому радиационному воздействию в период внутриутробного и постнатального развития (далее *in utero*). Средняя доза внутриутробного облучения ККМ у этих лиц была 85 ± 12 мГр, средняя доза постнатального облучения ККМ равнялась 506 ± 58 мГр. Остальные 115 человек из основной группы родились до начала радиоактивного загрязнения р. Течи и подверглись только постнатальному облучению (средняя постнатальная доза облучения ККМ составила 799 ± 63 мГр). В группу сравнения вошло 146 человек, проживающих в сходных социально-экономических и хозяйственно-бытовых условиях (сельское население), но с интенсивностью облучения ККМ, не превышавшей 1 мГр/год, и накопленной дозой менее 70 мГр за весь период своей жизни, в соответствии с п. 3.1.4. НРБ-99/2009 (Санитарные правила и нормативы СанПиН 2.6.1.2523-09). Обследуемые группы включали лиц обоего пола, принадлежавших к двум этническим группам: тюркам (татары и башкиры) и славянам (русские) (табл. 1).

На транскрипционную активность генов у обследованных лиц могут влиять различные факторы, в связи с этим из исследования были исключены лица, имеющие аутоиммунные, онкологические, хронические воспалительные

заболевания в фазе обострения; принимающие цитостатические препараты и антибиотики и проходившие диагностическое облучение в течение шести предшествующих месяцев до момента взятия образца крови, а также вступавшие в контакты с генотоксическими (химическими) агентами в процессе профессиональной деятельности. Перед процедурой забора крови все обследованные лица проходили плановый осмотр в клиническом отделении Уральского научно-практического центра радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства России (УНПЦ РМ ФМБА России) в период 2016–2019 гг. в рамках оказания медицинской помощи облученному населению. Согласно действующим международным нормам, все обследованные лица дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Настоящая работа проводилась с разрешения этического комитета УНПЦ РМ ФМБА России.

Методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-ВР) оценивали транскрипционную активность генов *STAT3*, *GATA3*, *NFκB1* и *PADI4*. Образцы венозной крови от пациентов в период 2016–2019 гг. собирали в вакуумные пробирки Tempus Blood RNA Collection Tubes (Applied Biosystem, США). Выделение нативной РНК осуществлялось либо сразу после стабилизации, либо после хранения образцов при –80 °С.

Экстракцию РНК выполняли с использованием коммерческого набора GeneJET Whole Blood RNA Purification Kit (Thermo Scientific™, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Информацию о концентрации и чистоте выделенных образцов РНК получали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США). Соотношение оптических плотностей, измеренных при А260/280 для очищенной РНК, выделенной из всех образцов крови, составило 2.1 ± 0.02.

Реакцию обратной транскрипции (ОТ) для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) осуществляли с использованием готового набора реагентов High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, США), содержащего рекомбинантную обратную транскриптазу М-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus), случайные гекса- и нанонуклеотидные праймеры, смесь dNTP и буфер ОТ. Согласно протоколу производителя, для синтеза кДНК использовали 10 мкл тотальной РНК.

Таблица 2. Характеристика праймеров и зондов для определения содержания мРНК

Ген	Праймеры и зонды (длина, п. н.)	Tm	GC, %	Размер ампликона, п. н.	Ссылки на мишени (транскрипты) из ресурса NCBI
STAT3	F: Экзон-экзонный переход – ex13-ex14 (20)	51.71	55.00	70	NM_003150.3
	R: Экзон-экзонный переход – ex14-ex15 (20)	51.96	55.00		
	Probe: Экзон – ex14 (20)	52.81	56.01		
GATA3	F: Экзон-экзонный переход – ex3-ex4 (18)	47.4	61.1	86	NM_001002295.1
	R: Экзон-экзонный переход – ex4-ex5 (18)	47.4	61.1		
	Probe: Экзон – ex4 (20)	50.5	60.00		
PADI4	F: Экзон-экзонный переход – ex5-ex6 (20)	52.90	55.00	107	NM_012387.2
	R: Экзон-экзонный переход – ex6-ex7 (20)	51.7	55.00		
	Probe: Экзон – ex6 (20)	52.35	55.00		
NFkB1	F: Экзон-экзонный переход – ex22-ex23 (21)	51.60	42.90	66	NM_001165412.1
	R: Экзон-экзонный переход – ex23-ex24 (21)	51.50	42.90		
	Probe: Экзон – ex22 (23)	52.00	44.10		
B2M	F: Экзон-экзонный переход – ex1-ex2 (22)	53.7	59.00	64	NM_004048.2
	R: Экзон-экзонный переход – ex2-ex3 (23)	53.4	45.5		
	Probe: Экзон – ex2 (23)	53.9	46.00		

Примечание. F – прямой праймер; R – обратный праймер; Probe – зонд; Tm – температура плавления; GC, % – процент содержания GC-пар.

Таблица 3. Характеристика полиморфных участков генов STAT3, GATA3, NFkB1, PADI4

Ген	Полиморфизм	Аллель	Расположение ¹	Позиция ¹
STAT3	rs1053023	T/C	3'UTR	chr17:42313598
GATA3	rs4143094	A/C	Инtron	chr10:8047173
NFkB1	rs28362491	Del/ATTG	Инtron	chr4:102500998-102501005
PADI4	rs874881	G/C	5'UTR	chr1:17334004

¹ По данным полногеномной базы данных 1000Genom, версия GRCh38.p12 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Анализ содержания мРНК выполняли методом количественной ПЦР-ВР с использованием коммерческих наборов TaqMan (Applied Biosystem, США). Характеристика праймеров и зондов, используемых для оценки экспрессии мРНК, приведена в табл. 2.

Для получения статистически значимых результатов каждую реакцию выполняли в трех повторах с использованием отрицательного контроля на приборе StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystem, США). Температурный режим: 1 цикл предварительная денатурация 95 °C/10 мин, далее 50 циклов: 95 °C/15 с, 60 °C/1 мин. Данные анализировали с использованием метода ΔΔCt с нормализацией по экспрессии гена «домашнего хозяйства» B2M в каждом образце.

Отбор ОНП, вошедших в исследование, проводили на основе анализа интернет-баз данных полногеномных исследований (www.harmap.ncbi.nlm.nih.gov) и базы данных однонуклеотидных полиморфизмов (www.snpedia.com). При отборе учитывались расположение ОНП и потенциальная возможность его влияния на транскрипционную активность генов (табл. 3).

Для генотипирования использовали ДНК, выделенную из замороженных при –80 °C образцов крови. Экстракцию ДНК из цельной крови осуществляли с использованием комплекта реагентов для выделения ДНК ExtraPhen (АТГ-Биотех, Россия). Количественную и качественную оценку образцов ДНК после экстракции выполняли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000C (Termo Scientific, США).

Генотипирование образцов и детекцию результатов проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени на приборе Applied Biosystems StepOnePlus (США) с использованием наборов реагентов, включающих праймеры и зонды для генотипирования («ТестГен», Россия). Характеристика праймеров и зондов для генотипирования приведена в табл. 4.

Аmplификацию осуществляли согласно инструкции производителя к конкретному набору. В качестве отрицательного контроля использовали деионизированную воду.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакетов программ Statistica 10.0 и WinPepi for Windows версия 11.65, проверку нормальности

Таблица 4. Последовательности праймеров и зондов для проведения генотипирования

Ген, полиморфизм	Праймеры и зонды (длина, п. н.)
<i>STAT3</i> rs1053023	F: 5'-GGTCTTAACCTGATTGTAG-3' (20)
	R: 5'-CAGCTTATAAACACCTTATAG-3' (22)
	Probe: 5'-FAM-tcttTaaTggGccac-BHQ-1-3' (15)
	Probe: 5'-VIC-tcttTaaCggGccac-BHQ-2-3' (15)
<i>GATA3</i> rs4143094	F: 5'-GCAGAAGATAAACGAGGTG-3' (19)
	F: 5'-GACGCAACTGCTTTAAC-3' (18)
	Probe: 5'-FAM-caaccCaaAagAaaaccc-BHQ-1-3' (18)
	Probe: 5'-VIC-caaccCaaCagAaaaccc-BHQ-2-3' (18)
<i>NFkB1</i> rs28362491	F: 5'-TGGACCGCATGACTCTATC-3' (19)
	R: 5'-GCTCTGGCTTCCTAGCAG-3' (18)
	Probe: 5'-FAM-ccccgacCattgGgc-BHQ-1-3' (15)
	Probe: 5'-VIC-ccccgacCattgattgGgc-BHQ-2-3' (18)
<i>PADI4</i> rs874881	F: 5'-GGTGTGTTGTTGAATGACTAA-3' (20)
	R: 5'-CACTGACTAAGGATGGAATA-3' (20)
	Probe: 5'-FAM-tcaccgGggTggg-BHQ-1-3' (13)
	Probe: 5'-VIC-tcaccgCggTggg-BHQ-2-3' (13)

Примечание. F – прямой праймер; R – обратный праймер; Probe – зонд.

распределения количества мРНК – с применением критерия Колмогорова–Смирнова. Полученное распределение перенных отличалось от нормального, в связи с этим использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Сравнение частот генотипов между этническими группами выполняли с применением статистического критерия χ^2 Пирсона. Уровень статистической значимости при оценке экспрессии генов соответствовал $p = 0.05$ и менее, при оценке связи ОНП с экспрессией генов – $p = 0.01$ и менее.

Результаты

Проведенный анализ мРНК у всех облученных лиц свидетельствовал о снижении содержания мРНК гена *NFkB1* и повышении количества мРНК гена *PADI4* относительно

группы сравнения. Те же закономерности регистрировались в группе лиц, облученных в период внутриутробного и постнатального развития, и в группе людей, облученных только в период постнатального развития (табл. 5).

Анализ сравнения медианных значений количества мРНК исследуемых генов у представителей различных этнических групп (тюрков и славян) в группе облученных лиц и группе сравнения не выявил статистически значимых различий (табл. 6). Распределение частот полиморфных локусов исследуемых генов у облученных лиц показано в табл. 7.

В этнических группах славян и тюрков распределение генотипов для всех полиморфных участков соответствовало ожидаемому, согласно закону Харди–Вайнберга, за исключением полиморфного участка rs 4143094 гена *GATA3* в группе тюрков. Кроме того, распределения аллелей и генотипов в группах славян и тюрков не различались между собой.

Не установлено ассоциаций аллельных вариаций rs1053023, rs4143094, rs28362491, rs874881 с количеством мРНК генов *STAT3*, *GATA3*, *PADI4*, *NFkB1* у облученных лиц в группе славян, группе тюрков, а также в объединенной популяции (табл. 8).

Обсуждение

Нами выявлено, что спустя 60 лет после начала радиационного воздействия у лиц, имеющих кумулятивные дозы облучения ККМ в диапазоне от 78 до 3510 мГр, регистрируются изменения в количестве мРНК генов *NFkB1* и *PADI4* по сравнению с контрольной группой (дозы облучения ККМ менее 70 мГр). Модуляция транскрипционной активности генов иммунного надзора ранее регистрировались и в других группах облученных лиц. Так, у людей с кумулятивными дозами облучения 0.1–113.35 мГр от трансуранивых радионуклидов наблюдалась избыточная экспрессия генов иммунного надзора и апоптоза через пять лет после начала облучения (Bazyka et al., 2018). Результаты исследования экспрессии генов у ликвидаторов последствий аварии на Чернобыльской АЭС также демонстрируют модуляцию активности более 100 генов, включая гены цитокинов и иммунного ответа у лиц с дозами облучения более 400 мГр через 11–12 лет после начала радиационного воздействия (Albanese et al., 2007).

Таблица 5. Количество мРНК (отн. ед.) исследуемых генов в клетках периферической крови у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию

Ген	Группа сравнения	Все облученные лица	Лица, облученные только в постнатальном периоде	Лица, облученные <i>in utero</i> и в постнатальном периоде
			Медиана 25–75 %	
<i>STAT3</i>	0.95* (0.57–1.43)**	0.90 (0.62–1.46)	0.92 (0.61–1.46)	0.88 (0.71–1.46)
<i>GATA3</i>	0.86 (0.58–1.38)	0.85 (0.61–1.41)	0.89 (0.62–1.49)	0.82 (0.61–1.15)
<i>NFkB1</i>	1.05 (0.57–1.66)	0.69 (0.46–1.31) $p = 0.0005$	0.71 (0.45–1.36) $p = 0.004$	0.69 (0.50–1.07) $p = 0.003$
<i>PADI4</i>	0.71 (0.43–1.12)	0.83 (0.54–1.89) $p = 0.003$	0.78 (0.54–1.81) $p = 0.02$	1.05 (0.58–2.08) $p = 0.006$

Примечание. Здесь и ниже: * – медиана; ** – 25 и 75 % квартили; p – уровень статистической значимости различий показателей между группой облученных лиц и группой сравнения.

Таблица 6. Количество мРНК (отн. ед.) исследуемых генов в зависимости от этнической принадлежности обследованных лиц

Ген	Группа сравнения		Облученные лица	
	Славяне	Тюрки	Славяне	Тюрки
<i>PADI4</i>	0.71 (0.42–1.11)	0.71 (0.49–1.13)	0.83 (0.46–1.72)	0.88 (0.59–2.25)
<i>NFkB1</i>	0.99 (0.57–1.50)	1.17 (0.61–1.85)	0.69 (0.49–1.20)	0.70 (0.44–1.38)
<i>STAT3</i>	0.97 (0.56–1.40)	0.93 (0.63–1.47)	0.84 (0.59–1.34)	0.98 (0.70–1.55)
<i>GATA3</i>	0.89 (0.61–1.37)	0.85 (0.51–1.57)	0.82 (0.57–1.21)	0.88 (0.65–1.47)

Таблица 7. Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам в группе облученных лиц

Ген, полиморфизм	Параметр	Этническая группа		<i>p</i> -value	Ген, полиморфизм	Параметр	Этническая группа		<i>p</i> -value
		Славяне	Тюрки				Славяне	Тюрки	
<i>STAT3</i> rs1053023	Частота аллелей, % (<i>N</i>)				<i>NFkB1</i> rs28362491	Частота аллелей, % (<i>N</i>)			
	Аллель Т	81 (151)	87 (120)	<i>p</i> = 0.165		Аллель Del	52 (92)	48 (62)	<i>p</i> = 0.489
	Аллель С	19 (35)	13 (18)			Аллель ATTG	48 (86)	52 (68)	
	Частота генотипа, % (<i>N</i>)					Частота генотипа, % (<i>N</i>)			
	Т/Т	69 (64)	77 (53)	<i>p</i> = 0.426		Del/Del	25 (22)	20 (13)	<i>p</i> = 0.756
	Т/С	25 (23)	20 (14)			Del/ATTG	54 (48)	55 (36)	
С/С	6 (6)	3 (2)	ATTG/ATTG		21 (19)	25 (16)			
<i>rE_{H-W}</i>	0.08	0.31		<i>rE_{H-W}</i>	0.53	0.46			
<i>GATA3</i> rs4143094	Частота аллелей, % (<i>N</i>)				<i>PADI4</i> rs874881	Частота аллелей, % (<i>N</i>)			
	Аллель С	73 (130)	80 (107)	<i>p</i> = 0.164		Аллель G	47 (84)	41 (43)	<i>p</i> = 0.052
	Аллель А	27 (48)	20 (27)			Аллель С	53 (94)	59 (77)	
	Частота генотипа, % (<i>N</i>)					Частота генотипа, % (<i>N</i>)			
	С/С	53 (47)	69 (46)	<i>p</i> = 0.059		G/G	21 (19)	15 (10)	<i>p</i> = 0.519
	С/А	40 (36)	22 (15)			G/C	52 (46)	51 (33)	
А/А	7 (6)	9 (6)	С/С		27 (24)	34 (22)			
<i>rE_{H-W}</i>	1.00	0.02		<i>rE_{H-W}</i>	0.83	0.80			

Примечание. *p*-value – уровень значимости различия частот аллелей и генотипов между славянами и тюрками; *rE_{H-W}* – равновесие Харди–Вайнберга.

Транскрипционные факторы часто используются в качестве кандидатных маркеров при развитии различных патологических состояний иммунной системы, поскольку их работа обеспечивает пластичность популяции иммунокомпетентных клеток, которая отмечается при аутоиммунных заболеваниях или злокачественных новообразованиях. Например, при различных видах рака может наблюдаться снижение функциональных способностей CD8⁺-клеток, фенотипически начинают преобладать Т-клетки эффекторной памяти (Т_{ЕМ}-клетки), в то же время увеличение количества Т-клеток центральной памяти (Т_{СМ}) и короткоживущих эффекторных клеток (Т_{ЕМРА}) повышает активность противоопухолевого иммунитета (DuPage, Bluestone, 2016).

Ранее в группе облученных жителей прибрежных сёл р. Течи нами была выявлена корреляционная связь экспрессии генов *NFkB1* и *PADI4* с показателями системного иммунитета у облученных лиц. В частности, количество мРНК коррелировало с абсолютным числом В-лимфо-

цитов и уровнями сывороточных IgG и IgM, а количество мРНК гена *PADI4* – с интенсивностью внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов (Аклеев и др., 2019). Вероятно, изменения в транскрипционной активности генов *NFkB1* и *PADI4* могут вносить определенный вклад в работу иммунной системы.

Помимо влияния внешних факторов, в транскрипционной активности генов определенную роль имеет и генетическая компонента, в частности ОНП, располагающиеся в некодирующих областях (энхансерах, донорах сплайсинга и акцепторных сайтах интронов). Такие ОНП способны влиять на уровень экспрессии генов путем изменений в сайтах связывания, образования новых сайтов или изменения степени родства различных транскрипционных факторов к определенным сайтам связывания ДНК. Однако в настоящем исследовании не установлено ассоциаций аллельных вариаций rs1053023, rs4143094, rs28362491, rs874881 с количеством мРНК генов *STAT3*, *GATA3*, *PADI4*, *NFkB1* у облученных лиц.

Таблица 8. Оценка влияния ОНП на транскрипционную активность генов у облученных лиц

Ген, полиморфизм	Модель	Генотип	Объединенная популяция		Славяне		Тюрки	
			Кол-во мРНК, медиана 25–75 %	<i>p</i>	Кол-во мРНК, медиана 25–75 %	<i>p</i>	Кол-во мРНК, медиана 25–75 %	<i>p</i>
<i>STAT3</i> rs1053023	Кодоминантная	T/T (109/58/51)	0.95 (0.60–1.46)	0.46	1.02 (0.59–1.36)	0.87	0.93 (0.60–1.53)	–
		T/C (36/23/13)	1.08 (0.67–1.43)		0.96 (0.64–1.40)		1.25 (0.97–1.46)	
		C/C (7/5/2)	0.84 (0.60–1.34)		1.04 (0.77–1.34)		–	
	Доминантная	T/T (109/58/51)	0.95 (0.60–1.46)	0.79	1.02 (0.59–1.38)	0.85	0.93 (0.60–1.52)	0.28
		T/C-C/C (43/28/15)	1.04 (0.66–1.40)		0.96 (0.64–1.40)		1.17 (0.71–1.46)	
	Рецессивная	T/T-T/C (145/81/64)	0.96 (0.62–1.46)	0.56	1.02 (0.62–1.39)	0.83	0.96 (0.69–1.49)	–
<i>GATA3</i> rs4143094	Кодоминантная	C/C (109/58/51)	0.85 (0.65–1.16)	0.24	0.82 (0.64–1.09)	0.97	0.91 (0.66–1.60)	0.77
		A/C (49/35/14)	0.74 (0.59–1.38)		0.80 (0.61–1.54)		0.68 (0.46–0.74)	
		A/A (13/6/7)	1.20 (0.44–1.49)		0.79 (0.36–2.03)		1.21 (0.67–1.49)	
	Доминантная	C/C (109/58/51)	0.85 (0.65–1.16)	0.59	0.82 (0.64–1.09)	0.44	0.91 (0.66–1.60)	0.10
		C/A-A/A (43/28/15)	0.76 (0.53–1.47)		0.80 (0.59–1.54)		0.69 (0.49–1.15)	
	Рецессивная	C/C-C/A (134/77/58)	0.81 (0.64–1.21)	0.51	0.80 (0.65–1.09)	0.89	0.76 (0.65–1.21)	0.29
<i>NFKB1</i> rs28362491	Кодоминантная	Del/Del (31/19/12)	1.09 (0.50–1.92)	0.50	1.14 (0.66–1.92)	0.19	0.82 (0.43–1.89)	0.22
		Del/ATTG (79/45/34)	0.85 (0.51–1.39)		0.82 (0.53–1.44)		1.01 (0.51–1.27)	
		ATTG/ATTG (34/18/16)	1.05 (0.53–1.36)		0.68 (0.43–1.28)		1.24 (0.89–1.67)	
	Доминантная	Del/Del (31/19/12)	1.09 (0.5–1.92)	0.78	1.14 (0.66–1.92)	0.25	0.82 (0.43–1.89)	0.71
		Del/ATTG-ATTG/ATTG (113/63/50)	0.99 (0.53–1.39)		0.77 (0.46–1.39)		1.09 (0.56–1.54)	
	Рецессивная	Del/Del-Del/ATTG (110/64/46)	0.96 (0.51–1.54)	0.44	0.87 (0.53–1.57)	0.17	0.98 (0.5–1.3)	0.11
<i>PADI4</i> rs874881	Кодоминантная	G/G (29/19/10)	0.75 (0.44–1.07)	0.09	0.75 (0.44–0.99)	0.36	0.75 (0.33–1.42)	0.30
		G/C (79/46/33)	0.82 (0.45–1.37)		0.80 (0.46–1.37)		0.91 (0.45–1.44)	
		C/C (46/24/22)	0.60 (0.39–0.93)		0.66 (0.39–0.90)		0.57 (0.39–0.93)	
	Доминантная	G/G (29/19/10)	0.75 (0.43–1.07)	0.85	0.75 (0.44–0.99)	0.99	0.75 (0.33–1.42)	0.55
		G/C-C/C (125/70/55)	0.67 (0.44–1.21)		0.69 (0.41–1.21)		0.64 (0.44–1.19)	
	Рецессивная	G/G-G/C (108/65/43)	0.78 (0.45–1.32)	0.04	0.78 (0.46–1.16)	0.14	0.91 (0.44–1.44)	0.12
	C/C (46/24/22)	0.60 (0.39–0.93)		0.66 (0.39–0.90)		0.57 (0.39–0.93)		

Заключение

Таким образом, у лиц, подвергшихся хроническому аварийному радиационному воздействию, наблюдаются снижение количества мРНК гена *NfkB1* и повышение количества мРНК гена *PADI4* относительно группы сравнения. Не выявлено влияния аллельных вариаций rs1053023, rs4143094, rs28362491, rs874881 на количество мРНК генов *STAT3*, *GATA3*, *PADI4*, *NfkB1* у облученных лиц.

С учетом малой численности обследованных лиц по изученным полиморфным участкам результаты исследования являются предварительными и требуют дальнейшей проверки с увеличением объема выборки.

Список литературы / References

Аклеев А.А., Никифоров В.С., Блинова Е.А., Долгушин И.И. Экспрессия генов иммунного ответа у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, в отдаленные сроки. *Рос. иммунол. журнал.* 2019;13(22):1042-1044. [Akleyev A.A., Nikiforov V.S., Blinova E.A., Dolgushin I.I. Delayed expression of immune response genes in persons chronically

exposed to radiation. *Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal = Russian Journal of Immunology.* 2019;13(22):1042-1044. (in Russian)]
База данных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). – URL: www.snpedia.com.
[Single-Nucleotide Polymorphism Database (SNP) – URL: www.snpedia.com.]
Крестинина Л.Ю., Силкин С.С., Микрюкова Л.Д., Елифанова С.Б., Аклеев А.В. Сравнительный анализ риска смерти от солидных злокачественных новообразований у населения, облучившегося на реке Теча и Восточно-Уральском радиоактивном следе. *Радиация и риск (Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра).* 2017;26(1):100-114. DOI 10.21870/0131-3878-2017-26-1-100-114.
[Krestinina L.Yu., Silkin S.S., Mikryukova L.D., Epifanova S.B., Akleyev A.V. Risk of death from solid cancer among residents of the Techa Riverside and the East Urals radioactive trace areas exposed to radiation: comparative analysis. *Radiatsiya i Risk = Radiation and Risk (Bulletin of the National Radiation and Epidemiological Registry).* 2017;26(1):100-114. DOI 10.21870/0131-3878-2017-26-1-100-114. (in Russian)]
Национальный центр биотехнологической информации (NCBI). – URL: www.ncbi.nlm.nih.gov.

- [National Center for Biotechnology Information (NCBI). – URL: www.ncbi.nlm.nih.gov. (in Russian)]
- Никифоров В.С., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Влияние комплекса факторов радиационной и нерадиационной природы на профиль транскрипционной активности генов у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. *Вопросы радиационной безопасности*. 2019;2(94):64-70.
- [Nikiforov V.S., Blinova E.A., Akleyev A.V. Influence of a combination of radiation and non-radiation factors on gene transcriptional activity profile in chronically exposed persons. *Voprosy Radiatsionnoy Bezopasnosti = Radiation Safety Issues*. 2019;2(94): 64-70. (in Russian)]
- Последствия радиоактивного загрязнения реки Теча. Под ред. А.В. Аклеева. Челябинск: Книга, 2016.
- [Akleyev A.V. (Ed.) The Consequences of Radioactive Pollution of the Techa River. Chelyabinsk: The Book Publ., 2016. (in Russian)]
- Портал для данных о генотипе HapMap. – URL: www.hapmap.ncbi.nlm.nih.gov.
- [HapMap Genotype Data Portal. – URL: www.hapmap.ncbi.nlm.nih.gov]
- Санитарные правила и нормативы СанПиН 2.6.1.2523-09. Нормы радиационной безопасности НРБ-99/2009 - п. 3.1.4.
- [Sanitary Regulations and Standards SanPiN 2.6.1.2523-09. Radiation Safety Standard-99/2009 (NRB-99/2009), p. 3.1.4 (in Russian)]
- Albanese J., Martens K., Karanitsa L.V., Schreyer S.K., Dainiak N. Multivariate analysis of low-dose radiation-associated changes in cytokine gene expression profiles using microarray technology. *Exp. Hematol.* 2007;35(4):47-54. DOI 10.1016/j.exphem.2007.01.012.
- Amundson S.A., Lee R., Koch-Paiz C.A. Differential responses of stress genes to low dose-rate gamma irradiation. *Mol. Cancer Res.* 2003;1(6):445-452.
- Azimian H., Bahreyni-Toossi M., Rezaei A., Rafatpanah H., Hamzehloei T., Fardid R. 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.
- Barnes P.J., Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336(15):1066-1071. DOI 10.1056/NEJM199704103361506.
- Bazyka D., Iliencko I., Sushko V., Loganovsky K., Lyashenko L., Golyarnik N., Lyaskivska O., Nechaev S., Shvayko L., Bazyka K., Pilinska M., Bezdobna L. Biological markers of external and internal exposure in shelter construction workers: a 13-year experience. *Radiat. Prot. Dosim.* 2018;182(1):146-153. DOI 10.1093/rpd/ncy128.
- Bhattacharya R., Rose P.W., Burley S.K., Prlić A. Impact of genetic variation on three dimensional structure and function of proteins. *PLoS One.* 2017;12(3):e0171355. DOI 10.1371/journal.pone.0171355.
- Brest P., Lapaquette P., Souidi M., Lebrigand K., Cesaro A., Vouret-Craviari V., Mari B., Barbry P., Mosnier J.F., Hebuterne X., Harel-Bellan A., Mograbi B., Darfeuille-Michaud A., Hofman P. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat. Genet.* 2011;43(3):242-245. DOI 10.1038/ng.762.
- Campbell T.M., Castro M.A.A., de Santiago L., Fletcher M.N.C., Hallim S., Prathalingam R., Ponder B.A.J., Meyer K.B. FGFR2 risk SNPs confer breast cancer risk by augmenting estrogen responsiveness. *Carcinogenesis*. 2016;37(8):741-750. DOI 10.1093/carcin/bgw065.
- Degteva M.O., Napier B.A., Tolstykh E.I., Shishkina E.A., Shagina N.B., Volchkova A.Y., Bougrov N.G., Smith M.A., Anspaugh L.R. Enhancements in the Techa River Dosimetry System: TRDS-2016D code for reconstruction of deterministic estimates of dose from environmental exposures. *Health Phys.* 2019;117(4):378-387. DOI 10.1097/HP.0000000000001067.
- Ding L.H., Shingyoji M., Chen F., Hwang J.J., Burma S., Lee C., Cheng J.F., Chen D.J. Gene expression profiles of normal human fibroblasts after exposure to ionizing radiation: A comparative study of low and high doses. *Radiat. Res.* 2005;164(1):17-26. DOI 10.1667/r3354.
- DuPage M., Bluestone J.A. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cell to treat immune-mediated disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2016;16(3): 149-163. DOI 10.1038/nri.2015.18.
- Fachin A.L., Mello S.S., Sandrin-Garcia P., Junta C.M., Ghilardi-Netto T., Donadi E.A., Passos G.A., Sakamoto-Hojo E.T. Gene expression profiles in radiation workers occupationally exposed to ionizing radiation. *J. Radiat. Res.* 2009;50(1):61-71. DOI 10.1269/jrr.08034.
- Iliencko I.N., Bazyka D.A. Overexpression of TP53, TP53I3 and BIRC5, alterations of gene regulation of apoptosis and aging of human immune cells in a remote period after radiation exposure. *Probl. Radiac. Med. Radiobiol.* 2016;21:238-246.
- Robert F., Pelletier J. Exploring the impact of single-nucleotide polymorphisms on translation. *Front. Genet.* 2018;9:507. DOI 10.3389/fgene.2018.00507.
- Schüz J., Deltour I., Krestinina L.Y., Tsareva Y.V., Tolstykh E.I., Sokolnikov M.E., Akleyev A.V. *In utero* exposure to radiation and haematological malignancies: pooled analysis of Southern Urals cohorts. *Br. J. Cancer.* 2017;116(1):126-133. DOI 10.1038/bjc.2016.373.
- Shastri B.S. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol. Biol.* (Clifton, N.J.). 2009;578:3-22. DOI 10.1007/978-1-60327-411-1_1.
- Tan H. The association between gene SNPs and cancer predisposition: Correlation or causality? *EBioMedicine.* 2017;16:8-9. DOI 10.1016/j.ebiom.2017.01.047.
- Visscher P.M., Brown M.A., McCarthy M.I., Yang J. Five years of GWAS discovery. *Am. J. Hum. Genet.* 2012;90(1):7-24. DOI 10.1016/j.ajhg.2011.11.029.
- Wang Y., Qiu C., Cui Q. A large-scale analysis of the relationship of synonymous SNPs changing microRNA regulation with functionality and disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(10):23545-23555. DOI 10.3390/ijms161023545.
- Woloschak G.E., Shearin-Jones P., Chang-Liu C.M. Effects of ionizing radiation on expression of genes encoding cytoskeletal elements: Kinetics and dose effects. *Mol. Carcinog.* 1990;3(6):374-378. DOI 10.1002/mc.2940030609.
- Wright J.B., Brown S.J., Cole M.D. Upregulation of c-MYC in cis through a large chromatin loop linked to a cancer risk-associated single-nucleotide polymorphism in colorectal cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 2010;30(6):1411-1420. DOI 10.1128/MCB.01384-09.
- Wyrobek A.J., Manohar C.F., Krishnan V.V., Nelson D.O., Furtao M.R., Bhattacharya M.S., Marchetti F., Coleman M.A. Low dose radiation response curves, networks and pathways in human lymphoblastoid cells exposed from 1 to 10 cGy of acute gamma radiation. *Mutat. Res.* 2011;722(2):119-130. DOI 10.1016/j.mrgentox.2011.03.002.

ORCID ID

E.A. Blinova orcid.org/0000-0002-2567-7945
V.S. Nikiforov orcid.org/0000-0002-6685-1823
M.A. Yanishevskaya orcid.org/0000-0002-2649-5123

Благодарности. Статья подготовлена в рамках выполнения Федеральной целевой программы «Оптимизация высокотехнологических методов, направленных на выявление медицинских последствий радиационных воздействий на персонал ПО «Маяк» и население Уральского региона», контракт № 27.501.19.2 от 08.07.2019 г.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 17.03.2020. После доработки 17.05.2020. Принята к публикации 19.05.2020.