

УДК: 576.32/.36:577.27:616.155:616-001.28

Д. А. Бази́ка, А. В. Кубашко✉, І. М. Ільєнко, О. А. Бе́ляєв, О. Я. Плескач

Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України”, 53, вул. Мельникова, м. Київ, 04050, Україна

ЕКСПРЕСІЯ БІЛКА CYCLIN D1 ТА ГЕНІВ *CCND1* І *PNKP* У МОНОНУКЛЕАРАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ УЧАСНИКІВ ЛІКВІДАЦІЇ НАСЛІДКІВ АВАРІЇ НА ЧАЕС З РІЗНИМ СТАНОМ ІМУНІТЕТУ

Мета. Дослідити зміни рівнів Cyclin D1+ клітин та асоційованих генів *CCND1* та *PNKP* у мононуклеарах периферичної крові в учасників ліквідації наслідків аварії (УЛНА) на ЧАЕС з різним імунним статусом в залежності від дози опромінення.

Матеріали і методи. Проаналізовано відносний рівень Cyclin D1+ клітин у мононуклеарах периферичної крові 39 УЛНА на ЧАЕС, чоловіків, опромінених у дозі у діапазоні 0,01–2,00 Гр. Імунологічний статус обстежених визначався за рівнем CD3/19, CD4/8, CD3/HLA-DR, CD3/16/56 методом проточної цитофлуориметрії та за вмістом Ig класів A,M,G методом імуноферментного аналізу у крові. Експресія генів *CCND1* та *PNKP*, які пов'язані з Cyclin D1, проводилось за методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Порівняння результатів здійснювалось із відповідними даними, отриманими від 18 здорових чоловіків, які не мали контакту з іонізуючим випромінюванням вище природного фону.

Результати. Показано, що відсоток Cyclin D1+ клітин збільшується за норму в осіб, опромінених у дозі > 0,1 Гр, та корелює з дозою опромінення ($r_s = 0,417$, $p = 0,048$). Відхилення рівня Cyclin D1+ клітин за межі контрольних значень пов'язується зі змінами в клітинній та гуморальній ланках імунітету. Зменшення відсотку Cyclin D1+ клітин за межі контрольних значень в УЛНА на ЧАЕС із дозою < 0,35 Гр супроводжується зниженням рівнів CD3+ та підвищенням CD3-16+56+ лімфоцитів; у осіб, опромінених у дозі > 0,35 Гр, збільшення відсотку Cyclin D1+ клітин асоціюється зі зниженням CD3+ та тенденцією щодо зниження CD3+16+56+ лімфоцитів у поєднанні зі збільшенням рівня IgG. Збільшення рівнів CD4+, CD19+, I_{reg}. та IgG супроводжується появою кореляційних зв'язків між Cyclin D1+ та CD3-16+56+ клітинами ($r_s = -0,872$, $p = 0,049$), Cyclin D1+ та CD8+ і IgG ($r_s = 0,683$, $p = 0,042$; $r_s = 0,809$, $p = 0,014$), Cyclin D1+ та CD4+ ($r_s = 0,602$, $p = 0,029$), Cyclin D1+ та CD19+ і IgM ($r_s = 0,604$, $p = 0,017$; $r_s = 0,538$, $p = 0,038$) відповідно. В УЛНА, опромінених у дозі > 0,1 Гр, фіксується зниження експресії генів *CCND1* та *PNKP* у супроводі появи негативних кореляційних зв'язків між RQ *PNKP* і дозою опромінення ($r_s = -0,638$, $p = 0,035$) та RQ *PNKP* і рівнем Cyclin D1+ клітин ($r_s = -0,792$, $p = 0,034$).

Висновки. Виявлені зміни вказують на радіаційно-асоційовані порушення експресії білка Cyclin D1 і регуляції асоційованих генів, що є ймовірним підґрунтям для комунікаційних порушень між клітинною та гуморальною ланками імунної системи і збільшує ризики реалізації стохастичних ефектів у вигляді формування онкопатології в УЛНА на ЧАЕС у віддаленому післяаварійному періоді.

Ключові слова: Cyclin D1, експресія *CCND1* та *PNKP* генів, клітинний та гуморальний імунітет, учасники ліквідації наслідків аварії на Чорнобильській АЕС.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2015. Вип. 20. С. 269–282.

✉ Кубашко Алла Володимирівна, e-mail: skygull11@yahoo.com

D. A. Bazyka, A. V. Kubashko✉, I. M. Ilyenko, O. A. Belyaev, O. J. Pleskach

State Institution "National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Melnykov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

Expression of Cyclin d1 protein and *CCND1* та *PNKP* genes in peripheral blood mononuclear cells in clean-up worker of Chernobyl accident with different state of immune system

Objective: to investigate the Cyclin D1+ cells levels changes, associated *CCND1* and *PNKP* genes in peripheral blood mononuclear cells in clean-up workers of Chernobyl accident with different state of immune system in depends on the dose irradiation.

Material and methods. Relative level of Cyclin D1+cells in peripheral blood mononuclears of 39 clean-up workers, men, irradiated in dose range 0.01–2.0 Gy have been analyzed. Immunological status of examinee' subjects was determined by CD3/19, CD4/8, CD3/HLA-DR, CD3/16/56 testing using flow cytometry method and Ig A,M,G testing by immunoenzymatic assay in blood. *CCND1* та *PNKP* gene expression, which associated with Cyclin D1 metabolism, was conducted using polymerase chain reaction (PCR) real time method. The obtained results were compared in relation to data from 18 healthy men, who had no contact with ionizing radiation over then nature background.

Results. Analyzed data of the nuclear controller of cell cycle – Cyclin D1 protein expression changes and related *CCND1* та *PNKP* genes in peripheral blood mononuclear cells in clean-up workers Chernobyl accident with different status of immune system in remote period after exposure is represented. It is shown, that in examinees' subjects exposed in dose > 0,1 Gy percentage of Cyclin D1+ cells is elevated against normal range and correlates with dose of radiation ($r_s = 0.417$, $p = 0.048$). Normal range deflation of relative amount of Cyclin D1+cells connects with changes in cellular and humoral immunity. Decline of relative amount of Cyclin D1+ cells below the control level following CD3+ lymphocytes decrease and CD3-16+56+ elevation in clean-up workers exposed in dose < 0.35 Gy. Increase of relative amount of Cyclin D1+ cells above the control range associates with CD3+ fall together with tendency of CD3+16+56+ lymphocytes fall that attends the IgG elevation in examinees' subjects with dose > 0.35 Gy. Percentage of Cyclin D1+ cells correlates with CD3-16+56+ ($r_s = -0.872$, $p = 0,049$), CD8+ and IgG ($r_s = 0,683$, $p = 0.042$; $r_s = 0.809$, $p = 0.014$), CD4+ ($r_s = 0.602$, $p = 0.029$), CD19+ and IgM ($r_s = 0.604$, $p = 0.017$; $r_s = 0.538$, $p = 0.038$) under condition of increased level CD4+, CD19+, I_{reg.} and IgG accordantly. Reveled decrease the *CCND1* and *PNKP* gene expression in clean-up workers exposed in dose > 0,1 Gy following appearance of correlation between (relative quantification) RQ *PNKP* and irradiation dose ($r_s = -0.638$, $p = 0.035$) and also with RQ *PNKP* and percentage of Cyclin D1+ cells ($r_s = -0.792$, $p = 0.034$).

Conclusions. Reveled changes in expression of Cyclin D1+ cells and regulation of related genes may point on possible radiation-associated firm molecular disturbances occurred during elimination of consequences of Chernobyl accident, that could be a potential basis for cell and humoral communicative links breach in immune system resulting in elevation of stochastic effects like oncopathology in clean-up workers of Chernobyl accident in remote period after exposure.

Key words: Cyclin D1, *CCND1* and *PNKP* gene expression, cell and humoral immunity, clean-up workers of Chernobyl accident.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2015;20:269–282.

ВСТУП

Результати моніторингу стану здоров'я постраждалих внаслідок Чорнобильської катастрофи свідчать про зростання (> 7 %) рівня захворюваності на соматичну патологію протягом останніх років. Експертний розгляд понад 294 815 медичних справ з 1989 року дозволив встановити, що розвиток непухлинних захворювань переважно нервової, бронхолегеневої, травної та системи кровообігу, а також онкопато-

INTRODUCTION

Results of health monitoring victims of Chernobyl disaster show the increase incidence (> 7 %) of somatic pathology for recent years. Expert examination more than 294,815 medical cases since 1989 revealed increase the development of non-neoplastic diseases mainly nervous, bronchopulmonary, digestive and circulatory system as well as cancer pathology include of the

логії, зокрема ендокринних та кровотворних органів безпосередньо пов'язується з дією іонізуючого випромінювання (ІВ) [1, 2].

На сьогодні відомо, що одним із клітинних ефектів ІВ є дестабілізація ДНК та порушення клітинного циклу. Білки родини циклінів при поєднанні у комплекс з іншими контролюючими факторами регулюють фазові переходи мітозу шляхом послідовної експресії та фосфорилювання специфічних “pocket proteins”.

В еукаріотичній клітині Cyclin D1 є першим з циклінів, який у відповідь на стимуляцію ростових і факторів транскрипції формує комплекси з Cyclin-залежними кіназами (Cdk) 4 і 6 та стимулює G1/S фазовий перехід. Cyclin D1/Cdk4 комплекс фосфорилює білок ретинобластоми (Rb), що сприяє вивільненню E2F фактора, який активує експресію необхідних генів і білків для переходу у S фазу. Реалізація E2F залежить від інтенсивності процесів фосфорилювання активних сайтів Rb, що в свою чергу пов'язується з концентрацією, функціональною активністю та терміном стабільності Cyclin D1, від чого залежить проходження клітиною першої “контрольної точки” циклу для подальшого синтезу ДНК [3].

В клітині Cyclin D1 стабільний лише ~24 хвилини. Його рівень збільшується у G1 фазі та продовжує зростати до моменту переходу клітини у S фазу, після чого відбувається його деградація 26S протеосомальним убіквітин-залежним шляхом та фосфорилюванням по Tyr286 залишку кіназою глікогенсинтази 3β (GSK-3β), яка сприяє вивільненню цього білка з ядра до цитоплазми. Активність GSK-3β може бути пригнічена сигналами, які послідовно залучають Ras, фосфатидилінозитол-3-ОН-кінази (PI3K), та протеїнкінази Akt шляхи, що визначає його деградацію як Ras-залежну та мітоген-регульовану. Фосфорилювання Cyclin D1 посилюється при зв'язуванні його у комплекс з CDK2, а мутація його залишку з Tyr286 на Ala (Tyr286A) посилює стабільність та дисметаболическу активність цього білка [4]. У високій концентрації Cyclin D1 гальмує синтез ДНК шляхом зв'язування з антигеном проліферуючих ядерних клітин (PCNA), скорочує термін G1 мітотичної фази, ініціює ампліфікацію ДНК та пов'язаний з дією ростових факторів (GF) апоптоз, стимулює циклін-залежні кінази інгібітори – p16, p27 та p21, активує естроген-залежну транскрипцію [5]. Новими знаннями в розумінні ролі Cyclin D1 у метаболізмі клітини є те, що за умов його гіперекспресії відбувається клітинна міграція та інвазія, посилюється ангіогенез, пригнічується мітохондріальний

endocrine and blood-forming organs that directly connects with the action of ionizing radiation (IR) [1, 2].

Nowadays, it is known that DNA destabilization and of the cell cycle impairment is one of the cellular effects of IR. Cyclin family proteins joined in complex with other factors regulate phase transition of cell cycle by sequential expression and phosphorylation of the specific “pocket proteins”.

Cyclin D1 is the first of cyclins in eukaryotic cell, which forms complexes with Cyclin-dependent kinases (Cdk) 4 and 6 and stimulates the G1/S phase transition in response to growth and transcription factors stimulation. Cyclin D1/Cdk4 phosphorylates retinoblastoma (Rb) protein, which promotes of E2F factor realizing that activates the genes and proteins expression necessary for the transition to the S phase. Deliverance of E2F depends on the intensity of phosphorylation of active Rb sites that associates with concentration and functional activity and term of Cyclin D1 stability influencing by turn on checkpoint control progression [3].

Cyclin D1 is stable ~24 minutes in cell. Its level increases in the G1 phase and continue growing up to point of cell's transition into S phase with followed degradation via the 26S ubiquitin-proteasome-dependents pathway and phosphorylation Tyr286 residue by glycogen synthase kinase 3β (GSK3β), which promotes realization of this protein from the nucleus the cytoplasm. Ras-, phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K), and protein kinase Akt signaling pathways can suppress GSK3β activity that determine the Cyclin D1 degradation as Ras-dependent and mitogen regulated. Formation of Cyclin D1/CDK2 complex provides enhancement of Cyclin D1 phosphorylation, and mutation of Tyr286 to Ala (Tyr286A) increases the stability and activity of this protein that forms dysmetabolic condition in cell [4]. At high concentrations Cyclin D1 inhibits DNA synthesis by binding to the proliferating nuclear cell antigen (PCNA), reduce the mitotic G1 phase, initiates amplification of DNA and growth factors (GF) associated apoptosis, stimulates cyclin-dependent kinase inhibitors – p16, p27 and p21, activates estrogen-dependent transcription [5]. The new knowledge in understanding of Cyclin D1 role in the cell's metabolism consist in that the it overexpression induces the cell migration and invasion, enhances angiogenesis,

метаболізм та хромосомна стабільність, посилюється чутливість ДНК до пошкодження та порушується її репарація [6]. Також з'являються дані про антигенні властивості Cyclin D1 за умов його гіперекспресії в клітинах різних типів. Експериментально показано, що синтезований шляхом стимуляції Т-лімфоцитів епітопний пептид HLA-DR.B1 надає CD4+ клітинам цитотоксичних властивостей у відповідь на гіперекспресію Cyclin D1 пухлиною та визначає його роль у протипухлинному імунітеті як цитотоксичного ефектора при онкогенній експресії HLA-DR [7].

Cyclin D1 кодується геном *CCND1* (11q13), який визнається як онкогенний маркер [8] та відіграє суттєву роль у розвитку раку молочних залоз, легень, прямої кишки, сечового міхура, печінки, аденоми парацитоподібної залози, меланоми, плоскоклітинної карциноми, лімфоми клітин мантії зони, мієлом [9]. Мутації та гіперекспресія цього гену, що асоціюється з порушеннями клітинного циклу, може призводити до туморогенезу та бути тригерним фактором у розвитку багатьох типів пухлин [10].

Проте залишаються питання щодо ролі ІВ у розвитку Cyclin D1-асоційованих імунодефіцитних станів як імовірного фактору ризику розвитку віддаленої неопластичної трансформації в опромінену організмі людини.

МЕТА

Мета дослідження – дослідити зміни рівнів Cyclin D1+ клітин та асоційованих генів *CCND1* та *PNKP* у мононуклеарах периферичної крові в учасників ліквідації наслідків аварії (УЛНА) на ЧАЕС з різним імунним статусом в залежності від дози опромінення.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ

В ході дослідження було проаналізовано відносний рівень Cyclin D1+ клітин у мононуклеарах периферичної крові (ПК) 39 УЛНА на ЧАЕС, чоловіків, віком ($58,31 \pm 4,95$) років, з різним імунологічним статусом, які знаходяться на обліку у Клініко-епідеміологічному реєстрі (КЕР) ДУ “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України” та проходили планове комплексне лікування. Всі обстежені мали радіаційний анамнез та коморбідну патологію органів серцево-судинної, нервової, гепатобіліарної систем хронічного перебігу без злоякісних новоутворень і апластичних трансформацій та розподілені на чотири групи залежно від дози зовнішнього оп-

inhibits mitochondrial metabolism, induces the chromosomal instability, enhances DNA damage sensing and DNA damage repair [6]. Appearing new data concerns of Cyclin D1 suggests that it overexpression led to enhance of its antigenic properties in the different types cells. Experimentally shown, that epitope's peptide HLA-DR.B1 synthesized by stimulating T lymphocytes provides CD4+ cells the cytotoxic properties in response to Cyclin D1 overexpression in tumor cells, which proves the role it protein as cytotoxic effector in HLA-DR oncogenic expression in antitumor immunity [7].

Gene *CCND1* (11q13) encoding Cyclin D1 is recognized as an oncogenic marker [8] and plays a significant role in the development of breast, lung, colon, bladder, liver cancer, parathyroid adenoma, melanoma, squamous cell carcinoma, mantle zone lymphoma, myeloma [9]. Mutations, amplification and overexpression of this gene is associated with cell cycle lesion, can lead to tumorigenesis and can be a trigger factor for many types of tumors [10].

However, the role of IR is not still clearly elucidated in the formation of Cyclin D1-associated of immunodeficiency different type as possible factor of remote neoplastic transformation after exposure.

OBJECTIVE

The objective of the study is to investigate the Cyclin D1+ cells levels changes, associated *CCND1* and *PNKP* genes in peripheral blood mononuclear cells in clean-up workers of Chernobyl accident with different state of immune system in depends on the dose irradiation.

MATERIAL AND METHODS

The analysis of Cyclin D1 positive cells relative level in peripheral blood (PB) mononuclears cells was carry out in 39 clean-up workers in the years 1986–1988, men, aged ($58,31 \pm 4,95$) years, with different immunological status are registered in the Clinical-Epidemiological Register (CER) SI “NRCRM NAMS of Ukraine” and took plane and complex treatment course. All examinee had radiation anamnesis and comorbid chronic pathology including cardiovascular, nervous, hepatobiliary systems without malignancy and aplastic transformation and were divided into four groups in depends on irradiation dose (D) documented in the personal medical cases. The 14 subjects exposed in

ромінення (D), задокументованої в історіях хвороб. До I групи увійшли 14 осіб, опромінених у дозовому діапазоні 0,001–0,099 Гр, II групу склали 8 осіб з дозою у межах 0,10–0,25 Гр, III групу – 14 осіб з дозою 0,26–0,99 Гр, IV групу склали 3 УЛНА, які перенесли гостру променеви хворобу (ГПХ) I-II ступеня та були опромінені у дозовому діапазоні 1,0–2,0 Гр. Контрольну групу сформовано з 18 практично здорових чоловіків, віком ($49,12 \pm 5,37$) років, у відповідності до вимог Міжнародної федерації клінічної хімії (IFCC) та які не мали контакту з ІВ вище природного фону.

Внутрішньоклітинна експресія Cyclin D1 оцінювалась за відносним рівнем Cyclin D1+ мононуклеарів у ПК, стабілізованій гепарином, які визначались методом проточної цитометрії (FACSCalibur, BD, США) з використанням FITC-мічених Mouse Anti-Human Cyclin D1 Monoclonal Antibodies (BD, Pharmingen) та Mouse IgG1 (BD, Pharmingen) в якості ізотопічного контролю до них. Підрахунок клітин проводили на 30 000 подій при довжині хвилі збудження 488 нм аргон-іонного лазера та його потужності 25 мВт. Коefіцієнт електронної компенсації спектру флуоресценції для FL-1 каналу становив 0,7 %.

Дослідження відносного рівня (RQ) експресії *CCND1* та *PNKP* генів, які пов'язані з Cyclin D1, проводилось за методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. РНК виділяли з мононуклеарів ПК на автоматичній станції QIAcube (QIAGEN, Germany) з використанням набору для виділення РНК – NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel, Germany). Синтез кДНК із зразків РНК проводили за допомогою High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). Ампліфікацію кДНК проведено за допомогою роботизованої системи 7900 HT FastReal-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) з використанням TagMan технології. Аналіз отриманих даних проведено із застосуванням програмного забезпечення SDS 2.3. Показники відносного рівня генної експресії (Relative Quantification – RQ) розраховували з використанням $\Delta\Delta Ct$ методу, де $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{ref}})_{\text{control}} - (Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{ref}})_{\text{irradiated}}$, та співвідношення рівняння дорівнює $2^{\Delta\Delta Ct}$.

Імунологічний статус УЛНА на ЧАЕС оцінювався за відносним рівнем лімфоцитів ПК з антигенами CD3/19, CD4/8, CD3/HLA-DR, CD3/16/56, які визначались за допомогою відповідних моноклональних антитіл (BD, США), мічених Fluorescein isothiocyanate (FITC) та Phycoerythrin (PE) флюорохромами методом проточної цитометрії (FACScan, BD, США) з урахуванням розрахункового імунорегуляторного індексу

the dose range 0,001–0,099 Gy were recruited into I group; 8 subjects with a dose in the range 0.10–0.25 Gy – into II group; 14 subjects with dose 0.26–0.99 Gy have consisted III group; three clean-up workers exposed in the dose range 1.7–2.0 Gy and underwent the acute radiation syndrome (ARS) 1–2 degree recruited into IV group. 18 healthy men aged (49.12 ± 5.37) years were included into control group in accordance with the requirements of the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) and who had no contact with IR above natural background level.

Intracellular expression of Cyclin D1 have evaluated by the relative level Cyclin D1+ cells in mononuclear cells in heparin-stabilized peripheral blood (PB) using flow cytometry (FACSCalibur, BD, USA) using FITC-stained Mouse Anti-Human Cyclin D1 Monoclonal Antibodies (BD Pharmingen) and Mouse IgG1 (BD Pharmingen) as isotopic control. Cell counting conducted using argon-ion laser with excitation wavelength 488 nm and its power 25 mV on 30,000 events. Compensation coefficient of fluorescence spectrum for FL-1 channel was 0.7%.

The study of the relative quantification (RQ) of gene expression *CCND1* and *PNKP* (DNA repair gene) were carried out using PCR real time method. RNA was isolated from PB mononuclears in automatic station QIAcube (QIAGEN, Germany) using the RNA isolation kit – NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel, Germany). The cDNA synthesis from RNA samples was carried out by High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). cDNA amplification conducted by the robotic system 7900 HT FastReal-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) using TagMan technology. Data analysis was conducted using the SDS 2.3 software. Relative levels of gene expression – RQ were calculated by the method of $\Delta\Delta Ct$, where $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{ref}})_{\text{control}} - (Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{ref}})_{\text{irradiated}}$, and the equation ratio is $2^{\Delta\Delta Ct}$.

Immunological status of clean-up workers was determined by the relative level of PB lymphocytes with antigens CD3/19, CD4/8, CD3/HLA-DR, CD3/16/56 using monoclonal antibodies (BD, USA) conjugated with either fluorescein isothiocyanate (FITC) or phycoerythrin (PE) by flow cytometry (FACScan, BD, USA) taking into account the computed immunoregulatory index

(I_{reg.}) – CD4+/CD8+. Вміст Ig класів G, M, A у ПК визначали імуноферментним методом за допомогою мікропланшетного рідера LabLine-022 (Австрія) з використанням наборів реагентів фірми “Гранум”, Україна.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою статистичного пакету Statistica 8.0 StatSoft. Inc. 1998–2007 pp.

Проводився описовий аналіз кожної вибірки з розрахунком середнього значення (M) та стандартної похибки (m) [4]. Порівняння двох незалежних сукупностей проводилось за непараметричним тестом – U-тест Манна-Уїтні (U-test Mann-Whitney), більше двох виборок – за тестом Крускала Уоліса ANOVA за ранками (Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks). Значущими розбіжностями вважались при значеннях коефіцієнта достовірності $p < 0,05$, $p < 0,01$ та $p < 0,001$. Розмах нормальних значень у контрольній групі вважався у межах ($M \pm 1\sigma$). Характер зв'язку між змінними показників визначався шляхом розрахунку коефіцієнта кореляції Spearman (r_s) [11].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Стан клітинного та гуморального імунітету в УЛНА на ЧАЕС у віддаленому післяаварійному періоді

Виявлено, що в групах УЛНА на ЧАЕС, розподілених за дозою опромінення, зміни у клітинній та гуморальній ланках імунної системи мали ознаки порушення імунологічної реактивності. Відмічено, що в опроміненіх осіб у $D < 0,10$ Гр відбувалось зниження рівня I_{reg.} за рахунок нижчого у 1,28 раза за контрольні значення відсотку CD4+ ($p = 0,007$). Проте в опроміненіх у діапазоні доз 0,1–1,0 Гр спостерігалась лише тенденція щодо зниження рівня I_{reg.}, що асоціювалось із пригніченням рівня CD3+16+56+ лімфоцитів. Відсоток останніх був достовірно нижчим у 2,22 раза ($p = 0,044$) за норму лише в III групі обстежених. У осіб II та III груп зазначені зміни супроводжувались збільшеним рівнем сироваткових IgA та IgG відносно контролю у 1,22 ($p = 0,012$) та 1,61 раза ($p < 0,0001$), відповідно. Це на фоні млявої експресії з боку CD19+, є ознакою імунодерегуляції, яка характеризується гальмуванням відповіді з боку В-клітинного ланцюга і може призводити до порушення механізмів антитілоутворення та елімінації патогена. Ймовірно, у осіб, які були опромінені у $D < 0,10$ Гр, ці події пов'язані з дією радіаційного чинника, оскільки у них знайдені значущі кореляційні зв'язки малої потужності між CD4+ та дозою опромінення на рівні ($r_s = 0,394$, $p = 0,017$), що може бути непрямим доказом радіаційно-асоційованих змін у рецепторно-розпіз-

(I_{reg.}) – CD4+/CD8+. Ig G, M, A classes PB content determined by ELISA kit (“Granum”, Ukraine) using microplate reader LabLine-022 (Austria).

Statistical analysis of the data was performed using the statistical package Statistica 8.0 StatSoft. Inc. 1998-2007.

Choice of method for data analysis included a n approach of descriptive statistics of each variable with calculation of the mean (M) and standard error mean (m) [4], nonparametric Mann-Whitney U-test – for comparison of two independent variables, Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks – for comparison more than two variables. Significant differences were considered at the values $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$. The normal values range was accepted within range ($M \pm 1\sigma$) [11]. Relation between variables was assayed by means of correlation analysis using coefficient of Spearman (r_s).

RESULTS AND DISCUSSION

Cellular and humoral immunity state in clean-up workers of Chernobyl accident in the remote period

The obtained data shown that the cellular and humoral links of immune system state in clean-up workers of Chernobyl accident had signs of immunological reactivity disorders. In exposed subjects in $D < 0.10$ Gy noted I_{reg.} fall due to a lower percentage of CD4 + in 1.28 times ($p = 0.007$) against control values. However in irradiated subjects in the dose range 0.10-1.00 Gy observed only a trend in decreasing I_{reg.}, that was associated with inhibition of CD3+16+56+ lymphocytes. The level of these cells was significantly lower in 2.22 times ($p = 0.044$) in compare the norm only in the third group of examinees. The subjects of II and III groups have similar changes accompanied by increased levels of serum IgG and IgA in compare to the control group in 1.22 times ($p = 0.012$) and 1.61 times ($p < 0.0001$) respectively, that on a ground of inefficient CD19+cell expression, could be explained as immunoderegulation sign, which characterizes by B-cell response inhibition resulting in impairment of antibody production mechanisms and pathogen elimination. Probably, in individuals who were exposed to doses < 0.10 Gy, this events associated with the action of radiation factor, as found significant correlations between CD4+ and dose ($r_s = 0.394$; $p = 0.017$), which may be indirect evidence of radiation-associated

навальному апараті імунокомпетентних клітин [12] (табл. 1).

changes in receptor-recognition apparatus of immunocompetent cells [12] (Table 1).

Таблиця 1

Стан клітинного та гуморального імунітету в групах УЛНА на ЧАЕС з різними діапазонами доз у віддаленому періоді після опромінення

Table 1

Cellular and humoral immunity in groups of clean-up workers with different dose ranges in the remote period after irradiation

Показники Indices	Групи / groups					
	Контрольна Control n=18		I (0<D<0,10) Гр/Гу n=14	II (0,10<D<0,25) Гр/Гу n=7	III (0,25<D<0,99) Гр/Гу n=13	IV (1,0<D<2,0) Гр/Гу n=3
	M±m	δ	M±m	M±m	M±m	M±m
Клітинного імунітету / cellular immunity						
CD3+19-, %	67,68 ± 1,71	7,26	62,46 ± 2,98	60,57 ± 3,67	65,18 ± 3,12	69,27 ± 7,98
CD3-19+, %	7,47 ± 0,70	2,95	9,11 ± 1,34	8,11 ± 1,32	7,03 ± 0,95	7,60 ± 2,46
CD4+8-, %	38,06 ± 1,96	8,32	29,81 ± 1,93**	38,24 ± 3,62 ¹	38,52 ± 1,92 ¹¹	43,93 ± 6,93
CD4-8+, %	29,04 ± 2,41	10,23	32,07 ± 2,86	25,08 ± 1,85	31,88 ± 2,16 ²	20,43 ± 3,03 ³
I _{reg.} , ум.од. / SU	1,51 ± 0,17	0,73	1,05 ± 0,13*	1,57 ± 0,18 ¹	1,33 ± 0,15	2,35 ± 0,68 ^{1,3}
CD3+HLA-DR+, %	4,92 ± 1,00	4,25	5,76 ± 1,10	5,93 ± 1,03	6,83 ± 1,20	8,13 ± 5,31
CD3+16+56+, %	10,88 ± 2,34	9,94	12,99 ± 2,05	6,41 ± 1,29 ¹	4,90 ± 0,75 ^{*,11}	9,50 ± 2,89
CD3-16+56+, %	15,95 ± 1,79	7,60	18,41 ± 2,49	21,85 ± 2,45	16,96 ± 2,35	16,20 ± 6,00
Гуморального імунітету / humoral immunity						
Ig A, г/л (g/L)	2,25 ± 0,60	0,26	3,04 ± 0,42	2,52 ± 0,40	2,85 ± 0,23*	1,84 ± 0,07 ^{*,3}
Ig G, г/л (g/L)	7,69 ± 0,24	1,04	9,64 ± 1,49	12,93 ± 1,41**	12,07 ± 1,50***	9,62 ± 1,49
Ig M, г/л (g/L)	0,96 ± 0,06	0,26	0,99 ± 0,10	1,04 ± 0,16	0,90 ± 0,06	0,94 ± 0,13

Примітки. *, **, *** – достовірна відмінність від контрольної групи (p < 0,05; p < 0,01; p < 0,001, відповідно) за U-test Mann-Whitney;

^{1,11} – достовірна відмінність від I групи (p < 0,05; p < 0,01 відповідно) за U-test Mann-Whitney;

² – достовірна відмінність від II групи (p < 0,05) за U-test Mann-Whitney;

³ – достовірна відмінність від III групи (p < 0,05) за U-test Mann-Whitney.

Notes. *, **, *** – significant difference against the control group (p<0.05; p<0.01; p<0.001 respectively) by Mann-Whitney U-test;

^{1,11} – significant difference against I group (p<0.05; p<0.01 respectively) by Mann-Whitney U-test;

² – significant difference against II group (p<0.05) by Mann-Whitney U-test;

³ – significant difference against III group (p < 0.05) by Mann-Whitney U-test.

Експресія білка Cyclin D1 та генів CCND1 і PNKP залежно від дозового навантаження в УЛНА на ЧАЕС з різним імунологічним статусом

За даними рангового тесту Kruskal-Wallis для більше двох вибірок відсоток Суclin D1+ клітин у групах УЛНА був достовірно різним. Виявлено, що рівень Суclin D1+ клітин в ПК УЛНА на ЧАЕС, опроміненних у D > 0,10 Гр був значно вищий відносно контролю: у II групі – у 1,50 раза (p = 0,003), у III – у 1,74 раза (p = 0,0008), а в УЛНА з перенесеною ГПХ, рівень цих клітин був у межах значень II та III груп (рис. 1).

В ході кореляційного аналізу було знайдено, що рівень Суclin D1+ мононуклеарів ПК позитивно пов'язувався з дозою опромінення – r_s = 0,417, p = 0,048. Найпотужніші зв'язки спостерігалися в групі УЛНА, опроміненних у дозах < 0,25 Гр (рис. 2).

Cyclin D1 protein expression and CCND1 and PNKP genes depending on accumulated dose in clean-up workers with different immunological status

Cyclin D1 levels in groups of clean-up workers was significant different by Kruskal-Wallis rank test. In clean-up workers of Chornobyl accident exposed in dose D > 0.10 Gy relative content of PB Cyclin D1+ cells was significantly higher vs. control group: in 1.50 times (p = 0.003) in the II group and in 1.74 times (p = 0.0008) in III group, whereas the percentage of these cells were at the level of II and III groups in clean-up workers who overcame ARS (Figure 1).

Correlation analysis data have shown that Cyclin D1+ of PB mononuclears positively associated with dose – r_s = 0.417, p = 0.048. The strongest correlation was found in the group of clean-up workers exposed in doses < 0.25 Gy (Figure 2).

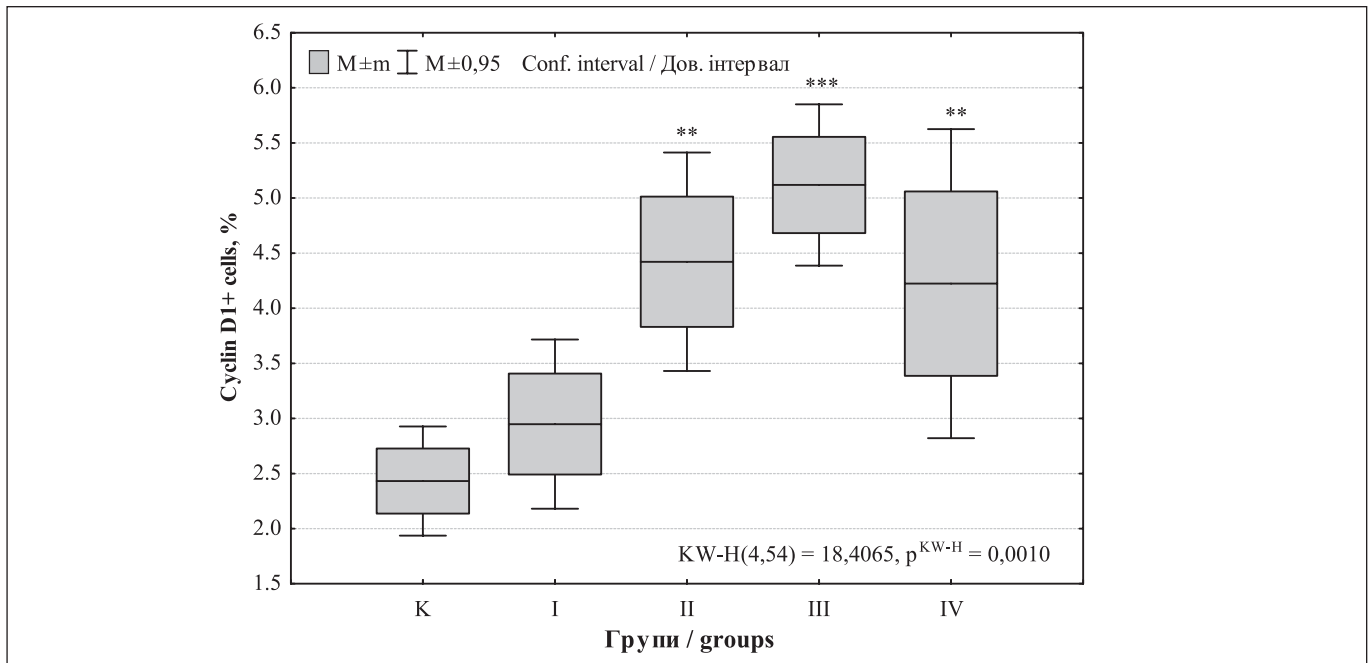


Рисунок 1. Відсоток Cyclin D1+ клітин у периферичній крові УЛНА на ЧАЕС, розподілених на групи за різними діапазонами доз у віддалений період після опромінення: I – ($D < 0,1$) Гр ($n = 13$); II – ($0,10 \leq D < 0,25$) Гр ($n = 7$); III – ($0,25 \leq D < 1,00$) Гр ($n = 13$); IV – ($1,0 \leq D \leq 2,0$) Гр ($n = 3$); K – контрольна група ($n = 18$).

Примітки. **,*** – достовірна відмінність від контрольної групи ($p_k \leq 0,01$; $p_k \leq 0,001$, відповідно) за U-test Mann-Whitney; p^{KW-H} – значущість за ранговим тестом Kruskal-Wallis ANOVA.

Figure 1. Cyclin D1+ cells percentage in peripheral blood in clean-up workers distributed into groups depends on different dose ranges in the remote period after irradiation: I – ($D < 0.1$) Gy, ($n = 13$); II – ($0.1 \leq D < 0.25$) Gy, ($n = 7$); III – ($0.25 \leq D < 1.00$) Gy, ($n = 13$); IV – ($1.0 \leq D \leq 2.0$) Gy, ($n = 3$); K – control group ($n = 18$).

Notes. **,*** – significant difference against control group ($p \leq 0.01$; $p \leq 0.001$ respectively) by Mann-Whitney U-test; p^{KW-H} – significance by Kruskal-Wallis ANOVA test by Ranks.

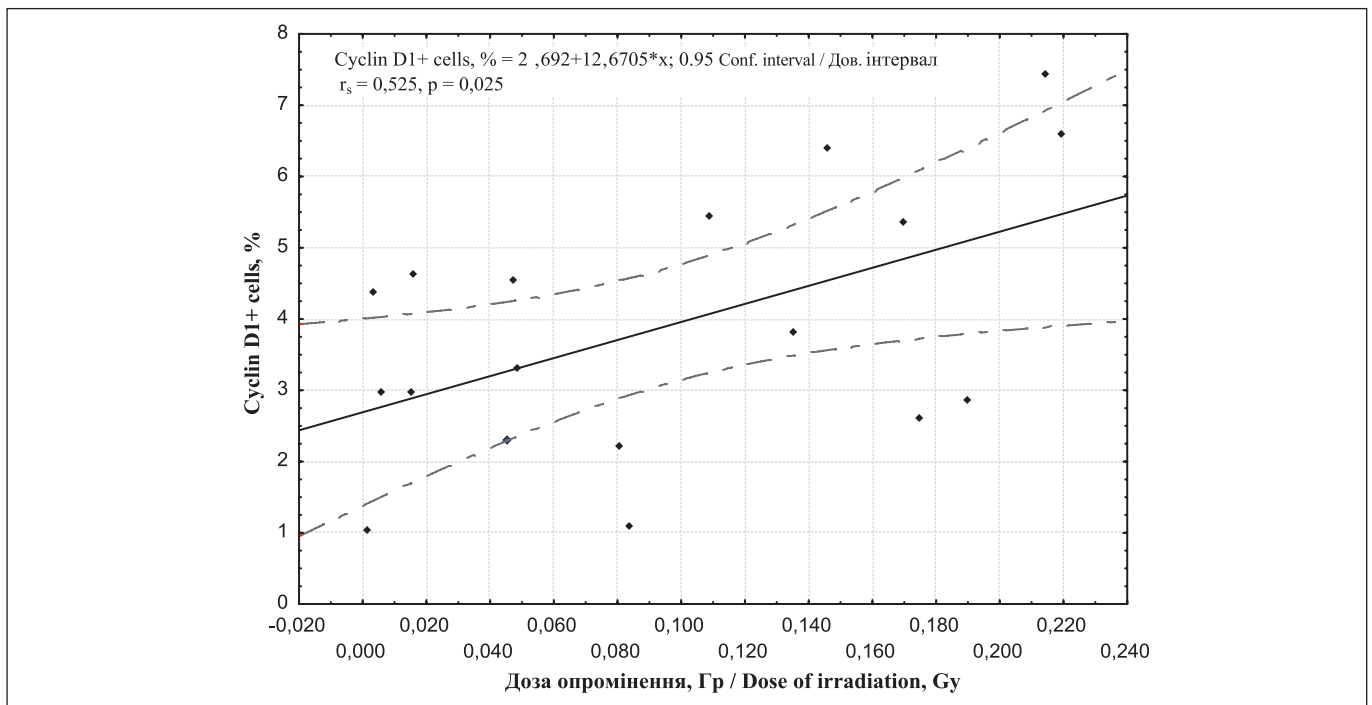


Рисунок 2. Кореляційна залежність між відсотком Cyclin D1+ клітин та дозою в ПК УЛПА на ЧАЕС, опроміненіх у дозі $D < 0,25$ Гр.

Figure 2. Correlation between the Cyclin D1+ PB mononuclears level and dose in clean-up workers of Chernobyl accident exposed in the dose range 0,001–0,25 Gy.

При дослідженні змін показників клітинної та гуморальної ланок імунної системи УЛНА при відхиленні рівня Cyclin D1+ клітин за межі показників в контрольній групі ($M \pm m$, $(2,38 \pm 0,22) \%$ при значенні $\delta = 0,90$), було виявлено, що зниження відсотку Cyclin D1+ клітин за нижню межу контрольних значень ($M-\delta$) спостерігалось у 9 осіб, опромінених у дозі $D < 0,35$ Гр. У них знайдено зниження рівня відсотку CD3+ та підвищення CD3-16+56+ лімфоцитів за норму в 1,22 раза ($p = 0,029$) та 1,70 раза ($p = 0,044$), відповідно, і спостерігалась тенденція щодо збільшення рівня сироваткових Ig класу G.

У 21 опроміненого УЛНА з більшим дозовим навантаженням відмічено підвищення відсотку CyclinD1+ клітин за верхню межу контрольних значень ($M+\delta$). У них знайдено зменшення відсотків CD3+ лімфоцитів у 1,10 раза ($p = 0,046$) у супроводі тенденцій щодо зниження CD3+16+56+ лімфоцитів на тлі значно підвищеного, порівняно з контролем, рівня IgG у 1,46 раза ($p = 0,004$). Між собою групи відрізнялись лише за рівнем CD3-16+56+ клітин (табл. 2).

У 9 УЛНА відсоток Cyclin D1+ клітин і показники клітинного та гуморального імунітету були у межах контрольних значень.

Дослідження зв'язків між рівнем Cyclin D1+ клітин ПК і показниками клітинного та гуморально-го імунітету показало, що при збільшеному, порівняно з нормою, відсотку CD4+ клітин ($\geq 46,38 \%$, $M+\delta$, $n = 7$) в УЛНА на ЧАЕС з'являлися зворотні кореляційні зв'язки між Cyclin D1+ та CD3-16+56+ клітинами – $r_s = -0,872$, $p = 0,049$. При відхиленні рівня I_{reg} до збільшення ($\geq 1,54$ ум.од., M , $n = 13$) відсоток Cyclin D1+ клітин пов'язувався з CD4+ клітинами – $r_s = 0,602$, $p = 0,029$. При збільшенні відсотку CD19+ ($\geq 10,42 \%$, $M+\delta$, $n = 9$), рівень Cyclin D1+ корелював зі значною силою з CD8+ та IgG – $r_s = 0,683$, $p = 0,042$ і $r_s = 0,809$, $p = 0,014$, відповідно, при цьому збільшення рівня IgG (10 г/л, $M+\delta$, $n = 15$) асоціювалось із появою кореляційних зв'язків між Cyclin D1+ і CD19+ клітинами та IgM – $r_s = 0,604$, $p = 0,017$ та $r_s = 0,538$, $p = 0,038$, відповідно. Проте в контрольній групі не було виявлено подібних зв'язків.

Отримані дані свідчать про те, що в УЛНА на ЧАЕС формування імунної відповіді на ендogenous та/або екзогенний подразники пов'язується зі збільшенням рівня Cyclin D1+ клітин. Це є ознакою розладу механізмів клітинного циклу, що може слугувати поштовхом для перенапруження імунної системи,

Investigation of changes in cellular and humoral immune system of clean-up workers is shown that deflation of the relative amount of Cyclin D1+cells out of normal range ($M \pm m$, $(2.38 \pm 0.22) \%$ at a value of $\delta = 0,90$) connects with particular changes in cell and humoral immunity. It was found that in 9 examinee exposed in $D < 0.35$ Gy decline of the CyclinD1+ cells percentage below normal range ($M-\delta$) associates with of CD3+ percentage fall and CD3-16+56+ rise in 1.22 times ($p = 0.029$) and 1.70 times ($p = 0.044$) respectively against control that accompanies the tendency to increase of serum Ig G class.

In 21 clean-up workers exposed to radiation doses $D > 0.35$ Gy reviled increased percentage of Cyclin D1+cells percentage upper of control range ($M + \delta$). It is associated with decreased level of CD3 + lymphocytes in 1.10 times ($p = 0.046$) attended by reduce of CD3+16+56+ lymphocytes level tendency on the background of significantly increased level of IgG in 1.46 times ($p = 0.004$) against control. All groups have difference between each other at value of CD3-16+56+ cells (Table 2).

The level of Cyclin D1+ cells and of cellular and humoral immunity indexes was within normal range in 9 clean-up workers of Chornobyl accident.

By correlation analysis shown that PB Cyclin D1+ mononuclears percentage associates with indexes of cellular and humoral immunity. At higher percentage of CD4+ cells than normal ($\geq 46.38\%$, $M+\delta$, $n = 7$) the correlation was appearing between Cyclin D1+ and CD3-16+56+ cells ($r_s = -0.872$, $p = 0.049$). The percentage of PB Cyclin D1+ cells correlated with CD4+ ($r_s = 0.602$, $p = 0.029$) at increase level of I_{reg} ($\geq 1,54$ units, M , $n = 13$). Percentage of PB Cyclin D1+ cells correlates with CD8+ and IgG ($r_s = 0.683$, $p = 0.042$ and $r_s = 0.809$, $p = 0.014$ respectively) at rice of CD19+ percentage ($\geq 10.42\%$, $M+\delta$, $n = 9$). At the same time, increase the level of IgG (i 10 g/l, $M+\delta$, $n = 15$) connects with the appearance of correlations between Cyclin D1+ and CD19+ cells and IgM as well ($r_s = 0.604$, $p = 0.017$ and $r_s = 0.538$, $p = 0.038$ respectively). However, there were no similar correlations in the control group.

Obtained data confirm that forming of immunological response to endogenous and/or exogenous stimuli in clean-up workers of Chornobyl accident associates with increasing levels Cyclin D1 + cells. It could be a sign of cell cycle mechanisms disorder resulting in immune system overstrain, com-

Таблиця 2

Показники клітинного та гуморального імунітету в УЛНА на ЧАЕС і контрольній групі залежно від відхилень відсотків Cyclin D1+ клітин за норму

Table 2

Cellular and humoral immunity indexes in groups of clean-up workers and control in depends on Cyclin D1+ cells percentage deflection of normal range

Показники Indices	Групи УЛНА залежно від відхилення відносного рівня Cyclin D1+ клітин за контроль (M±1δ) Groups of the clean-up workers depending on Cyclin D1+ cell deviation against control (M±1δ)			
	Контрольна Control n=18		I відсоток Cyclin D1+ клітин <1,48 %, n=9	II відсоток Cyclin D1+ клітин >3,28%, n=21
	M±m	δ	M±m	M±m
Доза опромінення, Гр Radiation dose, Gy	–	–	0,14 ± 0,10	0,47 ± 0,14
Клітинного імунітету / cellular immunity				
CD3+19-, %	67,68 ± 1,71	7,26	55,47 ± 3,37*	62,05 ± 1,56*
CD3-19+, %	7,47 ± 0,70	2,95	9,20 ± 2,35	8,32 ± 0,81
CD4+8-, %	38,06 ± 1,96	8,32	33,9 ± 2,65	37,41 ± 2,33
CD4-8+, %	29,04 ± 2,41	10,23	24,50 ± 3,57	27,88 ± 2,01
Ireg., ум.од.	1,51 ± 0,17	0,73	1,44 ± 0,23	1,51 ± 0,17
CD3+HLA-R+, %	4,92 ± 1,00	4,25	4,03 ± 0,96	6,02 ± 1,12
CD3+16+56+, %	10,88 ± 2,34	9,94	9,13 ± 3,19	7,21 ± 1,34
CD3-16+56+, %	15,95 ± 1,79	7,60	27,10 ± 4,70* [#]	18,77 ± 1,57
Гуморального імунітету / humoral immunity				
Ig A, г/л	2,25 ± 0,60	0,26	2,87 ± 0,49	2,82 ± 0,29
Ig G, г/л	7,69 ± 0,24	1,04	9,83 ± 1,39	11,24 ± 0,89**
Ig M, г/л	0,96 ± 0,06	0,26	0,92 ± 0,12	1,04 ± 0,09

Примітки. *, **, *** – достовірна відмінність від контрольної групи (p < 0,05; p < 0,01, відповідно) за U-test Mann-Whitney;

[#] – достовірна відмінність від II групи (p < 0,05) за U-test Mann-Whitney.

Notes. *, **, *** – significant difference against the control group (p < 0.05; p < 0.01 respectively) by Mann-Whitney U-test;

[#] – significant difference against II group (p < 0.05) by Mann-Whitney U-test.

порушення комунікаційних зв'язків між окремими її ланками, та, як наслідок, розвитку клітинного стресу. Ймовірно, формування таких залежностей пов'язано з тривалим функціонуванням радіаційно нерепарованої компоненти на тлі кіназно-незалежної нестабільності геному [10].

Для пошуку доказів цього припущення проведено аналіз відносного рівня експресії гена *CCND1*, що кодує білок Cyclin D1, та *PNKP* гена, який задіяний у репарації ДНК внаслідок її окисної деструкції в мононуклеарах ПК у 13 УЛНА на ЧАЕС у віддаленому післяаварійному періоді, які були розподілені на дві групи: до I увійшло 6 осіб, опромінених у дозах в межах (0,06 ± 0,02) Гр, до II – 7 осіб з дозою (0,23 ± 0,03) Гр.

Знайдено, що експресія *CCND1* і *PNKP* генів у мононуклеарах ПК УЛНА змінювалась залежно від дозового навантаження, отриманого під час ліквідації наслідків Чорнобильської катастрофи. Ви-

municative links damage between individual units that leads to cellular stress. Formation of such links probably associates with prolonged function of radiation induced not repaired components on a ground of kinase-independent genomic instability [10].

The analysis of relative levels expression of gene *CCND1*, coding Cyclin D1 protein, and gene *PNKP*, involved in oxidative DNA damage repair, was carried out in PB mononuclears in 13 clean-up workers in a remote post-accident period, who were divided into two groups: 6 subjects exposed in dose range (0.06 ± 0.02) Gy were recruited in I group, 7 subjects with dose (0.23 ± 0.03) Gy – into II group for research the evidences of this assumption.

The *CCND1* and *PNKP* gene expression changed in clean-up workers in remote period after exposure depending on dose received under the Chernobyl accident clean-up work. It was found,

явлено, що середні значення RQ *CCND1* та RQ *PNKP* генів були нижчими у II групі обстежених УЛНА відносно I у 10,57 ($p = 0,141$) і у 7,39 рази ($p = 0,013$), відповідно (рис. 3). RQ гена *PNKP* зворотно корелював із дозою опромінення ($r_s = -0,638$, $p = 0,035$) та з рівнем Cyclin D1+ клітин ($r_s = -0,792$, $p = 0,034$).

that RQ mean of *CCND1* and *PNKP* genes was lower in II group of clean-up workers against I in 10.57 times ($p = 0.141$) and 7.39 times ($p = 0.013$) respectively (Figure 3). RQ *PNKP* gene negative correlated with dose ($r_s = -0.638$, $p = 0.035$) and with Cyclin D1 + cells ($r_s = -0.792$, $p = 0.034$).

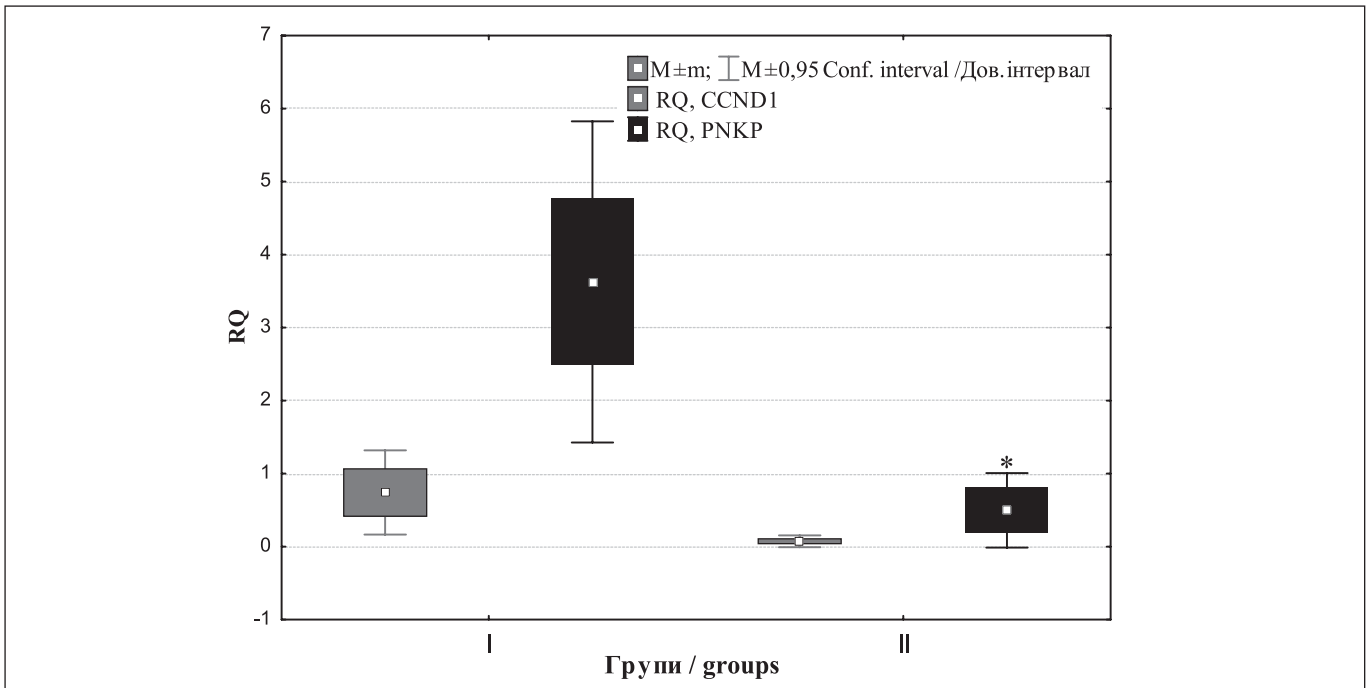


Рисунок 3. Експресія генів *CCND1* та *PNKP* у мононуклеарах периферичної крові в УЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення, розподілених на групи за різними діапазонами доз: I – ($D < 0,1$) Гр, ($n=6$); II – ($0,1 \leq D < 0,4$) Гр, ($n=7$).

Примітка. * – достовірна відмінність від I групи ($p \leq 0,05$) за U-test Mann-Whitney.

Figure 3. *CCND1* and *PNKP* gene expression in peripheral blood mononuclears in clean-up workers of the Chernobyl accident in the remote period after irradiation, distributed into groups in depends on dose ranges: I - ($D < 0.1$) Gy ($n = 6$); II - ($0.1 \leq D < 0.4$) Gy ($n = 7$).

Note. * – significant difference against II group ($p < 0.05$) by Mann-Whitney U-test.

Отримані дані узгоджуються з сучасними уявленнями про те, що зміни в експресії генів, які контролюють клітинний цикл, призводять до порушення його сигнального контролю, що може бути наслідком радіаційного пошкодження. Експериментально показано, що при однократному опроміненні культури клітин у дозі > 10 Гр відбувається протеосомальна убіквітин-залежна деградація Cyclin D1 та сигнальний арешт клітинного циклу мутованим атаксія-телангіектазивним шляхом (ATM) [13]. При короткостроковому фракційному опроміненні культури клітин HepG2 and HeLa у дозі 0,5 Gy відбувається гіперекспресія Cyclin D1 без ампліфікації *CCND1* гена [14]. При сумарному опроміненні в дозі 6 Гр протягом 9 днів у експериментальних тварин фіксується значуще збільшений рівень Cyclin D1 mRNA на тлі зменшення кількості гранулоцитів ($p < 0,05$) у порівнянні з неопроміненими твари-

Obtained data reconcile with modern results of researches about changes in genes expression control cellcycle signaling, affection of that could be outcome of IR influence. Experimental investigation shown, that single irradiation of culture cell in a dose > 10 Gy initiate proteasomal ubiquitin-dependent Cyclin D1 degradation and signal ataxia-telangiectasia mutated (ATM) dependent cell cycle arrest [13]. Short-term fractional irradiation HepG2 and HeLa culture cell in dose 0,5 Gy initiates of Cyclin D1 overexpression without *CCND1* gene amplification. Irradiation of experimental animals in cumulative dose 6 Gy induce rise level of Cyclin D1 mRNA against the background of granulocytes number decrease ($p < 0.05$) in compare with group of non-irradiated animals, that determines Cyclin D1 as an addi-

нами, що визначає Cyclin D1 як додатковий фактор формування радіоіндукованої імуносупресії [15].

Білок (Polynucleotide Kinase 3'-Phosphatase) гена *PNKP* 19q13.33 локусу каталізує 5' фосфорилування та 3' дефосфорилування нуклеїнових кислот у відповідь на дію ІВ та окисний стрес, в тому числі й радіоіндукований. Він бере участь у шляхах негомологічного приєднання кінців ДНК і відновлення видалених її основ та залучається у механізми кіназно-пов'язаної регуляції клітинного циклу при проходженні G1 фазової контрольної точки мітозу. Мутація цього гена асоціюється з незворотними неврологічними розладами – мікроцефалією, невиліковними нападами та затримкою розвитку [16]. *PNKP*-залежний механізм репарації ДНК істотно чутливий до радіаційного ушкодження. Показано, що ІВ активує фосфорилування *PNKP* білка по *Syr114* та *Syr126* залишках АТМ-залежним та ДНК-протеїнкіназними шляхами, тим самим ініціює його відновлювальну дію щодо одно- та дволанцюгових розривів ДНК. Проте мутації білка *in vitro* по цих амінокислотних сайтах пригнічує ДНК-кіназну та фосфатазну активність і знижує його афінність до ДНК [17], а експресія *PNKP* гена є необхідним механізмом репарації розривів ДНК, ініційованих окисним стресом [18], що збільшує стійкість клітин щодо окисного пошкодження ДНК.

Таким чином, виявлені зміни свідчать, що в УЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозі > 0,1 Гр, у віддаленому післяаварійному періоді наслідки опромінення зберігають свою значимість у порушеннях експресії Cyclin D1, які асоціюються з напруженням імункомпенсаторних механізмів у супроводі гіпоекспресії генів *CCND1* і *PNKP* та появи стрес-залежних цитопатологічних зв'язків, що збільшує ризики розвитку пухлинної патології.

ВИСНОВКИ

1. В УЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозі > 0,1 Гр, зафіксовано збільшення відсотку Cyclin D1+ клітин у мононуклеарах периферичної крові відносно контролю, яке має дозозалежний характер. Рівень Cyclin D1+ клітин в УЛНА на ЧАЕС кореляційно пов'язується з дозою опромінення ($r_s = 0,417$, $p = 0,048$), що є ознакою асоційованого з дозою порушення механізмів клітинного циклу.
2. Відхилення рівня Cyclin D1+ клітин у периферичній крові УЛНА на ЧАЕС за межі контрольних значень пов'язується зі станом клітинного та гуморального імунітету. Зменшення відсотку Cyclin D1+ клітин у осіб, опромінених в дозі < 0,35 Гр, супроводжується зниженням відсотків CD3+ та

tional factor of radiation induced immunosuppression [15].

Protein (Polynucleotide Kinase 3'-Phosphatase) *PNKP* gene (19q13.33) catalyzes nucleic acids 5' phosphorylation and 3' phosphorylation in response to oxidative stress include radiation-induced. It involves in DNA non-homologous end-joining and discarded its bases restoring pathways and involved in kinase-related regulation of the cell cycle checkpoint control and mitotic G1/S transition. Mutation of this gene is associated with irreversible neurological disorders – microcephaly, incurable attacks and developmental delay [16]. *PNKP*-dependent mechanism of DNA repair significantly sensitive to radiation damage. It is shown, that IR activates *PNKP* protein phosphorylation on *Syr114* *Syr126* residues by ATM-dependent protein kinase and DNA protein-kinase pathways, thereby initiates its renewing action toward single- and double-stranded DNA breaks. This protein mutation on these aminoacid sites *in vitro* inhibits it DNA kinase and phosphatase activity and reduces its affinity to DNA [17], and *PNKP* gene expression is a necessary mechanism of DNA repair in respond to oxidative stress, which increases cell resistance to oxidative DNA damage [18].

Thus, the detected changes indicate that consequences of IR exposure at doses over 0.1 Gy in the Chernobyl accident clean-up workers remain significant in affection of Cyclin D1 expression, which associates with strain in immunocompensatory mechanisms following *CCND1* and *PNKP* genes hypoexpression and appearance of cytopathological stress-dependent bonds, that can increase a risks of tumorigenesis.

CONCLUSIONS

1. The increased level of peripheral blood Cyclin D1+ mononuclears have been registered in clean-up workers of Chernobyl accident exposed in doses > 0.1 Gy against control on dose-dependent manner. Cyclin D1 + cells percentage correlates with dose ($r_s = 0.417$, $p = 0.048$) in these subjects, that could be a sign of radiation-associated cell cycle mechanism impairment.
2. Deflection of normal range the peripheral blood Cyclin D1+ cells level in clean-up workers from connects with the state of cellular and humoral immunity. Decline of Cyclin D1+ cells relative amount below the control level accompanies as CD3+ lymphocytes decrease as CD3-16+56+ ele-

підвищенням CD3-16+56+ лімфоцитів; збільшення відсотку Cyclin D1+ клітин, яке виявлено в опромінених у дозі > 0,35 Гр, асоціюється зі зниженням CD3+ та тенденцією щодо зниження CD3+16+56+ лімфоцитів у поєднанні зі збільшенням рівня IgG.

3. Збільшення за норму рівнів CD4+, CD19+, I_{reg} та IgG супроводжується появою кореляційних зв'язків між Cyclin D1+ та CD3-16+56+ клітинами ($r_s = -0,872$, $p = 0,049$), Cyclin D1+ та CD8+ і IgG ($r_s = 0,683$, $p = 0,042$; $r_s = 0,809$, $p = 0,014$), Cyclin D1+ та CD4+ ($r_s = 0,602$, $p = 0,029$), Cyclin D1+ та CD19+ і IgM ($r_s = 0,604$, $p = 0,017$; $r_s = 0,538$, $p = 0,038$), відповідно, що збільшує ймовірність порушення механізмів клітинної комунікації, антитілоутворення та елімінації патогена.

4. В УЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозі > 0,1 Гр, виявлено зниження відносного рівня експресії генів *CCND1* та *PNKP* на фоні появи негативних кореляційних зв'язків між RQ *PNKP* і дозою опромінення ($r_s = -0,638$, $p = 0,035$) та RQ *PNKP* і рівнем Cyclin D1+ клітин ($r_s = -0,792$, $p = 0,034$), що вказує на наявність стійких радіаційно-пов'язаних Cyclin D1-залежних змін в механізмах G1/S фазового переходу клітинного циклу на тлі ознак пригнічення процесів репарації.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Міністерство охорони здоров'я України. Прес-реліз до 27-ї роковини Чорнобильської катастрофи до парламентських слухань на тему: "Про стан, заходи та перспективи подолання Чорнобильської катастрофи" [Електронний ресурс]. – Київ, 2013. – 6 р. – Режим доступу : komekolog.rada.gov.ua/.../document?id=47067
2. Бузунов В. О. Непухлинна захворюваність та смертність учасників ліквідації аварії на ЧАЕС / В. О. Бузунов, В. М. Терещенко, Н. І. Стрій // Медичні наслідки аварії на Чорнобильській атомній станції / за ред. О. Ф. Возіанова, В. Г. Бебешка, Д. А. Базики. – К. : ДІА, 2007. – С. 422–436.
3. Копнин Б. П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза / Б. П. Копнин // Биохимия. – 2000. – Т. 65, вып. 1. – С. 5–33.
4. Diehl J. A. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway / J. A. Diehl, F. Zindy, C. J. Sherr // *Genes Dev.* – 1997. – Vol. 11, no. 8. – P. 957–972.
5. Fukami-Kobayashi J. Cyclin D1 inhibits cell proliferation through binding to PCNA and cdk2 / J. Fukami-Kobayashi, Y. Mitsui // *Exp. Cell Res.* – 1999. – Vol. 246, no. 2. – P. 338–347.
6. Pestell R. G. New roles of cyclin D1 / R. G. Pestell // *Am. J. Pathol.* – 2013. – Vol. 183, no. 1. – P. 3–9.
7. Identification of a human cyclin D1-derived peptide that induces human cytotoxic CD4 T cells / T. Dao, T. Korontsvit, V. Zakhaleva [et al.] // *PLoS One.* – 2009. – Vol. 4, no. 8. – P. e6730.

variation in clean-up workers exposed in dose < 0,35 Gy. Increase of Cyclin D1+ cells relative amount above the control range associates with CD3+ fall together with tendency to fall of CD3+16+56+ lymphocytes that attends the IgG elevation in examinees' subjects with dose >0,35 Gy.

3. Increased CD4+, CD19+, I_{reg}, IgG levels is followed by onset of correlations between Cyclin D1+ and CD3-16+56+cells ($r_s = -0.872$, $p = 0.049$), Cyclin D1+ and CD8+ and also IgG ($r_s = 0.683$, $p = 0.042$; $r_s = 0.809$, $p = 0.014$), Cyclin D1+ and CD4+ ($r_s = 0.602$, $p = 0.029$), Cyclin D1+ and CD19+ and IgM ($r_s = 0.604$, $p = 0.017$; $r_s = 0.538$, $p = 0.038$) correspondently, which increases the likelihood of cell communication and also antibody production and pathogen elimination mechanisms impairment.

4. The hypoexpression of *CCND1* and *PNKP* genes in following of negative correlations between RQ *PNKP* and dose ($r_s = -0,638$, $p = 0,035$) and between RQ *PNKP* and Cyclin D1+ cells level ($r_s = -0,792$, $p = 0,034$) is found in clean-up workers exposed in doses > 0.1 Gy, that points on presence of Cyclin D1-dependent changes in mechanisms of G1/S phase transition on a ground of reparation process damage signs that are associated with ionizing radiation influences.

REFERENCES

1. The Ministry of Health of Ukraine. [Press-release: 27-years after Chernobyl tragedy for Parliament proceedings entitled: About state, actions and perspectives of Chernobyl disaster remedial consequences] [Internet]. Kyiv; 2013. 6 p. Available from: komekolog.rada.gov.ua/.../document?id=47067. Ukrainian.
2. Buzunov VO, Tereshchenko VM, Strij NI. [Non-tumor morbidity and mortality rate in clean-up workers of Chernobyl accident]. In: Vozianov AF, Bebeshko VG, Bazyka DA, editors. [Medical consequences of the accident in Chernobyl nuclear power plant]. Kyiv: DIA; 2007. p. 422-36. Ukrainian.
3. Koptin BP. [Oncogene and tumor suppressor targets: key to understanding base mechanisms of cancerogenesis]. *Biochemistry (Moscow)*. 2000;65(1):5-33. Russian.
4. Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 1997;11(8):957-72.
5. Fukami-Kobayashi J, Mitsui Y. Cyclin D1 inhibits cell proliferation through binding to PCNA and cdk2. *Exp Cell Res.* 1999;246(2):338-47.
6. Pestell RG. New roles of cyclin D1. *Am J Pathol.* 2013; 183(1):3-9.
7. Dao T, Korontsvit T, Zakhaleva V, Haro K, Packin J, Scheinberg DA. Identification of a human cyclin D1-derived peptide that

8. Cyclin D as a therapeutic target in cancer / E. A. Musgrove, C. E. Caldon, J. Barraclough [et al.] // *Nat. Rev. Cancer.* – 2011. – Vol. 11, no. 8. – P. 558–572.
9. Overview of cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape: past and present / M. C. Casimiro, M. Velasco-Velazquez, C. Aguirre-Alvarado, R. G. Pestell // *Expert. Opin. Investig. Drugs.* – 2014. – Vol. 23, no. 3. – P. 295–304.
10. Cyclin D as a therapeutic target in cancer / E. A. Musgrove, C. E. Caldon, J. Barraclough [et al.] // *Nat. Rev. Cancer.* – 2011. – Vol. 11. – P. 558–572.
11. Ланг Т. А. Как описывать статистику в медицине. Аннотированное руководство для авторов, редакторов и рецензентов / Т. А. Ланг, М. Сесик ; пер. с англ. под ред. В. П. Леонова // М. : Практическая медицина, 2011. – 480 с.
12. Borghesi L. From B cell to plasma cell / L. Borghesi, C. Milcarek // *Immunol. Res.* – 2006. – Vol. 36, no. 1-3. – P. 27–32.
13. Santra M. K. F-box protein FBXO31 mediates cyclin D1 degradation to induce G1 arrest after DNA damage / M. K. Santra, N. Wajapeyee, M. R. Green // *Nature.* – 2009. – Vol. 459. – P. 722–725.
14. Acquired radioresistance of human tumor cells by DNA-PK/AKT/GSK3beta-mediated cyclin D1 overexpression / T. Shimura, S. Kakuda, Y. Ochiai [et al.] // *Oncogene.* – 2010. – Vol. 29. – P. 4826–4837.
15. Effect of the Jianpi Bushen Prescription on expressions of the Wnt3a and Cyclin D1 genes in radiation-damaged mice / D. C. He, J. J. Xiao, Y. Zhang [et al.] // *Genet. Mol. Res.* – 2013. – Vol. 12, no. 4. – P. 4137–4146.
16. Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair / J. Shen, E. C. Gilmore, C. A. Marshall [et al.] // *Nat. Genet.* – 2010. – Vol. 42, no. 3. – P. 245–249.
17. Phosphorylation of polynucleotide kinase/phosphatase by DNA-dependent protein kinase and ataxia-telangiectasia mutated regulates its association with sites of DNA damage / A. E. Zolner, I. Abdou, R. Ye [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – Vol. 39, no. 21. – P. 9224–9237.
18. Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage / A. Jilani, D. Ramotar, C. Slack [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, no. 34. – P. 24176–24186.
- induces human cytotoxic CD4 T cells. *PLoS One.* 2009 Aug 25;4(8):e6730. doi: 10.1371/journal.pone.0006730.
8. Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011 Jul 7;11(8):558-72. doi: 10.1038/nrc3090.
9. Casimiro MC, Velasco-Velazquez M, Aguirre-Alvarado C, Pestell RG. Overview of cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape: past and present. *Expert Opin Investig Drugs.* 2014;23(3):295-304.
10. The role of cyclin D1 in response to long-term exposure to ionizing radiation / T. Shimura, M. Fukumoto, N. Kunugita // *Cell Cycle* - 2013. - Vol.12, Issue 17 - P. 2738-2743.
11. Lang TA, Secic M. How to report statistics in medicine: Annotated guidelines for authors, editors and reviewers. Second ed. Philadelphia: American College of Physicians; 2006. 490 p.
12. Borghesi L, Milcarek C. From B cell to plasma cell. *Immunol Res.* 2006;36(1-3):27-32.
13. Santra MK, Wajapeyee N, Green MR. F-box protein FBXO31 mediates cyclin D1 degradation to induce G1 arrest after DNA damage. *Nature.* 2009 Jun 4;459(7247):722-5. doi: 10.1038/nature08011.
14. Shimura T, Kakuda S, Ochiai Y, Nakagawa H, Kuwahara Y, Takai Y, et al. Acquired radioresistance of human tumor cells by DNA-PK/AKT/GSK3beta-mediated cyclin D1 overexpression. *Oncogene.* 2010 Aug 26;29(34):4826-37. doi: 10.1038/onc.2010.238.
15. He DC, Xiao JJ, Zhang Y, Lin H, Ding XJ, Tu Y. Effect of the Jianpi Bushen Prescription on expressions of the Wnt3a and Cyclin D1 genes in radiation-damaged mice. *Genet Mol Res.* 2013 Oct 3;12(4):4137-46. doi: 10.4238/2013.
16. Shen J, Gilmore EC, Marshall CA, Haddadin M, Reynolds JJ, Eyaid W, et al. Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA. *Nat Genet.* 2010;42(3):245-9.
17. Zolner AE, Abdou I, Ye R, Mani RS, Fanta M, Yu Y, et al. Phosphorylation of polynucleotide kinase/phosphatase by DNA-dependent protein kinase and ataxia-telangiectasia mutated regulates its association with sites of DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2011 Nov;39(21):9224-37. doi: 10.1093/nar/gkr647.
18. Jilani A, Ramotar D, Slack C, Ong C, Yang XM, Scherer SW, et al. Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage. *J Biol Chem.* 1999;274(34):24176-86.

Стаття надійшла до редакції 2.09.2015

Received: 2.09.2015