

# ТЕОРЕТИЧНА МЕДИЦИНА

“Журнал НАМН України”, 2016, т. 22, № 2. — С. 123-134.

УДК 612.112:616.15-093:616-001.28

Д. А. Бази́ка, І. М. Ільєнко

Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України”, 04050 Київ

## ЗВ’ЯЗОК ГЕННОЇ РЕГУЛЯЦІЇ ДОВЖИНИ ТЕЛОМЕР, КЛІТИННОЇ ПРОЛІФЕРАЦІЇ ТА АПОПТОЗУ З ДОЗОЮ ОПРОМІНЕННЯ У ВІДДАЛЕНОМУ ПЕРІОДІ ПІСЛЯ ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ КАТАСТРОФИ\*

Метою роботи було визначити особливості модифікуючого впливу іонізуючого випромінювання на генну регуляцію апоптозу, проліферації та клітинного старіння в імунній системі на транскрипційно-трансляційному рівнях у віддаленому періоді після опромінення у широкому діапазоні доз. Досліджено 387 осіб (77 практично здорових осіб; 310 учасників ЛНА на ЧАЕС 1986-87 рр.). У роботі використані імунологічні (аналіз субпопуляційного складу та поверхневого фенотипу імунокомпетентних клітин периферичної крові, диференційний аналіз апоптозу за Анексин-V тестом, аналіз рівня експресії про- та антиапоптотичних протеїнів (*CD95*, *Bcl-2*) за допомогою проточної цитометрії) і молекулярно-генетичні (аналіз відносного рівня експресії генів-регуляторів довжини теломер та апоптозу методом ПЛР у реальному часі, flow-FISH аналіз відносної довжини теломер лімфоцитів периферичної крові) методи дослідження. У віддаленому періоді після опромінення в результаті Чорнобильської катастрофи встановлено системні та дозозалежні порушення генної регуляції апоптозу, старіння та проліферації імунокомпетентних клітин периферичної крові учасників ЛНА на ЧАЕС, які є основою розвитку незавершеності процесу апоптозу зі зниженням числа клітин як на ранніх, так і пізніх його стадіях, що проявляється в зниженні експресії фосфатидилсерину (найбільшою мірою вказані зміни визначаються після опромінення у дозах понад 500 мЗв), клітинного старіння та зростання TERT-пов’язаного ризику трансформації імунокомпетентних клітин, порушення циклін-кіназної регуляції клітинного циклу та диференціювання, при дозах опромінення вище 100 мЗв збереження радіогенних мутацій T-клітинних рецепторів та збереження імунологічної недостатності.

**Ключові слова:** іонізуюча радіація, експресія генів, теломери, апоптоз, імунна система, Чорнобиль.

Оцінка внеску радіаційно-індукованого ураження геному людини в реалізацію медичних наслідків опромінення людини у різні строки після радіаційного впливу залишається одним з пріоритетних напрямків радіобіологічних досліджень щодо механізмів ушкоджуючої дії іонізуючого випромінювання (ІВ) на організм людини. Наукові та клінічні дослідження, що проводились протягом післяава-

рійного періоду, свідчать, що значне зростання загальносоматичної та онкологічної патології може бути наслідком індукованої ІВ дестабілізації геному людини. Дисрегуляція генної регуляції відповідно може модифікувати клітинно-тканинні процеси, які є фундаментальними у життєдіяльності клітини [5]. До таких процесів відносяться вікові порушення у клітинній фізіології (регуляція

Д. А. Бази́ка — генеральний директор, чл.-кор. НАМН України  
І. М. Ільєнко — с.н.с., лабораторії імуноцитології, к.б.н. (ilyenko@ukr.net)

© Д. А. Бази́ка, І. М. Ільєнко, 2016.

\* — за матеріалами доповіді на міжнародній науковій конференції “Радіологічні та медичні наслідки Чорнобильської катастрофи — тридцять років по тому” (Київ, 18-19 квітня 2016 р.).

довжини теломер), зупинка клітинного росту та апоптогична загибель клітини, компенсаторна проліферація та канцерогенез.

Порушення генної регуляції апоптозу описано як наслідок впливу низки ендо- та екзогенних факторів, в т.ч. ІВ [1]. Генна регуляція апоптозу — це тонко налаштований процес балансу про- та антиапоптотичних механізмів, а кінцевий шлях апоптозу регулюється чітко визначеними генами. Ключовим серед них вважається *TP53*, який відповідає за регуляцію клітинного циклу та у немутованому стані виконує функцію супресора злоякісної трансформації [7]. Вплив посилювачів та інгібіторів апоптозу може проявляти себе або безпосередньо впливаючи на механізми загибелі клітини, або опосередковано — шляхом впливу на регуляцію транскрипції [2]. Тому необхідним є дослідження модифікуючого впливу ІВ на системні порушення генної регуляції апоптозу на транскрипційному та трансляційному рівнях у віддаленому пострадіаційному періоді.

Наявність радіаційного старіння у постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС відноситься до найбільш контроверсійних аспектів біологічних ефектів дії ІВ. Прискорене старіння встановлено в учасників ЛНА на ЧАЕС, зокрема, за показниками системи кровообігу [6]. В інших роботах із старінням пов'язують всі порушення імунної системи, підвищення захворюваності на аутоімунний тиреоїдит, алергічні захворювання та астму, які постійно зростають в забрудненій зоні у післяаварійний період [4]. В учасників ЛНА на ЧАЕС показано укорочення теломерних послідовностей в лейкоцитах периферичної крові (ПК) у віддаленому періоді після опромінення [3]. Вказані зміни не можуть вважатися остаточно доведеними.

Тридцятирічний досвід вивчення механізмів дії ІВ на організм людини показує перспективність визначення біологічних індикаторів та маркерів дози опромінення, клінічних ефектів віддаленого періоду та індивідуальних особливостей радіочутливості. Важливу роль може відігравати встановлення генетичного “підпису” у геномі людини, який залишає ІВ. На цьому тлі визначення особливостей генної регуляції процесів апоптозу, проліферації та клітинного старіння на транскрипційному та трансляційному рівнях у віддаленому періоді після Чорнобильської катастрофи є актуальним як з наукової так і медичної точки зору.

Метою роботи було визначити особливості модифікуючого впливу іонізуючого випромінювання на генну регуляцію апоптозу, довжину теломер та активацію імунокомпетентних клітин у віддаленому періоді після опромінення.

## Матеріал і методи

Матеріалом для проведення імунологічних та молекулярно-генетичних досліджень були лейкоцити ПК 387 осіб, обстежених у віддаленому періоді після опромінення у діапазоні малих та середніх доз та неопромінених осіб, з яких сформовано групи обстеження: основну та контрольну. Основну групу обстеження становили 310 чоловіків учасників ЛНА на ЧАЕС 1986-1987 рр. віком ( $55,4 \pm 0,7$ ) років ( $M \pm m$ ), які проходили комплексне обстеження у клінічних відділеннях та у поліклініці радіаційного реєстру ДУ “ННЦРМ НАМН України” за програмою Клініко-епідеміологічного реєстру (КЕР) та мали задокументовані дози зовнішнього опромінення в анамнезі, які були надані КЕР та валідизовані у відділі дозиметрії та радіаційної гігієни ДУ “ННЦРМ НАМН України”. Середня доза зовнішнього опромінення групи учасників ЛНА на ЧАЕС становила ( $360,82 \pm 32,32$ ) мЗв ( $M \pm m$ ). Індивідуальні інтегральні дози опромінення основної групи коливались в межах від 1,00 мЗв до 3100 мЗв. Основна група обстеження була розподілена на 3 підгрупи в залежності від дози зовнішнього опромінення ( $D$ ): I підгрупа —  $0 < D \leq 100$  мЗв, II підгрупа —  $100 < D \leq 500$  мЗв, III підгрупа —  $D > 500$  мЗв. Серед осіб III підгрупи, 31 учасника ЛНА на ЧАЕС (10,0 % загальної кількості) було опромінено у дозах понад 1000 мЗв — ( $1883,50 \pm 95,57$ ) мЗв ( $M \pm m$ ).

До контрольної групи увійшли 77 неопроміненіх осіб віком ( $52,9 \pm 6,0$ ) років ( $M \pm m$ ). Особи контрольної групи не брали участі у ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС і не мешкали на радіоактивно забруднених територіях. Критеріями включення до контрольної групи були відсутність тяжких інфекційних та пухлинних захворювань та рівень гематологічних і імунологічних показників у межах вікових норм.

У дослідженні були використані імунологічні та молекулярно-генетичні методи дослідження (табл. 1).

Таблиця 1

### Методи дослідження

Імунологічні методи	Молекулярно-генетичні методи
<b>Проточна цитометрія</b> - Аналіз субпопуляційного складу та поверхневого фенотипу ІКК ПК. - Диференційний аналіз апоптозу за Анексин-V тестом. - Аналіз рівня експресії про- та антиапоптотичних протеїнів (CD95, Bcl-2).	<b>ПЛР у реальному часі, flow-FISH</b> - Аналіз відносного рівня експресії генів-регуляторів довжини теломер та апоптозу. - Аналіз відносної довжини теломер лімфоцитів ПК.

Аналіз субпопуляційного складу та поверхневого фенотипу імунокомпетентних клітин (ІКК)

ПК досліджено методом проточної цитофлуориметрії у прямому імунофлуоресцентному тесті за допомогою панелі моноклональних антитіл (МКАТ) (*Becton Dickinson (BD)*, США) методом дво- та триколірного аналізу. Біозразки ПК відбирали з ліктьової вени у пробірці з гепаріном у концентрації 20 од/мл. Імуноцитофлуориметричний аналіз клітин ПК проводили за п'ятьма параметрами: два показника світлорозсіювання клітин: *FSC (Forward Side Scatter)* — показник прямого світлорозсіювання (визначення розміру клітин) та ортогональний *SSC (90°) (Side Scatter)* — показник бокового світлорозсіювання (характеристика оптичної щільності цитоплазми клітин, характеру клітинних включень та гранулярності клітини); три канали детекції специфічного флуоресцентного сигналу на різній довжині хвилі: *FL1, FL2, FL3*.

За показниками світлорозсіювання проводили диференціювання субпопуляцій лейкоцитів — лімфоцити, моноцити та гранулоцити. Панель МКАТ включала: *CD3/19, CD4/8/3, CD3/HLA-DR, CD3/16/56, CD4/25, CD3/4/45, CD34/38*, які були мічені двома/трьома флуорохромами: флуорисцеїн ізотіоціанатом (*FITC*), фікоеритрином (*PE*) та перидінінхлорофіл-протеїном (*PerCP Cy5,5*). Контролем були флуоресцентні мікросфери “*Calibrite*” (*BD*, США), мічені флуоресцентними мітками *FITC, PE, PerCP Cy5,5* та МКАТ до імуноглобулінів миші. Аналіз проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі *FACSCalibur (BD)*, США при реєстрації збудження флуоресценції при довжині хвилі 488 нм.

Оцінка апоптозу лімфоцитів ПК проводили за експресією проапоптотичних та антиапоптотичних білків (*CD95* та *Bcl-2*, відповідно). Поверхневу експресію *CD95* антигена (*BD*, США) на лейкоцитах гепаринізованої ПК досліджували у прямому імунофлуоресцентному тесті методом проточної цитофлуориметрії. Внутрішньоклітинну експресію антиапоптотичного білка *Bcl-2 (BD)*, США у лейкоцитах ПК проводили шляхом пермабілізаційного забарвлення.

Диференційний аналіз спонтанного апоптозу проводили за допомогою системи для визначення перебудов клітинних мембран, які є характерною ознакою програмованої клітинної загибелі — *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD)*, США та лазерної проточної цитометрії. Для диференціювання життєздатних клітин, клітин раннього та пізнього апоптозу використовували комбінацію *Annexin V* та пропідію йодиду (*PI*), що давало змогу кількісно та якісно оцінити процеси апоптозу.

Визначення відносної довжини теломер (*RTL*) проводили за допомогою методики *flow-FISH* (флуоресцентної гібридизації *in situ* з використанням проточної цитометрії) та набору *Telomere PNA Kit/FITC (DakoCytomation)*, Данія). Набір

рекомендовано для визначення відносної довжини теломер в ядерних гемопоетичних клітинах із використанням зв'язаних із флуоресцеїном зразків пептидної нуклеїнової кислоти (*PNA*). Методика підготовки зразків складалась з таких етапів: попередня обробка, денатурація, гібридизація (1-й день); промивання, фарбування ДНК, аналіз (2-й день). В якості контрольних клітин, була використана лінія лейкемічних клітин *K562* із довжиною теломер *6,5 kb* та триплоїним каріотипом (“Клітинний банк ліній з тканин людини та тварин”, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України).

Зразки, які гібридизуються з пробою *PNA* міченою *FITC*, мають показувати флуоресцентний сигнал по *FL1*, який вищий, ніж фоновий/аутофлуоресцентний сигнал, отриманий від зразків таких самих клітин, але гібридизованих за допомогою гібридизаційного розчину без проби *PNA*. Аналіз проводився у режимі *dot plot: FL1—H/FL3—H*. Відокремлення лімфоцитів проводилось за світлооптичними характеристиками *FSC* та *SSC* (прямого та бокового світлорозсіювання). Робочі гейти були виділені як для дослідних клітин (лімфоцити ПК людини), так і для контрольних (кордові клітини) клітини у  $G_{0/1}$  фазі. *RTL* була розрахована за формулою

$$RTL = \frac{FL1 \text{ дослідн. клітин із PNA зондом} - FL1 \text{ дослідн. клітин без PNA зонда}}{FL1 \text{ контр. клітин із PNA зондом} - FL1 \text{ контр. клітин без PNA зонда}} \times 100.$$

Підготовку зразків проводили з використанням термошейкера *TS100 (Biosan)*, Латвія із подальшим аналізом на лазерному проточному цитофлуориметрі *FACSCalibur (BD)*, США).

В роботі проведено визначення відносного рівня експресії таких 22 генів: *TP53, TP53I3, BIRC5, DDB2, NFKB1, TGFBR1, TERT, TERF1, TERF2, BRCA1, VEGFA, MKNK2, CDKN1B, CDKN2A, CCND1, CDKN1A, FASLG, MADD, BAX, MAPK14, NFKB2, CSF2*. Дизайн мікропроточних плашок із специфічними наборами праймер/зонд розроблений у відповідності із поставленими завданнями роботи. Характеристику кожного з вищезазначених генів подано, на підставі даних Національного центру біотехнологічної інформації (*NCBI*) та бази даних “*TaqMan*”-конфігурацій, розроблених та запропонованих фірмою виробником (*Applied Biosystems*, США) [8, 9] (табл. 2). В якості референсного був використаний 18S ген рибосомальної РНК (рРНК) (*ID Assay Hs99999901\_s1*).

Дослідження генної експресії проводили за допомогою ПЛР у реальному часі з використанням

Таблиця 2

Характеристика генів, використаних для дослідження генної експресії методом ПЛР у реальному часі та "TaqMan"-технології

Символ гена	Білок, що кодується геном	Символ гена	Білок, що кодується геном
<i>TP53</i> Hs00153340_m1	Онкопротеїн p53	<i>MKNK2</i> Hs00179671_m1	MAP кіназу взаємодії серін/треонін кінazi 2
<i>TP53I3</i> Hs00153280_m1	Онкопротеїн p53, що індукує протеїн 3	<i>CDKN1B</i> Hs00153277_m1	Інгібітор циклін-залежної кінazi 1B (p27, Kip1)
<i>BIRC5</i> Hs03063352_s1	Бакуловірусний інгібітор апоптозних повторів 5	<i>CDKN2A</i> Hs00923894_m1	Інгібітор циклін-залежної кінazi 2A
<i>DDB2</i> Hs03044953_m1	Ген, що кодує білок 2, пов'язаний з ушкодженням ДНК	<i>CCND1</i> Hs00277039_m1	Циклін D1
<i>NFKB1</i> Hs00765730_m1	Ядерний фактор κВ-клітин 1	<i>CDKN1A</i> Hs00355782_m1	Інгібітор циклін-залежної кінazi (p21, Cip1)
<i>TGFBR1</i> Hs00610318_m1	трансформуючий фактор росту, β-рецептор 1	<i>FASLG</i> Hs00181225_m1	Fas-ліганд (родина TNF)
<i>TERT</i> Hs00972646_m1	ген, який кодує теломеразу зворотною транскриптазу	<i>MADD</i> Hs00366249_m1	MAP-кіназний активаційний домен смерті
<i>TERF1</i> Hs00744634_s1	Теломерний зв'язуючий фактор 1	<i>BAX</i> Hs00751844_s1	Bcl-2-асоційований X протеїн
<i>TERF2</i> Hs00194619_m1	Теломерний зв'язуючий фактор 2	<i>MAPK14</i> Hs00176248_m1	Мітоген-активована протеїн-кінaza 14
<i>BRCA1</i> Hs00173233_m1	онкоген раку молочної залози, ранній початок	<i>NFKB2</i> Hs00174517_m1	Ядерний фактор κВ-клітин 2
<i>VEGFA</i> Hs00173626_m1	Васкулярний ендотеліальний фактор росту A	<i>CSF2</i> Hs00171266_m1	Колоніе-стимулюючий фактор (гранулоцитарно-макрофагальний)

набору специфічних зондів та праймерів для реалізації кількісної оцінки генної експресії — *TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, США)*. Основний алгоритм дослідження відносно рівня генної експресії складався з таких етапів: виділення РНК із лейкоцитів ПК, проведення зворотної транскрипції, підготовка реакційної суміші та завантаження *TLDA (TaqMan Low Density Array)*-плашок, ампліфікація кодуючої ДНК (кДНК) у режимі ПЛР у реальному часі.

Виділення РНК проводили за допомогою автоматичної станції *QIAcube (QIAGEN, Німеччина)* для виділення нуклеїнових кислот та спін-колоночної технології з використанням набору для виділення РНК — *NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel, Німеччина)*. Процес запуску системи складався з трьох кроків: завантаження буферів, завантаження ротор-адаптерів, завантаження зразків. Виділення тотальної РНК проводили з лейкоцитів ПК шляхом стабілізації, лізису та гомогонізації клітин, додавання етанолу та зв'язування тотальної РНК, відмивки та DNase обробки, елюції тотальної РНК.

Синтез кДНК зі зразків виділеної РНК проводився шляхом зворотної транскрипції з використанням набору *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США)*. Набір містить реагенти, які при комбінванні у відповідних кількостях (за стандартним протоколом) формують реакційну суміш *2x Reverse Transcription Master Mix (RT-MM)*. Рівні об'єми зразка РНК (10 мл) та

*RT-MM* (10 мл) змішували та проводили реакцію зворотної транскрипції за допомогою термошейкера *TS100*.

Для проведення ампліфікації, отриманий зразок кДНК додавали до реакційної суміші — *PCR Master mix* для генної експресії (*Applied Biosystems, США*) та вносили отриманий зразок до мікропроточної *TLDA* плашки *Micro Fluidic Card (Applied Biosystems, США)*. Були використані 384-луночні мікропроточні плашки з 8-ма портами та специфічною конфігурацією нанесених на них наборів реагентів *TaqMan* для дослідження експресії дослідних генів. Мікропроточну плашку із внесеними зразками центрифугували на центрифугу *Multifuge 3L (Heraeus, Німеччина)*, в результаті чого зразки рівномірно розподілялись по лунках мікропроточної плашки.

Ампліфікацію кДНК проводили на роботизованому генетичному аналізаторі *7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США)*. Показники відносного рівня генної експресії (*RQ — Relative Quantification*) розраховували за допомогою 2- $\Delta\Delta Ct$  методу, де  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{sample} - Ct_{ref})_{control} - (Ct_{sample} - Ct_{ref})_{irradiated}$ .

Первинний аналіз цитометричних даних проведений з використанням програмного забезпечення *WinMDI 2.8* та *CellQuestPro 5.1*. (*BD, США*). Аналіз отриманих даних відносного рівня генної експресії проведений за допомогою програмного забезпечення *SDS 2.3* та *RQ Manager 1.2*. (*Applied*

*Biosystems*, США). Статистична обробка даних була проведена за допомогою програмного забезпечення *Statistica 10.0*.

**Результати та їх обговорення.** Сигналом для запуску апоптозу є взаємодія специфічних позаклітинних лігандів з рецепторами клітинної загибелі, які експресуються на поверхні клітинної мембрани. Вже на етапі зв'язування рецептора з лігандом можна характеризувати ступінь готовності клітини до апоптозу. Проведено дослідження спонтанного рівня експресії *CD95* антигена в групі учасників ЛНА на ЧАЕС у залежності від дози опромінення. Встановлено значне зростання рівня експресії *FAS*-рецептора у дозових підгрупах учасників ЛНА на ЧАЕС порівняно з контролем. Слід відзначити, що зростання відносного рівня експресії *CD95*-антигена відбувалось прямо пропорційно зростанню ступеня дозового навантаження. Найвищі значення зафіксовані в підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, опроміненіх у дозах понад 500 мЗв. Аналіз експресії внутрішньоклітинного антиапоптотичного білка *Bcl-2* у лімфоцитах ПК основної групи, продемонстрував зниження експресії цього маркера в усіх дозових підгрупах порівняно з контролем (табл. 3). Отже загальним напрямом змін ключових регуляторів апоптозу у лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС є зростання ступеня готовності клітини до запуску самоликвідації та зниження функціонального стану білків антиапоптотичної системи.

*CD95*-рецепторно-лігандна система бере безпосередню участь в апоптозі, який індукуюється через *T*-клітинний рецептор лімфоцитів. Встановлено позитивну кореляцію між показниками *T*-клі-

тинної ланки імунітету та рівнем експресії *CD95*. У підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, опроміненіх у дозовому інтервалі  $0 < D \leq 100$  мЗв встановлено кореляцію середнього ступеня взаємодії між відсотком *CD3<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>* та *CD95<sup>+</sup>* клітин ( $r = 0,42, P < 0,05$ ), що свідчить про залучення активованих клітин до реалізації апоптотичних процесів у даній групі обстежених. Поряд з цим I підгрупа учасників ЛНА на ЧАЕС характеризувалась наявністю негативної кореляції між відсотком *CD3<sup>+</sup>DR<sup>-</sup>* та *CD3<sup>+</sup>4<sup>-</sup>* ( $r = -0,41$  та  $r = -0,38$ , відповідно,  $P < 0,05$ ). Подібний характер кореляції встановлено у II підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС ( $100 < D \leq 500$ ) мЗв. Встановлено негативну кореляцію між відсотком *CD3<sup>+</sup>4<sup>-</sup>* клітин та рівнем експресії проапоптотичного рецептора *CD95* ( $r = -0,41, P < 0,05$ ). Також даний дозовий діапазон характеризувався наявністю кореляції середньої сили між відсотком клітин із фенотипом *CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup>* та відносною кількістю *CD95<sup>+</sup>* клітин. Активація ліганд-рецепторного шляху апоптозу в лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС, опроміненіх у дозовому інтервалі понад 500 мЗв, імовірно відбувається за рахунок активованих *CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>* та *CD4<sup>-</sup>25<sup>+</sup>* клітин. На користь цього припущення свідчать встановлені кореляції високої сили взаємодії з рівнем експресії *CD95* ( $r = 0,58$  та  $r = 0,61$ , відповідно,  $P < 0,05$ ).

З метою кількісної та якісної оцінки апоптозу проведений диференційний аналіз спонтанного рівня запрограмованої клітинної загибелі лімфоцитів ПК учасників ЛНА на ЧАЕС. Встановлено зниження рівня клітин на стадії раннього апоптозу із фенотипом *Annexin V<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>* у III підгрупі ( $D > 500$ ) мЗв учасників ЛНА на ЧАЕС порівняно із контролем.

Таблиця 3

Експресія *CD95*-рецептора та антиапоптотичного білка *Bcl-2* у лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС в залежності від дози опромінення, % ( $M \pm SD$ )

Показник	Контрольна група	Учасники ЛНА на ЧАЕС		
		I підгрупа ( $0 < D \leq 100$ ) мЗв	II підгрупа ( $100 < D \leq 500$ ) мЗв	III підгрупа ( $D > 500$ ) мЗв
<i>CD95<sup>+</sup></i>	19,26 ± 9,32	(29,18 ± 9,85)***	(32,56 ± 9,81)***	(35,20 ± 9,68)***
<i>Bcl2<sup>+</sup></i>	37,84 ± 8,21	(32,31 ± 6,09)*	(33,65 ± 8,01)*	(32,66 ± 12,31)**

Примітки: \* —  $P < 0,05$ , \*\* —  $P < 0,01$ , \*\*\* —  $P < 0,001$  порівняно з контрольною групою.

Таблиця 4

Спонтанний рівень раннього та пізнього апоптозу у лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС в залежності від дози опромінення, % ( $M \pm SD$ )

Показник	Контрольна група	Учасники ЛНА на ЧАЕС		
		I підгрупа ( $0 < D \leq 100$ ) мЗв	II підгрупа ( $100 < D \leq 500$ ) мЗв	III підгрупа ( $D > 500$ ) мЗв
<i>Annexin V<sup>+</sup>PI<sup>-</sup></i>	15,9 ± 5,98	19,9 ± 9,08**	21,4 ± 11,52***	13,2 ± 8,14*
<i>Annexin V<sup>+</sup>PI<sup>+</sup></i>	1,6 ± 1,73	1,3 ± 0,88	1,5 ± 1,93	1,3 ± 1,24
<i>Annexin V<sup>-</sup>PI<sup>+</sup></i>	2,9 ± 3,68	2,2 ± 1,83	2,6 ± 3,10	1,9 ± 2,16

Примітки: \* —  $P < 0,05$ , \*\* —  $P < 0,01$ , \*\*\* —  $P < 0,001$  порівняно з контрольною групою.

Тоді як I ( $0 < D \leq 100$ ) мЗв та II ( $100 < D \leq 500$ ) мЗв підгрупи осіб у віддаленому періоді характеризувались зростанням цього показника. Відносний рівень клітин на пізніх стадіях апоптозу у дозових підгрупах учасників ЛНА на ЧАЕС був незмінним. Також не встановлено істотних змін у відсотку некротичних клітин із фенотипом *Annexin V-PI<sup>+</sup>* (табл. 4). На фоні активації проапоптотичних рецепторів, рівень клітин у стані самоліквідації, як на ранніх, так і на пізніх стадіях був зниженим, що є несприятливим фактором, оскільки може прискорити процеси старіння, накопичення мутацій та злоякісної трансформації.

При аналізі кореляції між відносним рівнем лімфоцитів на ранніх, пізніх стадіях апоптозу та некротизованих клітин та дозами опромінення статистично достовірні залежності встановлено лише у підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінені в інтервалі доз понад 500 мЗв —  $r = 0,17$ ,  $r = 0,32$ ,  $r = 0,12$  ( $P < 0,05$ ), відповідно.

Була встановлена кореляція між відносним рівнем лімфоцитів із фенотипом *Annexin V-PI<sup>+</sup>*, *Annexin V-PI<sup>+</sup>* та віком. У III підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС виявлена кореляція між відсотком лімфоцитів на ранніх стадіях апоптозу (*Annexin V-PI<sup>-</sup>*) та віком ( $r = 0,41$ ,  $P < 0,05$ ). Відносний рівень лімфоцитів на пізніх стадіях апоптозу (*Annexin V-PI<sup>+</sup>*) змінювався в залежності від віку у I та II підгрупах учасників ЛНА на ЧАЕС —  $r = 0,36$  ( $P < 0,05$ ),  $r = 0,28$  ( $P < 0,05$ ), відповідно.

Таким чином зміна співвідношення про- та антиапоптотичних білків в діапазоні доз до 500 мЗв залежить від дози та супроводжується входженням лімфоцитів в апоптоз. При більших дозах процес блокується дозозалежним включенням антиапоптотичних білків і не супроводжується на груповому рівні підвищенням числа *Annexin V-PI<sup>+</sup>* клітин, що свідчить про незавершеність апоптозу. В цьому дозовому діапазоні встановлена залежність апоптозу від віку.

Наявність радіаційно-асоційованого клітинного старіння у постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС, відноситься до найбільш контроверсійних аспектів біологічних ефектів дії опромінення. Для характеристики процесу клітинного старіння та оцінки ступеня внеску радіаційного компонента у прогресування цього процесу, проведено аналіз відносної довжини теломер ІКК, які відіграють

ключову роль у біології виживаності клітин, старіння та клітинної загибелі.

Результати дослідження показали зниження *RTL* у лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінені у широкому діапазоні доз порівняно з контрольною групою (табл. 5). Значимо, що максимальне зниження рівня відносної довжини теломер зафіксовано в групі учасників ЛНА на ЧАЕС, які були опромінені у дозах до 100 мЗв.

Довжина теломер соматичних клітин зменшується під впливом різних ендогенних та екзогенних патогенетичних факторів, та перш за все з віком. У загальній когорті учасників ЛНА на ЧАЕС  $r = -0,18$  ( $P < 0,05$ ) (рис. 1).

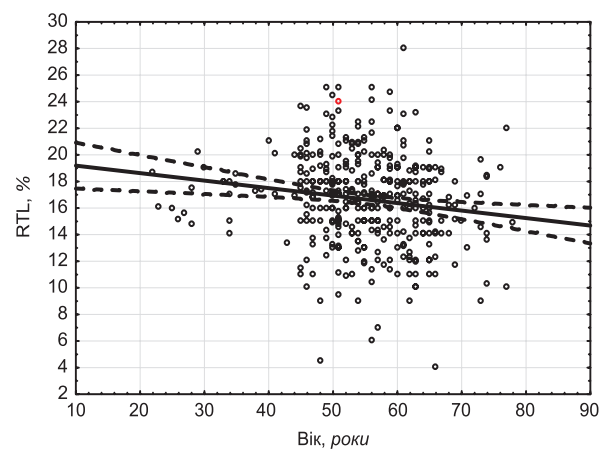


Рис. 1. Кореляція між відносною довжиною теломер та віком в групі учасників ЛНА на ЧАЕС.

З метою відокремлення модифікуючого впливу вікового та радіаційного компонентів на показник відносної довжини теломер, проведено дослідження кореляційних залежностей між показником *RTL* та дозою опромінення у підгрупах учасників ЛНА на ЧАЕС 1986-1987 рр. Встановлено наявність кореляції низької сили взаємодії в I підгрупі ( $0 < D \leq 100$ ) мЗв —  $r = 0,18$  та II підгрупі ( $100 < D \leq 500$ ) мЗв —  $r = -0,11$  учасників ЛНА на ЧАЕС. У III дозовій підгрупі осіб, опромінені в дозах понад 500 мЗв, зниження показника *RTL* не корелювало з дозою опромінення ( $r = -0,02$ ). Характер залежностей відрізнявся в різних дозових інтервалах. При низькодозовому опроміненні ( $0 < D \leq 100$ ) мЗв в

Таблиця 5

Відносна довжина теломер лейкоцитів ПК учасників ЛНА на ЧАЕС в залежності від дози опромінення, % ( $M \pm SD$ )

Показник	Контрольна група	Учасники ЛНА на ЧАЕС		
		I підгрупа ( $0 < D \leq 100$ ) мЗв	II підгрупа ( $100 < D \leq 500$ ) мЗв	III підгрупа ( $D > 500$ ) мЗв
<i>RTL</i>	$18,42 \pm 3,41$	$15,68 \pm 3,31^{***}$	$16,40 \pm 3,64^{***}$	$16,53 \pm 3,88^{**}$

Примітки: \*\* —  $P < 0,01$ , \*\*\* —  $P < 0,001$  порівняно з контрольною групою.

учасників ЛНА на ЧАЕС спостерігається позитивна кореляція (тенденція подовження відносної довжини теломер із дозою опромінення), а у дозових інтервалах ( $100 < D \leq 500$ ) мЗв та  $D > 500$  мЗв характер кореляції змінюється на негативний.

Проведено аналіз змін відносної довжини теломер та наявності кореляції з дозою опромінення при комбінації різних вікових та дозових інтервалів. Найбільш виражену негативну кореляцію (відносна довжина теломер зменшується з підвищенням дози опромінення) відзначено в групі учасників ЛНА на ЧАЕС як у віковому інтервалі від 40 до 50 років, так і у дозовому діапазоні від 100 до 1000 мЗв. Подальший аналіз показав, що поєднаний вплив вікових (40-50 років) та дозових (100-1000 мЗв) чинників збільшує вираженість негативної кореляції між дозою опромінення та відносною довжиною теломер.

Таким чином, відносна довжина теломер у віддаленому періоді після опромінення залежить від віку та дози опромінення. Найбільшим є зменшення *RFL* у дозовому інтервалі до 100 мЗв. Загальна тенденція зміни довжини теломер у когорті учасників ЛНА на ЧАЕС в залежності від дози опромінення у широкому діапазоні доз має позитивний характер, що є несприятливим фактором, оскільки може свідчити про порушення механізмів кінцевої недореplikації теломер та імовірність формування підґрунтя для злоякісної трансформації клітини. З іншого боку клітинне старіння може бути активоване стресом навіть у теломераза-позитивних клітинах [8] за посередництвом *p53*-залежного сигналіту. Поряд з цим результати нашого дослідження показали, що процеси регуляції довжини теломер в різних вікових групах мають відмінності у віддаленому періоді після опромінення. Комбінація вікових (40-50 років) та дозових ( $100 < D < 1000$  мЗв) меж впливає на інтенсивність негативних зв'язків між дозою опромінення та відносною довжиною теломер у бік її зменшення.

Дослідження особливостей регуляції апоптозу на транскрипційному рівні виявили зміни експресії ключових генів-регуляторів запрограмованої клітинної загибелі у віддаленому періоді після опромінення порівняно із неопроміненим контролем. Дослідження відносного рівня експресії гена *TP53* у групі учасників ЛНА на ЧАЕС показало статистично достовірне зростання у віддаленому періоді відносного рівня експресії даного гена лише у підгрупі осіб після опромінення дозами понад 500 мЗв (рис. 2). Активація гена *TP53* асоціюється із запуском запрограмованої клітинної загибелі, що знайшло підтвердження у нашому дослідженні. Встановлено кореляцію між відносним рівнем експресії гена *TP53* та рівнем експресії проапоптотичного маркера *CD95* у II ( $100 < D \leq 500$ ) та III

( $D > 500$ ) підгрупах учасників ЛНА на ЧАЕС ( $r = 0,27$  та  $r = 0,89$ ,  $P < 0,05$ , відповідно). Проведений кореляційний аналіз між рівнем антиапоптотичного білка *Bcl-2* та показником *RQ* гена *TP53* у групі осіб у віддаленому періоді після опромінення. Коефіцієнти кореляції становили: I підгрупа —  $r = -0,48$ , II підгрупа —  $r = -0,34$ , III підгрупа —  $r = 0,66$  ( $P < 0,05$ ). При аналізі відносного рівня експресії гена *TP53I3* у лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС статистично достовірних змін, порівняно з контролем, встановлено не було. Проте, за тенденціями характер змін середніх показників *RQ* гена *TP53I3* подібний змін експресії гена *TP53* (див. рис. 2).

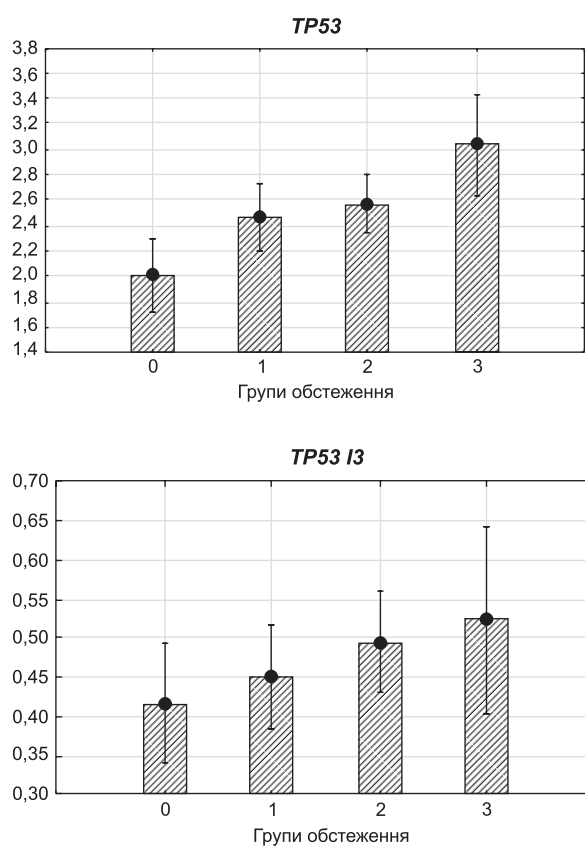


Рис. 2. Відносна експресія генів *TP53* та *TP53 I3* у лейкоцитах периферичної крові учасників ЛНА на ЧАЕС у залежності від дози опромінення. 0 — контроль, 1 — I підгрупа ( $0 < D \leq 100$ ), 2 — II підгрупа ( $100 < D \leq 500$ ), 3 — III підгрупа ( $D > 500$ ).

Не менш важливим геном у регуляції *FAS*-опосередкованого шляху апоптозу є ген *FASL*. Статистично достовірні зміни у середніх показниках *RQ* гена *FASL* встановлено лише у групі учасників ЛНА на ЧАЕС із дозовим навантаженням понад  $>500$  мЗв, проте тенденція до підвищення цього показника фіксується і в II підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС.



При дослідженні гена *FASL* простежувався зв'язок із механізмом *p53*-опосередкованого апоптозу, а саме: встановлено кореляцію між рівнями експресії генів *FASL*, *TP53* та *TP53I3* у підгрупах учасників ЛНА на ЧАЕС. I підгрупа — кореляція між показниками RQ гена *FASL* та гена *TP53I3* ( $r = 0,60, P < 0,05$ ), II підгрупа — між показниками RQ гена *FASL* та гена *TP53* ( $r = 0,29, P < 0,05$ ), III підгрупа — між показниками RQ гена *FASL* та гена *TP53I3* ( $r = 0,97, P < 0,05$ ). Також у II та III підгрупах учасників ЛНА на ЧАЕС показано зв'язок між відносним рівнем експресії гена *FASL* та імунологічними порушеннями. А саме: II підгрупа — кореляція між показником RQ гена *FASL* та відносним рівнем  $CD3^+16^+56^+$  клітин ( $r = -0,24, P < 0,05$ ), III підгрупа — між показником RQ гена *FASL* та відносним рівнем  $CD3^+16^+56^+$  клітин ( $r = 0,56, P < 0,05$ ).

Дослідження особливостей експресії гена-активатора апоптозу *BAX* продемонструвало статистично достовірні зміни в групі опромінених учасників ЛНА на ЧАЕС у дозах понад 500 мЗв, які характеризувалися зниженням середнього показника RQ гена *BAX*. Гіпоекспресія гена *BAX* у III підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС ( $D > 500$  мЗв) підтверджує гіпотезу про порушення реалізації апоптозу у віддаленому періоді при підвищеному дозовому навантаженні.

Серед інгібіторів запрограмованої клітинної загибелі був досліджений ген *BIRC5*, який кодує білок сурвівін. Встановлена гіперекспресія гена *BIRC5* у групі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозах понад 500 мЗв, порівняно із контрольною групою, це дещо пояснює, що ряд блокуючих ефектів апоптозу у даного контингенту осіб є несприятливою ознакою, щодо ризиків розвитку злоякісної трансформації.

Таким чином, у віддаленому періоді після опромінення зміни співвідношення про- та анти-апоптотичних білків у діапазоні доз до 500 мЗв залежать від дози та забезпечують входження клітин в апоптоз. Вказаних змін не спостерігалось у групі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозах понад 500 мЗв. На фоні проапоптотичного характеру співвідношення *CD95* та *Bcl-2* білків, достовірне підвищення експресії гена-регулятора апоптозу *FASL* не супроводжується збільшенням числа клітин на ранніх та пізніх стадіях апоптозу (*Annexin V<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>* та *Annexin V<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>*), що свідчить про незавершеність запрограмованої клітинної загибелі у цьому дозовому діапазоні (рис. 3). Поясненням є виснаження проапоптотичних реакцій у віддаленому періоді після опромінення у високих дозах, що є несприятливим фактором, оскільки може бути підґрунтям для прискорення процесів старіння, накопичення мутацій та злоякісної трансформації.

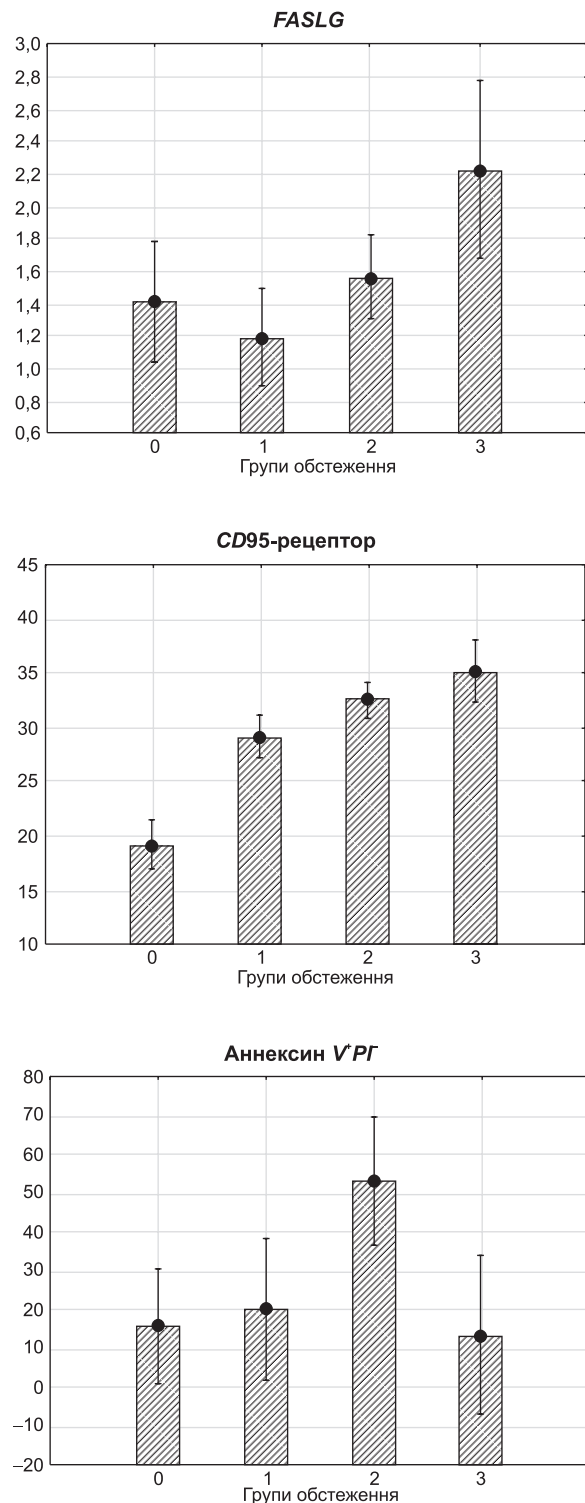


Рис. 3. Відносний рівень експресії гена-регулятора апоптозу *FASL*, відносний рівень експресії *CD95*-рецептора та відносна кількість Аннексин  $V^+PI^-$  лімфоцитів периферичної крові учасників ЛНА на ЧАЕС в залежності від дози опромінення. 0 — контроль, 1 — I підгрупа ( $0 < D \leq 100$ ) мЗв, 2 — II підгрупа ( $100 < D \leq 500$ ) мЗв, 3 — III підгрупа ( $D > 500$ ) мЗв.



Таблиця 6

Коефіцієнти кореляції відносного рівня експресії генів-регуляторів довжини теломер *TERF1*, *TERF2*, *TERT* та генів-регуляторів апоптозу *TP53*, *TP53I3* в учасників ЛНА на ЧАЕС в залежності від дози опромінення

Показник	I підгрупа ( $0 < D \leq 100$ ) мЗв	II підгрупа ( $100 < D \leq 500$ ) мЗв	III підгрупа ( $D > 500$ ) мЗв
<i>TP53 vs TERF1</i>	0,33*	0,70*	0,18
<i>TP53I3 vs TERF1</i>	0,47*	0,59*	0,01
<i>TP53 vs TERF2</i>	0,39*	0,53*	0,05
<i>TP53I3 vs TERF2</i>	0,80*	0,56*	0,10
<i>TP53 vs TERT</i>	0,53*	0,53*	0,44*
<i>I3 vs TERT</i>	0,68*	0,55*	0,57*

Примітка: \* —  $P < 0,05$  вірогідність  $r$ .

Гени *TERF1* та *TERF2* та білки, які ними кодуються, є основними негативними регуляторами довжини теломер, а дисбаланс у їх функціонуванні пов'язаний із розвитком злоякісної трансформації. У віддаленому періоді після опромінення встановлена загальна тенденція зниження середнього показника RQ гена *TERF1* у широкому діапазоні доз. Статистично достовірне зниження експресії гена *TERF1* встановлено у II та III підгрупах учасників ЛНА на ЧАЕС у порівнянні з контролем. Подібна картина зафіксована при дослідженні іншого гена негативного регулятора довжини теломер — *TERF2*. У віддаленому періоді після опромінення встановлена гіпоекспресія гена *TERF2* була статистично досто-

вірною в усіх дозових підгрупах учасників ЛНА на ЧАЕС. Однак найнижчий середній рівень *TERF2* генної експресії встановлено у групі осіб, опромінених у дозовому інтервалі понад 500 мЗв (рис. 4).

Ген *TERT* кодує теломеразну зворотню транскриптазу, функціонування якої в нормі приводить до збереження довжини теломер на постійному рівні, компенсуючи таким чином кінцеву недореplikацію і дозволяючи клітині ділитися необмежено довго. Дослідження відносного рівня експресії гена *TERT* продемонструвало статистично достовірне ( $P < 0,001$ ) зростання середнього показника RQ у віддаленому періоді після опромінення у дозовому інтервалі понад 500 мЗв. Дослідження кореляції між відносним

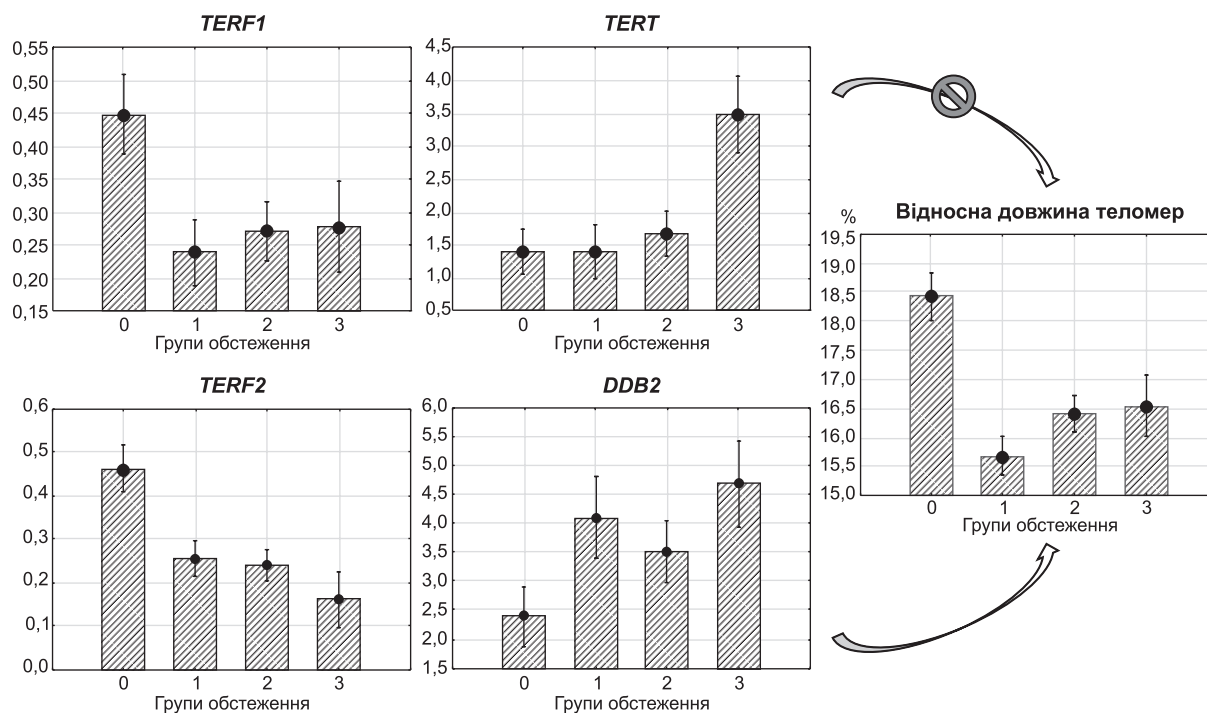


Рис. 4. Відносний рівень експресії генів-регуляторів теломеро-теломеразного комплексу (*TERF1*, *TERF2*, *TERT*), гена *DDB2* (кодує білок 2, пов'язаний із ушкодженням ДНК) та відносна довжина теломер. 0 — контроль, 1 — I підгрупа ( $0 < D \leq 100$ ), 2 — II підгрупа ( $100 < D \leq 500$ ), 3 — III підгрупа ( $D > 500$ ). (пояснення у тексті).

рівнем експресії гена *TERT* та дозою опромінення підтвердили такий характер змін у III підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, в якій  $r = 0,39$ ,  $P < 0,05$  (див. рис. 4).

Проаналізовано залежність встановлених порушень процесів генної регуляції теломеро-теломеразного комплексу від активації генів онкосупресорів *TP53* та *TP53I3* (табл. 6). Таким чином, встановлено радіаційно-асоційоване порушення генної регуляції довжини теломер ІКК у віддаленому періоді після опромінення. В інтервалі доз понад 500 мЗв встановлено дисбаланс експресії генів *TERF1* та *TERF2*, які кодують білки нуклеопротеїнового комплексу теломер на фоні активації *p53*-опосередкованої теломеразної активності та гіперекспресії гена *DDB2*, асоційованого із клітинним старінням. Імовірно, скорочення відносної довжини теломер є результатом *p53* активації клітинного старіння у учасників ЛНА на ЧАЕС.

Ген та білок *BRCA1*, відіграють ключову роль у репарації ДНК, регуляції клітинного циклу та підтримці генетичної стабільності. Механізми функціонування *BRCA1* включають регуляцію транскрипції генів, залучених до ексцизійної репарації нуклеотидів *p53*-залежним та незалежним способами. Загальною особливістю в асоційованій із дозою опромінення експресії гена *BRCA1* є її статистично достовірне зниження в усіх групах обстежених. Такі дані, імовірно, свідчать про порушення репараційних процесів генетичного апарату у віддаленому періоді після опромінення з підвищеним ступенем дозового навантаження. Зворотного характеру дані отримані при аналізі експресії гена *DDB2* в залежності від дози опромінення. Встановлена гіперекспресія даного гена в I та III підгрупах учасників ЛНА на ЧАЕС та тенденція до зростання RQ гена *DDB2* у II групі (див. рис. 4).

Процеси росту та поділу клітин регулюються за рахунок впливу різноманітних зовнішніх та внутрішніх стимулів, які за посередництвом запуску механізмів сигнальної трансдукції регулюють клітинний цикл. Статистично достовірне зниження середнього показника RQ гена *TGFBR1* встановлено у групі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозах понад 500 мЗв порівняно із контролем, що є підтвердженням порушень механізмів клітинної трансдукції та може впливати на проліферативну активність клітин та реалізацію апоптозу після дії ІВ. Компоненти каскаду сигнальної трансдукції взаємодіють з ядерними факторами транскрипції, які в свою чергу регулюють активність генів, що мають відношення до клітинного циклу. Аналіз особливостей експресії генів-регуляторів клітинного циклу продемонстрував односпрямованість змін цієї групи генів, які проявлялись у зниженні рівня експресії генів *CCND1*, *CDKN2A*, *CDKN1A* та

*CDKN1B*, що свідчить про зниження контролю переходу від  $G_1$  до  $S$  фази клітинного циклу. Встановлено порушення *MAP*-кіназного шляху регуляції клітинного циклу, що проявлялося дозозалежною гіпоекспресією генів *MAPK14* та *MKNK2*.

Аналіз експресії гена *NF- $\kappa$ B*, який бере участь у регуляції імунної відповіді, апоптозу та клітинного циклу, продемонстрував гіперекспресію гена *NFKB1* у лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС II та III підгруп. Встановлено статистично достовірну кореляцію між відносним рівнем експресії генів *NFKB1*, *NFKB2* та гена онкосупресора *TP53* у загальній когорті учасників ЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після опромінення. Коефіцієнти кореляції становили:  $r = 0,45$  ( $P < 0,05$ ) та  $r = 0,31$  ( $P < 0,05$ ), відповідно. Поряд з цим встановлено негативна кореляція між RQ гена *NFKB1* та відносним рівнем *Annexin V*<sup>+</sup>*PI*<sup>+</sup> лейкоцитів ПК загальної когорти учасників ЛНА на ЧАЕС у широкому діапазоні доз ( $r = -0,31$ ,  $P < 0,05$ ). Встановлено таргетність зв'язків генів *NFKB1*, *NFKB2*, *TP53*, *DDB2* та порушення регуляції апоптозу за участю *NF- $\kappa$ B*-сигналіну у віддаленому періоді після опромінення.

При дослідженні імунологічного фенотипу лімфоцитів ПК учасників ЛНА на ЧАЕС встановлено ряд особливостей у *T*- та *B*-ланках клітинного імунітету, що пов'язані з відзначеними змінами генної експресії. Встановлено зниження відносної кількості *CD3*<sup>+</sup> клітин в підгрупі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозах понад 500 мЗв, що свідчить про постійні зміни *T*-клітинної ланки імунітету протягом 25-30 років після аварії. Відзначено зростання відсотка *CD4*<sup>+</sup>*8*<sup>-</sup> *T*-хелперів у групі учасників ЛНА на ЧАЕС, опромінених у дозах понад 500 мЗв. Ефект активації *T*-хелперів у віддаленому періоді у поєднанні зі зростанням *B*-клітинної гуморальної відповіді може бути асоційований із розвитком аутоімунних та алергічних реакцій. Водночас встановлено позитивну кореляцію між відносною кількістю *CD4*<sup>+</sup>*8*<sup>+</sup> цитотоксичних *T*-лімфоцитів та дозою опромінення в інтервалі від 100 до 500 мЗв у групі учасників ЛНА на ЧАЕС. Про сталість змін та пов'язаність їх з дією ІВ у віддаленому періоді після опромінення також свідчать зміна числа ранніх *CD34*<sup>+</sup> попередників при опроміненні у дозах понад 500 мЗв, визначення підвищеного рівня варіантних по *T*-клітинному рецептору (*TCR*) *T*-лімфоцитів. Збереження дозозалежних порушень *TCR* у комплексі зі змінами у *T*- та *B*-ланках імунітету вказують на наявність індукованих радіацією сталих імунологічних порушень.

#### Висновки

У віддаленому періоді після опромінення в результаті Чорнобильської катастрофи встановлено

дозозалежні порушення генної регуляції апоптозу, старіння та проліферації імунотропних клітин.

У віддаленому періоді після опромінення в дозах до 100 мЗв визначено зміни генної регуляції, що включають підвищення експресії генів *TP53*, *DDB2* та зниження експресії *TERT1* та *TERT2* *TERT*, скорочення довжини теломер відносно неопроміненого контролю, що може розцінюватися як ознака радіаційного старіння.

У віддаленому періоді після опромінення в дозах, більших за 100 мЗв, відзначено підвищення проліферації на ранніх етапах диференціювання з підвищенням кількості *CD34<sup>+</sup>38<sup>+</sup>* клітин-попередників та числа TCR-варіантних лімфоцитів, що супроводжується порушенням експресії *CD3* антигену, активацією *CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>*; *CD3<sup>+</sup>19<sup>+</sup>HLDR<sup>+</sup>* лімфоцитів та змінами циклін-кіназної регуляції клітинного циклу та диференціювання.

Після опромінення в інтервалі доз, вищих за 500 мЗв встановлено зниження експресії генів сигнальної трансдукції та клітинного циклу *CCND1*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *CDKN1B*, *TGFBR1*, *MAPK14*; гіперекспресію гена-регулятора теломерази *TERT*, підвищення експресії генів позитивної регуляції апоптозу *TP53*, *TP53I3*, *FASL*; порушення балансу

експресії про- та антиапоптогенних генів *BAX*, *BIRC5*; дисбаланс експресії протеїнів, що регулюють здатність клітин до апоптозу – гіперекспресію FAS-рецептора, знижений відносний рівень Bcl-2. Результатом є незавершеність процесу апоптозу із зниженням числа лімфоцитів як на ранніх так і пізніх його стадіях.

Таким чином встановлено, що радіаційні ефекти в імунній системі учасників ЛНА на ЧАЕС формуються на послідовних етапах реалізації змін генної експресії, експресії регуляторних білків та основних індукованих ними клітинних процесів – проліферації, апоптозу та клітинного старіння, а основу розвитку імунологічної недостатності та підвищення ризику клітинної трансформації віддаленого періоду після опромінення складають пов'язані з дозою порушення динамічної рівноваги між двома шляхами відновлення клітинної популяції: шляху вільного від помилок відновлення з елімінацією клітин з радіогенними ушкодженнями, та шляху помилкового відновлення з нестабільністю геному та збереженням радіогенних мутацій. Вказані зміни відображають системні порушення фундаментальних механізмів регуляції життєдіяльності клітинних популяцій — проходження клітинного циклу, клітинного старіння та апоптозу.

#### Список використаної літератури

1. Коркушко О. В., Шатило В. Б. Ускоренное старение и пути его профилактики // *Buk. Med. Herald.* — 2009. — 13, № 4. — Р. 153-158.
2. Пилинская М. А., Шеметун А. М., Дыбский С. С. Результаты 14-летнего цитогенетического мониторинга контингентов приоритетного наблюдения, пострадавших от действия факторов аварии на Чернобыльской АЭС // *Вестн. Рос. Акад. Мед. Наук.* — 2001. — № 10. — С. 80-84.
3. Ilyenko I., Bazyka D., Liaskovska O. Analysis of relative telomere length and apoptosis in humans exposed to ionising radiation // *Exp. Oncol.* — 2012. — 33, № 4. — Р. 235-238.
4. Karim S., Mirza Z., Chaudhary A. G. et al. Assessment of radiation induced therapeutic effect and cytotoxicity in cancer patients based on transcriptomic profiling // *Int. J. Mol. Sci.* — 2016. — 17. — doi: 10.3390/ijms17020250.
5. Likhtarev I., Kovgan L., Vavilov S. et al. Post-Chornobyl thyroid cancers in Ukraine. Report 1: Estimation of thyroid doses // *Radiat. Res.* — 2005. — 163, № 2. — Р. 125-136.
6. O'Brien M. A., Kirby R. J. Apoptosis: a review of proapoptotic and antiapoptotic pathways and dysregulation in disease // *Vet. Emerg. Crit. Care.* — 2008. — 18, № 6. — Р. 572-585.
7. Okazaki R., Ootsuyama A. J. p53-dependent delayed effects of radiation vary according to time of irradiation of p53 +/- mice // *J. Radiat. Res.* — 2014. — 55, № 1. — Р. 25-31.
8. Weinert B. T., Timiras P. S. Physiology of aging. Invited review: theories of aging // *J. Appl. Physiol.* — 2003. — 95. — Р. 1706-1716.

Одержано 25.04.2016

### ЗАВИСИМОСТЬ ГЕННОЙ РЕГУЛЯЦИИ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР, КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА ОТ ДОЗЫ ОБЛУЧЕНИЯ В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ КАТАСТРОФЫ

Д. А. Базыка, И. Н. Ильенко

Государственное учреждение “Национальный научный центр радиационной медицины НАМН Украины”, 04050 Киев

Цель работы: определить особенности модифицирующего влияния ионизирующего излучения на генную регуляцию апоптоза, пролиферации и клеточного старения в иммунной системе на

транскрипционно-трансляционном уровнях в отдаленном периоде после облучения в широком диапазоне доз. Исследовано 387 человек (77 практически здоровых лиц; 310 участников ЛПА на ЧАЭС 1986-87 гг.). В работе использованы иммунологические (анализ субпопуляционного состава и поверхностного фенотипа иммунокомпетентных клеток периферической крови, дифференциальный анализ апоптоза по Анексин-V тесту, анализ уровня экспрессии про- и антиапоптотических протеинов (*CD95*, *Bcl-2*) с помощью проточной цитометрии) и молекулярно-генетические (анализ относительного уровня экспрессии генов-регуляторов длины теломер и апоптоза методом ПЦР в реальном времени, *flow-FISH* анализ относительной длины теломер лимфоцитов периферической крови) методы исследования. В отдаленном периоде после облучения в результате Чернобыльской катастрофы установлены системные и дозозависимые нарушения генной регуляции апоптоза, старения и пролиферации иммунокомпетентных клеток периферической крови УЛНА на ЧАЭС, которые являются основой незавершенности процесса апоптоза со снижением числа клеток как на ранних так и поздних его стадиях, что проявляется в снижении экспрессии фосфатидилсерину (в наибольшей степени указанные изменения определяются после облучения в дозах более 500 мЗв); развития клеточного старения и повышения TERT-связанного риска трансформации иммунокомпетентных клеток; нарушения циклин-киназной регуляции клеточного цикла и дифференцировки; при дозах облучения выше 100 мЗв сохранения радиогенных мутаций TCR и сохранения иммунологической недостаточности.

### DEPENDENCE OF GENE REGULATION OF TELOMERE LENGTH, CELL PROLIFERATION, APOPTOSIS ON RADIATION DOSES IN THE LATE PERIOD AFTER CHORNOBYL ACCIDENT

D. A. Bazyka, I. N. Iliencko

State Institution "National Research Centre for Radiation Medicine NAMS Ukraine", 04050 Kyiv

The aim of the study was to define the modifying effects of ionizing radiation on the genetic regulation of apoptosis, proliferation and cellular aging in the immune system at the transcription-translation levels in a late period after exposure to a wide range of doses. The study included 387 subjects (77 healthy volunteers, 310 male Chernobyl cleanup workers exposed to ionizing radiation in 1986-87). The following methods were used: immunological (analysis of subpopulation composition and surface phenotype of immunocompetent cells of peripheral blood, differential analysis of apoptosis by annexin-V test, analysis of gene expression analysis of pro- and antiapoptotic proteins (*CD95*, *Bcl-2*) using flow cytometry), molecular-genetic (analysis of relative level of expression of gene-regulators of telomere length and apoptosis by real-time PCR, *flow-FISH* analysis of relative length of lymphocyte telomeres in the peripheral blood). Systemic and dose-dependent disturbances were found in the gene regulation of apoptosis, aging and proliferation of immunocompetent cells of the peripheral blood, which are the basis of incomplete process of apoptosis at both its initial and late stages, resulted in a decrease of phosphatidylserine (these changes are most overt following irradiation in doses above 500 mSv); development of cell aging and increase of TERT-associated risk of transformation of immunocompetent cells; disorders of cyclin-kinase regulating cell cycle and differentiation; at doses above 100 mSv radiation induced mutations T-cell receptor, conservation and preservation of immune deficiency.