

TCR-МУТАЦИИ В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ИММУННЫЙ СТАТУС У ЛИЦ, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ РАДИАЦИОННОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ, В ОТДАЛЁННЫЕ СРОКИ

© 2019 г. А. А. Аклеев^{1,2*}, Е. А. Блинова^{2,3}, И. И. Долгушин¹

*E-mail: andrey.akleev@yandex.ru

¹ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения России, Челябинск, Россия;

²ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России,
Челябинск, Россия;

³ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия

Поступила: 29.11.2018. Принята: 22.01.2019

В отдалённые сроки после хронического радиационного воздействия с преимущественным облучением красного костного мозга (средняя доза облучения – $0,89 \pm 0,09$ Гр, диапазон индивидуальных значений: 0,09–1,96 Гр) у лиц с повышенным уровнем TCR-мутантных Т-лимфоцитов отмечено дозозависимое повышение содержания в периферической крови CD3⁺CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов, увеличение лизосомальной активности нейтрофилов, уровней сывороточного IL-1 α , интенсивности некроза лимфоцитов и снижение содержания IL-2 и CSF-GM в сыворотке крови. Проведённый анализ показал, что отмеченные изменения следует рассматривать как ответ на повышение частоты мутаций (в т.ч. TCR-мутаций) в облучённых клетках.

Ключевые слова: хроническое облучение, красный костный мозг, TCR-мутации, иммунный статус

DOI: 10.31857/S102872210005016-2

Адрес: 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: + 7 (351) 2327914, Аклеев Андрей Александрович.
E-mail: andrey.akleev@yandex.ru

Авторы:

Аклеев А. А., к. м. н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Челябинск, Россия;

Блинова Е. А., к. б. н., зав. лабораторией молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России, Челябинск, Россия;

Долгушин И. И., д. м. н., профессор, академик РАН, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Челябинск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известно, что иммунная система является одной из наиболее радиочувствительных в организме человека. До настоящего времени считалось, что причиной данного эффекта явля-

ется апоптотическая гибель лимфоцитов, наступающая в результате действия ионизирующего излучения. Однако последние данные свидетельствуют о том, что реакции клеток и тканей на облучение связаны не только с цитоидным действием радиации, что характерно для острого облучения в высоких дозах, но также обусловлены разнообразными функциональными ответами клеток и тканей на радиационное воздействие. Последнее характерно для малых доз ионизирующей радиации и хронического облучения с низкой мощностью дозы [1].

В ряде исследований показано, что у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, даже в отдалённые сроки после облучения регистрируется повышенный уровень мутаций в генах Т-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR) [2–4]. Аналогичные результаты отмечались в отдалённые сроки и у жителей прибрежных сёл реки Течи, которые подверглись хроническому многолетнему облучению пре-

имущественно с низкой мощностью дозы [5, 6]. Можно предположить, что радиационно-индуцированные мутации в TCR-генах могут нарушать функцию дефектных Т-лимфоцитов. Поскольку комплекс TCR/CD3 вовлечён на начальном этапе в ряд иммунных ответов, зависящих от Т-лимфоцитов, то потеря или альтерация экспрессии TCR-генов в выживших клетках может способствовать радиационно-индуцированному нарушению Т-клеточного ответа и иммунного статуса облучённого человека в целом [7]. Однако до настоящего времени не получено доказательств, что радиационно-индуцированные TCR-мутации могут вызывать вторичные иммунодефицитные состояния, в т.ч. в периоде отдалённых последствий облучения.

Целью настоящей работы было исследование особенностей системного иммунитета в отдалённые сроки у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в широком диапазоне доз облучения красного костного мозга (ККМ), имеющих повышенный уровень TCR-мутаций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 66 жителей прибрежных сёл реки Течи, которая была загрязнена жидкими радиоактивными отходами Производственного объединения «Маяк». Облучение людей носило сочетанный характер и было обусловлено внешним γ -излучением (преимущественно за счёт ^{137}Cs , ^{95}Zr , ^{95}Nb , ^{106}Ru , загрязнивших речную воду, пойменные земли и территории населённых пунктов) и внутренним вследствие поступления радионуклидов в организм людей с речной водой и продуктами питания местного производства (молоко, овощи, картофель и другие). Значительный вклад в формирование дозы внёс остеотропный радионуклид ^{90}Sr , который инкорпорировался в костную ткань и обеспечил наибольшие дозы облучения ККМ – центрального органа гемо- и иммунопоэза. Максимальные значения поглощённой в ККМ дозы облучения достигали 9 Гр, а кровяная и иммунная системы у населения, принимая во внимание их высокую радиочувствительность, являлись критическими в отношении медико-биологических эффектов. Наибольшие мощности доз облучения имели место в период сбросов жидких радиоактивных отходов непосредственно в реку Течу (1950–1956 гг.). [8]. При этом пик сбросов пришёлся на первую и вторую декады октября 1951 года, когда более 60% сум-

марной активности долгоживущих продуктов деления урана (^{90}Sr , ^{137}Cs , ^{147}Pr , ^{125}Sb , ^{155}Eu и др.) активностью около $1,23 \times 10^6$ Ки, поступили в реку Течу [9].

Группа обследованных лиц, сформированная на основе медико-дозиметрической Базы данных Уральского научно-практического центра радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства (УНПЦ РМ ФМБА России), включала 45 (68,2%) женщин и 21 (31,8%) мужчину. В исследование были включены лица пожилого возраста (средний достигнутый возраст на время обследования составил $70,4 \pm 0,8$ лет, возрастной диапазон: 60–84 года). Все исследования проводились только в случае получения от пациентов информированного согласия в письменном виде. Основную группу составили облучённые люди, у которых отмечалась повышенная частота TCR-мутаций в лимфоцитах периферической крови. В качестве критерия повышения частоты TCR-мутаций принимался их уровень, равный $M + 2\sigma$ (где M – уровень TCR-мутаций, оцененный у необлучённых людей, сопоставимых по возрасту, полу и национальности с представителями основной группы и проживающих в тех же административных районах) [10]. Группа лиц с повышенным уровнем TCR-мутаций включала 29 облучённых человек, среди которых преобладали женщины (18 человек, 62,1%) в возрасте 61–84 года (средний возраст – $71,2 \pm 1,1$ года). Группа сравнения была сопоставима с основной исследуемой группой по достигнутому на момент обследования возрасту (средний возраст составил $69,7 \pm 1,1$ лет, возрастной диапазон: 60–83 года), полу (превалировали женщины – 27 человек, 73%) и включала 37 облучённых жителей прибрежных сёл реки Течи, которые проживали в сходных социально-экономических условиях и имели аналогичный характер медицинского обслуживания. Частота TCR-мутаций в Т-лимфоцитах у представителей группы сравнения не превышала значения спонтанного их уровня, рассчитанного для жителей Уральского региона.

Как видно из **таблицы 1**, средние значения мощности дозы и поглощённой дозы облучения ККМ и мягких тканей (МТ) у облучённых лиц с повышенным уровнем TCR-мутаций не превышали таковые у людей с нормальным их уровнем. Индивидуальные дозы на МТ, которые являются аналогом доз на тимус и периферические органы иммунной системы, как и дозы на ККМ, рассчитывались с использованием дозиметриче-

Таблица 1. Дозиметрические характеристики представителей основной группы и группы сравнения, (M±m)

| Группа | Мощность дозы на КKM (1951), Гр/год | Мощность дозы на МТ (1951), Гр/год | Поглощённая доза на КKM, Гр | Поглощённая доза на МТ, Гр |
|-------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Основная n=29 | 0,21±0,02 (0–0,42)* | 0,02±0,003 (0–0,09) | 0,89±0,09 (0,09–1,96) | 0,07±0,01 (0,01–0,33) |
| Сравнения n=37 | 0,25±0,02 (0,07–0,78) | 0,03±0,01 (0,001–0,26) | 1,03±0,07 (0,30–2,34) | 0,07±0,02 (0,004–0,492) |

Примечание: * – указан диапазон варибельности индивидуальных значений доз

ской системы реки Течи TRDS-2009 [8]. Индивидуальные значения поглощённой дозы облучения КKM в группе лиц, имеющих повышенную частоту TCR-мутаций, составляли 0,09–1,96 Гр (среднее значение – 0,89±0,09 Гр), а в группе сравнения (облучённые лица, имеющие нормальный уровень TCR-мутаций в отдалённые сроки) – 0,30–2,34 Гр (среднее значение – 1,03±0,07 Гр). Мощность дозы и поглощённая доза облучения КKM существенно превышали таковые на МТ, так как в значительной мере были обусловлены инкорпорацией в костной ткани остеотропного радионуклида ⁹⁰Sr.

Исследование частоты встречаемости Т-лимфоцитов, имеющих мутации в Т-клеточном рецепторе, проводили методом проточной цитометрии с использованием упрощённого протокола анализа CD3⁺CD4⁺-клеток. Лимфоциты периферической крови человека выделяли в стерильных условиях на градиенте плотности фиколл-урографина (плотность 1077–1078 г/см³) в соответствии со стандартным протоколом [11]. Полученную клеточную суспензию распределяли в две пробирки. В первую пробирку добавляли моноклональные антитела IgG1-FITC/IgG1-PE (изотипический контроль, Beckman Coulter, США), в другую – моноклональные антитела анти-CD3-FITC (Beckman Coulter, США) и анти-CD4-PE (Beckman Coulter, США). После инкубации в темноте в течение 15 минут в каждую пробирку добавляли по 300–400 мкл фосфатно-солевого буфера. Анализ клеток проводился на лазерном (аргон 488 нм) проточном цитофлуориметре Epix XL-MCL (Beckman Coulter, США).

Исследование системного иммунитета включало анализ показателей, характеризующих состояние факторов адаптивного иммунитета (количество клеток в крови с фенотипами CD19⁺, CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, соотношение количества CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов, уровни иммуноглобулинов А, М, G в сыворотке крови), врождённого иммунитета (число

нейтрофильных гранулоцитов, моноцитов, показатели их фагоцитарной, лизосомальной активности и интенсивности внутриклеточного кислородзависимого метаболизма, количество CD16⁺CD56⁺- и CD3⁺CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов в крови), а также системы цитокинов (содержание IL-1α, IL-1β, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, CSF-GM, CSF-G, TNFα, IFNα, IFNγ в сыворотке крови).

Количество лейкоцитов, нейтрофилов и моноцитов в периферической крови у всех обследованных лиц определяли с помощью автоматического гематологического анализатора Pentra 120 DX (HORIBA ABX S.A.S., Франция). Численность основных популяций и субпопуляций лейкоцитов в крови оценивали методом CD-типирования с использованием стандартной панели меченых флуорохромами моноклональных антител (Beckman Coulter, США). Учёт проводили методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США).

Количественное определение содержания цитокинов и иммуноглобулинов в сыворотке крови человека проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) в твёрдофазном «сэндвич»-варианте [12] с использованием стандартных тест-систем (ВЕКТОР-БЕСТ, Россия и eBioscience, США). Для повышения точности исследования на каждый калибровочный и анализируемый образец выделяли по 2 лунки планшета. Таким образом, для одного пациента по 1 показателю получали 2 значения, после чего находили их среднюю величину. Учёт ИФА проводили на автоматическом микропланшетном ИФА-анализаторе «Lazurite» (DYNEX Technologies, США).

Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови рассчитывали по способности этих клеток поглощать микросферы латекса [13]. Оценку внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов и моноцитов проводили

путём постановки НСТ-теста в модификации А. Н. Маянского и М. К. Виксмана (1979) [14]. Лизосомальную активность нейтрофилов и моноцитов оценивали по методу И. С. Фрейдли (1986) [15]. Учёт данных реакций проводили методом световой иммерсионной микроскопии с помощью микроскопа Axio Imager. A2 (Carl Zeiss, Германия).

Определение интенсивности апоптоза лимфоцитов периферической крови осуществляли методом TUNEL (terminal desoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) в соответствии со стандартными протоколами анализа [16] с использованием коммерческой тест-системы (BD Biosciences, США). Суспензию лимфоцитов, выделенных из периферической крови, пермобилизовали 4%-ным раствором параформальдегида, фиксировали охлаждённым 70%-ным раствором этанола и хранили в морозильной камере при температуре -20°C до 3 месяцев. Непосредственно перед исследованием клетки двукратно отмывали от этанола с использованием wash buffer. Далее к суспензии лимфоцитов добавляли 51 мкл реакционной смеси, содержащей: 10 мкл reaction buffer; 0,75 мкл TdT Enzyme; 8 мкл FITC-dUTP; 32,25 мкл дистиллированной воды. Клетки ресуспендировали в смеси и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После инкубации лимфоциты дважды отмывали с помощью rinsing buffer и добавляли к ним 0,5 мл пропидия йодида (PI/RNase), после чего инкубировали в тёмной камере при 25°C в течение 30 минут. Детекцию лимфоцитов, имеющих признаки фрагментации ДНК (необратимая фаза апоптоза), проводили с помощью проточного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter, США). В одной пробе анализировали 30 000 клеток. Методом проточной цитометрии также оценивали интенсивность экспрессии лимфоцитами маркера CD95, характерного для клеток в стадии готовности к апоптозу.

Интенсивность некроза лимфоцитов оценивали методом Annexin V-FITC согласно стандартному протоколу анализа [17]. Перед окрашиванием лимфоциты, выделенные из периферической крови, ресуспендировали в 1 мл охлаждённого фосфатно-солевого буфера, затем центрифугировали 7 минут при 1500 об/мин., после чего удаляли надосадочную жидкость. К суспензии клеток добавляли охлаждённый 1%-ный раствор фиксирующего буфера (Beckman Coulter, США). Затем к 100 мкл суспензии лимфоцитов

добавляли 5 мкл Annexin V-FITC и 5 мкл пропидия йодида (Beckman Coulter, США). Клетки инкубировали в темноте в течение 15 минут при 4°C . После инкубации к лимфоцитам добавляли 400 мкл 1%-ного фиксирующего буфера и проводили анализ на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Лимфоциты, окрашенные только FITC, регистрировались как находящиеся на ранней стадии апоптоза, клетки, окрашенные только йодистым пропидием, детектировались как погибшие путём некроза.

Первичные данные анализировали с использованием табличного редактора «Microsoft Excel 2010» и пакета прикладных программ «Statistica 10.0». Для расчёта средних значений показателей, ошибок средних и диапазонов вариабельности показателей применяли базовые методы описательной статистики. Сравнение исследуемых групп проводилось путём вычисления U-критерия Манна-Уитни. О наличии статистически значимых различий между группами судили при $p < 0,05$. Для описания взаимосвязей между показателями системного иммунитета и величинами кумулятивной дозы и мощности дозы облучения ККМ и МТ применяли метод непараметрического корреляционного анализа по Спирмену. С целью оценки зависимости показателей, для которых были получены статистически значимые корреляции, от дозовых характеристик, использовали метод линейного регрессионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты анализа показателей адаптивного иммунитета у облучённых лиц, имеющих повышенный уровень TCR-мутаций, и в группе сравнения представлены в **таблице 2**. В отдалённые сроки после начала облучения у лиц с повышенным уровнем TCR-мутаций не отмечено каких-либо особенностей со стороны клеточного и гуморального звеньев адаптивного иммунитета. Численность основных популяций и субпопуляций лимфоцитов, соотношение количества $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ - и $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ -лимфоцитов, а также содержание сывороточных иммуноглобулинов А, М, G соответствовало таковому у облучённых в сопоставимых дозах лиц, имеющих нормальный уровень TCR-мутаций.

Как видно из **таблицы 3**, показатели лизосомальной активности нейтрофилов (ЛАН) и содержание НКТ-клеток ($\text{CD3}^+\text{CD16}^+\text{CD56}^+$ -лимфоциты) в крови у облучённых лиц с повышенным уровнем TCR-мутаций было статистически

Таблица 2. Средние значения показателей адаптивного иммунитета, интенсивности апоптоза и некроза лимфоцитов у представителей основной группы и группы сравнения, ($M \pm m$)

| Показатель | Основная группа n=29 | Группа сравнения n=37 |
|---|-------------------------|--------------------------|
| Т-звено адаптивного иммунитета | | |
| CD3 ⁺ -лимфоциты, % | 68,79±1,63 | 67,81±1,39 |
| CD3 ⁺ -лимфоциты, ·10 ⁹ /л | 1,63±0,10 | 1,49±0,09 |
| CD4 ⁺ -лимфоциты, % | 44,29±1,65 | 42,53±1,49 |
| CD4 ⁺ -лимфоциты, ·10 ⁹ /л | 1,01±0,08 | 0,91±0,06 |
| CD8 ⁺ -лимфоциты, % | 21,05±1,15 | 22,33±1,59 |
| CD8 ⁺ -лимфоциты, ·10 ⁹ /л | 0,50±0,04 | 0,51±0,06 |
| CD4/CD8 | 2,31±0,16 | 2,28±0,18 |
| В-звено адаптивного иммунитета | | |
| CD19 ⁺ -лимфоциты, % | 10,27±0,72 | 11,59±0,96 |
| CD19 ⁺ -лимфоциты, ·10 ⁹ /л | 0,24±0,02 | 0,25±0,03 |
| IgA, мг/мл | 2,65±0,30 | 2,22±0,25 |
| IgG, мг/мл | 18,91±2,20 | 15,35±1,54 |
| IgM, мг/мл | 1,61±0,27 | 1,43±0,15 |
| Интенсивность апоптоза и некроза лимфоцитов | | |
| Апоптоз лимфоцитов, % | 0,24±0,05 | 0,52±0,10 |
| CD95 ⁺ -лимфоциты, % | 3,35±0,84 | 4,73±1,06 |
| CD95 ⁺ -лимфоциты, ·10 ⁹ /л | 0,074±0,018 | 0,106±0,024 |
| Некроз лимфоцитов, % | 0,12±0,01 p=0,01 | 0,02±0,01 |

значимо выше, чем в группе сравнения. Можно предположить, что изменения вышеуказанных параметров врождённого иммунитета, скорее всего, носят компенсаторный характер и направлены на элиминацию мутантных клеток, повреждения в которых не были репарированы. Необходимо отметить, что уровень CD95⁺-лимфоцитов, находящихся в стадии готовности к апоптозу, в основной группе лиц не был изменён относительно группы сравнения. Анализ интенсивности апоптоза лимфоцитов в сравниваемых группах также не позволил отметить статистически значимых различий (табл. 2). Вместе с тем, у облучённых лиц с повышенной частотой TCR-мутаций в лимфоцитах наблюдалось повышение доли этих клеток, гибнущих посредством некроза, по сравнению с группой облучённых лиц, имеющих нормальный уровень TCR-мутаций (табл. 2). Полученные результаты свидетельствуют о том, что TCR-мутантные лимфоциты, по-видимому,

элиминируются не посредством апоптоза, а благодаря цитотоксическому действию клеточных факторов врождённого иммунитета, в частности, нейтрофилов и НКТ-клеток.

Анализ цитокинового профиля (табл. 4) позволил отметить у облучённых лиц с повышенным уровнем TCR-мутантных лимфоцитов в крови разнонаправленный характер изменений в содержании некоторых сывороточных цитокинов: повышение уровней IL-1α одновременно со снижением количеств IL-2 и CSF-GM. Необходимо отметить, что несмотря на более низкий уровень сывороточного CSF-GM, число нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов в периферической крови у людей с повышенной частотой мутаций в генах Т-клеточного рецептора лимфоцитов статистически значимо не отличалось от такового в группе сравнения (табл. 3). Основным эффектом IL-2, вырабатываемого, в основном, Т-хелперами 1 типа, является активация

Таблица 3. Средние значения показателей врождённого иммунитета у представителей основной группы и группы сравнения, ($M \pm m$)

| Показатель | Основная группа n=29 | Группа сравнения n=37 |
|--|-----------------------------------|--------------------------|
| Лейкоциты, $10^9/\text{л}$ | $6,60 \pm 0,39$ | $6,28 \pm 0,23$ |
| Гранулоциты | | |
| Нейтрофилы, % | $51,71 \pm 1,84$ | $55,64 \pm 1,62$ |
| Нейтрофилы, $10^9/\text{л}$ | $3,45 \pm 0,26$ | $3,50 \pm 0,18$ |
| Палочкоядерные нейтрофилы, % | $6,24 \pm 0,98$ | $4,29 \pm 0,45$ |
| Сегментоядерные нейтрофилы, % | $46,37 \pm 3,02$ | $51,29 \pm 1,72$ |
| Базофилы, % | $0,95 \pm 0,16$ | $0,63 \pm 0,15$ |
| Эозинофилы, % | $3,08 \pm 0,49$ | $2,84 \pm 0,34$ |
| АФН, % | $4,42 \pm 0,62$ | $3,90 \pm 0,44$ |
| ИФН, усл. ед. | $11,81 \pm 2,19$ | $8,18 \pm 1,40$ |
| Фагоцитарное число, усл. ед. | $2,64 \pm 0,43$ | $1,96 \pm 0,21$ |
| НСТ-тест нейтрофилов спонтанный, % | $57,03 \pm 2,58$ | $57,38 \pm 2,32$ |
| НСТ-тест нейтрофилов индуцированный, % | $53,58 \pm 2,82$ | $52,59 \pm 2,18$ |
| ЛАН, усл. ед. | $439,28 \pm 14,86$ $p=0,049^*$ | $390,77 \pm 17,10$ |
| СЛАН, усл. ед. | $14,60 \pm 1,19$ | $14,06 \pm 1,04$ |
| Моноциты | | |
| Моноциты, % | $6,93 \pm 0,54$ | $6,27 \pm 0,47$ |
| Моноциты, $\cdot 10^9/\text{л}$ | $0,47 \pm 0,06$ | $0,39 \pm 0,03$ |
| АФМ, % | $4,80 \pm 0,60$ | $4,68 \pm 0,56$ |
| ИФМ, усл. ед. | $10,80 \pm 2,25$ | $9,03 \pm 1,55$ |
| Фагоцитарное число, усл. ед. | $1,98 \pm 0,22$ | $1,95 \pm 0,25$ |
| НСТ-тест моноцитов спонтанный, % | $58,86 \pm 2,05$ | $54,85 \pm 1,93$ |
| НСТ-тест моноцитов индуцированный, % | $55,81 \pm 2,40$ | $57,29 \pm 1,97$ |
| ЛАМ, усл. ед. | $316,46 \pm 21,16$ | $321,63 \pm 13,23$ |
| СЛАМ, усл. ед. | $1,29 \pm 0,14$ | $1,25 \pm 0,12$ |
| Цитотоксические клетки | | |
| CD16 ⁺ CD56 ⁺ -лимфоциты, % | $17,43 \pm 1,48$ | $16,08 \pm 1,17$ |
| CD16 ⁺ CD56 ⁺ -лимфоциты, $10^9/\text{л}$ | $0,410 \pm 0,039$ | $0,373 \pm 0,042$ |
| CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ -лимфоциты, % | $5,90 \pm 0,64$ $p=0,036$ | $4,43 \pm 0,50$ |
| CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ -лимфоциты, $10^9/\text{л}$ | $0,138 \pm 0,016$ $p=0,022$ | $0,095 \pm 0,011$ |

Примечания: АФН (АФМ) – активность фагоцитоза нейтрофилов (моноцитов); ИФН (ИФМ) – интенсивность фагоцитоза нейтрофилов (моноцитов); ЛАН (ЛАМ) – лизосомальная активность нейтрофилов (моноцитов); НСТ-тест – тест с нитросиним тетразолием; СЛАН (СЛАМ) – суммарная лизосомальная активность нейтрофилов (моноцитов);

p*обозначает уровень статистической значимости различий средних значений показателей у лиц сравниваемых групп

T-клеточного иммунного ответа (преимущественно Th1-типа), поэтому снижение его уровня в сыворотке крови у представителей основной группы может быть связано с повышением количества у них CD3⁺CD16⁺56⁺-лимфоцитов, либо с определённой функциональной неполноценностью TCR-мутантных T-лимфоцитов. IL-1α является провоспалительным цитокином,

основные функции которого сводятся к активации регенеративных процессов в органах и тканях, усилению пролиферации гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников разных ростков кроветворения, а также к повышению функциональной активности зрелых клеток врождённого и адаптивного иммунитета [18]. Исходя из этого, повышение содержа-

Таблица 4. Средние значения содержания цитокинов в сыворотке крови у представителей основной группы и группы сравнения, (M±m)

| Показатель | Основная группа n=29 | Группа сравнения n=37 |
|---------------|-------------------------|--------------------------|
| IL-1α, пг/мл | 1,66±0,21 p=0,008 | 0,66±0,20 |
| IL-1β, пг/мл | 19,14±6,22 | 44,71±15,52 |
| IL-1RA, пг/мл | 201,45±33,90 | 182,66±123,61 |
| IL-2, пг/мл | 8,90±2,03 p=0,020 | 17,72±4,56 |
| IL-4, пг/мл | 3,04±0,90 | 4,30±0,94 |
| IL-6, пг/мл | 5,86±2,94 | 19,92±10,32 |
| IL-8, пг/мл | 2,43±0,79 | 4,46±1,13 |
| IL-10, пг/мл | 8,88±3,71 | 11,03±1,71 |
| IL-17, пг/мл | 2,32±0,29 | 2,29±0,52 |
| CSF-GM, пг/мл | 1,33±0,39 p=0,012 | 3,94±0,75 |
| CSF-G, пг/мл | 5,98±1,29 | 9,87±2,76 |
| TNFα, пг/мл | 4,00±0,55 | 4,81±0,42 |
| IFNα, пг/мл | 5,20±2,03 | 5,14±1,06 |
| IFNγ, пг/мл | 13,73±3,70 | 22,83±5,52 |

Таблица 5. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (R) между иммунологическими показателями и дозиметрическими характеристиками у облучённых лиц, имеющих повышенную частоту TCR-мутаций

| Показатель | Мощность дозы на ККМ (1951), Гр/год | Мощность дозы на МТ (1951), Гр/год | Поглощённая доза на ККМ, Гр | Поглощённая доза на МТ, Гр |
|---|---|--|-----------------------------------|----------------------------------|
| ЛАН, усл. ед. | 0,48 p=0,020* | 0,08 | 0,49 p=0,013 | -0,04 |
| CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ -лимфоциты, 10 ⁹ /л | 0,30 | 0,43 p=0,025 | 0,30 | 0,23 |
| CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ -лимфоциты, % | 0,03 | 0,05 | 0,07 | -0,20 |
| IL-1α, пг/мл | -0,44 | -0,01 | -0,37 | -0,06 |
| IL-2, пг/мл | 0,04 | 0,10 | 0,05 | -0,04 |
| CSF-GM, пг/мл | 0,19 | 0,10 | 0 | 0,32 |

Примечание: *p – обозначает уровень статистической значимости корреляций (приведён только для корреляций с уровнем статистической значимости p<0,05).

ния IL-1 α в сыворотке крови у лиц, имеющих повышенную частоту мутаций в TCR-генах, может рассматриваться в качестве компенсаторно-приспособительной реакции организма.

Корреляционный и регрессионный анализ позволил выявить умеренную положительную зависимость показателя лизосомальной активности нейтрофилов от мощности дозы в период максимального радиационного воздействия (1951 год) и кумулятивной дозы облучения ККМ (табл. 5). Абсолютное количество CD3⁺CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов в крови у лиц, имеющих повышенный уровень TCR-мутаций, умеренно положительно коррелировало с мощностью дозы на МТ в период максимального радиационного воздействия. Относительное число CD3⁺CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов в крови, а также уровни сывороточных IL-1 α , IL-2 и CSF-GM не зависели от дозы и мощности дозы облучения ККМ и МТ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о сложной связи между параметрами системного иммунитета и частотой TCR-мутаций в лимфоцитах периферической крови у облучённого человека в отдалённые сроки. До настоящего времени не было показано, что радиация может влиять на процесс созревания иммунокомпетентных клеток. По нашему мнению, возможны два механизма повышения частоты TCR-мутаций в лимфоцитах периферической крови у облучённых людей.

Облучение тимуса, вызванное внешним γ -излучением и внутренним за счёт равномерно распределяющихся радионуклидов (преимущественно ¹³⁷Cs), может влиять на процессы V(D)J-рекомбинации, в процессе которой формируется репертуар T-клеточных рецепторов лимфоцитов [7]. По-видимому, мутантные по TCR-генам T-лимфоциты способны преодолеть позитивную и негативную селекцию в тимусе, следствием чего является регистрация их повышенного уровня в периферической крови. Однако такой механизм индукции TCR-мутаций в отдалённые сроки представляется маловероятным в силу следующих причин. Во-первых, известно, что TCR-мутантные T-лимфоциты достаточно быстро элиминируются из организма — период их полувыведения составляет около двух лет [19]. Во-вторых, поскольку в последние 30 лет мощность дозы облучения ККМ у жителей прибрежных сёл реки Течи не превышает

допустимый уровень (1 мЗв в год), повышенный уровень TCR-мутаций у них в отдалённые сроки невозможно объяснить текущим облучением.

Скорее всего, повышенная частота TCR-мутаций в отдалённом периоде является следствием облучения жителей прибрежных сёл реки Течи в период максимальных сбросов радиоактивных отходов, когда наблюдались наибольшие мощности доз облучения (1950–1956 гг.). Как отмечалось выше, у этих людей наибольшие дозы облучения приходились на ККМ, где локализуются наиболее радиочувствительные гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) и костномозговые клетки-предшественники иммуноцитов. Известно, что после облучения в больших дозах может развиваться радиационно-индуцированная нестабильность генома (РИНСГ) [20], в т.ч. и в ГСК и костномозговых клетках-предшественниках. Сублетальные повреждения ГСК, вызванные облучением в период максимального радиационного воздействия, длительное время сохранялись в покоящихся клетках и могли вызывать нестабильность генома в клетках-потомках в отдалённые сроки, когда они начинали пролиферировать. Можно полагать, что следствием РИНСГ в клетках-предшественниках T-лимфоцитов может быть нарушение созревания T-лимфоцитов (в том числе, нарушение формирования репертуара T-клеточных рецепторов), изменение функции зрелых клеток и, как следствие, нарушение иммунных ответов в облучённом организме. Вместе с тем, результаты нашего исследования показывают, что, по-видимому, повышение частоты мутантных по TCR-генам T-лимфоцитов не оказывает существенного влияния на системный иммунитет у облучённых людей в отдалённые сроки.

Корреляционный и регрессионный (данные не представлены) анализ выявленных изменений со стороны иммунной системы от дозы и мощности дозы облучения ККМ и тимуса позволил выявить положительные зависимости показателя ЛАН (от мощности и поглощённой дозы облучения ККМ) и абсолютного количества CD3⁺CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов (от мощности дозы облучения МТ). Поскольку частота TCR-мутаций определяется дозой облучения, можно предположить, что обнаруженные изменения системного иммунитета следует рассматривать как вторичную реакцию иммунной системы на индукцию соматических мутаций в облучённых клетках [5]. TCR-мутации в лимфоцитах периферической крови часто рассматриваются в ка-

честве индикатора соматического радиационно-индуцированного мутагенеза [2–4].

Ранее проведённые исследования свидетельствовали о том, что иммунная система способна отвечать на формирование клона трансформированных клеток после облучения [21]. Известно, что мутации являются важными событиями для индукции канцерогенеза [22]. Однако до настоящего времени неясно, реагирует ли иммунная система на генетические изменения, связанные с формированием мутаций после облучения, которые имеют место значительно раньше, чем злокачественная трансформация стволовых клеток. Ответ на этот вопрос имеет принципиальное значение, так как позволяет понять, на каком этапе после облучения иммунная система включается в процесс поддержания генетического гомеостаза облучённого организма. Результаты данного исследования позволяют предположить, что иммунная система реагирует на повреждения ядерной ДНК достаточно рано, когда после неудачной репарации ДНК имеет место фиксация повреждений ДНК в виде устойчивых мутаций. Характер выявленных изменений иммунитета, которые касаются преимущественно врождённого звена и системы цитокинов, подтверждает данное предположение.

Таким образом, у людей, подвергшихся хроническому аварийному радиационному воздействию и имеющих повышенный уровень TCR-мутаций, в отдалённые сроки отмечено повышение содержания в периферической крови CD3⁺CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов, лизосомальной активности нейтрофилов, сывороточного IL-1 α , интенсивности некроза лимфоцитов и снижение уровней IL-2 и CSF-GM в сыворотке крови.

Выявленные изменения можно рассматривать как реакцию иммунной системы на повышение частоты TCR-мутаций в лимфоцитах облучённых людей. Складывается впечатление, что элиминация TCR-мутантных лимфоцитов из организма обеспечивается, главным образом, благодаря цитотоксическим лимфоцитам. Важно отметить, что изменения иммунитета, выявленные у жителей прибрежных сёл реки Течи, имеющих повышенную частоту TCR-мутаций, регистрируются в период реализации отдалённых радиационно-индуцированных эффектов и могут играть определённую роль в их формировании [8].

Благодарность. Авторы благодарят зав.отделом Базы данных «Человек» Н. В. Старцева за помощь в формировании исследуемых групп.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. ICRP Publication 118. Early and late effects of radiation in normal tissues and organs – threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. *Annals of the ICRP*. Elsevier 2012, 322.
2. Kyoizumi S., Umeki S., Akiyama M., Hirai Y., Kusunoki Y., Nakamura N., Endoh K., Konishi J., Sasaki M. S., Mori T., Fujita S., Cologne J. B. Frequency of mutant T lymphocytes defective in the expression of the T-cell antigen receptor gene among radiation-exposed people. *Mutat. Res.* 1992, 265(2), 173–180.
3. Саенко А. С., Замулаева И. А., Смирнова С. Г. Определение частоты мутаций по локусам гликофорина А и Т-клеточного рецептора: информативность для биологической дозиметрии острого и пролонгированного облучения. *Радиационная биология. Радиоэкология* 1998, 38(2), 171–180. [Sayenko A. S., Zamulayeva I. A., Smirnova S. G. Determining the frequency of mutations at glycoforin A locus and T-cell receptor: informative value for biological dosimetry of acute and prolonged exposure. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologia* 1998, 38(2), 171–180.]
4. Смирнова С. Г., Орлова Н. В., Замулаева И. А., Саенко А. С. Мутации по локусу Т-клеточного рецептора у людей в отдалённые сроки после острого и пролонгированного облучения. *Радиационная биология. Радиоэкология* 2002, 42(6), 624–627. [Smirnova S. G., Orlova N. V., Zamulayeva I. A., Sayenko A. S. Mutations at T-cell receptor locus in humans long after acute or prolonged exposure. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologia* 2002, 42(6), 624–627.]
5. Аклейев А. В., Веремева Г. А., Киозуми С. Влияние хронического радиационного воздействия на уровень соматических мутаций в клетках периферической крови людей в отдалённые сроки. *Радиационная биология. Радиоэкология* 1998, 38(4), 573–586. [Akleyev A. V., Veremeyeva G. A., Kiozumi S. The influence of chronic radiation exposure on the level of somatic mutations in peripheral blood cells of people at later time points. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologia* 1998, 38(4), 573–586.]
6. Блинова Е. А., Веремева Г. А., Аклейев А. В. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes and mutations in the gene of the T-cell receptor in survivors of chronic radiation exposure. *Health Physics*. 2012, 3(1), 58–60.
7. Израэльсон М., Касацкая С., Погорелый М. Анализ индивидуальных репертуаров Т-клеточных рецепторов. *Иммунология*. 2016; 37 (6): 347–352. [Izraelson M., Kasatskaya S., Pogoreliy M. Analysis of individual repertoires of T-cell receptors. *Immunologia* 2016, 37(6), 347–352.]
8. Дегтева М. О., Толстых Е. И., Шагина Н. Б., Шишкина Е. А., Бугров Н. Г., Воробьева М. И., Возилова А. В. Дозы облучения населения, проживавшего на реке Тече. В кн.: Последствия радиоактивного загрязнения реки Течи. Книга, Челябинск 2016, 105–147. [Degteva M. O., Tolstykh E. I., Shagina N. B., Shishkina E. A., Bugrov N. G., Vorobyova M. I., Vozilova A. V. In: Consequences of radioactive contamination of the Techa River. *Kniga, Chelyabinsk* 2016, 105–147.]

9. *Глаголенко Ю. В., Дрожко Е. Г., Мокров Ю. Г.* Восстановление параметров источника сбросов жидких радиоактивных отходов радиохимического производства в р. Теча. Сообщение 1. Разработка методики и основные результаты. Вопросы радиационной безопасности 2008, спец. вып. 76–91. [*Glagolenko Yu. V., Drozhko Ye. G., Mokrov Yu. G.* Reconstruction of the source parameters of the releases of liquid radioactive waste of the radiochemical plant into the Techa River. Report 1. Method development and main results. *Voprosy Radiatsionnoi Bezopasnosti* 2008, Special issue, 76–91.]
10. *Блинова Е. А., Веремеева Г. А., Маркина Т. Н., Аклеев А. В.* Апоптоз лимфоцитов периферической крови и мутации в гене Т-клеточного рецептора у лиц, перенесших хроническое радиационное воздействие. Вопросы радиационной безопасности 2011, 4, 38–44. [*Blinova E. A., Veremeyeva G. A., Markina T. N., Akleyev A. V.* Apoptosis of the peripheral blood lymphocytes and mutations in T-cell receptor gene in persons affected by chronic radiation exposure. *Voprosy Radiatsionnoi Bezopasnosti* 2011, 4, 38–44.]
11. *Хейфец Л. Б., Абалакин В. А.* Разделение форменных элементов крови человека в градиенте плотности верографин-фиколл. Лабораторное дело 1973, 10, 579–581. [*Heifets L. B., Abalakin V. A.* Separation of formed elements of human blood on density gradient Ficoll-verografin. *Laboratornoye delo* 1973, 10, 579–581.]
12. *Кишкун А. А.* Иммунологические исследования и методы диагностики инфекционных заболеваний в клинической практике. Медицинское информационное агентство, Москва 2009, 712. [*Kishkun A. A.* Immunological studies and methods of diagnosing infectious diseases in clinical practice. *Meditsinskoye informatsionnoye agentstvo*, Moscow 2009, 712.]
13. *Фрейдлин И. С.* Система мононуклеарных фагоцитов. Медицина, Москва 1984, 272. [*Freidlin I. S.* Reticuloendothelial system. Moscow 1984, 272.]
14. *Маянский А. Н., Виксман М. К.* Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: методические рекомендации. Казань 1979, 15. [*Mayansky A. N., Viksman M. K.* Method of assessment of functional activity of human neutrophils using nitroblue tetrazolium reduction test: methodical recommendations. Kazanskiy NIEM, Kazan 1979, 15.]
15. *Фрейдлин И. С.* Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека: учебное пособие. Ленинград 1986, 261. [*Freidlin I. S.* Approaches to studying phagocytosing cells in making an assessment of immunological status of a person: textbook. Leningrad 1986, 261.]
16. *Vermes I.* Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods* 2000, 243, 167–190.
17. *Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C.* A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Method.* 1995, 184(1), 39–51.
18. *Гребенюк А. Н., Легеца В. И.* Противолучевые свойства интерлейкина-1. Фолиант, Санкт-Петербург 2012, 90. [*Grebenyuk A. N., Legeza V. I.* Radioprotective properties of interleukin-1. Foliant, Saint Petersburg 2012, 90.]
19. *Akiyama M., Kusunoki Y., Umeki S., Hirai Y., Nakamura N., Kyoizumi S.* Evaluation of four somatic mutation assays as biological dosimeter in humans. In: Dewey WC et al (ed) Radiation Research: A Twentieth-Century Perspective. Vol. II: Congress Proceedings. Academic Press, San Diego 1992, 177–182.
20. *Morgan W. F.* Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects. *Radiat. Res.* 2003, 159(5), 581–596.
21. *Seliger B., Abken H. and Ferrone S.* HLA G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends Immunol.* 2003, 24 (2), 82–87.
22. *Алексеев И. В., Кузьмич А. И., Пleshкан В. В., Тюлькина Д. В., Зиновьева М. В., Костина М. Б., Сverdlov Е. Д.* Причина раковых мутаций: поправимая плохая жизнь или неизбежные стохастические ошибки репликации? Молекулярная биология 2016, 50(6): 906–921. [*Alekseenko I. V., Kuzmich A. I., Pleshkan V. V., Tyulkina D. V., Zinovyeva M. V., Kostina M. B., Sverdlov E. D.* The cause of cancer mutations: improvable bad life or inevitable stochastic replication errors? *Molecular Biology* 2016, 50(6), 906–921.]

**TCR-MUTATIONS IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES
AND IMMUNE STATUS IN INDIVIDUALS EXPOSED
TO CHRONIC RADIATION EXPOSURE**

© 2019 A. A. Akleyev^{1,2*}, E. A. Blinova^{2,3}, I. I. Dolgushin¹

*E-mail: andrey.akleev@yandex.ru

¹*Southern-Urals State Medical University of the Russian Federation
Ministry of Public Health, Chelyabinsk, Russia;*

²*Urals Research Center for Radiation Medicine of the FMBA of Russia, Chelyabinsk, Russia;*

³*Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia*

Received: 29.11.2018. **Accepted:** 22.01.2019

Long after the onset of chronic radiation exposure with predominant irradiation of red bone marrow (mean exposure dose was 0.89 ± 0.09 Gy, individual dose range was 0.09–1.96 Gy) in individuals with increased level of TCR-gene mutated T-lymphocytes a dose-dependent increase in the number of peripheral blood CD3⁺CD16⁺CD56⁺-lymphocytes, lysosomal activity of neutrophils, lymphocyte necrosis intensity as well as serum IL-1 α levels were noted. It is assumed that these changes could be immune response to increase in the mutation frequency (including TCR-mutations) in the cells of individuals exposed at a wide dose-range.

Key words: chronic radiation exposure, red bone marrow, TCR-mutations, immunological status

Authors:

Akleyev A. A., ✉ PhD (Medicine), associate professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical laboratory diagnostics, Southern-Urals State Medical University of the Russian Federation Ministry of Public Health, Chelyabinsk, Russia, 454092 Chelyabinsk, 64 Vorovsky st. Phone: + 7 (351) 2327914. **E-mail:** andrey.akleev@yandex.ru

Blinova E. A., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular-cell Radiobiology, Urals Research Center for Radiation Medicine of FMBA of Russia, Chelyabinsk, Russia;

Dolgushin I. I., MD, Professor, Academician of the Russian Academy of Science. Head of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical laboratory diagnostics, Southern-Urals State Medical University of the Russian Federation Ministry of Public Health, Chelyabinsk, Russia.