

АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ У ХРОНИЧЕСКИ ОБЛУЧЁННЫХ ЛИЦ

Блинова Е. А.^{1,2}, Аклеев А. А.^{1,3}

¹ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России; ²ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет»; ³ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия

Проведена оценка показателей апоптотической гибели лимфоцитов у жителей прибрежных сёл реки Теча, подвергшихся многолетнему низкоинтенсивному радиационному воздействию. Исследование включало в себя анализ количества лимфоцитов на стадии фрагментации ДНК методом TUNEL, количества CD95⁺ лимфоцитов в крови и уровней ФНО α в сыворотке крови. Выявлено статистически значимое повышение содержания сывороточного ФНО α у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в диапазоне доз от 0,08 до 4,23 Гр.

Ключевые слова: радиация, лимфоциты периферической крови, апоптоз, проточная цитометрия

Введение. В результате сбросов жидких радиоактивных отходов в реку Теча в первые годы (1949-1956 гг.) эксплуатации ядерно-промышленного комплекса «Маяк» на территории Южного Урала хроническому радиационному воздействию подверглось более 30000 человек. Характер облучения определялся поступлением в организм основного дозообразующего радионуклида – остеотропного ⁹⁰Sr, в результате чего происходило облучение преимущественно красного костного мозга (ККМ) – центрального органа иммуногенеза [1]. Несмотря на то, что в последние десятилетия годовая мощность дозы облучения в когорте реки Теча достигла фонового уровня, у облучённых лиц до сих пор регистрируются клеточные [2] и тканевые эффекты облучения [3]. Одной из вероятных причин перечисленных эффектов хронического облучения могут являться сублетальные мутации, возникшие вследствие неадекватной репарации повреждённой ДНК в гемопоэтических стволовых клетках ККМ. Известно, что одним из основных механизмов поддержания постоянства генома организма является апоптоз, поскольку он способствует элиминации клеток, несущих разнообразные структурные повреждения. Нарушения регуляции процесса апоптоза в сторону угнетения могут сопровождаться сохранением в организ-

ме клеток с изменённой структурой и с неограниченным пролиферативным потенциалом, что повышает риск развития онкологических заболеваний. Действительно, по данным эпидемиологических исследований, проведённых спустя 60-65 лет после начала облучения, у жителей прибрежных сёл реки Теча имеет место повышенный радиационный риск развития лейкозов и солидных опухолей [3, 4].

Целью нашего исследования являлась оценка интенсивности апоптоза лимфоцитов у жителей прибрежных сёл реки Теча в период реализации отдалённых эффектов облучения (спустя 60-65 лет после начала радиационного воздействия).

В основную группу было включено 145 пациентов, проживавших в прибрежных сёлах реки Теча и подвергшихся хроническому радиационному воздействию. Индивидуальные дозы облучения ККМ были оценены при помощи дозиметрической системы реки Теча (TRDS-2009) [5]. Среднее значение дозы облучения ККМ в этой группе составило $1,12 \pm 0,07$ (0,08-4,23) Гр.

Группу сравнения составили 109 лиц, проживавших в тех же административных районах, что и облучённые, но доза их облучения не превышала значения фонового уровня для жителей Российской Федерации. Обе группы

были сопоставимы по полу, возрасту и национальному составу. На момент обследования средний возраст людей в группе облучённых лиц составил $69 \pm 0,5$ (56-88) лет, в группе сравнения – $69 \pm 0,6$ (58-83) лет.

Перед проведением анализа все пациенты проходили осмотр врача-терапевта с целью исключения заболеваний, которые могли повлиять на интенсивность апоптоза лимфоцитов (острые инфекционные заболевания, обострения хронических заболеваний, болезни системы крови, злокачественные новообразования, аутоиммунные заболевания). Пациентами давалось письменное согласие на проведение исследования. Исследование интенсивности апоптоза и экспрессии рецептора CD95 проводилось на лимфоцитах периферической крови методом проточной цитометрии. Подробно техники выделения лимфоцитов, а также анализа интенсивности апоптоза лимфоцитов методом TUNEL и определения количества клеток, экспрессирующих рецептор CD95, описаны в других публикациях [6]. Исследование содержания ФНО α в сыворотке крови проводилось методом ИФА в твердофазном «сэндвич»-варианте. Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи табличного редактора Excel и программного пакета Statistica 10.0. Сравнение несвязанных групп осуществлялось непараметрическим методом Манна-Уитни (U-тест). Для описания взаимосвязей между показателями интенсивности апоптоза лимфоцитов и величинами кумулятивной дозы облучения ККМ применялся метод непараметрического корреляционного анализа по Спирмену.

В таблице 1 представлены средние значения показателей, отражающих интенсивность апоптоза лимфоцитов, количество клеток, экспрессирующих рецептор CD95, а также уровней ФНО α в сыворотке крови обследованных лиц. В группе облучённых лиц отме-

чено статистически значимое повышение содержания ФНО α ($p=0,01$) в сыворотке крови относительно лиц группы сравнения. Однако, различий в интенсивности апоптоза лимфоцитов по критерию фрагментации ДНК и количестве клеток, экспрессирующих рецептор «клеточной смерти» CD95, между обследованными группами не наблюдалось.

Проведение корреляционного анализа не выявило зависимости количества CD95+ лимфоцитов и клеток с фрагментацией ДНК от величины кумулятивной дозы облучения ККМ.

Таким образом, полученные результаты не позволили установить отличий в интенсивности апоптоза лимфоцитов по критерию фрагментации ДНК и в количестве клеток, имеющих «готовность» к апоптозу по экспрессии CD95 между лицами сравниваемых групп. В то же время, повышение уровней сывороточного ФНО α может свидетельствовать о развитии у облучённых людей в отдалённые сроки хронического радиационно-индуцированного воспаления [7]. Отсутствие корреляционной зависимости интенсивности апоптоза лимфоцитов и экспрессии ими рецептора CD95 от дозы облучения ККМ свидетельствуют о том, что в отдалённые сроки после радиационного воздействия большее влияние на интенсивность апоптоза лимфоцитов оказывают факторы нерадиационной природы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аклеев А. В. Механизмы эффектов хронического радиационного воздействия. Патогенез хронического лучевого синдрома. В кн.: Хронический лучевой синдром у жителей прибрежных сёл реки Теча. Книга, Челябинск 2012, 79-163. [Akleyev A. V. Mechanisms involved in chronic radiation exposure effects. Pathogenesis of chronic radiation syndrome. In: Chronic Radiation Syndrome in Techa Riverside Residents. The Book, Chelyabinsk 2012, 79-163].

Таблица 1 – Интенсивность апоптоза лимфоцитов, частота экспрессии CD95 и содержание ФНО α в сыворотке крови у облучённых лиц и у лиц группы сравнения

Группы	CD95+ лимфоциты, % Медиана (25 %-75 %)	CD95+ лимфоциты, абс. Медиана (25 %-75 %)	Клетки с фрагментацией ДНК, % Медиана (25 %-75 %)	Содержание сывороточного ФНО α , пкг/мл Медиана (25 %-75 %)
Облучённые лица (n=145)	1,70 (0,74-4,33)	0,04 (0,02-0,09)	0,15 (0,06-0,41)	4,72 p=0,01 (3,24-6,75)
Группа сравнения (n=109)	1,67 (0,59-4,22)	0,04 (0,01-0,11)	0,14 (0,05-0,41)	3,59 (1,28-5,24)

2. Blinova E. A., Veremeyeva G. A., Akleyev A. V. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes and mutations in the gene of the T-cell receptor in survivors of chronic radiation exposure. *Health Physics* 2012, 103, 58-60.
3. Крестинина Л. Ю., Силкин С. С., Микрюкова Л. Д., Епифанова С. Б., Аклеев А. В. Сравнительный анализ риска смерти от солидных злокачественных новообразований у населения, облучившегося на реке Теча и Восточно-Уральском радиоактивном следе. *Радиация и риск (Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра)* 2017, Т. 26, № 1, 100-114. [Krestinina L. Yu., Silkin S. S., Mikryukova L. D., Epifanova S. B., Akleyev A. V. Risk of death from solid cancer among residents of the Techa Riverside and the East Urals Radioactive Trace areas exposed to radiation: comparative analysis. *Radiation and Risk (Bulletin of the National Radiation and Epidemiological Register)* 2017, Vol. 26, № 1, 100-114].
4. Krestinina L. Y., Davis F. G., Schonfeld S., Preston D. L., Degteva M. O. et al. Leukaemia incidence in the Techa River Cohort: 1953-2007. *British Journal of Cancer* 2013, 109, 2886-2893.
5. Tolstykh E. I., Degteva M. O., Peremyslova L. M., Shagina N. B., Shishkina E. A. et al. Reconstruction of long-lived radionuclide intakes for Techa river-side residents: strontium-90. *Health Physics* 2011, 101, 28-47.
6. Блинова Е. А., Аклеев А. В. Апоптоз лимфоцитов периферической крови у жителей прибрежной территории реки Теча, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. *Радиационная биология. Радиоэкология* 2016, Т. 56, № 1, 26-34. [Blinova E. A., Akleyev A. V. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in residents of the coastal area of the Techa River exposed to chronic irradiation. *Radiation Biology. Radioecology* 2016, Vol. 56, № 1, 26-34].
7. Krewski D., Lubin J. H., Zielinski J. M., Alavanja M., Catalan V. S. et al. Residential radon and risk of lung cancer: a combined analysis of 7 North American case-control studies. *Epidemiology* 2005, 16, 137-145.

ANALYSIS OF THE APOPTOTIC DEATH INDICATORS OF LYMPHOCYTES AMONG THE PERSONS EXPOSED TO CHRONIC IRRADIATION

Blinova E. A.^{1,2}, Akleyev A. A.^{1,3}

¹FGBUN "The Ural scientific and practical center of radiation medicine" of FMBA of Russia, ²Chelyabinsk State University; ³South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

The evaluation of the apoptotic death of lymphocytes among the inhabitants of the coastal villages of the Techa River exposed to long-term low-level irradiation was carried out. We analysed the number of lymphocytes in the stage of DNA fragmentation by the TUNEL method, the number of CD95⁺ lymphocytes in the blood and the levels of TNF α in serum. A statistically significant increase in serum TNF α was observed in persons exposed to chronic radiation exposure in the dose range from 0.08 to 4.23 Gy.

Key words: radiation, peripheral blood lymphocytes, apoptosis, flow cytometry