

На правах рукописи



Донов Павел Николаевич

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ ИММУННЫЙ ОТВЕТ И  
АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ, КАК БИОМАРКЕРЫ  
РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

03.01.01 – радиобиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2017



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность работы

Последствия воздействия ионизирующего излучения (ИИ) на клетки организма человека зависят от процессов репарации ДНК, контроля клеточного цикла, апоптоза, активности антиоксидантов и иммунной системы [Аклеев, 2012; МКРЗ, 2012]. Среди отдаленных последствий воздействия ИИ генетические нарушения представляют особую значимость, поскольку они являются предпосылкой канцерогенеза [Котеров, 2010]. В отдаленные сроки после воздействия ИИ в геноме человека сохраняется повышенный уровень повреждений: стабильных и нестабильных хромосомных aberrаций (ХА), микроядер, мультиаберрантных клеток, мутаций в генах Т-клеточного рецептора (TCR) и др. [Hande и др., 2005; Wahab и др., 2008; Lazutka, 1996; Kodama и др., 2001; Neel, 1998; Saenko и др., 2000; Slozina и др., 1997; Vorobtsova, Semenov, 2006]. У лиц, облученных в результате радиоактивного загрязнения р. Теча, в отдаленный период сохраняется повышенный уровень ХА, TCR-мутаций, апоптоза лимфоцитов и клеток с нарушениями пролиферации [Аклеев и др. 1998; Veremeueva и др., 2010; Vozilova и др., 2013]. Эпидемиологические исследования выявили повышенный риск злокачественных новообразований (ЗНО) в когорте реки Теча [Krestinina и др., 2013; Schonfeld и др., 2013].

Иммунная система является критической при хроническом воздействии ИИ, что обусловлено её высокой радиочувствительностью и участием в поддержании генетического гомеостаза [Аклеев, 2012]. Радиационно-индуцированные изменения в иммунокомпетентных клетках и их предшественниках могут сохраняться и вносить свой вклад в развитие отдаленных эффектов облучения, в частности – ЗНО. При этом важное значение имеет окислительный стресс, который является одним из последствий воздействия ИИ, опосредующих развитие отдаленных эффектов [Azzam и др., 2012; Vuonanno и др., 2011]. В отдаленный период у облученных лиц сохраняются нарушения окислительно-восстановительного гомеостаза, о чем свидетельствует снижение уровня

супероксиддисмутазы (СОД) и повышение уровня оксида азота (NO) в сыворотке крови [Veremeyeva и др., 2010].

Актуальным вопросом современной радиобиологии является индивидуальная радиочувствительность (РЧ) человека. Генетический полиморфизм может быть одним из факторов, влияющих на РЧ. По данным литературы, однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) в генах иммунной системы и антиоксидантов способны влиять на работу данных систем, изменяя степень экспрессии генов, структуру и функцию их продуктов. Часто данные ОНП ассоциированы с развитием ЗНО. В литературе не найдено исследований, посвященных комплексному анализу связи ОНП с радиационно-индуцированными генетическими эффектами сочетанного хронического внешнего и внутреннего облучения человека в дозах на красный костный мозг (ККМ) от 0,5 мГр до 4,67 Гр в отдаленные сроки после воздействия (более 50 лет). Поэтому проводимое исследование представляет интерес в плане поиска маркеров РЧ на индивидуальном уровне.

**Цель:** проанализировать значение однонуклеотидных полиморфизмов в локусах генов, контролирующих работу иммунной и антиоксидантной систем  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$ ,  $IL2$ ,  $IL4$ ,  $IL6$ ,  $IL8$ ,  $IL10$ ,  $IL12$ ,  $CYBA$ ,  $GPX1$ ,  $CAT$ ,  $SOD2$ ,  $MPO$  в формировании индивидуальной чувствительности человека к хроническому воздействию ионизирующего излучения.

**Задачи исследования:**

- 1) Провести анализ частот аллелей по изучаемым локусам в группе жителей прибрежных сел реки Теча
- 2) Исследовать влияние дозы облучения красного костного мозга (ККМ), мощности дозы, возраста, употребления алкоголя и курения на частоту нестабильных хромосомных aberrаций (ХА) и TCR-мутаций в лимфоцитах облученных лиц с исследуемым генотипом.
- 3) Оценить частоту нестабильных ХА и TCR-мутаций в лимфоцитах крови у облученных лиц с ОНП генов, контролирующих иммунную и антиоксидантную системы.

4) Проанализировать показатели систем окислительно-восстановительного гомеостаза и иммунитета у носителей генотипов, ассоциированных с повышенной частотой нестабильных ХА и TCR-мутаций.

### **Научная новизна**

В группе лиц из когорты р. Теча, которые подверглись хроническому радиационному воздействию в диапазоне кумулятивных доз на ККМ от 0,5 мГр до 4,67 Гр, впервые проведен комплексный анализ связи генотипов по ОНП в локусах генов иммунной системы *IL1 $\beta$  rs1143634*, *IL2 rs2069762*, *IL4 rs2070874*, *IL6 rs1800795*, *IL8 rs4073*, *IL10 rs1800872*, *IL12 rs3212227*, *MPO rs2333227*, *CYBA rs4673*, *TNF $\alpha$  rs361525*, антиоксидантов *GPX1 rs1050450*, *CAT rs7943316*, *SOD2 rs4880*, а также пола, этнического фактора, курения и употребления алкоголя, дозы на ККМ и мощности дозы с частотой нестабильных ХА лимфоцитов и мутаций Т-клеточного рецептора в отдаленные сроки после воздействия (более 50 лет). Впервые показана ассоциация аллеля Т локуса *IL4 rs2070874* – со снижением частоты нестабильных ХА лимфоцитов, а генотипа АС по локусу *IL12 rs3212227* – со снижением частоты мутаций Т-клеточного рецептора лимфоцитов у изучаемых облученных лиц. Кроме того, у носителей аллеля Т по локусу *IL4 rs2070874*, ассоциированного со снижением частоты ХА, снижено абсолютное количество Т-лимфоцитов, Т-хелперов, В-лимфоцитов, относительное и абсолютное содержание натуральных киллеров – Т-клеток (NKT-клеток), суммарная лизосомальная активность моноцитов и уровень ИЛ-17, в то время как у носителей генотипа АС по локусу *IL12 rs3212227*, ассоциированного со снижением частоты TCR-мутаций, отмечено снижение доли В-лимфоцитов, абсолютного количества адгезирующих моноцитов и повышение уровня ИЛ-2 и ИЛ-8.

### **Положения, выносимые на защиту**

1) В группе лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в отдаленный период (через 50-60 лет от начала воздействия) в дозах на красный костный мозг от 0,5 мГр до 4,67 Гр (средняя доза 0,99 Гр), носители минорного аллеля Т по полиморфному локусу *IL4 rs2070874* относительно

гомозигот СС характеризуются снижением частоты нестабильных ХА обменного типа в лимфоцитах периферической крови, а носители гетерозиготного генотипа АС по локусу *IL12 rs3212227* по сравнению с гомозиготами АА и СС характеризуются снижением частоты соматических мутаций в генах TCR в лимфоцитах периферической крови.

2) У облученных лиц – носителей аллеля Т локуса *IL4 rs2070874* по сравнению с носителями генотипа СС и у носителей генотипа АС по локусу *IL12 rs3212227* по сравнению с гомозиготами АА и СС отмечены значимые различия параметров, характеризующих как адаптивный, так и врожденный иммунитет.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Результаты исследования указывают на ассоциацию ОНП генов иммунной системы *IL4 rs2070874* и *IL12 rs3212227* с уровнем нестабильных обменных ХА и соматических мутаций в лимфоцитах, а также с показателями иммунной системы у лиц, подвергшихся хроническому воздействию ИИ в отдаленный период. Выявленные особенности позволяют рассматривать ОНП *IL4 rs2070874* и *IL12 rs3212227* в качестве биомаркеров, позволяющих оценить резистентность человека к отдаленным соматико-стохастическим эффектам радиационного воздействия. Результаты работы могут быть использованы для оптимизации наблюдения за большими группами облученного населения после радиационных аварий, что повысит эффективность лечебно-профилактических и диагностических мероприятий, направленных на выявление отдаленных эффектов облучения. Материалы исследования используются в учебном процессе на кафедре радиационной биологии Челябинского Государственного университета.

### **Апробация работы**

Положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на 7 конференциях: «Региональная Научно-практическая конференция, посвященная 15-летию биологического факультета ЧелГУ» (Челябинск, 10-12 апреля 2013 г.), «58-я ежегодная конференция Health Physics Society» (США, Мэдиссон, 7-11 июля 2013 г.), «Радиация, экология и техносфера» (Белоруссия, Гомель, 26-27 сентября 2013 г.), «Полипатии в семейной медицине, профилактической и клинической

кардиологии» (Челябинск, ЮУГМУ, 2013), 59-я ежегодная конференция Health Physics Society (США, Балтимор, 13-17 июля 2014 г.), VII Международная студенческая электронная научная конференция «Студенческий научный форум» (<http://www.scienceforum.ru/>, март 2015), 60-я ежегодная конференция Health Physics Society (США, Индианаполис, 14-18 июля 2015 г.).

**Публикации:** по теме диссертации опубликовано 12 работ, из них 4 статьи в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций.

### **Структура диссертации**

Диссертация изложена на 156 страницах компьютерного текста и включает 23 таблицы, 10 рисунков. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, главы собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы, включающего 395 источников (48 отечественных и 347 иностранных).

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Характеристика обследуемой группы облученных лиц**

Изучаемая группа состояла из 396 человек, непосредственно подвергшихся хроническому воздействию ИИ на реке Теча, в которую осуществлялся сброс жидких радиоактивных отходов (ЖРО) ПО «Маяк» [Аклеев, 2012].

Критерии включения в исследуемую группу: год рождения (до 1949 включительно), постоянное проживание в прибрежных населенных пунктах р. Теча в 1950-1960 годы, наличие реконструированной индивидуальной дозы облучения ККМ, наличие образца крови в банке ДНК УНПЦ РМ. Критерии исключения: аутоиммунные и онкологические заболевания, острые или хронические воспалительные заболевания в фазе обострения, применение цитостатиков и длительное применение антибиотиков, диагностическое облучение ИИ в течение 6 предшествующих месяцев, контакт с генотоксичными химическими веществами в процессе профессиональной деятельности, были

исключены потомки обследуемых лиц. На 62,9% (249 человек) группа состояла из татар и башкир, славянские народы (русские, украинцы, белорусы) составляли 37,1% (147 человек), что характерно для данной местности, где коренными народами являются башкиры и татары. Всего в группе было 134 (33,8%) мужчин и 262 (66,2%) женщин, что характерно для данной возрастной группы. Соотношение полов в группе славян (31,3% мужчин / 68,7% женщин) незначительно отличалось от такового в группе татар и башкир (35,3% мужчин / 64,7% женщин). Средний возраст составил 68,1 лет (от 51 до 90), в группах мужчин и женщин он различается незначительно (66,9/68,6 лет), так же как в группах татар и башкир и славян (67,3/69,3 лет). Лица исследуемой группы подверглись комбинированному внешнему и внутреннему  $\gamma$ - и  $\beta$ - облучению с низкой ЛПЭ. Основными источниками внешнего  $\gamma$ -облучения являлись: вода, донные отложения и пойменные почвы, участки территории, загрязненные в результате хозяйственной деятельности. Доза от внешнего  $\gamma$ -излучения сформировалась преимущественно в 1950-1952 годах [Аклеев, 2012]. Внутреннее облучение было обусловлено радионуклидами, поступавшими в организм с речной водой и продуктами питания местного производства [Дегтева и др., 2000]. Основным дозообразующим радионуклидом являлся остеотропный  $^{90}\text{Sr}$  [Tolstykh и др., 2011]. В связи с этим основной количественной мерой воздействия ИИ на организм обследованных лиц была выбрана доза облучения ККМ. Индивидуальные дозы облучения ККМ были рассчитаны в биофизической лаборатории УНПЦ РМ с использованием дозиметрической системы TRDS-2009 [Tolstykh и др., 2011]. Диапазон доз на ККМ в группе составил 0,5 мГр – 4,67 Гр, медиана 0,86 Гр. Наибольшая интенсивность воздействия ИИ в исследуемой группе была отмечена в 1951 году: диапазон значений мощности дозы от 0 до 1,36 Гр/год, медиана 0,2 Гр. Перед забором крови обследуемые лица проходили анкетирование на предмет курения табака и употребления алкоголя. Ответы ранжировались согласно критериям [Калев, Волкова, 1996]. 75% (286 чел.) обследуемых никогда не курили, 15% (57 чел.) бросили более чем за год до обследования, 10% (39 чел.) курили на момент обследования. 17% (64 чел.)

употребляли алкоголь редко (менее 350 мл в водочном эквиваленте в месяц), 81% (308 чел.) – умеренно (350 – 700 мл), 2% (10 чел.) – часто (более 750 мл).

### **Методы исследования**

Собственные лабораторные исследования включали: выделение ДНК из образцов крови, генотипирование по изучаемым ОНП. Частота ХА, TCR-мутаций, иммунологические и биохимические исследования были проведены сотрудниками лаборатории радиационной генетики УНПЦ РМ.

Генотипирование включало три этапа: выделение ДНК из образца крови, постановка ПЦР и анализ данных ПЦР. Выделение ДНК производилось из венозной крови, хранящейся в банке ДНК УНПЦ РМ при  $-80^{\circ}\text{C}$ , методом фенол-хлороформной экстракции [Sambrook, Russell, 2006] с модификациями. Генотипирование образцов проводилось методом ПЦР в реальном времени, с использованием тест-систем фирмы «Тест-ген» (Россия). Принцип действия тест-системы описан [Holland и др., 1991; Kutuyavin и др., 2000]. ПЦР проводилась на приборе «StepOnePlus» (Applied Biosystems, США). Анализ данных генотипирования производился в программе Step One Software (Applied Biosystems, США).

Объектом цитогенетического исследования являлись лимфоциты. Препараты из Т-лимфоцитов периферической крови доноров получали согласно [МАГАТЭ, 2014]. Анализировали частоту обменных нестабильных ХА, которые суммировали частоту дицентрических и кольцевых хромосом, ацентрических фрагментов на 100 клеток. Исследование проведено кандидатом биологических наук Возиловой А.В.

Методика анализа частоты TCR-мутаций описана [Kunugita и др., 2007; Kyoizumi и др., 1990]. Анализ проводился в клеточной суспензии с использованием МКА IgG1-PE/ IgG1-FITC и CD3-FITC/CD4-PE (Beckman Coulter, США). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре EPIC XL-MCL (Beckman Coulter, США). Исследование проведено кандидатом биологических наук Маркиной Т.Н.

Для оценки окислительного стресса анализировались уровни CuZn-СОД, малонового диальдегида (МДА), NO в сыворотке крови. Уровень фермента CuZn-СОД определяли методом ИФА на планшетах Bender MedSystems (Австрия) с использованием автоматического ИФА-анализатора LAZURITE (Dy nex Technologies, США). Содержание МДА определяли в реакции с тиобарбитуровой кислотой [Камышников, 2000]. Оптическую плотность раствора измеряли на анализаторе «ФП 901-М» (Labsystems, Финляндия). Анализ уровня NO в сыворотке крови проводили с использованием тест-систем R&D Systems (США) по методике [Nims и др., 1996]. Исследования проведены кандидатом биологических наук Варфоломеевой Т.А.

Иммунологические исследования проведены кандидатом медицинских наук Аклеевым А.А. Параметры иммунитета оценивали с использованием стандартных методик. Рассматривали следующие параметры: 1) Абсолютное и относительное количество лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов; 2) Абсолютное и относительное количество: CD3+, CD4+, CD8+, CD3-CD16+56+, CD3+CD16+56+, CD19+ (с помощью МКА) [Клаус, 1990], соотношение количества CD4+/CD8+ клеток; 3) Концентрация ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-1 $\beta$ -РА, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-17, ГМФР, ГФР, TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IgA, IgG, IgM оценивалась методом ИФА в твердофазном «сэндвич» - варианте. 4) Функциональная активность моноцитов и нейтрофилов: поглотительная способность (в тесте с микросферами инертного полистирольного латекса [Фрейдлин и др. 1976; Хейфец, Абалакин, 1973; Эберт и др., 1983]; ферментативная (лизосомальная) активность – по включению в лизосомы акридинового оранжевого [Хейфец, Абалакин, 1973]; окислительно-восстановительный потенциал – в спонтанном и индуцированном (частицами латекса) варианте теста с нитросиним тетразолием (НСТ) [Виксман, Маянский, 1979; Park, Fikrig, Smithwick, 1968; Segal, 1985].

### **Статистическая обработка результатов**

Анализ частот аллелей и генотипов проводился с помощью сервиса SNPStats [Solé и др., 2006]. Сравнение частот генотипов выполнено с применением статистического критерия  $\chi^2$  Пирсона в программе WinPeri v.11.43

[Abramson, 2011] и SNPStats. При анализе частот генотипов использовались кодоминантная, доминантная, рецессивная и сверхдоминантная генетические модели [Clarke и др., 2011]. Выявление ОНП, ассоциированных с анализируемой величиной проводилось методом «random forests» [Hothorn, Hornik, Zeileis, 2006] в модификации С. Strobl и др. [Hapfelmeier и др., 2012; Hothorn и др., 2006; Janitza и др., 2013; Strobl и др., 2008; Strobl и др., 2009] в программе «R». Построение графиков, сравнение групп по количественным признакам выполнялось в программе Statistica v.10.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Частоты аллелей и генотипов в группе лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию

Частоты аллелей и генотипов по изучаемым полиморфным локусам генов иммунной системы и антиоксидантов в обследуемой группе представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Частота аллелей и генотипов по полиморфным локусам генов иммунной системы и антиоксидантов в исследуемой группе

Локус	Частота аллеля (N, %)		Частота генотипа (N, %)			p
<i>IL1β rs1143634</i> (n=394)	C	T	C/C	C/T	T/T	0,44
	624 (79%)	164 (21%)	244 (62%)	136 (35%)	14 (3%)	
<i>IL2 rs2069762</i> (n=394)	A	C	A/A	A/C	C/C	0,58
	508 (64%)	280 (36%)	161 (41%)	186 (47%)	47 (12%)	
<i>IL4 rs2070874</i> (n=393)	C	T	C/C	C/T	T/T	1
	538 (68%)	248 (32%)	184 (47%)	170 (43%)	39 (10%)	
<i>IL6 rs1800795</i> (n=368)	G	C	G/G	G/C	C/C	0,91
	439 (60%)	297 (40%)	130 (35%)	179 (49%)	59 (16%)	
<i>IL8 rs4073</i> (n=378)	T	A	T/T	T/A	A/A	0,92
	406 (54%)	350 (46%)	108 (29%)	190 (50%)	80 (21%)	
<i>IL10 rs1800872</i> (n=386)	C	A	C/C	C/A	A/A	0,63
	542 (70%)	230 (30%)	188 (49%)	166 (43%)	32 (8%)	
<i>IL12 rs3212227</i> (n=391)	A	C	A/A	A/C	C/C	0,89
	586 (75%)	196 (25%)	220 (56%)	146 (38%)	25 (6%)	

<i>TNFA rs361525</i> (n=394)	G	A	G/G	G/A	A/A	0,71
	733 (93%)	55 (7%)	340 (85,5%)	53 (14%)	1 (0,5%)	
<i>CYBA rs4673</i> (n=390)	C	T	C/C	C/T	T/T	0,38
	565 (72%)	215 (28%)	208 (54%)	149 (38%)	33 (8%)	
<i>MPO rs2333227</i> (n=394)	C	T	C/C	C/T	T/T	0,2
	679 (86%)	109 (14%)	289 (73%)	101 (26%)	4 (1%)	
<i>GPX1 rs1050450</i> (n=387)	C	T	C/C	C/T	T/T	0,71
	548 (71%)	226 (29%)	192 (50%)	164 (42%)	31 (8%)	
<i>CAT rs7943316</i> (n=384)	T	A	T/T	T/A	A/A	0,92
	460 (60%)	308 (40%)	137 (36%)	186 (48%)	61 (16%)	
<i>SOD2 rs4880</i> (n=385)	T	C	T/T	T/C	C/C	0,6
	441 (57%)	329 (43%)	129 (34%)	183 (47%)	73 (19%)	

Примечание: p – уровень значимости отклонения частот генотипов от равновесного распределения Харди-Вайнберга, N – количество наблюдений.

Частоты аллелей и генотипов соответствуют равновесию Харди-Вайнберга, что указывает на стабильность и случайность распределения аллелей в исследуемой выборке. Полученные частоты были сопоставлены с данными других исследований в аналогичных этнических группах, также были оценены различия по частоте генотипов между этническими группами. Выявлено различие в распределении генотипов по *IL1β rs1143634*: в группе славян наблюдалась более высокая частота CC (72%) по сравнению с татарами и башкирами (56%), а среди последних чаще встречались гетерозиготы (40% против 24% у славян). Группа славян значимо отличалась по распределению генотипов от литературных данных: в исследовании [Хуторная и др., 2014] в группе русских частота генотипов была ближе к таковой для исследуемой группы татар и башкир. Распределение генотипов *IL1b rs1143634* в группе татар с башкирами значимо не отличалось от данных литературы [Нургалиева и др., 2014]. Значимые различия обнаружены и для *IL6 rs1800795*: генотипы GC и CC чаще встречались у славян, чем у татар и башкир (54% и 21% против 45% и 14% соответственно, p<0,01). При этом, частота генотипов у славян в исследуемой группе не отличалась от таковой в литературе [Трофимов, 2009]. Различия в распределении аллелей между этническими группами также обнаружены для *TNFA rs361525*: генотипы GA и AA

чаще встречались у татар с башкирами, чем у славян (17% и 0,5% у татар с башкирами против 8% и 0% у славян соответственно,  $p=0,02$ ). При этом, данные литературы по славянам согласуются с полученными данными [Трофимов, 2009]. Частота минорного аллеля T *CYBA rs4673* была значимо выше у славян, чем у татар с башкирами (генотип TT 13% против 6%). Вместе с тем, частота T в группе славян была выше, чем описано в литературе (генотипы СТ и ТТ 39% и 13% по сравнению с 29,6% и 8,6% в литературе [Никитин, 2008]). Генетический обмен между этническими группами славян, татар и башкир долгое время был затруднен, чему способствовала географическая и культурная изоляция. В связи с этим, наблюдаемые различия частот генотипов по локусам *IL1 $\beta$  rs1143634*, *IL6 rs1800795*, *TNF $\alpha$  rs361525*, *CYBA rs4673* в этнических группах ожидаемы. Отличия полученных частот генотипов по локусам *IL1 $\beta$  rs1143634* и *CYBA rs4673* в группе славян от литературных данных могут объясняться сложностью стратификации анализа: в исследуемую группу славян могли входить лица, принадлежащие к украинскому, белорусскому, молдавскому, немецкому этносу.

Исходя из предположения, что частота аллелей в отдаленные сроки после облучения может изменяться в виду различной скорости элиминации аллелей в зависимости от кумулятивной дозы облучения ККМ, было оценено равновесие Харди-Вайнберга в трёх дозовых подгруппах: до 0,5 Гр, 0,5 – 1 Гр и более 1 Гр на ККМ. В группе лиц с кумулятивной дозой облучения ККМ, превышающей 1 Гр, наблюдается отклонение от равновесного распределения Харди-Вайнберга по локусу *IL6 rs1800795* (N, чел.: TT= 66 (41%), ТА=63 (39%), АА=31 (20%),  $p=0,03$ ). В группе лиц с дозой на ККМ более 1 Гр наблюдается сниженная доля гетерозигот GC и повышенная доля гомозигот GG и CC локуса *IL6 rs1800795*. Было проверено распределение частот генотипов локуса *IL6 rs1800795* при дозе более 1 Гр в этнических группах. Обнаружено отклонение частот генотипов по локусу *IL6 rs1800795* от равновесия Харди-Вайнберга при дозе более 1 Гр у татар и башкир ( $p=0,04$ ): отмечается преобладание генотипа GG (48,3% против 20% у славян).

## **Связь генетического полиморфизма с частотой нестабильных хромосомных aberrаций в отдаленные сроки после хронического радиационного воздействия**

Частота ХА в исследуемой группе варьировала от 0% до 3,1%. При этом, у 79,3% лиц частота ХА на 100 клеток была равна 0%, у 20% лиц частота ХА составляла 0,2% и более.

По данным А.В. Возиловой, в группе необлученных лиц (сопоставимой по возрасту и другим нерадиационным факторам с облученными) уровень обменных нестабильных ХА составляет  $0,15 \pm 0,05\%$  (контрольный уровень) [Vozilova и др., 2013]. Учитывая то, что период полувыведения лимфоцитов, содержащих нестабильные ХА варьирует от 110 дней до 4 лет [Снигирева, 2011], частота ХА в группе исследуемых облученных лиц спустя 50-60 лет после хронического облучения не должна превышать контрольный уровень. Несмотря на это, у 20,7% лиц исследуемой выборки частота ХА превышает верхнюю границу ошибки среднего для контрольного уровня (0,2%), в связи с чем исследуемая группа была разделена на 2 подгруппы: 1) с частотой ХА менее 0,2% (138 человек, 79,3%), 2) с частотой ХА 0,2% и более (36 человек, 20,7%).

В результате анализа связи генотипа, дозы и других параметров с частотой ХА с помощью метода «random forests» был выявлен один параметр, связанный с уровнем ХА – полиморфный локус *IL4 rs2070874*. Поскольку был проведен только **качественный** анализ параметров, связанных с частотой ХА, было необходимо провести **количественную оценку** выявленной связи. В результате обнаружено снижение частоты ХА в группе носителей генотипов СТ и ТТ по сравнению с гомозиготами СС (доминантная модель): ОШ=0,45, 95% ДИ=0,21-0,97 ( $p=0,039$ ).

Несмотря на то, что нестабильные обменные ХА являются маркером радиационного воздействия, в исследуемой группе лиц не было выявлено прямой связи дозы и мощности дозы с частотой ХА, но данная связь могла быть опосредована генотипом. В связи с этим, было оценено влияние генотипа на связь дозы с частотой ХА (рисунки 1, 2).

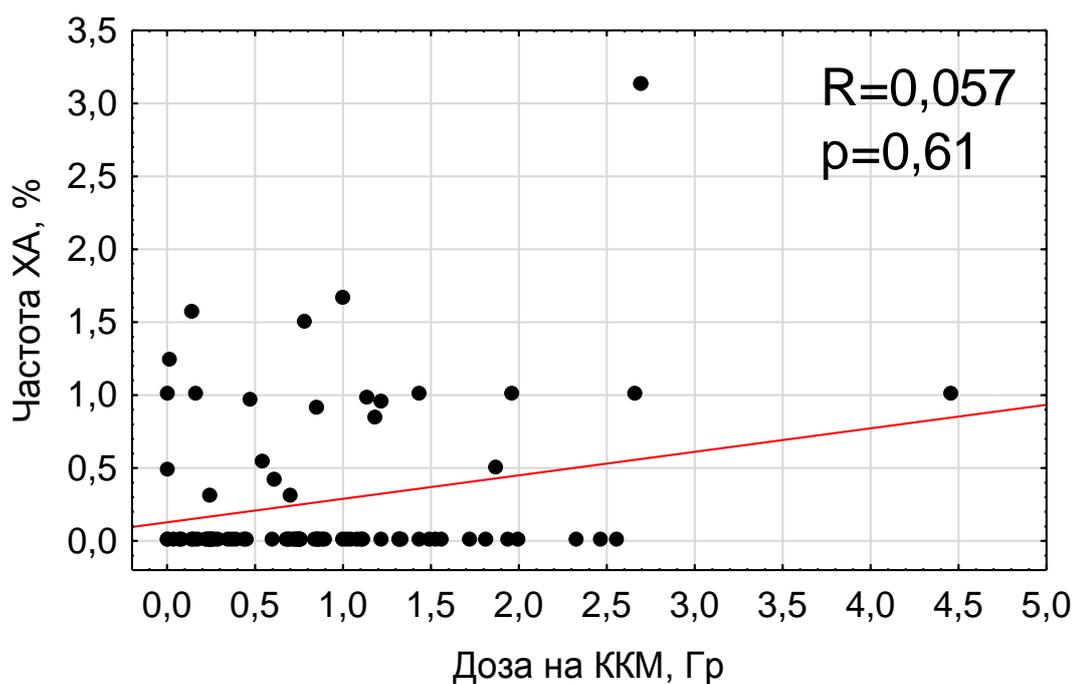


Рисунок 1 – Корреляция частоты нестабильных обменных ХА с дозой облучения ККМ в группе носителей генотипа СС локуса *IL4* rs2070874.

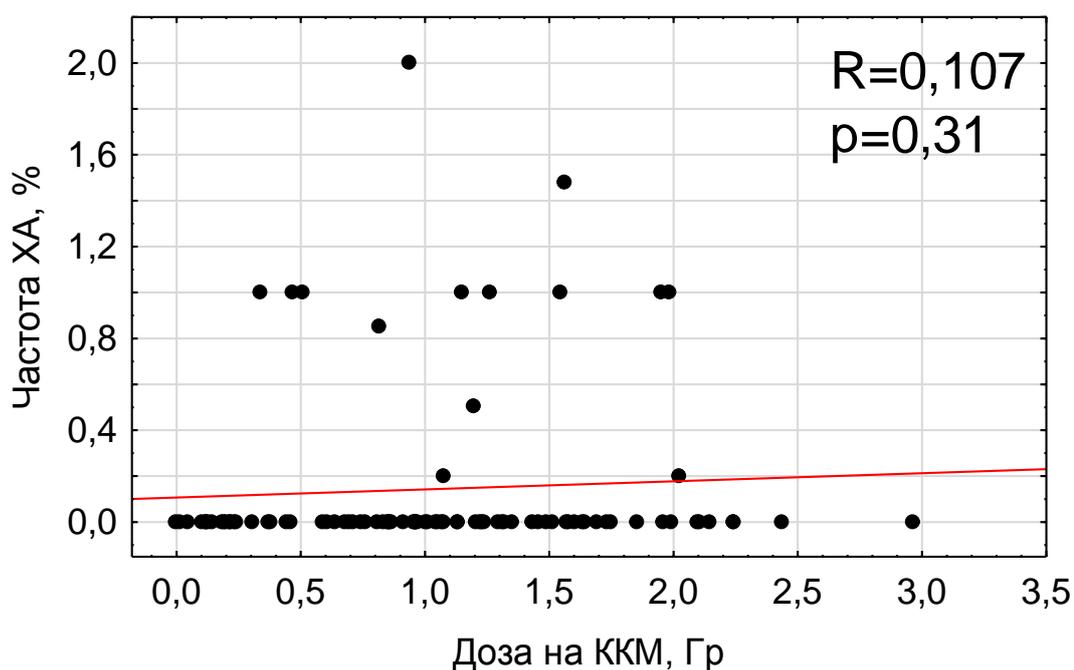


Рисунок 2 – Корреляция частоты нестабильных обменных ХА с дозой облучения ККМ в группе носителей генотипов СТ и ТТ локуса *IL4* rs2070874.

Корреляция между дозой облучения и частотой ХА не оказалась статистически значимой ни в группе гомозигот *IL4* rs2070874 СС ( $R=0,057$ ,  $p=0,61$ ), ни в группе носителей аллеля Т ( $R=0,107$ ,  $p=0,31$ ).

Итак, в результате проведенного анализа показано: 1) отсутствие связи с частотой ХА дозы, мощности дозы облучения ККМ, возраста и других параметров кроме генотипа по локусу *IL4 rs2070874*; 2) отсутствие влияния генотипа на корреляцию дозы с частотой ХА; 3) у носителей минорного аллеля Т наблюдается сниженная частота ХА по сравнению с носителями генотипа СС.

### **Связь генетического полиморфизма с частотой мутаций Т-клеточного рецептора в отдаленные сроки после хронического радиационного воздействия**

**Качественный** анализ обнаружил связь ОНП *IL12 rs3212227* с частотой TCR-мутаций. **Количественная** оценка обнаруженной связи показала, что у носителей АС частота TCR-мутаций (в среднем 0,19%) по сравнению с АА и СС (в среднем 0,48%) снижена на 0,29% ( $p=0,037$ ). Не было выявлено прямой связи дозы с частотой TCR-мутаций. Однако, данная связь могла быть опосредована генотипом, в связи с чем было оценено влияние генотипа на взаимосвязь дозы с частотой TCR-мутаций (рисунки 3, 4).

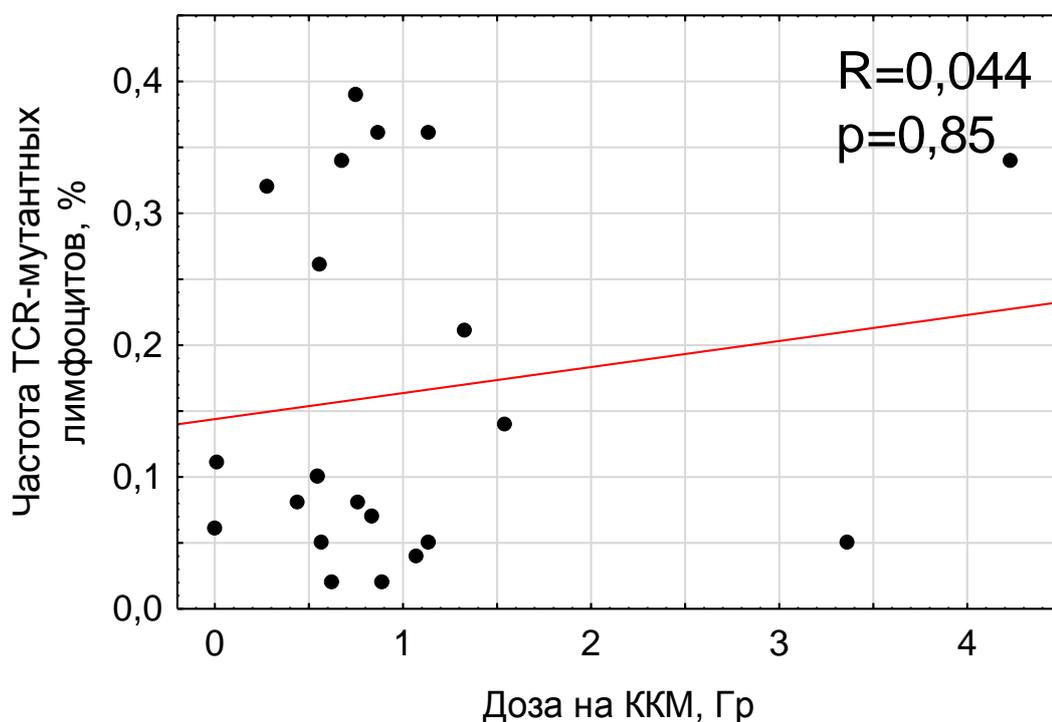
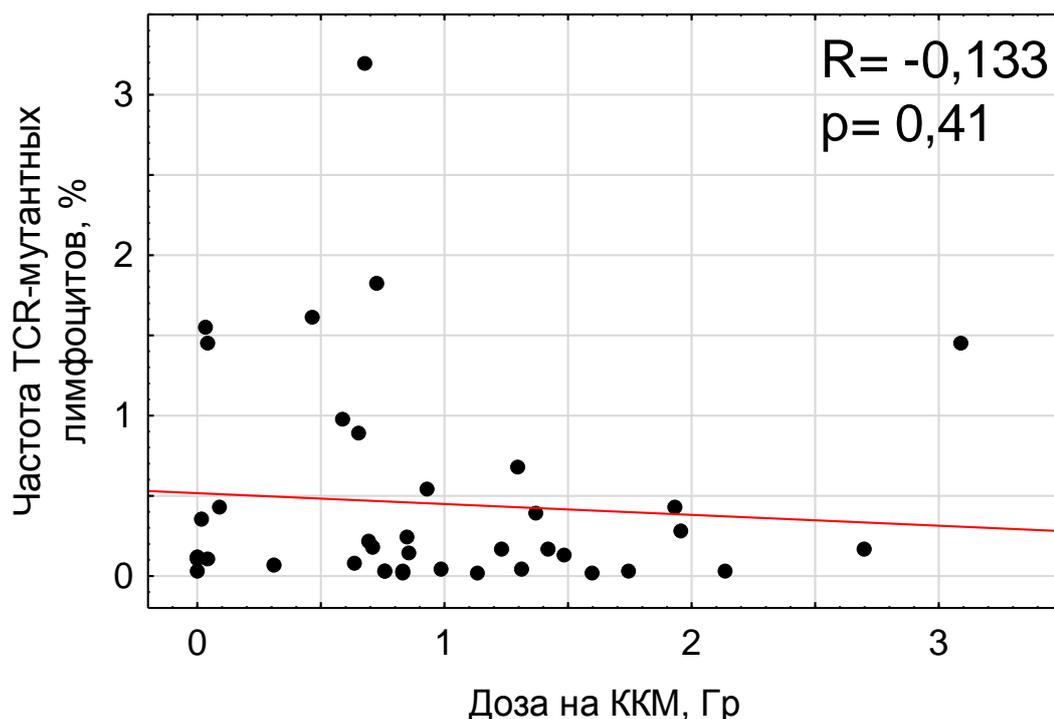


Рисунок 3 – Корреляция частоты TCR-мутантных лимфоцитов с дозой облучения ККМ в группе с генотипом АС локуса *IL12 rs3212227*



## Параметры иммунной и антиоксидантной систем у носителей генотипов, ассоциированных с частотой ХА и TCR-мутаций

Допустимо предположить, что связь генов, кодирующих ИЛ-4 и ИЛ-12 с частотой нестабильных обменных ХА и TCR-мутаций у облученных лиц может быть опосредована влиянием различных аллелей ОНП на процессы транскрипции и/или трансляции генов иммунной системы, что в условиях хронического радиационного воздействия на иммунную систему могло способствовать нарушениям гомеостаза. Исходя из этого предположения, согласно задаче №4 данной работы, были оценены иммунные показатели у носителей генотипов СС и СТ+ТТ по локусу *IL4 rs2070874*, ассоциированных с уровнем ХА, и у носителей генотипов АС и АА+СС по локусу *IL12 rs3212227*, ассоциированных с частотой TCR-мутаций лимфоцитов.

Полученные значения всех иммунных показателей укладываются в диапазон нормальных значений для данного возраста [Хаитов, Ильина, 2013], однако у носителей различных генотипов наблюдается ряд статистически значимых различий. Так, у носителей генотипов СС и СТ+ТТ по локусу *IL4 rs2070874* наблюдаются различия параметров клеточного, гуморального, цитокинового и фагоцитарного звеньев иммунитета (таблица 2).

Таблица 2 – Показатели ( $M \pm se$ ) иммунитета у носителей генотипов по локусу *IL4 rs2070874*

Показатель	Генотип по локусу <i>IL4 rs2070874</i>		p
	СС (n=107)	СТ+ТТ (n=115)	
CD3 <sup>+</sup> *10 <sup>9</sup> /л	1,55±0,05	1,41±0,07	0,017
CD3 <sup>+</sup> 4 <sup>+</sup> *10 <sup>9</sup> /л	0,93±0,04	0,85±0,04	0,021
CD3 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup> , %	6,81±0,47	5,65±0,41	0,025
CD3 <sup>+</sup> 16 <sup>+</sup> 56 <sup>+</sup> , *10 <sup>9</sup> /л	0,15±0,01	0,11±0,01	0,0007*
CD19 <sup>+</sup> , *10 <sup>9</sup> /л	0,24±0,01	0,21±0,01	0,03
СЛАМ, *10 <sup>9</sup> /л	1,39±0,09	1,16±0,08	0,047
ИЛ-17 (пг/мл)	4,12±0,37	3,18±0,27	0,038

Примечание: \* - наибольшая статистическая значимость

Носители *IL4 rs2070874* СТ+ТТ по сравнению с СС характеризуются сниженным абсолютным количеством Т-лимфоцитов, Т-хелперов, НКТ-клеток, В-лимфоцитов, сниженной лизосомальной активностью моноцитов и снижением уровня ИЛ-17. Данные особенности позволяют предположить [Хаитов, Пинегин, Ярилин, 2009], что у носителей Т наблюдается сниженная интенсивность воспаления по сравнению с СС. Наибольшая ассоциация наблюдается между генотипом и абсолютным количеством CD3<sup>-</sup>16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> -клеток (у носителей СС в среднем 150\*10<sup>6</sup> клеток в литре крови, у носителей СТ+ТТ в среднем 110\*10<sup>6</sup>, p=0,0007). CD3<sup>-</sup>16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> - популяция содержит в основном НКТ-клетки [Пичугина, 2008]. Их основные функции – цитотоксическая [Schmidt-Wolf и др., 1994; UNSCEAR, 2006] и иммунорегуляторная [Subleski и др., 2011]. Клетки, несущие радиационно-индуцированные генетические дефекты, могут элиминироваться посредством НК-клеток [Kusunoki и др., 2001]. Предположительно, сниженное количество НКТ-клеток у носителей *IL4 rs2070874* Т обусловлено меньшей частотой радиационно-индуцированных генетических повреждений (что косвенно подтверждается проведенным анализом частоты ХА). Кроме того, повышенный уровень НКТ-клеток может наблюдаться при хроническом воспалительном процессе [Хаитов и др., 2009]. Соответственно, низкий уровень НКТ-клеток может говорить о менее интенсивном воспалении. Результаты сравнения иммунологических параметров у носителей генотипов АС и АА+СС по локусу *IL12 rs3212227* представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Показатели (M±se) иммунитета у носителей генотипов по локусу *IL12 rs3212227*

Показатель	Генотип по локусу <i>IL12 rs3212227</i>		p
	АА+СС (n=130)	АС (n=93)	
CD19 <sup>+</sup> , %	10,97±0,45	9,9±0,59	0,047
АКАМ, *10 <sup>9</sup> /л	0,023±0,002	0,017±0,002	0,037
ИЛ-2 (пг/мл)	8,91±1,13	11,72±1,24	0,003*
ИЛ-8 (пг/мл)	5,91±1,62	6,89±1,3	0,025

Примечание: \* - наиболее значимая ассоциация.

Гетерозиготы *IL12 rs3212227* АС по сравнению с гомозиготами АА и СС характеризуются: снижением доли В-лимфоцитов (CD19<sup>+</sup> клеток), снижением абсолютного количества адгезирующих моноцитов (АКАМ), повышением уровня ИЛ-2 и ИЛ-8. Наиболее статистически значимое различие наблюдается по ИЛ-2: у носителей АА+СС в среднем 8,91±1,13 пг/мл, у АС – повышенный уровень, в среднем 11,72±1,24 пг/мл (p=0,003). ИЛ-2 оказывает воздействие главным образом на Т-лимфоциты: усиливает пролиферацию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, ингибирует апоптоз [Gaffen, Liu, 2004]. ИЛ-2 важен для функционирования регуляторных Т-клеток, обеспечивающих элиминацию аутореактивных Т-лимфоцитов [Malek, Castro, 2010]. Кроме Т-лимфоцитов, ИЛ-2 активен в отношении НК-клеток: он усиливает продукцию НК-клетками TNFα, IFNγ и GM-CSF, а также синергично с ИЛ-12 повышает цитотоксическую активность НК-клеток [Khatrı и др., 1998]. Показано, что ИЛ-2 усиливает активацию врожденного иммунитета при облучении, а именно – радиационно-индуцированную цитотоксичность НК-клеток [Halpern и др., 1991; Sonn и др., 2012]. Уменьшение продукции ИЛ-2 является одним из проявлений иммунодефицита [Хаитов и др., 2009]. Таким образом, повышение уровня ИЛ-2 у носителей АС, вероятно, является показателем усиления клеточного иммунитета.

Одним из последствий радиационного воздействия является окислительный стресс, который может индуцировать развитие отдаленных эффектов [Riley, 1994; Schaue и др., 2012]. Были оценены показатели, характеризующие уровень окислительного стресса в группах по генотипам *IL4 rs2070874* и *IL12 rs3212227*. В результате генотипические группы, различающиеся по частоте ХА и TCR-мутаций, не показали различий по уровню Cu/Zn СОД, МДА и NO. Из этого можно сделать вывод об отсутствии особенностей функционирования антиоксидантной системы у носителей генотипов по ОНП *IL4 rs2070874* и *IL12 rs3212227* в отдаленный период после хронического радиационного воздействия.

Подводя итоги проведенного анализа, следует отметить, что ОНП, ассоциированные с уровнем ХА и частотой TCR-мутаций, находятся в генах интерлейкинов: *IL4*, *IL12*. Это ставит вопрос о возможных механизмах вовлечения

интерлейкинов и иммунной системы в целом в поддержание генетической стабильности клеток облученных лиц. В настоящее время в литературе нет исследований о вовлеченности указанных полиморфизмов в поддержание генетического гомеостаза. Таким образом, подобные данные получены впервые.

### **Выводы**

1. Частоты аллелей в исследуемой группе распределены согласно закону Харди-Вайнберга. Частоты аллелей в основном согласуются с данными литературы (кроме локусов *IL1 $\beta$*  rs1143634 и *CYBA* rs4673). Этнические группы славян и башкир с татарами различаются по частотам аллелей локусов: *IL1 $\beta$*  rs1143634, *IL6* rs1800795, *TNF $\alpha$*  rs361525, *CYBA* rs4673. В группе татар с башкирами с дозой на ККМ более 1 Гр наблюдается отклонение от равновесного распределения по аллелям локуса *IL6* rs1800795 – преобладает аллель G.

2. В отдаленные сроки у лиц, подвергшихся хроническому облучению и достигших возраста 50 лет и более, не выявлено влияния дозы облучения ККМ, мощности дозы в период максимального воздействия, достигнутого возраста, курения, употребления алкоголя на частоту нестабильных ХА или TCR-мутаций

3. Среди облученных лиц носители различных генотипов по ОНП локусам генов, контролирующим иммунную и антиоксидантную системы *IL1 $\beta$*  rs1143634, *IL2* rs2069762, *IL6* rs1800795, *IL8* rs4073, *IL10* rs1800872, *MPO* rs2333227, *CYBA* rs4673, *TNF $\alpha$*  rs361525, *GPX1* rs1050450, *CAT* rs7943316, *SOD2* rs4880 не различаются по частоте нестабильных ХА обменного типа и TCR-мутаций в лимфоцитах периферической крови. Отмечается значимое снижение частоты нестабильных ХА обменного типа в группе носителей минорного аллеля T по локусу *IL4* rs2070874 по сравнению с гомозиготами CC (p=0,039), а также значимое снижение частоты TCR-мутаций в группе гетерозигот AC по локусу *IL12* rs3212227 по сравнению с гомозиготами AA и CC (p=0,037).

4. Ассоциативная связь ОНП *IL4* rs2070874 с частотой ХА и ОНП *IL12* rs3212227 с частотой TCR-мутаций в лимфоцитах периферической крови у облученных жителей прибрежных сел реки Теча может быть связана с особенностями у них иммунитета. Носители аллеля T по локусу *IL4* rs2070874 по

сравнению с носителями СС характеризуются сниженным абсолютным количеством Т-лимфоцитов, Т-хелперов, НКТ-клеток, В-лимфоцитов, сниженной лизосомальной активностью моноцитов и сниженным уровнем ИЛ-17. Носители генотипа АС по локусу *IL12 rs3212227*, по сравнению с носителями АА+СС, характеризуются значимым снижением относительного количества В-лимфоцитов, абсолютного количества активных моноцитов, а также повышение уровня ИЛ-2 и ИЛ-8.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи в российских журналах из списка ВАК:**

- 1) **Донов П. Н.**, Уржумов П. В., Блинова Е. А., Аклеев А. В. Полиморфизмы генов TNF $\alpha$ , IL1b, IL4, IL8 и уровень интерлейкинов в плазме крови человека // Российский Иммунологический Журнал. – Т. 7 (16). - № 2-3 (1).- Апрель – Сентябрь 2013 с. 28-29
- 2) Уржумов П.В., Возилова А.В., **Донов П.Н.**, Блинова Е.А., Аклеев А.В. Связь полиморфизма генов систем репарации ДНК с повышенным уровнем хромосомных aberrаций у облученных лиц // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. г. Гомель. № 1 (11), апрель 2014. с. 59. ISSN 2074-2088
- 3) **Донов П.Н.**, Уржумов, П.В., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Связь полиморфизмов генов цитокинов, оксидативного ответа, клеточного цикла и репарации с хромосомными aberrациями у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию на реке Теча // Вопросы радиационной безопасности. №3 (75). 2014. С. 61-68
- 4) **Донов П.Н.**, Аклеев А.А. Интенсивность внутриклеточного кислородзависимого метаболизма нейтрофилов и моноцитов у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, полиморфных по генам СУВА и МРО // Российский иммунологический журнал. – Т. 10 (19). - № 3. – 2016. – С. 251-254

#### **Статьи в иных изданиях:**

- 1) Донов П.Н., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Полиморфизм генов CAT, SOD2, SOD3, NOS, CYP1A1, GSTP1 у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию // Вестник КарГУ, Серия «Биология. Медицина. География». № 3(71)/2013, С. 45-50
- 2) Донов П. Н., Уржумов П. В., Блинова Е. А., Аклеев А. В. Определение частот полиморфизмов генов CYP1A1 И GSTP1 в группе облученных когорты реки Течи // Вестник ЧелГУ. 2013. № 7 (298). Биология. Вып. 2. С. 109–111.

#### **Тезисы докладов:**

- 1) Donovan, P., Urzhumov, P., Blinova, E., Akleyev, A. Assessment of polymorphism frequency in detoxification genes for a sample of persons exposed to chronic radiation // Health Physics. - July 2013 - Volume 105 - Supplement 1. - Abstracts of Papers Presented at the Fifty-Eighth Annual Meeting of the Health Physics Society Madison, Wisconsin 7-11 July 2013 1.-, pp: S1-S108
- 2) Донов П.Н., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Полиморфизм генов детоксикации и биотрансформации у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию // Радиация, экология и техносфера. Материалы международной научной конференции (Гомель, 26-27 сентября 2013 г.) – НАН Беларуси, Институт радиобиологии, редкол.: А.Д. Наумов (гл. ред.) [и др.]. – Минск: Институт радиологии, 2013 – 202 с., С. 56-58
- 3) Уржумов П. В., Донов П. Н., Аклеев А. В. Исследование связи генетических и средовых факторов с развитием сердечно-сосудистой патологии у потомков облученных лиц // Полипатии в семейной медицине, профилактической и клинической кардиологии. Материалы всероссийской научно-практической конференции, посвященной 75-летию Заслуженного деятеля науки РФ, профессора О.Ф. Калева / Под редакцией профессора О.Ф. Калева.- Челябинск.: Изд-во ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, 2013.- С. 197-200. - УДК 616-031.14

- 4) Donovan, P., Urzhumov, P., Blinova, E., Akleyev, A. The study of association of interleukin gene polymorphisms with cancer in people exposed to chronic irradiation // Health Physics, Volume 107, No. 1, July 2014, Supplement 1, Abstracts of Papers Presented at the Fifty-Ninth Annual Meeting of the Health Physics Society Baltimore, Maryland 13 July - 17 July 2014, pp. S21-S22
- 5) Донов П.Н., Уржумов П.В., Аклеев А.В. Однонуклеотидные полиморфизмы генов оксидативного стресса и иммунитета в группе лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию на реке Теча (Южный Урал) // Материалы VII Международной студенческой электронной научной конференции «Студенческий научный форум» URL: [www.scienceforum.ru/2015/2/14708](http://www.scienceforum.ru/2015/2/14708) (дата обращения: 17.02.2015).
- 6) Donovan, P., Kadyrova, N., Varfolomeyeva, T., Akleyev, A. The link between oxidative status gene polymorphisms and the level of malonic dialdehyde with cancer in individuals chronically exposed to irradiation on the Techa river // Health Physics. - July 2015 - Volume 109 – Supplement to. - Abstracts of Papers Presented at the Sixtieth Annual Meeting of the Health Physics Society Indianapolis, Indiana 14-18 July 2015. – p. S18