

СТАТУС МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ АПОПТОЗА И ИНТЕНСИВНОСТЬ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ЛИЦ, ПОДВЕРГАВШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОМУ РАДИАЦИОННОМУ ОБЛУЧЕНИЮ

© 2022 г. Е. А. Блинова^{a, b, *}, В. С. Никифоров^{a, b}, А. И. Котикова^{a, b},
М. А. Янишевская^a, А. В. Аклеев^{a, b}

^aУральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства, Челябинск, 454048 Россия

^bЧелябинский государственный университет, Челябинск, 454001 Россия

*e-mail: blinova@urcrm.ru

Поступила в редакцию 29.03.2022 г.

После доработки 13.04.2022 г.

Принята к публикации 13.05.2022 г.

Метилирование CpG-островков промоторных регионов генов – наиболее распространенная эпигенетическая модификация, принимающая участие в регуляции экспрессии генов. В ряде исследований показано, что ионизирующее излучение может вызывать как гипер- так и гипометилирование ДНК. Аберрантное метилирование влияет на реализацию клеточных процессов и может приводить к развитию различных патологических состояний. В литературе имеются единичные исследования статуса метилирования ДНК у человека в отдаленные сроки после радиационного воздействия. Проведен анализ уровня метилирования CpG-островков промоторных регионов генов апоптоза (*BCL2*, *ATM*, *MDM2*, *CDKN1A*, *STAT3*, *NFKB1*), а также его влияния на интенсивность апоптоза лимфоцитов периферической крови у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. В исследовании приняли участие жители Южно-Уральского региона, подвергшиеся хроническому радиационному воздействию вследствие сбросов в 1949–1956 гг. радиоактивных отходов в реку Течу производственным объединением “Маяк”. Установлено, что среди облученных доля лиц с гиперметилированным промотором гена *BCL2* статистически значимо больше, чем в группе сравнения. Процент метилирования промоторного региона гена *ATM* слабо положительно коррелировал с дозовыми и возрастными характеристиками. Также установлены различия в частоте апоптоза лимфоцитов у облученных лиц с гипо- и гиперметилированными промоторами гена *ATM*. На основании полученных данных можно предполагать, что в отдаленном периоде после хронического низкоинтенсивного радиационного воздействия в диапазоне малых и средних доз происходят эпигенетические модификации генома, выражающиеся в изменении метилирования промоторных регионов генов *BCL2* и *ATM*.

Ключевые слова: радиационное облучение, CpG-островки, гиперметилирование, *BCL2*, *ATM*, апоптоз лимфоцитов

DOI: 10.31857/S0026898422050032

ВВЕДЕНИЕ

Ионизирующее излучение (ИИ), помимо непосредственного повреждения генетического аппарата клетки, может вызывать эпигенетические нарушения, проявляющиеся в изменении статуса метилирования ДНК, модификации гистонов, модуляции экспрессии генов и микроРНК. Некоторые из этих альтераций митотически стабильны и могут

сохраняться в ряду клеточных поколений, приводя к развитию отдаленных эффектов ионизирующего излучения, таких как онкологические заболевания и возраст-ассоциированные заболевания [1].

Метилирование ДНК – наиболее распространенная эпигенетическая модификация, играющая важную роль в регуляции клеточных процессов, прежде всего экспрессии генов, и в развитии геномной нестабильности [2]. Наиболее широко изучено гиперметилирование промоторных областей, которое приводит к снижению транскрипционной активности гена или его полному вы-

Сокращения: ИИ – ионизирующее излучение; ЛПК – лимфоциты периферической крови; ККМ – красный костный мозг; мГр – миллигрей; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени.

ключению [3]. Кроме того, в последнее время все чаще встречается информация о глобальном гипометилировании как факторе развития онкогенеза [4]. Будучи достаточно лабильной системой, статус метилирования ДНК в значительной степени зависит от эндогенных факторов (например, аберрантная активность метилтрансфераз, нарушение работы систем репарации клетки) [5] и экзогенных факторов, в том числе радиационной природы. В ряде исследований показано, что ИИ опосредует стойкое изменение статуса метилирования ДНК в широком диапазоне доз [6–8].

Один из основных процессов, принимающих участие в реализации как ранних, так и отдаленных эффектов радиационного облучения, – апоптоз. Его активация начинается с изменения экспрессии генов, регулирующих процессы репарации повреждений ДНК, контроля клеточного цикла, пролиферации и дифференцировки клеток [9]. По мере реализации клеточной гибели включается генетическая программа, регулирующая баланс внутриклеточных про- и антиапоптотических факторов.

В физиологических условиях поддерживается строгое равновесие про- и антиапоптотических белков, однако после радиационного воздействия, а также при различных патологических состояниях происходит смещение этого равновесия, обусловленное изменением экспрессии генов, принимающих участие в апоптозе. Нарушение процесса апоптоза способствует развитию патологических состояний, которые могут сопровождаться сохранением в облученном организме клеток с неограниченным пролиферативным потенциалом или развитием цитопенических состояний, связанных с повышенной гибелью клеток.

В ранее проведенных нами исследованиях у хронически облученных жителей прибрежных сел реки Течи регистрировали изменения интенсивности апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови (ЛПК) в отдаленные сроки [10]. Кроме того, было показано изменение транскрипционной активности апоптотических генов, которое сопровождалось снижением относительного содержания мРНК белка BCL-2 и увеличением относительного содержания мРНК BAX у облученных лиц спустя более 60 лет после начала хронического радиационного воздействия [11].

Учитывая вышесказанное, мы исследовали уровни метилирования промоторных регионов генов апоптоза: *BCL2*, *ATM*, *MDM2*, *CDKN1A*, *STAT3*, *NFKB1*, – а также их влияние на интенсивность апоптоза ЛПК у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Характеристика обследованных лиц. Исследование уровня метилирования CpG-островков про-

моторных регионов генов *BCL2*, *ATM*, *MDM2*, *CDKN1A*, *STAT3*, *NFKB1* и апоптотической гибели лимфоцитов проводили у лиц, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию вследствие сбросов радиоактивных отходов в реку Течу в 1949–1956 гг. производственным объединением “Маяк” (ПО “Маяк”) [12].

В исследовании участвовало 145 жителей прибрежных сел реки Течи. Все обследуемые лица были разделены на две группы: группа сравнения, в которую вошло 65 человек с накопленной дозой облучения красного костного мозга (ККМ), не превышающей 70 мГр [13], и группа облученных (80 человек) с накопленными дозами в диапазоне от 80 до 3510 мГр (среднее значение – 790 ± 80 мГр). Накопленные дозы в тимусе и периферических лимфоидных органах в группе облученных находились в диапазоне от 3 до 640 мГр (среднее значение – 90 ± 10 мГр). У лиц из группы сравнения дозы облучения ККМ составляли от 1 до 63 мГр, а тимуса и периферических лимфоидных органов – от 0 до 30 мГр. Сравнимые группы были сопоставимыми по полу, возрасту и включали представителей двух этнических групп: славян и тюрков. Характеристика обследуемых групп представлена в табл. 1.

Апоптотическую гибель ЛПК анализировали у 89 человек двух групп, их подробная характеристика представлена в табл. 2.

Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие на проведение исследования, одобренное этическим комитетом УНПЦ РМ ФМБА России (Челябинск).

Оценка уровня метилирования промоторных регионов генов. Бисульфитная конверсия была выполнена с использованием набора реагентов EpiJET Bisulfite Conversion Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

Эффективность конверсии оценивали по выходу и качеству ДНК, обработанной бисульфитом, с помощью набора для преобразования и количественного контроля бисульфита Cell-to-CpG™ Bisulfite Conversion and Quantitation Control Kit (“Thermo Fisher Scientific”). Методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием коммерческого набора праймеров Conversion Control Primer Mix (“Thermo Fisher Scientific”) определяли количество неконвертированной и конвертированной геномной ДНК. Качество конверсии и фрагментации ДНК анализировали электрофорезом в 2%-ном агарозном геле с использованием бромистого этидия в качестве красителя.

После обработки ДНК бисульфитом и определения эффективности конверсии проводили амплификацию с праймерами, специфичными для метилированных участков ДНК. Последователь-

Таблица 1. Характеристика участников исследования

Характеристика группы		Облученные лица	Группа сравнения
Число участников		80	65
Возраст, лет		71 ± 5.5 ^a (62–83)	65 ± 6.7 ^a (54–79)
Пол	мужчины	28 (35%) ^b	21 (32%) ^b
	женщины	52 (65%)	44 (68%)
Этническая группа	славяне	36 (45%)	45 (69%)
	тюрки	44 (55%)	20 (31%)
Накопленные дозы облучения ККМ, мГр		790 ± 80 ^c (80–3510)	20 ± 2 ^c (1–63)
Накопленные дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, мГр		90 ± 10 ^c (3–640)	7 ± 1 ^c (0–30)

^a Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD), в скобках указаны минимальные и максимальные значения (min–max). ^b Данные представлены как число участников (процентное соотношение). ^c Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка (SE), (min–max).

Таблица 2. Характеристика участников исследования по апоптотической гибели ЛПК

Характеристика группы		Облученные лица (N = 49)	Группа сравнения (N = 40)
Возраст на момент обследования, лет		70.98 ± 0.83 ^a (62–83)	63.45 ± 1.02 ^a (56–79)
Пол	мужчины	18 (36.7%) ^b	14 (35%) ^b
	женщины	31 (63.3%)	26 (65%)
Этническая принадлежность	славяне	18 (36.7%)	29 (72.5%)
	тюрки	31 (63.3%)	11 (27.5%)
Накопленные дозы облучения ККМ, мГр		556 ± 106 ^a (77.7–3507)	9.41 ± 2.63 ^a (1.30–56.1)
Накопленные дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, мГр		59.4 ± 11 ^a (2.83–355)	1.87 ± 1.61 ^a (0–33.6)

^a Данные представлены как среднее ± SE, (min–max). ^b Данные представлены как число участников (процентное соотношение).

ности праймеров для ПЦР фрагментов промоторных регионов генов *ATM*, *BCL2*, *CDKN1A* были взяты из литературных данных [14–16]. Праймеры для промоторных регионов генов *MDM2*, *STAT3*, *NFKB1* сконструированы с использованием программы MethPrimer. Олигонуклеотиды были синтезированы фирмой “ДНК-Синтез” (Россия). Характеристика праймеров представлена в табл. 3.

Статус метилирования последовательностей генов анализировали с использованием метилспецифической ПЦР. Использовали 5× реакционную смесь qPCRmix-HS (“Евроген”, Россия), состоящую из высокопроцессивной Taq ДНК-полимеразы со специфическими моноклональными антете-

лами, красителем SYBR Green I, смеси dNTP, Mg²⁺ и ПЦР-буфера. Состав ПЦР-смеси для амплификации фрагментов ДНК представлен в табл. 4. ПЦР-РВ проводили с использованием амплификатора StepOnePlus Real-Time PCR System (“Applied Biosystems”, США).

В качестве контролей для оценки метилирования исследуемых CpG-островков промоторных регионов генов использовали подвергнутые бисульфитной конверсии образцы коммерческой полностью метилированной ДНК CpG Methylated Human Genomic DNA (“Thermo Fisher Scientific”) и неметилированной ДНК (Human Genomic DNA: Male). Контроли смешивали в следующем соотношении: 0/100, 2/98, 5/95, 10/90, 25/75,

Таблица 3. Используемые в работе олигонуклеотиды

Ген	Тип праймера	Последовательность (5'→3') ^a	T_m^b , °C	Длина ампликона, п.н.
<i>BCL2</i>	Meth ^c	F: GTTTT TAGCGTTCGGTATCGG R: AAATCTCTATCCACGAAACCGC	60	192
	Unmeth ^d	F: GGGTTTTAGTGTGTTGGTATTGG R: AAATCTCTATCCACAAAACCACTTC	59	194
<i>ATM</i>	Meth	F: GGAGTTCGAGTCGAAGGGC R: CTACCTACTCCCGCTTCCGA	59	239
	Unmeth	F: GTTTTGGAGTTTGAGTTGAAGGGT R: AACTACCTACTCCCACTTCCAA	56	246
<i>CDKN1A</i>	Meth	F: GTCGAAGTTAGTTTTTTGTGGAGTC R: CGAAATCCCCTATTATCTACGC	65	230
	Unmeth	F: TTGAAGTTAGTTTTTTGTGGAGTTG R: CCAAAATCCCCTATTATCTACCAC	66	230
<i>MDM2</i>	Meth	F: TTTGTCGGGTTATTAGTGTGAAC R: CCTTTACTACAATTTCAAACGTA	58	129
	Unmeth	F: TTGTTGGGTTATTAGTGTGAATGT R: CCTTTACTACAATTTCAAACATA	56	130
<i>STAT3</i>	Meth	F: TAGTCGAGGGAATAAGTTTTAATCG R: GAAAAACCGAACTACGCGT	61	156
	Unmeth	F: AGTTGAGGGAATAAGTTTTAATTGG R: AAACCAAAAAACCAAACTACACAT	59	162
<i>NFKB1</i>	Meth	F: TTAGTTAGGAAGTGAGAGAGTGAGC R: GAAAAAACAAAAAAACAATCAACG	60	189
	Unmeth	F: TTTAGTTAGGAAGTGAGAGAGTGAGTG R: CAAAAAACAAAAAAACTATCAACA	61	193

^a F – прямой праймер, R – обратный праймер; ^b температура плавления; ^c метилированный праймер; ^d неметилированный праймер.

50/50, 75/25 и 100/0. Уровни метилирования для каждого контрольного образца составили 0, 2, 5, 10, 25, 50, 75 и 100% соответственно.

Результаты метилирования анализировали с использованием программного обеспечения HRM Software. Уровень метилирования промоторных регионов, превышающий 50%, рассматривали как гиперметилирование, а в диапазоне от 0 до 10% – как гипометилирование.

Оценка апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови. Анализ проводили методом TUNEL (TdUTP Nick End Labeling – концевое мечение dUTP при помощи терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы). У пациентов клиники УНПЦ РМ венозную кровь собирали в вакуумную пробирку (объем 9 мл) с антикоагулянтом (гепарин). Лейкоцитарную фракцию выделяли в градиенте плотности Lymphoprep (“STEMCELL Technologies”, Норвегия) согласно инструкции производителя. Затем проводили пермобилизацию клеток и фиксировали с использованием

охлажденного 70%-ного этилового спирта. Позднюю апоптотическую гибель ЛПК оценивали с использованием набора APO DIRECT™ Kit (“BD”, США) на проточном цитофлуориметре Navios (“Beckman Coulter”, США) путем мечения разрывов ДНК с помощью FITC-dUTP [17].

Статистический анализ данных. Для анализа нормальности распределения количественных показателей использовали критерий Колмогорова–Смирнова. При описании выборок данных, подчиняющихся законам нормального распределения, использовали среднее арифметическое значение (M) с указанием ошибки среднего ($\pm SE$) и диапазона значений (min–max). При описании выборок, распределение частот в которых отличалось от нормального, использовали медиану (Me) и 25–75 процентиля (Q1–Q3).

Выборки данных сравнивали с использованием *U*-критерия Манна–Уитни. Сравнение частот выявленных случаев метилирования в исследуемых группах проводили с помощью точного кри-

Таблица 4. Условия проведения ПЦР в реальном времени

Ген	Условия ПЦР-РВ	Число циклов	Объем компонентов ПЦР-смеси, мкл
<i>BCL2</i>	95°C 5 мин	1	qPCRMix-HS SYBR – 5 Прямой праймер – 1.5 Обратный праймер – 1.5 dH ₂ O – 16 ДНК-матрица – 1
	95°C 30 с 60°C 30 с 72°C 30 с	40	
	95°C 5 мин	1	
<i>ATM</i>	95°C 30 с 58°C 30 с 72°C 30 с	40	
	95°C 5 мин	1	
	95°C 30 с 66°C 30 с 72°C 30 с	40	
<i>MDM2</i>	95°C 5 мин	1	
	95°C 30 с 58°C 30 с 72°C 30 с	40	
	95°C 5 мин	1	
<i>STAT3</i>	95°C 30 с 60°C 30 с 72°C 30 с	40	
	95°C 5 мин	1	
	95°C 30 с 61°C 30 с 72°C 30 с	40	
<i>NFKB1</i>	95°C 5 мин	1	
	95°C 30 с 61°C 30 с 72°C 30 с	40	
	95°C 5 мин	1	

терия Фишера. Статистически значимыми считались различия при $p < 0.05$.

С целью оценки влияния накопленной дозы излучения и возраста на исследуемые показатели проводили корреляционный анализ. Коэффициенты ранговой корреляции (R) рассчитывали по Спирмену, статистически значимыми считали корреляции при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование метилирования CpG-островков промоторных регионов генов

Распределение участников, обследованных по уровню метилирования CpG-островков промоторных областей генов *BCL2*, *ATM*, *CDKN1A*, *MDM2*, *STAT3*, *NFKB1*, представлено на рис. 1.

В связи с тем, что некоторые подгруппы по показателю уровня метилирования были малочисленными, для оценки частот выявленных случаев метилирования были сформированы две подгруппы в каждой обследованной группе: в первую вошли участники с уровнем метилирования CpG-островков промоторов исследуемых генов от 0 до

10%, во вторую – от 10 до 100%. В табл. 5 представлены данные по уровню метилирования CpG-островков промоторов генов *BCL2*, *CDKN1A*, *ATM*, *MDM2*, *STAT3* и *NFKB1* в ЛПК у участников исследования.

Доля выявленных лиц с повышенным уровнем метилирования (более 10%) CpG-островков промоторного гена *BCL2* в группе облученных была статистически значимо выше, чем в группе сравнения ($p = 0.002$, OR = 8.5, 95% CI = 1.9–38.6). Для остальных промоторных регионов исследуемых генов статистически значимых различий не обнаружено (табл. 5). Более чем у 90% членов группы сравнения регистрировали гипометилирование промоторной области гена *BCL2* (уровень метилирования варьировал от 0 до 10%), в то время как в группе облученных гипометилирование регистрировали у 75% обследованных, а гиперметилирование (уровень метилирования >50%) – у 18% (рис. 1). Кроме того, у большинства участников из группы сравнения (87% обследованных) уровень метилирования промоторного региона гена *ATM* составил от 0 до 10%, а в группе облученных – у 77%. У большинства участников ис-

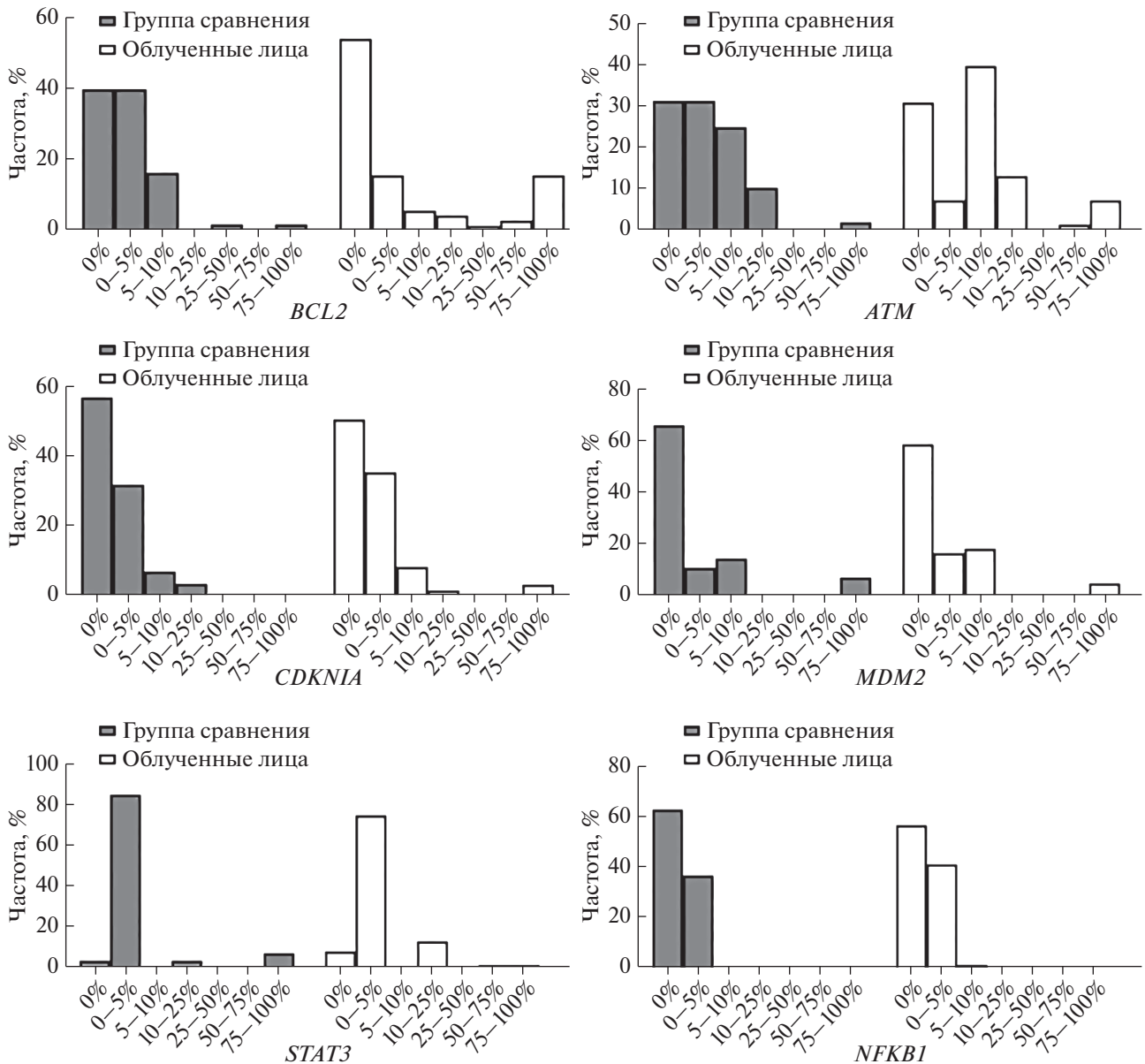


Рис. 1. Распределение участников исследования по уровню метилирования промоторов генов *BCL2*, *ATM*, *CDKN1A*, *MDM2*, *STAT3*, *NFKB1*. По оси абсцисс отложен процент метилированных CpG-островков в промоторных участках генов; по оси ординат – частота встречаемости среди обследованных лиц.

следования, как в группе облученных, так и сравнения, уровень метилирования промоторных регионов генов *CDKN1A*, *MDM2* и *STAT3* не превышал 5%, а для гена *NFKB1* гиперметилирование промоторной области не обнаружено вообще (рис. 1).

На уровень метилирования ДНК могут влиять различные факторы, как радиационной, так и нерадиационной природы. Так, известно о возраст-зависимом изменении метилирования ДНК [18]. Учитывая это, мы провели корреляционный анализ зависимости уровня метилирования от дозы облучения ККМ, тимуса и периферических лим-

фоидных органов, а также возраста на момент обследования. Результаты представлены в табл. 6.

В результате корреляционного анализа установлено, что процент метилирования промоторного региона гена *ATM* слабо положительно коррелирует с дозой облучения ККМ ($R = 0.2, p = 0.03$), тимуса и периферических лимфоидных органов ($R = 0.24, p = 0.008$), а также с возрастом на момент обследования ($R = 0.3, p = 0.001$). Метилирование промоторного региона гена *BCL2* слабо положительно коррелирует с возрастом на момент обследования ($R = 0.23, p = 0.001$). Для остальных генов

Таблица 5. Уровни метилирования CpG-островков промоторных регионов исследованных генов у хронически облученных лиц и в группе сравнения

Ген	Частота встречаемости, число (%)				OR (95% CI) ^b	p-value ^c
	облученные лица		группа сравнения			
	0–10% ^a	10–100%	0–10%	10–100%		
<i>BCL2</i>	53 (75.7)	17 (24.3)	53 (96.4)	2 (3.6)	8.5 (1.9–38.6)	0.002
<i>ATM</i>	53 (78.0)	15 (22.0)	42 (87.6)	6 (12.4)	1.9 (0.7–5.5)	0.2
<i>CDKN1A</i>	56 (94.9)	3 (5.1)	27 (96.3)	1 (3.7)	1.4 (0.1–14.6)	1.0
<i>MDM2</i>	56 (94.8)	3 (5.2)	25 (92.6)	2 (7.4)	0.7 (0.1–4.3)	0.6
<i>STAT3</i>	50 (83.3)	10 (16.7)	24 (88.9)	3 (11.1)	1.6 (0.4–6.3)	0.7
<i>NFKB1</i>	59 (100)	0	27 (100)	0	–	–

^a Процент метилирования CpG-островков в промоторных областях; ^b отношение шансов (95%-ный доверительный интервал); ^c двусторонний точечный тест Фишера.

Таблица 6. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (R) процента метилирования промоторных регионов исследуемых генов от доз облучения, накопленных в ККМ, тимусе и периферических лимфоидных органах, а также от возраста пациента на момент исследования

Ген	R (p) ^a		
	Доза облучения ККМ, 1– 510 мГр ^b	Доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, 0–640 мГр ^b	Возраст, 54–83 лет ^b
<i>MDM2</i>	0.02 (0.9)	–0.01 (0.9)	0.09 (0.4)
<i>BCL2</i>	0.04 (0.6)	0.08 (0.3)	0.23 (0.01)
<i>ATM</i>	0.2 (0.03)	0.24 (0.008)	0.3 (0.001)
<i>CDKN1A</i>	0.15 (0.1)	0.09 (0.4)	0.17 (0.1)
<i>STAT3</i>	0.05 (0.6)	–0.08 (0.4)	0.09 (0.4)
<i>STAT3</i>	0.04 (0.7)	0.48 (0.6)	–0.08 (0.4)
<i>NFKB1</i>	0.07 (0.5)	0.03 (0.9)	0.2 (0.1)

^a Коэффициент ранговой корреляции Спирмена (уровень значимости); ^b диапазон минимальных и максимальных значений.

статистически значимых связей с исследуемыми показателями не выявлено.

Интенсивность апоптотической гибели лимфоцитов при разных уровнях метилирования промоторных областей генов

Уровень метилирования промоторных регионов влияет на транскрипционную активность регулируемых ими генов. Так, гипометилирование способствует активации транскрипции, а гиперметилирование – ее репрессии. Это отражается на уровнях экспрессии соответствующих белков и, следовательно, на регуляции клеточных процессов, в том числе апоптоза. Нами проведено сравнение уровней апоптотической гибели ЛПК облученных пациентов, имеющих разный уровень метилирования промоторных регионов генов *BCL2* и *ATM*. В табл. 7 представлены медианные значения пока-

зателей апоптоза в группе облученных, а также в объединенной группе, состоящей из облученных и необлученных участников исследования.

В результате исследования у облученных лиц с уровнем метилирования промоторного участка гена *ATM* от 10 до 100% обнаружено снижение частоты апоптотической гибели ЛПК – в отличие от лиц с гипометилированием этого участка (от 0 до 10%). Снижение уровня апоптоза ЛПК выявлено и в объединенной группе с гиперметилированием (рис. 2).

При исследовании уровня апоптоза в зависимости от степени метилирования промоторного региона *BCL2* не обнаружено статистически значимых различий в интенсивности апоптотической гибели ЛПК, как в группе облученных, так и в объединенной (табл. 7).

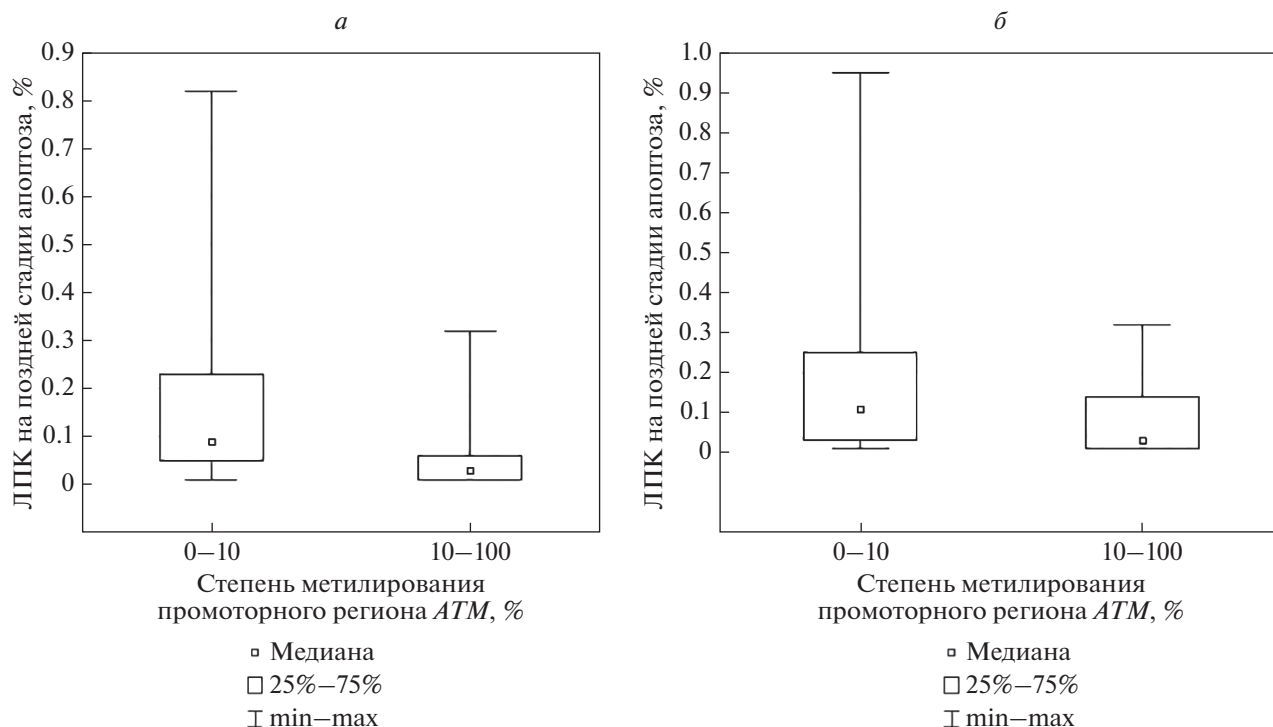


Рис. 2. Уровень поздней апоптотической гибели ЛПК у лиц с гипо- и гиперметилированием промоторного региона гена *ATM* в группе облученных (а) и в объединенной группе участников (б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Один из важнейших механизмов регуляции экспрессии генов – метилирование ДНК. Аберрантное метилирование может приводить к нестабильности генома, неконтролируемому делению клеток и развитию различных патологических состояний [19]. Известно, что ИИ, будучи генотоксическим агентом, способствует как гипер-, так и гипометилированию ДНК. В большинстве исследований *in vitro* и *in vivo* показано,

что в ранние сроки после облучения (часы, сутки) эпигенетический статус генома изменяется достаточно динамично [20]; при этом имеются лишь единичные исследования статуса метилирования ДНК человека в отдаленные сроки после радиационного воздействия. Так, в лейкоцитах крови ликвидаторов аварии на Чернобыльской атомной электростанции (АЭС) и работников других АЭС, в отдаленном периоде после радиационного воздействия, было выявлено гиперме-

Таблица 7. Уровень апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови при различных уровнях метилирования промоторных регионов генов *BCL2* и *ATM*

Группа	Параметр	Уровень метилирования промоторной области			
		<i>BCL2</i>		<i>ATM</i>	
		0–10%	10–100%	0–10%	10–100%
Облученные	<i>N</i> ^а	28	9	26	8
	Апоптоз ^б , %	0.09 (0.04–0.26)	0.06 (0.01–0.21)	0.09 (0.05–0.25)	0.03 ^с (0.01–0.10)
Объединенная группа	<i>N</i> ^а	64	12	59	11
	Апоптоз ^б , %	0.09 (0.03–0.26)	0.06 (0.01–0.19)	0.11 (0.03–0.25)	0.03 ^с (0.01–0.14)

^а Число участников; ^б уровень апоптоза представлен как Ме (Q1–Q3); ^с *p* = 0.03 (уровень значимости различий уровня поздней стадии апоптоза между облученными лицами с гипо- и гиперметилированием промоторной области гена *ATM*).

тирование CpG-островков в промоторах генов *INK4A* (рамка считывания белка p16) и *GSTP1* [21]. Кроме того, среди работников реакторного производства ПО “Маяк”, подвергшихся длительному внешнему воздействию γ -излучения и сочетанному внешнему и внутреннему облучению, доля лиц с гиперметилованием CpG-островков в промоторах генов *GSTP1*, *TP53* и *SOD2* была статистически значимо выше, чем в контрольной группе [22]. При исследовании уровня метилирования геномной ДНК у врачей-рентгенологов, подвергшихся облучению в диапазоне малых доз (20 мЗв в год или 100 мЗв за 5 лет), был выявлен пониженный уровень метилирования повторов LINE-1 по сравнению с контрольной группой [23].

В проведенном нами исследовании установлено, что в группе облученных пациентов доля лиц с повышенным уровнем метилирования CpG-островков в промоторе гена *BCL2* была статистически значимо выше, чем в группе сравнения. Стоит отметить, что в проведенных ранее исследованиях качественного анализа уровня метилирования ДНК в промоторных регионах нескольких генов мы не обнаружили в группе пациентов с дозой облучения ККМ в диапазоне от 0.08 до 0.9 Гр статистически значимого увеличения доли лиц с метилированными CpG-островками в промоторной области гена *BCL2* [24]. В тоже время, было выявлено, что уровень метилирования промоторного региона гена *ATM* слабо положительно коррелирует с дозами облучения ККМ, тимуса и лимфоидных органов. Пока нет сообщений об изменении статуса метилирования гена *ATM* при хроническом радиационном воздействии, хотя М. Li и соавт. [25] выявили линейную зависимость снижения экспрессии гена *ATM* от дозы облучения в условиях хронического радиационного воздействия. Это косвенное доказательство в пользу эффекта гиперметилования регуляторной области гена *ATM* в отдаленном периоде после радиационного воздействия.

Также нами показано, что метилирование промоторных регионов генов *BCL2* и *ATM* положительно коррелирует с возрастом на момент обследования.

Гиперметилование CpG-островков промоторных областей приводит к подавлению инициации транскрипции с контролируемых ими генов, что в конечном счете отражается на уровне кодируемого белка и регуляции клеточных процессов. Нами показано, что у облученных лиц с уровнем метилирования промоторного участка гена *ATM* в диапазоне от 10 до 100% апоптотическая гибель ЛПК происходит реже, чем при гипометилировании этого участка. Продукт гена *ATM* – серин/треониновая протеинкиназа – активируется двухцепочечными разрывами ДНК и фосфорилирует белки, регулирующие клеточный

цикл и апоптоз, в частности рекрутирует Chk2 и фосфорилирует MDM2 и p53 [26]. Вероятно, гиперметилование промоторного участка *ATM* приводит к снижению транскрипционной активности этого гена, уровня кодируемого белка и к нарушению механизмов передачи сигнала от повреждений, что, в свою очередь, активирует апоптотическую гибель лимфоцитов. Например, при гипофункции гена *Atm* у мышей (*Atm-null*) регистрируют повышенный уровень соматических мутаций и нарушения при прохождении клеточного цикла в контрольных точках фаз G1, S и G2 [27].

При исследовании частоты апоптоза в зависимости от уровня метилирования CpG-островков промоторного региона гена антиапоптотического белка *BCL-2* статистически значимых различий как в группе облученных лиц, так и в объединенной с группой сравнения выборке не выявлено. Белок *BCL-2* подавляет апоптотическую гибель клеток за счет контроля проницаемости митохондриальной мембраны, предотвращает выход цитохрома *c*, что, в свою очередь, ингибирует эффекторные каспазы [28]. Гиперметилование промоторной области *BCL2* может подавлять транскрипционную активность этого гена и, как следствие, активировать апоптотическую гибель клеток. Несмотря на то, что сейчас нами не обнаружена прямая связь степени метилирования промоторной области *BCL2* с уровнем апоптоза, ранее мы сообщали о повышении апоптотической гибели ЛПК у облученных лиц [10]. Стоит отметить, что на данном этапе, из-за малочисленности выборок, нельзя сделать окончательных выводов о влиянии метилирования промоторных регионов генов *BCL2* и *ATM* на апоптоз. В связи с этим результаты исследования уровня апоптоза ЛПК в зависимости от степени метилирования CpG-островков промоторных регионов *BCL2* и *ATM* можно считать предварительными, для их уточнения необходимы дальнейшие исследования на расширенной выборке.

Таким образом, в рамках проведенного исследования у облученных лиц в отдаленном периоде после хронического низкоинтенсивного радиационного воздействия в диапазоне малых и средних доз наблюдаются эпигенетические модификации генома, выражающиеся в изменении метилирования промоторных регионов генов, регулирующих апоптоз и клеточный цикл: *BCL2* и *ATM*.

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. В группе облученных доля лиц с уровнем метилирования более 10% CpG-островков промоторного региона гена *BCL2* была статистически значимо выше, чем в группе сравнения ($p = 0.002$, OR = 8.5, 95% CI 1.9–38.6). Следовательно, можно говорить о гиперметилировании этого гена в

отдаленном периоде после хронического радиационного воздействия.

2. Метилирование промоторного региона гена *ATM* слабо положительно коррелировало с дозой облучения, накопленной в ККМ, тимусе и периферических лимфоидных органах, а также с возрастом на момент обследования.

3. У облученных пациентов с гиперметилированным промотором гена *ATM* апоптотическую гибель ЛПК регистрировали чаще, чем у членов той же группы с гипометилированием этой области генома.

Работа проведена при финансовой поддержке Федерального медико-биологического агентства России (Государственный контракт № 27.501.21.2 от 11 июня 2021 года).

Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено этическим комитетом УНПЦ РМ ФМБА России в соответствии с Хельсинской декларацией 1964 года.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ilnytsky Y., Kovalchuk O. (2000) Non-targeted radiation effects-an epigenetic connection. *Mutat. Res.* **714**, 113–125.
2. Spainhour J.C., Lim H.S., Yi S.V., Qiu P. (2019) Correlation patterns between DNA methylation and gene expression in the cancer genome atlas. *Cancer Inform.* **18**, 1176935119828776.
3. Greenberg M.V.C., Bourc'his D. (2019) The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 590–607.
4. Van Tongelen A., Lorient A., De Smet C. (2017) Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Lett.* **28**(396), 130–137.
5. Edwards J.R., Yarychivska O., Boulard M., Bestor T.H. (2017) DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics Chromatin.* **10**, 23.
6. Antwi D.A., Gabbara K.M., Lancaster W.D., Ruden D.M., Zielske S.P. (2013) Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways. *Epigenetics.* **8**(8), 839–848.
7. Bae, J.H., Kim J.G., Heo K., Yang K., Kim T.O., Yi J.M. (2015) Identification of radiation-induced aberrant hypomethylation in coloncancer. *BMC Genomics.* **16**(56), 12.
8. Lahtz C., Bates S.E., Jiang Y., Li A.X., Wu X., Hahn M.A., Pfeifer G.P. (2012) Gamma irradiation does not induce detectable changes in DNA methylation directly following exposure of human cells. *PLoS One.* **7**(9), e44858.
9. Verheij M., Bartelink H. (2000) Radiation-induced apoptosis. *Cell Tissue Res.* **301**, 133–142.
10. Блинова Е.А., Котикова А.И., Янишевская М.А., Аклеев А.В. (2020) Апоптоз лимфоцитов и полиморфизм генов регуляции апоптоза у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. *Медицинская радиология и радиационная безопасность.* **65**(4), 36–42.
11. Никифоров В.С., Блинова Е.А., Аклеев А.В. (2020) Транскрипционная активность генов клеточного цикла и апоптоза у хронически облученных лиц, имеющих повышенную частоту TCR-мутантных лимфоцитов. *Радиация и риск.* **29**(2), 89–100.
12. (2016) *Последствия радиоактивного загрязнения реки Течи.* Под ред. Аклеева А.В. Челябинск: ФМБА, Уральский научно-практический центр радиационной медицины. 390 с.
13. (2009) *Государственные санитарно-эпидемиологические правила и нормативы.* СанПиН 2.6.1.2523-09. Нормы радиационной безопасности (НРБ-99/2009). Москва: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 100 с.
14. Begam N., Jamil K., Raju S.G. (2017) Promoter hypermethylation of the *ATM* gene as a novel biomarker for breast cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **18**(11), 3003–3009.
15. Watanabe M., Nakahata S., Hamasaki M., Saito Y., Kawano Y., Hidaka T., Yamashita K., Umeki K., Taki T., Taniwaki M., Okayama A., Morishita K. (2010) Downregulation of *CDKN1A* in adult T-cell leukemia/lymphoma despite overexpression of *CDKN1A* in human T-lymphotropic virus 1-infected cell lines. *J. Virol.* **84**(14), 6966–6977.
16. Li L.C., Dahiya R. (2002) MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* **18**(11), 1427–1431.
17. Vermes I., Haanen C., Reutelingsperger C. (2000) Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods.* **243**(1–2), 167–190.
18. Salameh Y., Bejaoui Y., El Hajj N. (2020) DNA methylation biomarkers in aging and age-related diseases. *Front. Genet.* **11**, 171.
19. Kulis M., Esteller M. (2010) DNA methylation and cancer. *Adv. Genet.* **70**, 27–56.
20. Jaenisch R. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33**, 245–254.
21. Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rubanovich A.B. (2016) Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure. *Environ. Res.* **146**, 10–17.
22. Кузьмина Н.С., Лаптева Н.Ш., Русинова Г.Г., Азизова Т.В., Вязовская Н.С., Рубанович А.В. (2017) Гиперметилирование промоторов генов в лейкоцитах крови человека в отдаленный период после перенесенного радиационного воздействия. *Радиационная биология. Радиоэкология.* **57**(4), 341–356.
23. Cho Y.H., Jang Y., Woo H.D., Kim Y.J., Kim S.Y., Christensen S., Cole E., Choi S.Y., Chung H.W. (2018) LINE-1 hypomethylation is associated with radiation-induced genomic instability in industrial radiographers. *Environ. Mol. Mutagen.* **60**(2), 174–184.

24. Блинова Е.А., Никифоров В.С., Янишевская М.А., Аклеев А.В. (2021) Метилирование генов *BCL-2*, *CDKN1A* и *ATM* у лиц, подвергшихся хроническому облучению. *Медицина экстремальных ситуаций*. **23**(3), 11–15.
25. Li M.J., Wang W.W., Chen S.W., Shen Q., Min R. (2011) Radiation dose effect of DNA repair-related gene expression in mouse white blood cells. *Med. Sci. Monit.* **17**, 290–297.
26. Hoekstra M.F. (1997) Responses to DNA damage and regulation of cell cycle checkpoints by the ATM protein kinase family. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 170–175.
27. Rotman G. (1999) ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene*. **18**, 6135–6144.
28. Knight T., Luedtke D., Edwards H., Taub J.W., Ge Y. (2019) A delicate balance – the BCL-2 family and its role in apoptosis, oncogenesis, and cancer therapeutics. *Biochem. Pharmacol.* **162**, 250–261.

METHYLATION STATUS OF APOPTOSE GENES AND INTENSITY OF APOPTOTIC DEATH OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PERSONS CHRONICALLY EXPOSED TO RADIATION

E. A. Blinova^{1, 2, *}, V. S. Nikiforov^{1, 2}, A. I. Kotikova^{1, 2},
M. A. Yanishevskaya¹, and A. V. Akleyev^{1, 2}

¹Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, 454048 Russia

²Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, 454001 Russia

*e-mail: blinova@urcrm.ru

Methylation of the CpG-islands of gene promoter regions is the most common epigenetic modification involved in the regulation of gene expression. A number of studies has shown that ionizing radiation can cause both hyper- and hypomethylation of DNA. Aberrant methylation affects cellular processes and can lead to the development of various pathological states. In the literature, there are single studies on methylation status of human DNA in a long time after radiation exposure. Here, methylation level of CpG-islands of promoter regions of the apoptosis genes (*BCL2*, *ATM*, *MDM2*, *CDKN1A*, *STAT3*, *NFKB1*), and also its influence on apoptosis of peripheral blood lymphocytes in chronically exposed persons were studied. The residents of the South Ural region who were chronically exposed to radistion (after discharges of radioactive wastes into the Techa river by the “Mayak Production Association” in 1949–1956) were included in the study. It was established that the proportion of individuals with hypermethylated *BCL2* gene promoter among the exposed people was statistically significantly higher than in the control group. The percentage of methylation of the *ATM* gene promoter weakly positively correlated with dose and age characteristics. Differences in the frequency of lymphocyte apoptosis in exposed individuals with hypo- and hypermethylated *ATM* gene promoter were also established. The data obtained indicate that in the long-term period after chronic low dose-rate radiation exposure in the range of low and medium doses epigenetic modifications of the genome occur, which are manifested as changes in methylation of promoter regions of *BCL2* and *ATM* genes.

Keywords: radiation exposure, CpG-islands, hypermethylation, *BCL2* gene, *ATM* gene, lymphocyte apoptosis