

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.21

Влияние метилирования промоторов генов регуляции апоптоза на интенсивность клеточной гибели лимфоцитов у облученных людей**Е.А. Блинова^{1, 2, *} , А.И. Котикова^{1, 2} , А.В. Аксеев^{1, 2}** ¹Лаборатория молекулярно-клеточной радиобиологии, Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Федеральное медико-биологическое агентство, Россия, 454141 г. Челябинск, ул. Воровского, д. 68А;²Кафедра радиационной биологии, Челябинский государственный университет, Россия, 454001, г. Челябинск, ул. Братьев Кашириных, д. 123

*e-mail: blinova@urcrm.ru

Апоптоз играет жизненно важную роль в поддержании баланса между пролиферацией клеток и их гибелью. Аберрантное метилирование промоторных регионов генов, регулирующих клеточную гибель, может влиять на их транскрипционную активность и, как следствие, на реализацию апоптоза. Дефекты в реализации апоптотического пути приводят к развитию различных заболеваний, в том числе онкологических. Целью настоящего исследования был анализ влияния метилирования CpG-динуклеотидов в промоторных областях генов *BCL2*, *BAX*, *TP53* и *MDM2* на интенсивность клеточной гибели лимфоцитов периферической крови (ЛПК) у лиц, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию. Всего было обследовано 279 жителей прибрежных сел реки Течи (Южный Урал). Из них 145 человек подверглись хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию в результате сбросов радиоактивных отходов производственным объединением «Маяк» в реку Теча в период с 1949 по 1956 гг. (средняя накопленная доза облучения красного костного мозга обследованных лиц составила $734 \pm 49,40$ мГр). Анализ метилирования промоторных регионов генов *MDM2*, *TP53*, *BAX* и *BCL2* проводился методом метилспецифической полимеразной цепной реакции в реальном времени. Исследование апоптотической гибели ЛПК проводилось методом проточной цитометрии. Было установлено, что в отдаленном периоде после начала хронического радиационного воздействия в группе облученных людей наблюдались статистически значимые различия в распределении обследованных людей по уровню метилирования CpG-динуклеотидов в промоторных регионах генов *BCL2* и *TP53* по сравнению с необлученными людьми. При оценке влияния метилирования на интенсивность клеточной гибели как в объединенной группе, так в группе облученных лиц регистрируется повышение частоты ЛПК на ранней и поздней стадии апоптоза в группах с гипометилированными участками промотора гена *MDM2*.

Ключевые слова: хроническое радиационное воздействие, клеточная гибель, метилирование ДНК, промоторные регионы генов, лимфоциты, апоптоз

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-12

Введение

Изменения в характере метилирования промоторных областей генов могут влиять на транскрипционную активность этих генов. Аберрантное метилирование в генах, регулирующих клеточную гибель, вероятно отражается на эффективности поддержания клеточного гомеостаза [1]. Апоптоз играет жизненно важную роль в регуляции клеточного баланса. Дефекты в реализации апоптотического пути приводят к развитию различных заболеваний, в том числе онкологических [2].

Степень метилирования зависит от многих факторов: активности ДНК-метилтрансфераз, образа жизни (питание, курение, употребление алкоголя), возраста, а также экзогенных факторов окружающей среды. Ионизирующее излучение является одним из факторов, приводящих к изменению паттерна метилирования [3]. При этом может наблюдаться как гиперметилирование, так и гипометилирование в зависимости от дозы, вида радиационного воздействия, времени после облучения [4, 5]. Локальное гипометилирование

может привести к аномальной активации генов, включая онкогены, в то время как гиперметилирование способствует подавлению транскрипции, в том числе и генов-супрессоров опухолей [6]. Аналогичное явление может происходить в генах, регулирующих пути клеточной гибели. Такие эпигенетические модификации могут влиять на баланс между экспрессией про- и антиапоптотических белков, что отражается на реализации клеточной гибели.

Данная работа является продолжением цикла исследований о влиянии ионизирующего излучения на эпигенетические показатели у лиц, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию вследствие проживания на радиационно-загрязненных территориях (Южный Урал). В ранее проведенных исследованиях у людей, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, наблюдались изменения показателей апоптоза как на клеточном, так и на молекулярном уровне. Спустя более 60 лет после начала хронического радиационного воздействия у облученных людей были выявлены количественные изменения интенсивности апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови (ЛПК) [7], регистрировалось снижение относительного содержания мРНК антиапоптотического гена *BCL-2* и увеличение относительного содержания мРНК проапоптотического гена *BAX* [8], наблюдались изменения в уровне метилирования промоторного региона гена *BCL2*, а также дозозависимое изменение метилирования промоторного региона гена *ATM* [9].

Целью настоящей работы было исследование влияния метилирования промоторных областей в генах *BCL2*, *BAX*, *TP53* и *MDM2* на интенсивность клеточной гибели ЛПК у лиц, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию.

Материалы и методы

Характеристика исследуемых лиц. В исследовании влияния метилирования промоторов генов апоптоза на интенсивность клеточной гибели ЛПК приняло участие 279 жителей прибрежных сел реки Течи, проходящих стационарное лечение в клинике Уральского научно-практического центра радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства России (УНПЦ РМ ФМБА России). В группу облученных людей вошли 145 человек, проживающих на побережье реки Течи и подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию в результате сбросов радиоактивных отходов в 1949–1956 гг. в реку Теча. Облучение носило пролонгированный характер: внешнее γ -излучение вследствие нахождения вблизи реки и поймы, а также внутреннее β -излучение от радионуклидов (преимущественно Sr^{90} и Cs^{137}), поступающих в организм с молоком, овощами, мясом и рыбой [10]. Средняя накопленная доза облучения красного костного мозга (ККМ) у облученных людей составила $734 \pm 49,40$ мГр, а средняя накопленная доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов (ТиПЛО) – $98,10 \pm 8,93$ мГр.

Группу сравнения составили 134 человека, чьи накопленные дозы облучения ККМ не превышали фоновый уровень за весь период жизни (70 мГр) [11]. Средняя накопленная доза облучения ККМ в группе сравнения была $17,40 \pm 1,44$ мГр, а средняя накопленная доза облучения ТиПЛО – $7,07 \pm 0,84$ мГр. Подробная характеристика исследуемых людей представлена в табл. 1.

Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие на проведение исследования, одобренное этическим комитетом УНПЦ РМ ФМБА России (протокол № 2 от 20 июля 2021 г.).

Таблица 1

Характеристика обследованных лиц

Характеристика группы		Облученные люди N = 145	Группа сравнения N = 134
Возраст на момент обследования, лет: M $\pm$ SE (min–max)		71,86 $\pm$ 0,46 (62–87)	65 $\pm$ 0,61 (54–87)
Пол, человек (%)	Мужчины	50 (35)	47 (35)
	Женщины	95 (65)	87 (65)
Этническая принадлежность, человек (%)	Славяне	60 (41)	80 (60)
	Татары	66 (46)	45 (34)
	Башкиры	19 (13)	9 (6)
Поглощенная доза облучения ККМ, мГр: M $\pm$ SE (min–max) [10]		734 $\pm$ 49,40 (77,70–3507)	17,40 $\pm$ 1,44 (0–68)
Поглощенная доза облучения ТиПЛО, мГр: M $\pm$ SE (min–max)		98,10 $\pm$ 8,93 (0,29–645)	7,07 $\pm$ 0,84 (0–39,40)

Анализ уровня метилирования промоторных областей генов. Для исследования процента метилирования CpG-динуклеотидов использовали образцы ДНК, взятые из «Коллекции биологических образцов» УНПЦ РМ ФМБА России [13]. Геномную ДНК подвергали бисульфитной конверсии с использованием набора реагентов EpiJET Bisulfite Conversion Kit (Thermo Scientific, США). Конвертированную ДНК амплифицировали с праймерами, специфичными для метилированных участков промоторных регионов генов *MDM2*, *TP53*, *BAX* и *BCL2*. Последовательности праймеров были сконструированы с использованием программы Methyl Primer Express Software V.1.0 (Applied Biosystems; США) и синтезированы фирмой ДНК-Синтез (Россия). Последовательность праймеров: *TP53* (Forward: GTAGTTTGAACGTTTTATTTTGGC; Reverse: CCTACTACGCCCTCTACAAACG); *MDM2* (Forward: TTTGTCTGGGTATTAGTGTGAAC; Reverse: CCTTTTACTACAATTTTCGAAACGTA); *BCL-2* (Forward: GTTTTTAGCGTTCGGTATCGG; Reverse: AAATCTCTATCCACGAAACCGC); *BAX* (Forward: GAGGGGTAGAAATTTTCGGAT; Reverse: ATAATACGAACGACAAACCCG). Амплификацию проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Scientific, США). В качестве реакционной смеси использовали 5× qPCRmix-HS (Евроген, Россия). Температурный и временной режимы ПЦР-РВ: первая денатурация (95°, 5 мин), денатурация (95°, 30 с), отжиг (температура отжига для каждого гена) и элонгация (72°, 30 с) — 50 циклов; кривая плавления (95°, 10 с; 60°, 1 мин; 95°, 15 с; 60°, 15 с). В качестве контролей для оценки процента метилирования исследуемых CpG-динуклеотидов использовали коммерческие образцы 100% метилированной ДНК (CpG Methylated Human Genomic DNA; Thermo Fisher Scientific, США) и 0% метилированной ДНК (Human Genomic DNA: Male; Promega, США).

Анализ клеточной гибели ЛПК. Этапы пробоподготовки и методологии исследования подробно описаны в ранее [14].

Апоптотическая гибель ЛПК оценивалась с помощью набора FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD, США), в котором компонент аннексин V-FITC (AnnV-FITC) связывается с молекулой фосфатидилсерина на поверхности мембраны, служащей маркером процесса апоптоза. Маркером некроза является проникновение в клетку ДНК тропного красителя — пропидия йодида. Анализ пробы проводился на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США). Результаты представляли собой процентное соотношение клеток: ранняя стадия апоптоза (AnnV-FITC+/PI-), поздняя стадия апоптоза (AnnV-FITC+/PI+) и некроз (AnnV-FITC-/PI+) [14].

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программного комплекса SPSS Statistics 17.0. Для сравнения распределений обследованных лиц по уровню метилирования использовали критерий Хи-квадрат (χ^2) с поправкой Йетса. Сравнение выборок данных клеточной гибели проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$. Корреляционный анализ с целью оценки влияния дозы облучения ККМ и возраста на уровень метилирования проводили путем расчета коэффициентов ранговой корреляции (Rs) по Спирмену.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования было получено распределение обследованных лиц по уровню метилирования CpG-динуклеотидов в промоторах генов *TP53*, *MDM2*, *BCL2* и *BAX* в группе хронически облученных людей и у людей из группы сравнения (рисунок).

Распределение облученных людей по уровню метилирования CpG-динуклеотидов в промоторах генов *BCL2* ($\chi^2 = 16,56$; $p = 0,002$) и *TP53* ($\chi^2 = 9,59$; $p = 0,05$) статистически значимо отличалось от такового для группы контроля. В группе сравнения количество человек с уровнем метилирования CpG-динуклеотидов в промоторе гена *BCL2* от 0 до 10% составило 97,8% и 1,1 % с уровнем метилирования 50–100%, в то время как 12% людей, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, имели уровень метилирования 50–100%. При сравнении только этих двух групп значение χ^2 с поправкой Йетса составило 8,04 ($p = 0,005$). Основные различия в распределении обследованных лиц по уровню метилирования CpG-динуклеотидов в промоторе гена *TP53* были в диапазоне от 0% до 5% и от 25% до 100%. В группе сравнения у 22% обследованных регистрировалось гипометилирование, а у 7,8% гиперметилирование, в то время как в группе облученных таких людей было 11,8% и 1,3% соответственно. При сравнении отдельно только этих групп также наблюдались статистически значимые различия ($\chi^2 = 7,27$; $p = 0,03$). Однако следует заметить, что как в группе облученных, так и в группе сравнения у большинства обследованных лиц уровень метилирования составил от 5% до 25%. Для остальных генов не было найдено статистически значимых различий в распределении обследованных лиц по уровню метилирования CpG-динуклеотидов.

В доступной литературе имеется информация об изменении уровня метилирования промоторов различных генов в лейкоцитах крови: так, у ликвидаторов аварии на Чернобыльской атомной электростанции (ЧАЭС) наблюдалось гиперметилирование CpG-динуклеотидов промоторов генов *p16/INKA* и *GSTP1* [15], а у облученных работни-

ков реакторного производства производственного объединения «Маяк» гиперметилование CpG-островков промоторов генов *GSTP1*, *Tp53* и *SOD2* [16]. Однако стоит заметить, что характер радиационного воздействия и дозы облучения как у ликвидаторов аварии на ЧАЭС, так и у работников ПО «Маяк» отличались от этих показателей для лиц, обследованных в нашей работе. Большая часть работников ПО «Маяк» подвергалась внешнему γ -излучению, контактировала с аэрозолями плутония, а часть работников подверглась внутреннему действию α -излучений, суммарная доза внешнего γ -облучения составила от 0,96–4,1 Гр [16]. В наших исследованиях мы не наблюдаем явно выраженного гиперметилования CpG-динуклеотидов в промоторных областях исследуемых генов, у большинства людей в обеих группах уровень метилирования не превышает 10%. Такие различия в результатах, вероятно, могут быть обусловлены разным характером радиационного воздействия (хроническое низкоинтенсивное радиационное воздействие) и суммарными накопленными дозами.

Для выявления роли радиационного воздействия, а также влияния возраста на уровень метилирования был проведен корреляционный анализ. Однако, согласно полученным результатам, не было установлено корреляционных связей между уровнем метилирования CpG-динуклеотидов

в промоторных регионах изученных генов и дозой облучения ККМ, дозой облучения ТиПЛО, а также достигнутым возрастом (табл. 2).

Дифференциальное метилирование промоторных регионов генов, регулирующих клеточную гибель может приводить к изменению количества мРНК и, следовательно, концентрации белковых продуктов генов, что может влиять на реализацию клеточной гибели. В связи с этим на следующем этапе работы было проведено исследование клеточной гибели в зависимости от уровня метилирования CpG-динуклеотидов в промоторах генов *TP53*, *MDM2*, *BAX* и *BCL2*.

Таблица 2

Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (Rs) процента метилирования CpG-динуклеотидов в промоторных регионах исследуемых генов с поглощенной дозой облучения ККМ и ТиПЛО, а также возрастом пациента на момент исследования

Ген	Доза облучения ККМ	Доза облучения ТиПЛО	Возраст на момент исследования
MDM2	0,01 (0,9)	0,06 (0,4)	0,1 (0,3)
BAX	0,02 (0,8)	-0,01 (0,9)	-0,1 (0,2)
BCL2	0,08 (0,2)	0,12 (0,08)	-0,01 (0,9)
TP53	0,06 (0,4)	-0,03 (0,6)	-0,1 (0,4)

Примечание: В скобках указано *p*-значение, рассчитанное для коэффициентов ранговой корреляции Спирмена (Rs).

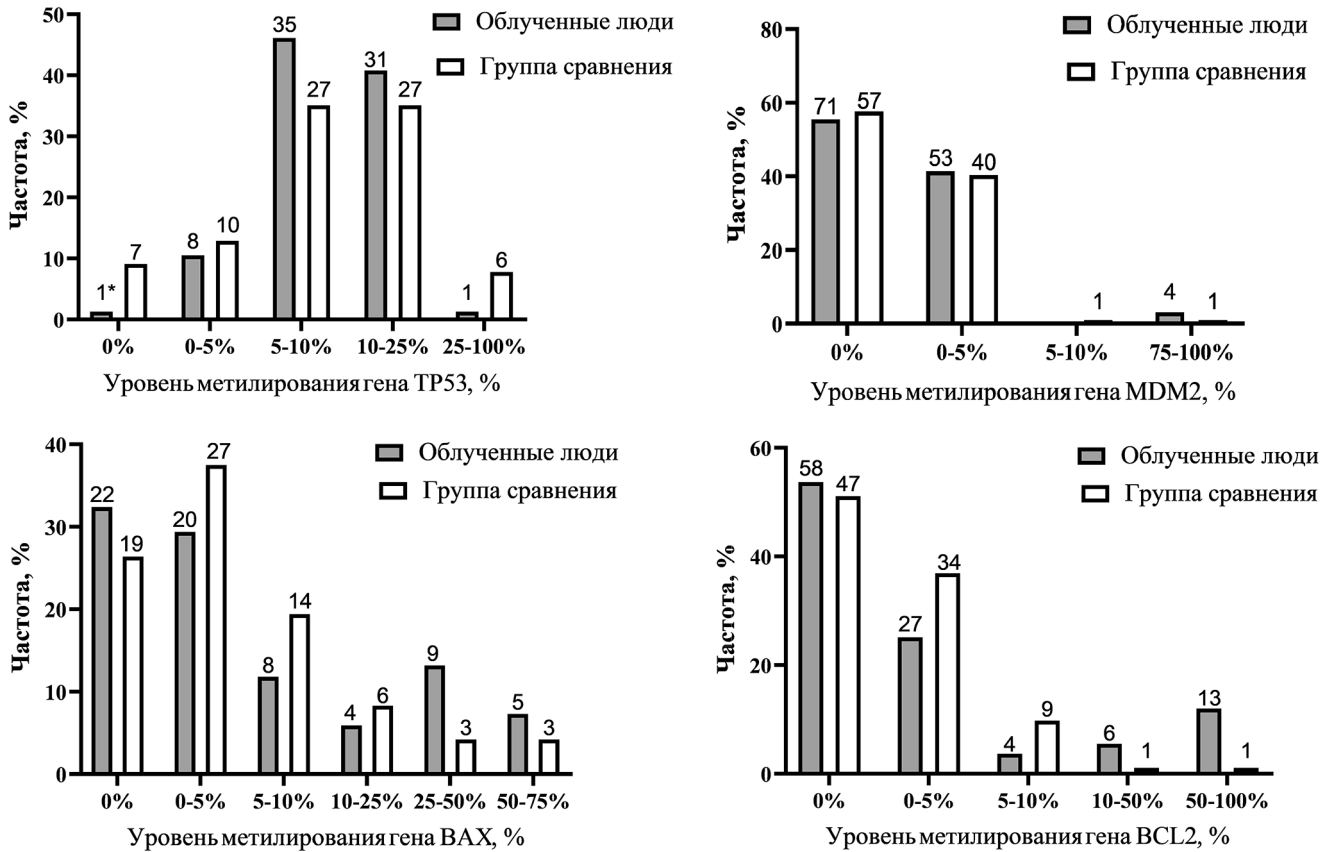


Рисунок. Распределение обследованных лиц по уровню метилирования CpG-динуклеотидов в промоторных регионах генов *TP53*, *MDM2*, *BAX* и *BCL2*. По оси абсцисс отложен процент метилирования CpG-динуклеотидов, по оси ординат – процент обследованных людей; цифры над столбцами указывают количество человек в каждой группе.

Таблица 3

Интенсивность клеточной гибели ЛПК в зависимости от уровня метилирования CpG-динуклеотидов в промоторах генов *TP53*, *MDM2*, *BAX* и *BCL2*

Уровень метилирования	Облученные люди			Объединенная группа		
	Ранняя стадия, %	Поздняя стадия, %	Некроз, %	Ранняя стадия, %	Поздняя стадия, %	Некроз, %
Ген <i>TP53</i>						
До 10%	2,19 (0,25–8,08)	0,01 (0–0,04)	0,03 (0,01–0,06)	2,99 (0,83–8,08)	0,01 (0–0,17)	0,02 (0,01–0,04)
Более 10%	2,24 (0,57–6,38)	0,01 (0–0,11)	0,03 (0,01–0,09)	1,91 (0,53–5,29)	0,02 (0–0,09)	0,04 (0,01–0,07)
Ген <i>MDM2</i>						
0%	6,38 (2,72–10,29)	0,06 (0,02–0,11)	0,02 (0,01–0,05)	6,51 (2,72–9,91)	0,07 (0,02–0,15)	0,02 (0,01–0,06)
Более 5%	1,01 (0,17–3,95) <i>p</i> = 0,0002	0,01 (0–0,06) <i>p</i> = 0,001	0,03 (0,01–0,07)	1,39 (0,36–3,77) <i>p</i> = 0,001	0,01 (0–0,02) <i>p</i> = 0,004	0,03 (0,02–0,06)
Ген <i>BAX</i>						
До 10%	1,81 (0,21–6,71)	0,01 (0–0,09)	0,04 (0,01–0,09)	2,71 (0,55–7,03)	0,01 (0–0,08)	0,03 (0,01–0,06)
Более 10%	4,81 (1,65–9,32)	0,02 (0,01–0,09)	0,02 (0,01–0,03)	4,82 (1,79–9,32)	0,03 (0,01–0,11)	0,02 (0,01–0,05)
Ген <i>BCL-2</i>						
0%	6,38 (4,08–10,25)	0,08 (0,03–0,11)	0,02 (0,01–0,06)	5,13 (3,19–10,25)	0,08 (0,03–0,11)	0,03 (0,01–0,09)
Более 5%	2,62 (0,42–9,33)	0,02 (0,01–0,11)	0,03 (0,01–0,04)	6,38 (1,85–,32)	0,06 (0,01–0,15)	0,02 (0,01–0,04)

Было обнаружено, что у обследованных лиц как в объединенной группе, включающих облученных лиц и группу сравнения, так и отдельно в группе облученных людей наблюдается изменение частоты клеток на ранней и поздней стадии апоптоза в зависимости от уровня метилирования CpG-динуклеотидов промотора гена *MDM2* (табл. 3). В случае гипометилирования CpG-динуклеотидов в промоторе *MDM2* регистрируется повышение количества клеток на ранней и поздней стадиях апоптоза по сравнению с уровнем метилирования более 5%. Анализ корреляции уровня метилирования CpG-динуклеотидов в гене *MDM2* с частотой клеток, находящихся на ранней и поздней стадии апоптоза, также показал статистически значимую отрицательную корреляционную связь как в объединенной группе ($R_s = -0,46$; $p < 0,001$ для частоты апоптоза на ранней стадии и $R_s = -0,45$; $p < 0,001$ для частоты апоптоза на поздней стадии), так и в группе облученных лиц ($R_s = -0,53$; $p < 0,001$ для ранней стадии и $R_s = -0,46$; $p < 0,001$ для поздней стадии апоптоза). При этом для генов, которые различались по уровню метилирования, у облученных лиц и группы сравнения статистически значимых различий не обнаружено.

Ген *MDM2* функционально может проявлять признаки как онкогена, так и супрессора опухолей. Показано, что белок MDM2 является нега-

тивным регулятором убихинон-оксидоредуктазы, что приводит к снижению митохондриального дыхания, выраженному окислительному стрессу и активации апоптоза по митохондриальному пути [17]. В нашем исследовании мы наблюдаем увеличение интенсивности апоптоза ЛПК как на ранней стадии, так и на поздней стадии в группах, где отсутствует метилирование изученных CpG-островков в промоторной области гена *MDM2* (0% метилирования), что, вероятно, указывает на реализацию апоптотической гибели именно по этому пути. Однако стоит заметить, что с гена *MDM2* синтезируется множество транскриптов мРНК, это приводит к экспрессии полноразмерного *MDM2* дикого типа, а также возникновению множества изоформ [18]. В нашей работе мы рассматривали уровень метилирования лишь одного участка промоторной области этого гена, поэтому для подтверждения полученных результатов требуются дополнительные исследования.

Заключение

В результате проведенного исследования было установлено, что в отдаленном периоде, спустя более 60 лет после начала хронического радиационного воздействия, в группе облученных лиц (в диапазоне дозы облучения ККМ от 77,70 до 3507 мГр) наблюдались статистически значимые

различия в распределении обследованных людей по уровню метилирования CpG-динуклеотидов в промоторных регионах генов *BCL2* и *TP53* по сравнению с необлученными людьми. В обеих группах преобладали люди пожилого возраста. Однако корреляционных связей с дозовым фактором, а также возрастом на момент обследования установлено не было.

При оценке влияния метилирования на интенсивность клеточной гибели как в объединенной группе, так в группе облученных лиц регистрируется повышение частоты ЛПК на ранней и поздней стадии апоптоза в группах с гипометилированием CpG-островков в промоторе гена *MDM2*. Результаты корреляционного анализа также подтверждают связь интенсивности апоптоза

с клеточной гибелью с уровнем метилирования гена *MDM2*. Однако для подтверждения полученных результатов требуется проведение дальнейших исследований метилирования всех промоторных областей гена *MDM2*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Федерального медико-биологического агентства в рамках выполнения федеральной целевой программы «Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2020 гг. и на период до 2030 г.» (контракт № 27.501.21.2 от 11.06.2021 г.). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследование одобрено этическим комитетом УНПЦ РМ ФМБА России протокол № 2 от 20 июля 2021 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gopisetty G., Ramachandran K., Singal R. DNA methylation and apoptosis. *Mol Immunol.* 2006;43(11):1729–1740.
2. Pfeffer C.M., Singh A.T.K. Apoptosis: A target for anticancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(2):448.
3. Antwi D.A., Gabbara K.M., Lancaster W.D., Ruden D.M., Zielske S.P. Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways. *Epigenetics.* 2013;8(8):839–848.
4. Bae J.H., Kim J.G., Heo K., Yang K., Kim T-O., Yi J.M. Identification of radiation-induced aberrant hypomethylation in coloncancer. *BMC Genomics.* 2015;16(56):12.
5. Lahtz C., Bates S.E., Jiang Y., Li A.X., Wu X., Hahn M.A., Pfeifer G.P. Gamma irradiation does not induce detectable changes in DNA methylation directly following exposure of human cells. *PLoS One.* 2012;7(9):e44858.
6. Hatzia Apostolou M., Iliopoulos D. Epigenetic aberrations during oncogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011;68:1681–1702.
7. Блинова Е.А., Котикова А.И., Янишевская М.А., Аклеев А.В. Апоптоз лимфоцитов и полиморфизм генов регуляции апоптоза у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию. *Медицинская радиология и радиационная безопасность.* 2020;65(4):36–42.
8. Никифоров В.С., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Транскрипционная активность генов клеточного цикла и апоптоза у хронически облученных лиц, имеющих повышенную частоту TCR-мутантных лимфоцитов. *Радиация и риск.* 2020;29(2):89–100.
9. Blinova E.A., Nikiforov V.S., Kotikova A.I., Yanievskaya M.A., Akleyev A.V. Methylation status of apoptosis genes and intensity of apoptotic death of peripheral blood lymphocytes in persons chronically exposed to radiation. *Mol. Biol.* 2022;56(6):993–1002.
10. *Последствия радиоактивного загрязнения реки Течи.* Под ред. А.В. Аклеева. Челябинск: Книга; 2016. 390 с.
11. 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; 2009. 100 с.
12. Дегтева М.О., Напье Б.А., Толстых Е.И., Шишкина Е.А., Бугров Н.Г., Крестинина Л.Ю., Аклеев А.В. Распределение индивидуальных доз в когорте людей, облученных в результате радиоактивного загрязнения реки Течи. *Медицинская радиология и радиационная безопасность.* 2019;3:46–53.
13. Блинова Е.А., Кореченкова А.В., Никифоров В.С., Янишевская М.А., Котикова А.И., Аклеев А.В. «Коллекция биологических образцов» Свидетельство о регистрации базы данных RU 2024621345, 28.03.2024. Заявка от 07.02.2024.
14. Блинова Е.А., Котикова А.И., Аклеев А.В. Интенсивность апоптоза лимфоцитов крови у облученных лиц с облигатными формами предраковых заболеваний. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2023;176(8):233–236.
15. Kuzmina N.S., Lapteva N.Sh., Rubanovich A.B. Hypermethylation of gene promoters in peripheral blood leukocytes in humans long term after radiation exposure. *Environ. Res.* 2016;146:10–17.
16. Кузьмина Н.С., Лаптева Н.Ш., Русинова Г.Г., Азизова Т.В., Вязовская Н.С., Рубанович А.В. Гиперметилирование промоторов генов в лейкоцитах крови человека в отдаленный период после перенесенного радиационного воздействия. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2017;57(4):341–356.
17. Elkholi R., Abraham-Enachescu I., Trotta A.P., Rubio-Patiño C., Mohammed J.N., Luna-Vargas M.P.A., Gelles J.D., Kaminetsky J.R., Serasinghe M.N., Zou C., Ali S., McStay G.P., Pfleger C.M., Chipuk J.E. MDM2 integrates cellular respiration and apoptotic signaling through NDUFS1 and the mitochondrial network. *Mol. Cell.* 2019;74(3):452–465.e7.
18. Jeyaraj S., O'Brien D.M., Chandler D.S. MDM2 and MDM4 splicing: an integral part of the cancer spliceome. *Front Biosci.* 2009;14:2647–2656.

Поступила в редакцию 10.07.2024

После доработки 05.11.2024

Принята в печать 26.12.2024

RESEARCH ARTICLE

Effect of gene promoter methylation of apoptosis regulation on the intensity of lymphocyte cell death in exposed people

E.A. Blinova^{1, 2, *} , A.I. Kotikova^{1, 2} , A.V. Akleyev^{1, 2} 

¹Laboratory of Molecular and Cellular Radiobiology, Urals Research Center for Radiation Medicine, Federal Medical Biological Agency, Vorovsky ul., 68A, Chelyabinsk, 454141, Russia;

²Department of Radiation Biology, Chelyabinsk State University, Bratiev Kashirinykh ul., 129, Chelyabinsk, 454001, Russia

*e-mail: blinova@urcrm.ru

Apoptosis plays a vital role in maintaining the balance between proliferating cells and their death. Modifications in the methylation level of promoter regions of genes regulating cell death can affect the transcriptional activity of these genes and, consequently, the execution of apoptosis. At the same time, any defects in the implementation of the apoptotic pathway lead to the development of various diseases, including cancer. The objective of the study was to analyse the effect of methylation of promoter regions in *BCL2*, *BAX*, *TP53* and *MDM2* genes on the intensity of cell death of peripheral blood lymphocytes in individuals exposed to chronic low dose rate radiation. A total of 279 residents of the Techa riverside villages (Southern Urals) were examined, 145 of them were exposed to chronic low dose rate radiation due to the discharge of radioactive waste by the Mayak Production Association into the Techa River between 1949 and 1956 (the average accumulated dose to red bone marrow was 734 ± 49.40 mGy). Methylation of promoter regions of *MDM2*, *TP53*, *BAX* and *BCL2* genes was analysed by methyl-sensitive real-time PCR. Apoptotic death of peripheral blood lymphocytes (PBLs) was studied by flow cytometry method. It was found that in the long-term period, after the onset of chronic radiation exposure, statistically significant differences were observed in the distribution of the examined people in the group of exposed people by the level of methylation of promoter regions of *BCL2* and *TP53* genes in comparison with unexposed people. When assessing the effect of methylation on the intensity of cell death in both the combined group and the group of exposed individuals, an increased frequency of PBLs at early and late stages of apoptosis is registered in the groups with hypomethylated *MDM2* gene promoter.

Keywords: chronic radiation exposure, cell death, DNA methylation, promoter regions of genes, lymphocytes, apoptosis

Funding: The study was conducted with the financial support of the Federal Medical and Biological Agency as part of the Federal Target Program “Ensuring Nuclear and Radiation Safety for 2016–2020 and for the period until 2030” (Contract No. 27.501.21.2 dated June 11, 2021).

Сведения об авторах

Блинова Евгения Андреевна — канд. биол. наук, зав. лабораторией молекулярно-клеточной радиобиологии Уральского научно-практического центра радиационной медицины ФМБА России, доц. кафедры радиационной биологии Челябинского государственного университета. Тел.: 8-351-232-79-14; e-mail: blinova@urcrm.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2567-7945>

Котикова Алиса Игоревна — мл. науч. сотр. лаборатории молекулярно-клеточной радиобиологии ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России, г. Челябинск, Россия; аспирант кафедры радиационной биологии ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия. Тел.: 8-351-232-79-14; e-mail: kotikova@urcrm.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1695-1340>

Аклеев Александр Васильевич — докт. мед. наук, проф., директор ФГБУН «Уральский научно-практический центр радиационной медицины» ФМБА России, заведующий кафедрой радиационной биологии ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», г. Челябинск, Россия. Тел.: 8-351-232-79-14; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2583-5808>