

DOI: <https://doi.org/10.17816/humeco568691>

Экспрессия генов клеточного цикла у внутриутробно облучённых жителей прибрежных сёл реки Течи

В.С. Никифоров^{1, 2}, Е.А. Блинова^{1, 2}, А.В. Аклеев^{1, 2}¹ Уральский научно-практический центр радиационной медицины, Челябинск, Российская Федерация;² Челябинский государственный университет, Челябинск, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Внутриутробный период развития организма является наиболее чувствительным к действию ионизирующего излучения. Хотя эффекты пренатального облучения остаются малоизученными, предполагается, что антенатально облучённые организмы составляют группу риска в отношении развития отдалённых соматико-стохастических последствий облучения.

Цель исследования. Проанализировать экспрессию мРНК генов клеточного цикла (*TP53*, *MDM2*, *CDKN1A*, *ATM*) в отдалённые сроки у лиц, подвергшихся хроническому радиационному облучению на реке Течи во время внутриутробного развития.

Материал и методы. Исследование проводилось спустя более 60–70 лет после начала хронического облучения у 170 человек. Из них 54 человека подверглись воздействию во внутриутробном и постнатальном периодах развития, 80 человек подверглись хроническому облучению после рождения. Группа сравнения включала 36 человек, проживающих в сходных социально-экономических условиях, с накопленной дозой облучения красного костного мозга, не превышающей 70 мГр за весь период жизни.

Результаты. В отдалённые сроки у жителей прибрежных сёл реки Течи, облучённых в периоды антенатального и постнатального развития, наблюдается снижение относительного содержания мРНК гена *MDM2* и *CDKN1A* по сравнению с необлучёнными людьми и людьми, хроническое облучение которых происходило после рождения. Результаты корреляционного анализа свидетельствуют об отсутствии зависимости изменения экспрессии мРНК исследуемых генов от величины накопленной поглощённой дозы внутриутробного и постнатального облучения красного костного мозга у обследуемых людей.

Заключение. Снижение транскрипционной активности генов *MDM2* и *CDKN1A* у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию во внутриутробном периоде, может оказывать роль в развитии отдалённых последствий облучения у человека.

Ключевые слова: экспрессия генов; хроническое облучение; *in utero*; постнатальное облучение; река Теча; малые дозы.

Как цитировать:

Никифоров В.С., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Экспрессия генов клеточного цикла у внутриутробно облучённых жителей прибрежных сёл реки Течи // Экология человека. 2023. Т. 30. № 8. С. 589–599. DOI: <https://doi.org/10.17816/humeco568691>

DOI: <https://doi.org/10.17816/humeco568691>

Expression of cell cycle genes among the residents of settlements along the Techa River exposed to ionizing radiation *in utero*

Vladislav S. Nikiforov^{1, 2}, Evgeniya A. Blinova^{1, 2}, Alexander V. Akleyev^{1, 2}

¹Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russian Federation;

²Chelyabinsk state University, Chelyabinsk, Russian Federation

ABSTRACT

BACKGROUND: The period of intrauterine development is highly susceptible to the effects of ionizing radiation. While the consequences of radiation exposure during pregnancy are not yet fully understood, it is believed that individuals exposed to ionizing radiation in utero are at a greater risk of long-term health consequences.

AIM: To analyze the expression of mRNA of cell cycle genes (*TP53*, *MDM2*, *CDKN1A*, *ATM*) in individuals exposed during intrauterine development to chronic radiation exposure after the Techa River accident.

MATERIAL AND METHODS: The study was conducted over 60–70 years after the onset of chronic radiation exposure in a group of 170 individuals. Among them, 54 individuals were exposed to radiation during both prenatal and postnatal periods of development, while 80 individuals were exposed to chronic radiation after birth. The comparison group consisted of 36 individuals living in similar socio-economic conditions, with a lifetime cumulative dose of red bone marrow radiation not exceeding 70 mGy.

RESULTS: Individuals residing in coastal villages along the Techa River, who were exposed to radiation during both the prenatal and postnatal stages of development, experience a reduction in the relative mRNA content of the *MDM2* and *CDKN1A* genes compared to the control group and individuals who were exposed to chronic radiation after birth. The results of the correlation analysis indicate that there is no association between changes in mRNA expression of the studied genes and the accumulated absorbed dose of intrauterine and postnatal exposure of red bone marrow.

CONCLUSION: The reduced transcriptional activity of the *MDM2* and *CDKN1A* genes in individuals exposed to chronic radiation in utero may play a role in the development of long-term effects of radiation exposure in humans.

Keywords: gene expression; chronic radiation exposure; *in utero*; postnatal exposure; Techa River; low doses.

To cite this article:

Nikiforov VS, Blinova EA, Akleyev AV. Expression of cell cycle genes among the residents of settlements along the Techa River exposed to ionizing radiation in utero. *Ekologiya cheloveka (Human Ecology)*. 2023;30(8):589–599. DOI: <https://doi.org/10.17816/humeco568691>

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день эффекты внутриутробного (*in utero*) облучения остаются плохо изученными и противоречивыми.

Данные о потенциальном биологическом воздействии на организм после внутриутробного облучения, как правило, получены на животных и свидетельствуют о высокой радиочувствительности эмбриона к летальным эффектам облучения в предимплантационном периоде. Однако облучение беременных лабораторных мышей (BALB/c) в период органогенеза в дозах 10–13 мЗв в сутки в течение 10 дней не оказывало вредного воздействия на потомство [1].

Данные эпидемиологов указывают, что малые дозы диагностического облучения (до 10 мГр), полученные в период антенатального развития, приводят к увеличению частоты лейкемии в детском и взрослом возрасте [2]. Исследования японских учёных, проведённые на группе людей, подвергшихся внутриутробному облучению при атомной бомбардировке Хиросимы и Нагасаки, демонстрируют более высокую долю лиц с умственной отсталостью и снижением антропометрических показателей преимущественно за счёт роста и массы тела [3].

Сообщается, что воздействие ионизирующего излучения во внутриутробном периоде может влиять на развитие эмбриона и плода в зависимости от поглощённой дозы и гестационного возраста, в котором происходит облучение. Так, при исследовании последствий аварии на Чернобыльской атомной электростанции (ЧАЭС), отмечается повышенная частота стабильных aberrаций хромосомного типа у лиц, облучённых в первый гестационный период развития плода (0–8 недель) [4]. Напротив, частота лимфоцитов с микроядрами у лиц, проживавших в сёлах вдоль реки Течи и подвергшихся облучению *in utero* (средняя накопленная доза облучения клеток красного костного мозга (ККМ), полученная в период внутриутробного развития, составляла $30 \pm 0,5$ мГр), а затем и в постнатальный период (средняя доза облучения ККМ — 280 ± 5 мГр) была достоверно снижена по сравнению с людьми, не подвергавшимися аварийному облучению [5]. Кроме того, у данной категории лиц наблюдался дисбаланс в цитокиновом профиле, который выражался в снижении уровней IL-2, IL-10, CSF-GM в сыворотке крови [6].

К сожалению, исследований, посвящённых изучению генетических и эпигенетических эффектов внутриутробного облучения, на сегодняшний день крайне мало. Учитывая, что большинство эмбриональных клеток активно размножается, облучение на ранних стадиях развития может привести к значительному накоплению радиационно-индуцированных стабильных эпигенетических меток, способных оказывать влияние на экспрессию генов.

Предполагается, что эпигенетические изменения генома в ответ на внутриутробное облучение играют важную роль в развитии организма и его восприимчивости к заболеваниям [7]. Так, спустя два года после облучения

11-дневных эмбрионов мышей в дозе 100 мГр были обнаружены изменения в экспрессии генов митохондриального комплекса и генов теплового шока [8]. В частности, авторы отметили снижение уровня активной формы *MAP4K4*, участвующей в широком спектре физиологических процессов, включая пролиферацию и адгезию клеток, развитие сердечно-сосудистых заболеваний [9] и рака [10], тем самым впервые дали представление о молекулярных механизмах сердечной недостаточности у мышей, облучённых во время внутриутробного периода развития.

Облучение в антенатальный период в диапазоне малых доз (10, 20 и 40 сГр) служило причиной активации апоптоза нейронов на фоне увеличения экспрессии гена *TP53* в клетках развивающегося мозга крыс [11], что согласуется с результатами исследования [12], в котором продемонстрировано повышенное содержание мРНК протоонкогенов у внутриутробно облучённых крыс в неокортексе и гиппокампе в течение первых недель после рождения.

На основании вышесказанного можно предположить, что люди, облучённые в период антенатального развития, могут составлять группу риска в отношении развития отдалённых стохастических последствий облучения. Однако механизмы, в том числе эпигенетические, лежащие в основе долгосрочных эффектов облучения плода у человека, остаются малоизученными.

Цель исследования. Анализ экспрессии мРНК генов клеточного цикла (*TP53*, *MDM2*, *CDKN1A*, *ATM*) в отдалённые сроки у лиц, подвергшихся хроническому радиационному облучению на реке Тече во время внутриутробного развития.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа была проведена в отдалённые сроки (спустя более 60–70 лет) после начала хронического облучения у 170 человек. В исследовании участвовали три группы лиц:

- лица, подвергшиеся хроническому радиационному воздействию во внутриутробном и в постнатальном периодах развития;
- лица, подвергшиеся хроническому радиационному облучению только в период постнатального развития;
- группа сравнения — лица, проживающие в сходных социально-экономических условиях, с накопленной дозой облучения ККМ, не превышающей 70 мГр за весь период жизни. Данная категория лиц внутриутробному облучению не подвергалась.

Сравниваемые группы были сопоставимы по полу, этнической принадлежности и возрасту (старше 60 лет). Обследуемые группы хронически облучённых лиц имели равные по величине накопленные поглощённые постнатальные дозы облучения ККМ. Основные характеристики исследуемых групп представлены в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика исследуемых групп**Table 1.** Characteristics of the studied groups

Характеристика групп Characteristics of groups	Группа сравнения Control group n=36	Облучённые <i>in utero</i> и постнатально In utero and postnatal exposure n=54	Облучённые только в постнатальном периоде Postnatal exposure n=80
Возраст на момент обследования, лет: M±SE (min–max) Age at the time of examination, years: M±SE (min–max)	74,3±0,7 (63,0–87,0)	65,5±0,3 (60,0–70,0)	73,8±0,6 (65,0–87,0)
Пол, n, % Sex, n, %	Мужчины Men Женщины Women	21 (38,9) 33 (61,1)	33 (41,2) 47 (58,8)
Этническая принадлежность, n, % Ethnicity, n, %	Славяне Slavic Тюрки Turkic	22 (61,2) 14 (38,8)	49 (61,2) 31 (38,8)
Накопленная постнатальная доза облучения ККМ, мГр: M±SE (min–max) Cumulative postnatal dose to RBM, mGy: M±SE (min–max)	23,2±2,7 (0,1–55,0)	506,2±51,4 (77,8–1721,8)	512,2±37,9 (80,8–1764,1)
Накопленная доза облучения ККМ в период внутриутробного развития, мГр: M±SE (min–max) Cumulative in utero dose to RBM, mGy: M±SE (min–max)	0	80,3±11,9 (0,01–357,9)	0

Примечание: ККМ — красный костный мозг.

Note: RBM — red bone marrow.

При формировании групп были использованы следующие критерии включения в исследование:

- облучённые лица из когорты реки Течи, проживавшие в одном из 41 села, расположенного на побережье реки Течи, в период с 01.01.1950 по 31.12.1960 гг.;
- наличие рассчитанной индивидуальной поглощённой накопленной дозы облучения ККМ, полученной в антенатальный и постнатальный периоды развития.

Критерии исключения:

- наличие у обследованных лиц онкологических, аутоиммунных, острых или хронических (период обострения) воспалительных заболеваний на период обследования;
- приём противоопухолевых препаратов, антибиотиков, стероидных гормонов из подкласса кортикостероидов в течение последних 6 месяцев до исследования.
- наличие контакта с генотоксичными агентами в процессе профессиональной деятельности.

Индивидуальные дозы, полученные членами когорты в период внутриутробного развития, а также ежегодные постнатальные дозы были оценены на основе дозиметрической системы реки Течи (TRDS) [13], в которую был включён специальный алгоритм для расчёта доз внутриутробного облучения.

Дозы, полученные в период внутриутробного развития, воздействовавшие на ККМ, были рассчитаны как сумма внутренних доз, накопленных в результате перехода радионуклидов из организма матери в организм плода, и внешних доз, накопленных в период пребывания матери на загрязнённой территории (около дома или вблизи реки). Для расчёта внутренних доз от ^{89,90}Sr использовалась биокинетическая модель перехода стронция из организма матери в плод и новая дозиметрическая модель беременной женщины [14, 15].

Все пациенты подписывали добровольное информированное согласие на проведение исследования, одобренное этическим комитетом Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства» (УНПЦ РМ ФМБА России).

Кровь для оценки относительного содержания мРНК генов *TP53*, *MDM2*, *CDKN1A*, *BAX* и *BCL-2* брали из локтевой вены в объёме 3 мл в стерильные вакуумные пробирки Tempus Blood RNA Collection Tubes (Thermo Scientific™, США). Выделение РНК осуществлялось колоночным методом при помощи коммерческого набора GeneJET Stabilized and Fresh Whole Blood RNA Kit (Thermo Scientific™, США). Количественные и качественные характеристики выделенных образцов общей РНК оценивали

Таблица 2. Характеристика использованных праймеров**Table 2.** Characteristics of the used primers

Ген Gene	Праймеры и зонды: длина (п.н.) Primers and probes: length (bp)	Температура, °C Temperature, °C	GC, % GC content, %	Размер ампликона, п.н. Amplicon size, bp	Ссылки на мишени из ресурса NCBI NCBI links
<i>TP53</i>	F: ex8–ex9 (20)	61,08	60,00	206	NM_001126112.2
	R: ex10–ex11 (20)	60,04	60,00		
	Probe: ex10 (20)	59,89	70,00		
<i>MDM2</i>	F: ex8 (19)	59,86	57,89	271	NM_002392.5
	R: ex10–ex11 (24)	59,12	41,67		
	Probe: ex10 (24)	58,61	54,17		
<i>CDKN1A</i>	F: ex3 (20)	59,31	55,00	140	NM_001291549.1
	R: ex3–ex4 (24)	59,61	45,83		
	Probe: ex3 (20)	59,98	65,00		
<i>ATM</i>	F: ex15–ex16 (22)	60,16	45,45	130	NM_000051.3
	R: ex16–ex17 (25)	58,61	36,00		
	Probe: ex16 (22)	57,43	50,00		
<i>COMT</i>	F: ex2–ex3 (19)	59,93	57,89	162	NM_007310.2
	R: ex3–ex4 (18)	59,64	61,11		
	Probe: ex3 (23)	59,97	70,00		

Примечание: GC — доля гуанина и цитозина среди всех остатков нуклеотидов рассматриваемой нуклеотидной последовательности; NCBI — Национальный центр биотехнологической информации (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Note: GC content — the proportion of guanine and cytosine among all nucleotide elements of the studied nucleotide sequence; NCBI — The National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Scientific™, США). Чистоту препарата определяли по значениям поглощения на длинах волн, равных 260 и 280 нм (A260/280). Реакция обратной транскрипции проводилась отдельным этапом с использованием коммерческого набора реактивов MMLV RT kit («Евроген», Россия). Относительное количественное содержание мРНК определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием амплификатора CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Олигонуклеотидная последовательность праймеров и зондов были разработаны коммерческой компанией ООО «Тест-Ген» (табл. 2).

Реакцию проводили в следующем временном режиме: предварительная денатурация при температуре 95 °C в течение 5 мин, циклическая денатурация при 95 °C в течение 20 с, отжиг праймеров и элонгация при 65 °C в течение 60 с. Для каждого образца реакцию проводили в трёх повторах.

Относительную продукцию генов рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [16]. В качестве эндогенного контроля был использован ген «домашнего хозяйства» *COMT*. Расчет проводился с помощью программного обеспечения прибора Real-Time CFX96 — Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, США).

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программных комплексов SPSS Statistics 17.0 и Graph Pad Prism 8.4.3. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Сравнение выборок данных проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни, поскольку распределение большинства значений не соответствовало закону нормального распределения. Корреляционный анализ с целью оценки влияния внутриутробной и постнатальной доз облучения ККМ на количественные показатели относительного содержания мРНК исследуемых генов проводили путём расчёта коэффициентов ранговой корреляции (R) по Спирмену. Для всех критериев и тестов различия признавали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как видно из рис. 1, *a*, *b*, в отдаленные сроки у лиц, облучённых *in utero* и в постнатальном периоде, не было отмечено изменений в экспрессии генов *TP53* и *ATM*.

При сравнении транскрипционной активности генов в обследуемых группах были зафиксированы достоверные

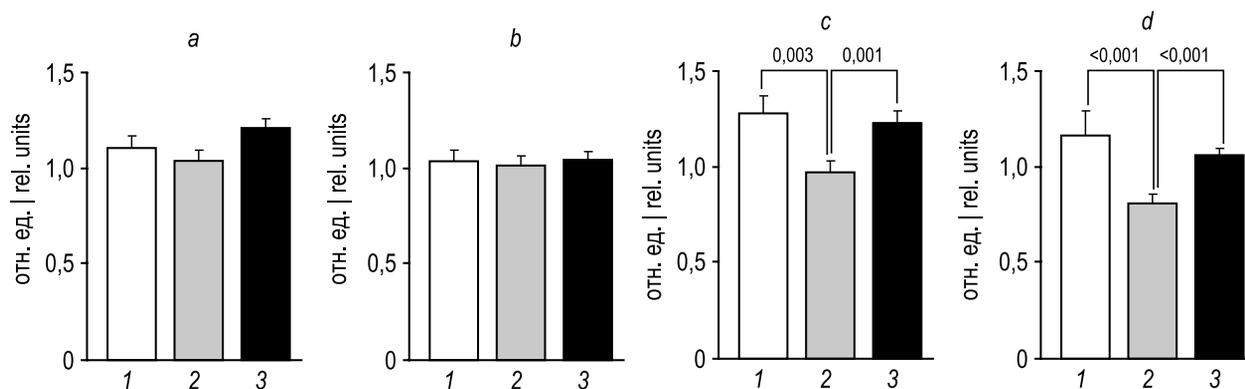


Рис. 1. Относительное содержание мРНК генов в отдалённые сроки у лиц, подвергшихся хроническому радиационному облучению в разные периоды онтогенеза; между группами представлено p -значение для U -критерия Манни–Уитни: a — *TP53*; b — *ATM*; c — *MDM2*; d — *CDKN1A*.

1 — группа сравнения; 2 — облучённые *in utero* и в постнатальном периоде; 3 — облучённые только в постнатальном периоде.

Fig. 1. Relative mRNA level in individuals chronically exposed to radiation in different periods of ontogenesis; P-values were calculated using Mann–Whitney U-test: a — *TP53*; b — *ATM*; c — *MDM2*; d — *CDKN1A*.

1 — control group; 2 — *in utero* and postnatal exposed; 3 — only postnatal exposed.

изменения со стороны экспрессии генов *MDM2* и *CDKN1A*. Показано, что у облучённых внутриутробно людей в отдалённые сроки снижено относительное содержание мРНК гена *MDM2* (рис. 1, c). Статистически значимые различия были получены при сопоставлении как с группой сравнения ($p=0,003$), так и с группой лиц, облучённых только в постнатальный период.

Аналогичная картина прослеживается при анализе экспрессии гена *CDKN1A* (рис. 1, d). При оценке различий

между исследуемыми группами отмечается статистически значимое снижение экспрессии этого гена у лиц, подвергшихся хроническому облучению *in utero*. Уровни статистической значимости как с группой сравнения, так и с группой лиц, хроническое облучение у которых началось после рождения, составляли $<0,001$ в каждом из случаев.

Поскольку люди внутри обследуемых групп были распределены неравномерно относительно этнического

Таблица 3. Сравнение экспрессии мРНК генов в группах обследованных лиц у славян и тюрков, Me(Q1–Q3)

Table 3. Comparison of mRNA gene expression in groups of examined individuals among the participants of Slavic and Turkic ethnicity, Me(Q1–Q3)

Группы исследования Study groups	Этническая принадлежность Ethnicity	<i>TP53</i>	<i>MDM2</i>	<i>ATM</i>	<i>CDKN1A</i>
		Me (Q1–Q3)			
Группа сравнения Control group	Славяне Slavic $n=22$	1,07 (0,83–1,28)	1,37 (0,88–1,72)	1,00 (0,78–1,17)	1,08 (0,98–1,27)
	Тюрки Turkic $n=14$	1,29 (0,83–1,57)	1,21 (0,99–1,44)	0,99 (0,78–1,29)	1,00 (0,74–1,31)
Облучённые <i>in utero</i> и постнатально In utero and postnatal exposure	Славяне Slavic $n=25$	1,19 (0,98–1,30)	0,89* (0,83–1,25)	0,93 (0,84–1,18)	0,81* (0,72–1,13)
	Тюрки Turkic $n=29$	1,03 (0,75–1,16)	0,88** (0,62–1,15)	1,00 (0,92–1,13)	0,82** (0,60–1,00)
Облучённые только постнатально Postnatal exposure	Славяне Slavic $n=49$	1,19 (0,86–1,43)	1,20 (0,87–1,46)	1,00 (0,90–1,24)	1,15 (1,00–1,30)
	Тюрки Turkic $n=31$	1,13 (0,72–1,44)	1,21 (0,89–1,58)	1,04 (0,90–1,17)	1,07 (0,82–1,24)

Примечание: * статистически значимое различие показателей между группами славян, облучённых *in utero* и постнатально, и славян, облучённых только в постнатальный период, а также славян из группы сравнения; ** статистически значимое различие показателей между группами тюрков, облучённых *in utero* и постнатально, и тюрков, облучённых только в постнатальный период, а также тюрков из группы сравнения.

Note: *Statistically significant difference with the group of the Slavs exposed only postnatally, and the Slavs from the control group; ** statistically significant difference with the group of the Turkic people exposed only postnatally and the Turkic people from the control group.

Таблица 4. Частота отклонений от референтных значений (95% ДИ) относительного содержания мРНК генов *MDM2*, *CDKN1A* в обследованных группах

Table 4. Frequency of deviations from the reference values (95% CI) of the relative mRNA content of *MDM2*, *CDKN1A* genes in the examined groups

Ген Gene	Частота отклонений от референтных значений, абс., (%) Frequency of deviations from reference values, abs., (%)						Референтные значения Reference values
	Группа сравнения Control group		Облучённые <i>in utero</i> и в постнатальный период <i>In utero and postnatal exposure</i>		Облучённые только в постнатальный период Postnatal exposure		
	<2,5%	>97,5%	<2,5%	>97,5%	<2,5%	>97,5%	
<i>MDM2</i>	1 (2,8)	1 (2,8)	4 (7,4)	0 (0)	3 (3,7)	1 (1,2)	0,45–2,55
<i>CDKN1A</i>	1 (2,8)	1 (2,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,32–2,56

Таблица 5. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (R) между относительным содержанием мРНК исследуемых генов и величинами накопленных постнатальных и внутриутробных доз облучения красного костного мозга

Table 5. Spearman's rank correlation coefficients (R) for the associations between the relative mRNA content of the studied genes and the accumulated postnatal and in utero doses to red bone marrow

Относительное содержания мРНК генов, отн. ед. Relative mRNA content of the genes, r.u.	Накопленная постнатальная доза облучения ККМ, мГр Cumulative postnatal dose to RBM, mGy	Накопленная доза облучения ККМ, полученная в период внутриутробного развития, мГр Cumulative in utero dose to RBM, mGy
<i>TP53</i>	–0,06 (0,46)	–0,16 (0,23)
<i>ATM</i>	0,03 (0,70)	–0,02 (0,86)
<i>MDM2</i>	–0,14 (0,06)	–0,07 (0,59)
<i>CDKN1A</i>	–0,11 (0,14)	0,08 (0,56)

Примечание: ККМ — красный костный мозг.

Note: RBM — red bone marrow.

состава (в группе облучённых *in utero* и постнатально преобладали лица тюркского происхождения, в то время как в группе сравнения и в группе лиц, облучённых только постнатально, численно превышали лица славянского происхождения), был проведён сравнительный анализ экспрессии генов в каждой группе среди славян и тюрков. Результаты анализа представлены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, независимо от этнической принадлежности в группе людей, облучённых *in utero* и в постнатальный период, наблюдается статистически значимое снижение транскрипционной активности генов *MDM2* и *CDKN1A*.

На следующем этапе работы было важно оценить долю хронически облучённых лиц *in utero*, имеющих выраженное снижение экспрессии мРНК генов *MDM2* и *CDKN1A*. Для этого в группе сравнения были получены референтные показатели относительного содержания мРНК вышеуказанных генов, входящих в пределы 95% ДИ. После чего был проведен сравнительный анализ частот исследуемых показателей, выходящих за границы 95% ДИ.

Результаты анализа представлены в табл. 4, где видно, что вариабельность индивидуальных значений относительного содержания мРНК генов *MDM2* и *CDKN1A* в анализируемых группах была сопоставима.

В табл. 5. представлены результаты корреляционного анализа, который демонстрирует отсутствие зависимости изменения экспрессии генов от величины накопленной дозы облучения ККМ, полученной людьми в периоды антенатального и постнатального развития.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение паттерна экспрессии генов, участвующих в важных клеточных событиях, в том числе в контроле клеточного цикла, в отдалённые сроки после облучения можно рассматривать как потенциальную причину накопления цитогенетических аномалий, а также развития ряда соматико-стохастических эффектов (прежде всего злокачественных новообразований) у людей, облучённых внутриутробно, что определяет актуальность исследования.

В рамках работы, посвящённой изучению транскрипционной активности генов клеточного цикла в отдалённые сроки у людей, подвергшихся хроническому радиационному воздействию на реке Тече в антенатальном и постнатальном периодах развития, нами было отмечено изменение экспрессии генов *MDM2* и *CDKN1A*.

У лиц, подвергшихся хроническому облучению в период внутриутробного развития, наблюдается

статистически значимый низкий уровень экспрессии мРНК гена *MDM2*.

Ген *MDM2* представляет собой онкоген, основная функция которого реализуется через взаимодействие с белком p53. Согласно экспериментальным данным, гиперэкспрессия *MDM2* представляет собой механизм блокирования активности p53, который широко распространён в опухолевых клетках [17]. Так, крайне высокие уровни *MDM2* могут снижать ответ на лучевую терапию путём снижения восприимчивости к p53-опосредованному апоптозу, что делает этот белок одним из маркеров агрессивного течения рака молочной железы, лёгких, желудка и пищевода [18].

Следует отметить, что в рамках настоящей работы обследование проходили относительно здоровые люди, не имеющие в анамнезе онкологических, хронических и воспалительных заболеваний, таким образом, можно предположить, что сниженная экспрессия *MDM2* в отдалённые сроки у обследуемых людей может носить протекторный эффект. Поскольку *MDM2* выступает в качестве негативного регулятора активности белка p53, то, вероятно, пониженная транскрипция гена *MDM2* может оказывать влияние на создание ауторегуляторной обратной связи, позволяющей поддерживать крайне низкую концентрацию p53 в отсутствие стресса. Однако более весомые доказательства этого механизма будут получены после исследования концентрации белка p53 в отдалённые сроки у хронически облучённых людей, что определяет перспективу дальнейших исследований.

Наравне с пониженными значениями экспрессии гена *MDM2* нами было зафиксировано снижение экспрессии гена *CDKN1A* в отдалённые сроки у внутриутробно облучённых людей.

Белок p21, кодируемый геном *CDKN1A*, играет важную роль в клеточном ответе на повреждение ДНК. В ответ на стрессовое воздействие данный белок начинает активно взаимодействовать с рядом транскрипционных факторов, в том числе с p53, опосредуя остановку клеточного цикла в фазе G1. Дополнительно p21 может связываться с ядерным антигеном пролиферирующих клеток и вспомогательным фактором ДНК-полимеразы, тем самым играть регулируемую роль в репликации ДНК в S-фазе и последующей репарации повреждений ДНК [19].

Недавние исследования показывают, что снижение экспрессии гена *CDKN1A* (p21) в клетке приводит к избыточной дублированности центриолей, опосредуя развитие аберрантного числа centrosом, что характерно для клеток со злокачественным фенотипом [20]. Кроме того, крайне низкий уровень p21 может служить источником длительных митозов и возникновения дефектов в продвижении по клеточному циклу [21]. Поскольку у жителей прибрежных сёл реки Течи спустя 60 лет после начала хронического облучения выявлено статистически значимое увеличение частоты лимфоцитов периферической крови (ЛПК) с блоком клеточного цикла по сравнению с показателями

необлучённых людей [22], вполне вероятно, что пониженная экспрессия гена *CDKN1A* может вносить определённый вклад в задержку клеточного цикла ЛПК в отдалённые сроки у облучённых *in utero* лиц.

Однозначно ответить на вопрос, почему в группе облучённых людей *in utero* и в постнатальный период происходит снижение экспрессии мРНК гена *CDKN1A* на сегодняшний день не представляется возможным. Прежде всего это связано с тем, что в условиях низкоинтенсивного хронического радиационного воздействия процессы повреждения и репарации молекулярных и клеточных структур протекают во времени параллельно, следовательно, механизмы изменения экспрессии генов имеют более сложную природу, чем при остром облучении. Вполне возможно, что негативная регуляция экспрессии гена *CDKN1A* происходит не напрямую. Так, показано, что некоторые транскрипционные факторы способны подавлять экспрессию определённых генов, в том числе генов циклин-зависимых киназ, в случае активации апоптотической программы гибели клеток [23]. Кроме того, на транскрипционную активность генов могут оказывать влияние эпигенетические модификации (метилирование промоторных регионов, экспрессия регуляторных микроРНК) [24] и генетические особенности – наличие полиморфизма в промоторных участках, регионах связывания с транскрипционными факторами, а также регуляторных участках (энхансерах и сайленсерах) [25]. Поскольку данные факторы в настоящей работе не учитывались, это можно отнести к ограничениям работы.

Однако полученные результаты в ходе частотного анализа позволили прийти к заключению, что снижение экспрессии генов *MDM2* и *CDKN1A* у внутриутробно облучённых людей обусловлено умеренным изменением транскрипционной активности генов у данной категории лиц, а не у отдельных индивидуумов. Отсутствие влияния дозы облучения на изменения в профиле экспрессии генов, свидетельствует о сложных причинно-следственных связях выявленных изменений у лиц, подвергшихся облучению в антенатальном и раннем постнатальном периодах развития, что требует дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование показало, что изменения в количественном содержании мРНК генов в условиях комбинированного внешнего γ - и внутреннего облучения (преимущественно ^{90}Sr) сохраняются длительное время. Наиболее выраженные изменения в экспрессии исследуемых генов отмечались у лиц, подвергшихся облучению в антенатальном и раннем постнатальном периодах развития, что может быть связано с эпигенетической регуляцией, однако этот вопрос требует проведения дополнительных исследований. К сожалению, механизм длительного сохранения изменения паттерна экспрессии генов у жителей прибрежных сёл реки Течи не изучен.

Поскольку в данной работе речь идёт о генах клеточного цикла, в частности *MDM2*, выступающего в качестве онкогена, и *CDKN1A*, снижение экспрессии которого говорит об утрате контроля клеточного цикла, что характерно для онкогенеза, можно предположить, что изменения в экспрессии гомеостатических генов могут приводить к нестабильности генома у жителей прибрежных сёл реки Течи и являться причиной повышения радиогенного риска развития отдалённых соматико-стохастических эффектов облучения у данной категории людей, прежде всего злокачественных новообразований.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). В.С. Никифоров — выполнение лабораторных методов исследования, обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, написание текста и подготовка окончательного варианта статьи; Е.А. Блинова — планирование исследования, обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, редакция текста статьи; А.В. Аклеев — курирование, планирование исследования, редакция текста статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального медико-биологического агентства России в ходе проведения прикладной научно-исследовательской работы «Модернизация высокотехнологичных методов, направленных на выявление медицинских последствий радиационных воздействий на персонал ПО «Маяк» и население Уральского региона» в рамках Федеральной целевой программы

«Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2020 годы и на период до 2030 года».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Этический комитет. Все участники исследования до включения в исследование добровольно подписали форму информированного согласия, утвержденную в составе протокола исследования этическим комитетом.

ADDITIONAL INFORMATION

Authors' contribution. All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors have made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication). V.S. Nikiforov — performing laboratory research methods, literature review, collection and analysis of literary sources, writing the text and preparing the final version of the article; E.A. Blinova — research planning, literature review, collection and analysis of literary sources, editorial text of the article; A.V. Akleyev — supervision, research planning, editing the text of the article.

Funding source. The study was carried out with the financial support of the Federal Medical and Biological Agency of Russia as a part of the research “Modernization of high-tech methods aimed at identifying the medical consequences of radiation effects on the personnel of the Mayak and the population of the Ural region” within the framework of the Federal Program “Ensuring nuclear and Radiation Safety in 2016–2020 and for the period up to 2030”.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval. Written informed consent was obtained from all the study participants before the study according to the study protocol approved by the local ethic committee.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Howell E.K., Gaschak S.P., Griffith K.D., Rodgers B.E. Radioadaptive response following in utero low-dose irradiation // *Radiation Research*. 2013. Vol. 179, N 1. P. 29–37. doi: 10.1667/RR3029.1
2. Doll R., Wakeford R. Risk of childhood cancer from fetal irradiation // *The British Journal of Radiology*. 1997. Vol. 70. P. 130–139. doi: 10.1259/bjr.70.830.9135438
3. Miller R.W. Effects of prenatal exposure to ionizing radiation // *Health physics*. 1990. Vol. 59, N 1. P. 57–61. doi: 10.1097/00004032-199007000-00006
4. Михайлова Г.Ф. Сравнительный анализ нестабильных и стабильных хромосомных aberrаций в группах лиц, облучившихся внутриутробно во время аварии на ЧАЭС в различные периоды пренатального развития // *Радиация и риск. Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра*. 2006. Т. 15, № 3–4. С. 157–163.
5. Ахмадуллина, Ю.Р., Возилова А.В., Аклеев А.В. Исследование повреждений ДНК лимфоцитов периферической крови методом микроядерного теста у жителей прибрежных сел реки Течи, подвергшихся хроническому облучению внутриутробно и постнатально // *Генетика*. 2020. Т. 56, № 4. С. 463–470. doi: 10.31857/S0016675820040025
6. Козинцева Е.А., Аклеев А.А., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Цитокиновый профиль людей, хронически облученных in utero и постнатально, в отдаленные сроки // *Российский иммунологический журнал*. 2021. Т. 24, № 2. С. 275–282. doi: 10.46235/1028-7221-1005-CPI
7. Bateson P., Barker D., Clutton-Brock T., et al. Developmental plasticity and human health // *Nature*. 2004. Vol. 430, N 6998. P. 419–421. doi: 10.1038/nature02725
8. Bakshi M.V., Azimzadeh O., Merl-Pham J., et al. In-Utero Low-Dose Irradiation Leads to Persistent Alterations in the Mouse Heart Proteome // *PLOS One*. 2016. Vol. 11, N 6. P. e0156952. doi: 10.1371/journal.pone.0156952
9. Virbasius J.V., Czech M.P. Map4k4 Signaling Nodes in Metabolic and Cardiovascular Diseases // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2016. Vol. 27, N 7. P. 484–492. doi: 10.1016/j.tem.2016.04.006
10. Gao X., Gao C., Liu G. Hu J. MAP4K4: an emerging therapeutic target in cancer // *Cell & Bioscience*. 2016. Vol. 6. P. 6. doi: 10.1186/s13578-016-0121-7
11. Bolaris S., Bozas E., Benekou A., et al. In utero radiation-induced apoptosis and p53 gene expression in the developing rat brain //

- International Journal of Radiation Biology. 2001. Vol. 77, N 1. P. 71–81. doi: 10.1080/095530001453131
12. Ferrer I., Olive M., Blanco R., et al. Selective c-Jun overexpression is associated with ionizing radiation-induced apoptosis in the developing cerebellum of the rat // Brain research. Molecular brain research. 1996. Vol. 38, N 1. P. 91–100. doi: 10.1016/0169-328x(95)00334-o
 13. Degteva M.O., Napier B.A., Tolstykh E.I., et al. Individual Dose Distribution in Cohort of People Exposed as a Result of Radioactive Contamination of the Techa River // Medical Radiology and Radiation Safety. 2019. Vol. 64, N 3. P. 46–53. doi:10.12737/article_5cf2364cb49523.98590475
 14. Shagina N.B., Fell T.P., Tolstykh E.I., et al. Strontium biokinetic model for the pregnant woman and fetus: application to Techa River studies // Journal of Radiological Protection. 2015, Vol. 35, N 3. P. 659–676. doi: 10.1088/0952-4746/35/3/659
 15. Maynard M.R., Shagina N.B., Tolstykh E.I., et al. Fetal organ dosimetry for the Techa River and Ozyorsk offspring cohorts, part 1: Urals-based series of fetal computational phantoms // Radiation and Environmental Biophysics. 2015. Vol. 54, N 1. P. 37–46. doi: 10.1007/s00411-014-0571-4
 16. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method // Methods. 2001, Vol. 25, N 4. P. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
 17. Zhao Y., Yu H., Hu W. The regulation of MDM2 oncogene and its impact on human cancers // Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 2014. Vol. 46, N 3. P. 180–189. doi: 10.1093/abbs/gmt147
 18. Zhang R., Wang H. MDM2 oncogene as a novel target for human cancer therapy // Current Pharmaceutical Design. 2000. Vol. 6, N 4. P. 393–416. doi: 10.2174/1381612003400911
 19. Cazzalini O., Scovassi A.I., Savio M., et al. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response // Mutation Research. 2010. Vol. 704, N 1–3. P. 12–20. doi: 10.1016/j.mrrev.2010.01.009
 20. Fisk H.A., Thomas J.L., Nguyen T.B. Breaking Bad: Uncoupling of Modularity in Centriole Biogenesis and the Generation of Excess Centrioles in Cancer // Results and Problems in Cell Differentiation. 2019. Vol. 67. P. 391–411. doi: 10.1007/978-3-030-23173-6_17
 21. Kreis N.N., Friemel A., Zimmer B., et al. Mitotic p21Cip1/CDKN1A is regulated by cyclin-dependent kinase 1 phosphorylation // Oncotarget. 2016. Vol. 7, N 31. P. 50215–50228. doi: 10.18632/oncotarget.10330
 22. Маркина Т.Н., Аклеев А.В., Веремева Г.А. Пролiferативная активность и клеточный цикл лимфоцитов периферической крови (ЛПК) человека в отдалённые сроки после хронического радиационного воздействия // Радиация и риск. Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра. 2011. Т. 20, № 1. С. 50–58.
 23. Besson A., Dowdy S.F., Roberts J.M. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond // Developmental Cell. 2008. Vol. 14, N 2. P. 159–169. doi: 10.1016/j.devcel.2008.01.013
 24. Spainhour J.C., Lim H.S., Yi S.V., Qiu P. Correlation Patterns Between DNA Methylation and Gene Expression in The Cancer Genome Atlas // Cancer Informatics. 2019. Vol. 18. P. 1176935119828776. doi: 10.1177/1176935119828776
 25. Игнатъева Е.В., Матросова Е.А. Геномная изменчивость в регуляторных районах генов, ассоциированная с заболеваниями человека: механизмы влияния на транскрипцию генов и полногеномные информационные ресурсы, обеспечивающие исследование этих механизмов // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. Т. 25, № 1. С. 18–29. doi:10.18699/VJ21.003

REFERENCES

1. Howell EK, Gaschak SP, Griffith KD, Rodgers BE. Radioadaptive response following in utero low-dose irradiation. *Radiation Research*. 2013;179(1):29–37. doi: 10.1667/RR3029.1
2. Doll R, Wakeford R. Risk of childhood cancer from fetal irradiation. *The British Journal of Radiology*. 1997;70:130–139. doi: 10.1259/bjr.70.830.9135438
3. Miller RW. Effects of prenatal exposure to ionizing radiation. *Health Physics*. 1990;59(1): 57–61. doi: 10.1097/00004032-199007000-00006
4. Mikhailova GF. The comparative analysis of unstable and stable chromosomal aberrations in persons exposed in utero in the course of different prenatal periods as a result of Chernobyl Accident. *Radiation & Risk. Bulletin of the National Radiation and Epidemiological Registry*. 2006;15(3–4):157–163.
5. Akhmadullina YuR, Vozilova AV, Akleyev AV. Study of The DNA Damage in Peripheral Blood Lymphocytes Using Micronucleus Test in Residents of The Techa Riverside Villages Who Were Chronically Exposed in Utero and Postnatally. *Russian Journal of Genetics*. 2020;56(4):481–487. doi: 10.1134/S102279542004002X
6. Kodintseva EA, Akleyev AA, Blinova EA, Akleyev AV. Cytokine Profile in The Subjects After Long-Term in Utero and Postnatal Exposure to Chronic Irradiation. *Russian Journal of Immunology / Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal*. 2021;24(2):275–282. doi: 10.46235/1028-7221-1005-CP1
7. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, et al. Developmental plasticity and human health. *Nature*. 2004;430(6998):419–421. doi: 10.1038/nature02725
8. Bakshi MV, Azimzadeh O, Merl-Pham J, et al. In-Utero Low-Dose Irradiation Leads to Persistent Alterations in the Mouse Heart Proteome. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156952. doi: 10.1371/journal.pone.0156952
9. Virbasius JV, Czech MP. Map4k4 Signaling Nodes in Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2016;27(7):484–492. doi: 10.1016/j.tem.2016.04.006
10. Gao X, Gao C, Liu G, Hu J. MAP4K4: an emerging therapeutic target in cancer. *Cell & Bioscience*. 2016;6:56. doi: 10.1186/s13578-016-0121-7
11. Bolaris S, Bozas E, Benekou A, et al. In utero radiation-induced apoptosis and p53 gene expression in the developing rat brain. *International Journal of Radiation Biology*. 2001;77(1):71–81. doi: 10.1080/095530001453131
12. Ferrer I, Olive M, Blanco R, et al. Selective c-Jun overexpression is associated with ionizing radiation-induced apoptosis in the

- developing cerebellum of the rat. *Brain research. Molecular brain research*. 1996;38(1):91–100.
doi: 10.1016/0169-328x(95)00334-0
13. Degteva MO, Napier BA, Tolstykh EI, et al. Individual Dose Distribution in Cohort of People Exposed as a Result of Radioactive Contamination of the Techa River. *Medical Radiology and Radiation Safety*. 2019;64(3):46–53.
doi: 10.12737/article_5cf2364cb49523.98590475
14. Shagina NB, Fell TP, Tolstykh EI, et al. Strontium biokinetic model for the pregnant woman and fetus: application to Techa River studies. *Journal of Radiological Protection*. 2015;35(3):659–676.
doi: 10.1088/0952-4746/35/3/659
15. Maynard MR, Shagina NB, Tolstykh EI, et al. Fetal organ dosimetry for the Techa River and Ozyorsk offspring cohorts, part 1: Urals-based series of fetal computational phantoms. *Radiation and Environmental Biophysics*. 2015;54(1):37–46.
doi: 10.1007/s00411-014-0571-4
16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402–408.
doi: 10.1006/meth.2001.1262
17. Zhao Y, Yu H, Hu W. The regulation of MDM2 oncogene and its impact on human cancers. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2014;46(3):180–189.
doi: 10.1093/abbs/gmt147
18. Zhang R, Wang H. MDM2 oncogene as a novel target for human cancer therapy. *Current Pharmaceutical Design*. 2000;6(4):393–416. doi: 10.2174/1381612003400911
19. Cazzalini O, Scovassi AI, Savio M, et al. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutation Reserch*. 2010;704(1–3):12–20.
doi: 10.1016/j.mrrev.2010.01.009
20. Fisk HA, Thomas JL, Nguyen TB. Breaking Bad: Uncoupling of Modularity in Centriole Biogenesis and the Generation of Excess Centrioles in Cancer. *Results and Problems in Cell Differentiation*. 2019;67:391–411. doi: 10.1007/978-3-030-23173-6_17
21. Kreis NN, Friemel A, Zimmer B, et al. Mitotic p21Cip1/CDKN1A is regulated by cyclin-dependent kinase 1 phosphorylation. *Oncotarget*. 2016;7(31):50215–50228.
doi: 10.18632/oncotarget.10330
22. Markina TN, Akleyev AV, Veremeyeva GA. Proliferative activity and cell cycle of peripheral blood lymphocytes (pbl) at late time after chronic radiation exposure in man. *Radiation & Risk. Bulletin of the National Radiation and Epidemiological Registry*. 2011;20(1):50–58.
23. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental Cell*. 2008;14(2):159–169.
doi: 10.1016/j.devcel.2008.01.013
24. Spainhour JC, Lim HS, Yi SV, Qiu P. Correlation Patterns Between DNA Methylation and Gene Expression in The Cancer Genome Atlas. *Cancer Informatics*. 2019;18:1176935119828776.
doi: 10.1177/1176935119828776
25. Ignatieva EV, Matrosova EA. Disease-associated genetic variants in the regulatory regions of human genes: mechanisms of action on transcription and genomic resources for dissecting these mechanisms. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(1):18–29. doi:10.18699/VJ21.003

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

* **Никифоров Владислав Сергеевич**, канд. биол. наук, научный сотрудник, доцент;
адрес: Российская Федерация, 454141, Челябинск, ул. Воровского, д. 68, корп. А;
ORCID: 0000-0002-6685-1823;
eLibrary SPIN: 1073-1507;
e-mail: nikiforovx@mail.ru

Блинова Евгения Андреевна, канд. биол. наук, доцент
ORCID: 0000-0002-2567-7945;
eLibrary SPIN: 8964-2316;
e-mail: blinova@urcrm.ru

Аклеев Александр Васильевич, д-р мед. наук, профессор;
ORCID: 0000-0003-2583-5808;
eLibrary SPIN: 3419-6671;
e-mail: akleyev@urcrm.ru

AUTHORS' INFO

Vladislav S. Nikiforov, Cand. Sci. (Biol.) research associate, associate professor;
address: 68A, Vorovsky street, 454141, Chelyabinsk, Russian Federation;
ORCID: 0000-0002-6685-1823;
eLibrary SPIN: 1073-1507;
e-mail: nikiforovx@mail.ru

Evgeniya A. Blinova, Cand. Sci. (Biol.), associate professor;
ORCID: 0000-0002-2567-7945;
eLibrary SPIN: 8964-2316;
e-mail: blinova@urcrm.ru

Alexander V. Akleyev, MD, Dr. Sci. (Med.), professor;
ORCID: 0000-0003-2583-5808;
eLibrary SPIN: 3419-6671;
e-mail: akleyev@urcrm.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author