

Влияние метилирования и транскрипционной активности генов редокс-системы на клеточную гибель лимфоцитов крови у хронически облучённых лиц

Киселев О.С.^{1,2}, Блинова Е.А.^{1,2}, Аклеев А.В.^{1,2}

¹ Южно-Уральский федеральный научно-клинический центр медицинской биофизики
Федерального медико-биологического агентства, Озёрск, Россия

² Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

*Хроническое радиационное воздействие может вызывать стойкие эпигенетические изменения, влияющие на механизмы клеточной гибели и развитие отдалённых биологических эффектов. Роль метилирования генов редокс-системы в регуляции апоптоза и некроза лимфоцитов у хронически облучённых лиц остаётся недостаточно изученной. Цель исследования — оценить связь метилирования промоторных регионов и транскрипционной активности генов редокс-системы с интенсивностью апоптоза и некроза лимфоцитов периферической крови у хронически облучённых лиц. Материалы и методы: В исследование включён 171 человек: 99 лиц, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию, и 72 человека группы сравнения, проживавших в сходных социально-бытовых условиях. Апоптоз и некроз лимфоцитов периферической крови оценивали методом проточной цитометрии. Молекулярный анализ включал оценку метилирования CpG-динуклеотидов в промоторных регионах генов редокс-системы и определение их транскрипционной активности. Результаты исследования и обсуждение: У облучённых лиц выявлено статистически значимое повышение уровня некроза лимфоцитов по сравнению с группой сравнения ($p=0,033$). Некроз положительно коррелировал с дозами облучения красного костного мозга ($p=0,24$; $p=0,001$), тимуса и периферических лимфоидных органов ($p=0,19$; $p=0,013$). При анализе апоптоза были выявлены статистически значимые положительные корреляционные связи с уровнем метилирования генов *SOD2* ($p=0,18$; $p=0,017$), *GPX1* ($p=0,26$; $p=0,001$), *GSTP1* ($p=0,22$; $p=0,004$), *MPO* ($p=0,41$; $p<0,0001$) и *CAT* ($p=0,21$; $p=0,006$). По данным множественного регрессионного анализа, апоптоз ассоциирован с метилированием *GSTP1* и *MPO*. Заключение: Таким образом, у хронически облучённых лиц в отдалённые сроки после воздействия некротическая гибель лимфоцитов ассоциирована преимущественно с дозой облучения, тогда как апоптоз связан с гиперметилированием промоторных регионов генов редокс-системы.*

Ключевые слова: хроническое радиационное воздействие; лимфоциты периферической крови, апоптоз, некроз, редокс-система, метилирование ДНК, транскрипционная активность, гены антиоксидантной системы.

Введение

Ионизирующее излучение (ИИ) является фактором, способным вызывать не только прямые повреждения ДНК, но и долговременные изменения клеточной регуляции, затрагивающие процессы репарации, апоптоза, некроза, окислительно-восстановительного гомеостаза и эпигенетического контроля экспрессии генов [1–4]. Особое значение имеет изучение отдалённых эффектов хронического низкоинтенсивного радиационного воздействия, поскольку клеточный ответ в этих условиях формируется не как результат одномоментного повреждения, а как следствие длительной перестройки регуляторных систем организма. Такая проблема актуальна для жителей прибрежных сёл реки Течи, подвергшихся хроническому радиационному воздействию вследствие сбросов жидких радиоактивных отходов в 1949–1956 гг. [5–7].

Ранее у хронически облучённых жителей прибрежных сёл реки Течи уже были проведены исследования показателей апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови. Было показано, что в отдалённые сроки после начала

облучения у облучённых лиц регистрировались изменения отдельных показателей апоптоза и иммунного ответа, включая повышение содержания сывороточного ФНО α [10]. В последующих работах установлено, что повышенная интенсивность апоптоза лимфоцитов не приводила к развитию выраженного вторичного иммунодефицита, однако сопровождалась изменениями отдельных показателей врождённого иммунитета [11]. Кроме того, была показана связь частоты апоптотической гибели лимфоцитов с полиморфными вариантами генов регуляции апоптоза, в частности *BAX*, что указывает на возможный вклад генетических факторов в индивидуальную радиочувствительность [12].

На молекулярном уровне у хронически облучённых лиц с различной интенсивностью раннего апоптоза, позднего апоптоза и некроза изучалась транскрипционная активность генов репарации, клеточного цикла и апоптоза. Было выявлено, что повышенная интенсивность раннего апоптоза ассоциирована с увеличением относительного содержания мРНК *PAD14*, позднего апоптоза — с изменением транскрипционной активности *TP53* и *BCL-2*, а некроза — с повышением транскрипционной активности *TP53* [13]. Эти данные

Киселев Олег Сергеевич

Южно-Уральский федеральный научно-клинический центр медицинской биофизики

Адрес для переписки: 456783, Россия, Челябинская область, Озёрск, Озерское шоссе, д. 19; E-mail:

kiselevoleg230@gmail.com

свидетельствуют о том, что различные варианты клеточной гибели у хронически облучённых лиц могут сопровождаться специфическими изменениями экспрессии генов, участвующих в поддержании клеточного гомеостаза.

Важным механизмом регуляции экспрессии генов является метилирование ДНК. Метилирование CpG-динуклеотидов промоторных регионов может изменять транскрипционную активность генов и тем самым влиять на реализацию клеточных процессов, включая апоптоз [14–16]. У лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, ранее были выявлены изменения метилирования промоторных регионов генов апоптоза *BCL2*, *ATM*, *TP53* и *MDM2*, а также показана связь метилирования отдельных генов с интенсивностью клеточной гибели лимфоцитов [14, 17]. Таким образом, накопленные данные свидетельствуют о значении генетических, транскрипционных и эпигенетических механизмов в регуляции апоптоза и некроза у хронически облучённых лиц.

Вместе с тем большинство ранее выполненных исследований было сосредоточено на генах апоптоза, репарации ДНК и клеточного цикла. Менее изученным остаётся вклад генов редокс-системы, однако окислительно-восстановительный статус клетки является одним из центральных звеньев радиационного ответа. ИИ сопровождается образованием активных форм кислорода, которые могут повреждать ДНК, белки и липиды, а также участвовать в регуляции апоптоза, некроза, воспаления и адаптационных реакциях [18–20]. В этих условиях состояние антиоксидантной и прооксидантной систем может определять направление клеточного ответа – сохранение жизнеспособности, запуск апоптоза или переход к гибели по некротическому пути.

Гены *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPX1*, *GSTP1*, *CYBA*, *MPO* и другие участвуют в образовании, нейтрализации и метаболизме активных форм кислорода. Изменение метилирования их промоторных регионов и транскрипционной активности может быть одним из механизмов, связывающих хроническое радиационное воздействие, окислительный стресс и клеточную гибель. Ранее было показано, что у хронически облучённых лиц уровень метилирования промоторного региона *GPX1* статистически значимо отличается от группы сравнения и связан с дозой облучения красного костного мозга [21]. Однако остаётся неясным, связаны ли метилирование и транскрипционная активность генов редокс-системы с интенсивностью апоптоза и некроза лимфоцитов.

Таким образом, актуальным является изучение роли генов редокс-системы в регуляции клеточной гибели у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию.

Цель исследования – оценка связи метилирования промоторных регионов и транскрипционной активности генов редокс-системы с интенсивностью апоптоза и некроза лимфоцитов периферической крови у хронически облучённых лиц в отдалённые сроки после начала воздействия.

Материалы и методы

Описание группы обследованных лиц

В исследование включён 171 человек, относящийся к Уральской когорте аварийно-облучённого населения и группе сравнения. Исследование проводилось в отдалённые сроки после начала хронического радиационного воздействия – спустя более 60 лет. В качестве биологического материала использовали лимфоциты периферической крови.

Основную группу составили 99 человек, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию (медианное значение накопленной дозы красного костного мозга (ККМ) – 568,5 (73,5–3715,5) мГр). Группа сравнения включала 72 человека, проживавших в сходных социально-бытовых условиях с накопленной дозой облучения ККМ менее 70 мГр. Характеристика облучённых лиц и группы сравнения представлена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика обследованных лиц
[Table 1. Characteristics of the studied groups]

Характеристика группы [Characteristics of the group]	Группа сравнения [Comparison group] (N=72)	Облучённые лица [Exposed individuals] (N=99)
Возраст на момент обследования, лет [Age at the time of examination, years] ¹	66,3 ± 0,8 (56–87)	72,3 ± 0,6 (62–94)
Пол, количество (%) [Sex, persons (%)]		
Мужчины [Men]	27 (37,5 %)	35 (35,4 %)
Женщины [Women]	45 (62,5 %)	64 (64,6 %)
Этническая принадлежность, количество (%) [Ethnicity, persons (%)]		
Славяне [Slavs]	37 (51,4 %)	45 (45,5 %)
Тюрки [Turkic peoples]	35 (48,6 %)	54 (54,5 %)
Поглощённая доза облучения [Absorbed dose]		
Поглощённая доза облучения красного костного мозга (ККМ), мГр [Absorbed dose to red bone marrow (RBM), mGy] ²	11,3 (0–56,1)	568,5 (73,5–3715,5)
Поглощённая доза тимуса и периферических лимфоидных органов, мГр [Absorbed dose of thymus and peripheral lymphoid organs, mGy] ²	3,4 (0–39,4)	59,2 (2,0–488,8)

¹ Среднее значение ± ошибка среднего (мин.–макс.) [Mean ± standard error (min–max)].

² Медиана (минимум–максимум) [Median (min–max)].

Индивидуальные дозы облучения были реконструированы с использованием дозиметрической системы TRDS-2016 [22]. Для каждого обследованного учитывали накопленную дозу облучения ККМ, а также дозу облучения тимуса и периферических органов иммунной системы.

При формировании выборки учитывали возраст, пол и этническую принадлежность обследованных лиц, поскольку эти факторы могут влиять на интенсивность клеточной гибели лимфоцитов и должны рассматриваться как потенциальные модифицирующие переменные при статистическом анализе.

Таким образом, исследуемая выборка представляет собой группу лиц пожилого возраста, обследованных в отдалённый период после хронического радиационного воздействия, с документированными индивидуальными дозами облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов.

Методы исследования

Для оценки апоптотической и некротической гибели лимфоцитов периферической крови венозную кровь забирали из локтевой вены в объёме 6 мл в вакуумные пробирки типа Vacuette с Li-гепарином (Improvacuter, Китай). Лейкоцитарную фракцию выделяли из цельной крови методом центрифугирования в градиенте плотности фиколл-урографина 1,077–1,078 г/см³ по стандартной методике.

Апоптотическую и некротическую гибель лимфоцитов периферической крови оценивали методом проточной цитометрии с применением окрашивания Annexin V-FITC/PI, как описано ранее [13, 14]. Результаты представляли в виде процента соответствующей клеточной популяции от общего числа проанализированных лимфоцитов.

Уровень метилирования промоторных регионов генов редокс-системы оценивали в образцах геномной ДНК, выделенной из периферической крови. После бисульфитной модификации ДНК проводили метилспецифичную ПЦР с последующим анализом кривых плавления высокого разрешения (MS-PCR-HRM), по ранее описанной методике [21]. Количественную оценку метилирования выполняли с использованием калибровочных стандартов с известным соотношением метилированной и неметилированной ДНК; процент метилирования рассчитывали по калибровочным кривым.

Транскрипционную активность генов редокс-системы определяли методом количественной ПЦР в реальном времени после выделения суммарной РНК из периферической крови и синтеза кДНК. Относительное содержание мРНК исследуемых генов рассчитывали с использованием сравнительного Ct-подхода по методу Ливака. Каждый образец анализировали в трёх технических повторях; результаты представляли в виде относительного уровня транскрипционной активности.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводили с использованием пакета Statistica. Проверка на нормальность распределения осуществлялась с помощью критерия Шапиро–Уилка. При отклонении от нормального распределения количественные данные представляли в виде медианы и межквартильного размаха – Me (Q1–Q3). Возраст обследованных лиц описывали как $M \pm SE$ (min–max), дозовые показатели – как Me (min–max).

Для сравнения двух независимых групп применяли U-критерий Манна–Уитни. Корреляционные взаимосвязи оценивали с помощью рангового коэффициента Спирмена.

Вклад дозиметрических, клинко-демографических и молекулярных факторов (возраст, пол, этническая принадлежность, накопленная доза облучения ККМ, дозы на тимус и периферические лимфоидные органы, уровень метилирования и транскрипционной активности генов редокс-системы) в вариabельность показателей некроза, раннего и позднего апоптоза определяли методом множественного регрессионного анализа.

Критический уровень статистической значимости принимали равным $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Оценка клеточной гибели лимфоцитов периферической крови у обследованных лиц

Согласно результатам исследования, представленным в таблице 2, у облучённых людей медианный уровень некроза оказался выше, чем у лиц группы сравнения ($p=0,033$), в то время как по показателям апоптоза различий не обнаружено.

Таблица 2. Оценка клеточной гибели лимфоцитов периферической крови у обследованных лиц

[Table 2. Assessment of peripheral blood lymphocyte death in the studied groups]

Показатель [Parameter]	Группа сравнения [Comparison group], N=72	Облучённые лица [Exposed individuals], N=99	Значение p [p-value]
Некроз, % [Necrosis, %]	0,02 (0,01–0,05) ¹	0,03 (0,01–0,09) ¹	0,033
Апоптоз, % [Apoptosis, %]	3,72 (1,12–7,85) ¹	3,52 (0,75–9,46) ¹	0,95

¹Me (Q1–Q3) – медиана и межквартильный размах [Me (Q1–Q3) — median and interquartile range]

Для оценки связи фенотипов клеточной гибели с дозовыми и демографическими факторами использовался ранговый коэффициент Спирмена. В таблице 3 приведены коэффициенты корреляции (ρ) и уровни значимости (p). Анализ показал, что некротическая гибель лимфоцитов положительно ассоциирована с накопленной дозой облучения ККМ ($p=0,24$; $p=0,001$) и дозой облучения тимуса и периферических лимфоидных органов ($p=0,19$; $p=0,013$). Для апоптоза достоверных связей с дозовыми характеристиками выявлено не было. Пол показал слабую отрицательные корреляции с апоптозом ($\rho=-0,15$; $p=0,048$), что отражает большую выраженность апоптоза у женщин.

Таблица 3. Корреляции фенотипов клеточной гибели с дозовыми и демографическими факторами

[Table 3. Correlations of cell death phenotypes with dose and demographic factors]

Показатель [Parameter]	Доза ККМ [Dose to red bone marrow]	Доза тимуса и периферических лимфоидных органов [Dose of thymus and peripheral lymphoid organs]	Возраст [Age]	Пол [Sex]	Этнос [Ethnicity]
Некроз, % [Necrosis, %]	$\rho = 0,24$; $p = 0,001$	$\rho = 0,19$; $p = 0,013$	$\rho = 0,19$; $p = 0,013$	$\rho = 0,02$; $p = 0,84$	$\rho = 0,02$; $p = 0,8$
Апоптоз, % [Apoptosis, %]	$\rho = -0,02$; $p = 0,77$	$\rho = -0,06$; $p = 0,57$	$\rho = -0,14$; $p = 0,067$	$\rho = -0,15$; $p = 0,048$	$\rho = -0,03$; $p = 0,68$

ρ – коэффициент ранговой корреляции Спирмена [Spearman's rank correlation coefficient]

Для оценки возможных корреляций клеточной гибели лимфоцитов с молекулярными характеристиками редокс-системы в анализ были включены ранее полученные нами данные об уровне метилирования промоторных регионов генов *SOD2*, *GPX1*, *GSTP1*, *MPO*, *CAT*, *CYBA*, а также данные о транскрипционной активности генов *CYBA*, *SOD2*, *CAT*, *GPX1*, *GSTP1* [19, 20]. Некроз демонстрировал лишь тенденцию к отрицательной ассоциации с метилированием *GPX1* ($p = -0,15$; $p = 0,057$) и *GSTP1* ($p = -0,14$; $p = 0,071$), однако статистически значимых связей с показателями метилирования и транскрипционной активности генов редокс-системы выявлено не было. При анализе апоптоза были выявлены статистически значимые положительные корреляционные связи с уровнем метилирования генов *SOD2* ($p = 0,18$; $p = 0,017$), *GPX1* ($p = 0,26$; $p = 0,001$), *GSTP1* ($p = 0,22$; $p = 0,004$), *MPO* ($p = 0,41$; $p < 0,0001$) и *CAT* ($p = 0,21$; $p = 0,006$). Наиболее выраженная ассоциация наблюдалась для метилирования *MPO*. Транскрипционная активность генов редокс-системы оказалась связана лишь с апоптозом: уровень апоптоза отрицательно коррелировали с экспрессией *GPX1* ($p = -0,20$; $p = 0,009$), что может отражать компенсаторное снижение активности антиоксидантной системы при усилении апоптоза.

Многофакторный регрессионный анализ влияния радиационных и нерадиационных факторов на клеточную гибель

Для уточнения вклада дозовых, клинко-демографических и молекулярных факторов в формирование фенотипа клеточной гибели лимфоцитов был проведён множественный линейный регрессионный анализ. В качестве зависимых переменных последовательно рассматривали показатели некроза и апоптоза лимфоцитов периферической крови. В качестве независимых переменных в модели включали возраст, пол, этническую принадлежность, поглощённые дозы облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов, а также ранее полученные нами показатели метилирования и транскрипционной активности генов редокс-системы [19, 20]. Перед построением моделей независимые переменные стандартизовали с использованием z-преобразования.

В таблице 4 представлены только статистически значимые предикторы, сохранявшие самостоятельную ассоциацию с показателями клеточной гибели при одновременном учёте остальных факторов.

Таблица 4. Многофакторный регрессионный анализ факторов, ассоциированных с фенотипами клеточной гибели лимфоцитов периферической крови¹

[Table 4. Multivariable regression analysis of factors associated with peripheral blood lymphocyte death phenotypes]¹

Зависимая переменная [Dependent variable]	Параметры модели [Model parameters]	Значимые предикторы [Significant predictors]	β	p
Некроз [Necrosis]	$R^2 = 0,075$; $F = 0,76$; $p = 0,72$	Не выявлены [Not detected]	–	–
Ранний апоптоз [Early apoptosis]	$R^2 = 0,252$; $F = 3,18$; $p = 0,001$	Метилирование <i>GSTP1</i> [methylation <i>GSTP1</i>]	0,857	0,04
		Метилирование <i>MPO</i> [methylation <i>MPO</i>]	1,770	0,001

¹ β – стандартизованный коэффициент регрессии, R^2 – коэффициент детерминации, F-статистика критерия Фишера [β – standardized regression coefficient, R^2 – coefficient of determination, Fisher's F-statistic]

По результатам многофакторного анализа для некроза не было выявлено независимых статистически значимых предикторов. Несмотря на наличие положительных корреляций некроза с дозами облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов, после одновременного учёта клинко-демографических и молекулярных факторов эти связи не сохраняли самостоятельной статистической значимости. Это позволяет предположить, что некротическая гибель лимфоцитов в отдалённый период хронического облучения имеет многофакторную природу и не определяется изолированным влиянием одного из включённых в модель показателей.

Наиболее информативной оказалась модель апоптоза, объяснявшая около 25 % вариабельности данного показателя. Независимыми предикторами апоптоза были уровни метилирования CpG динуклеотидов в промоторных областях генов *GSTP1* и *MPO*. Положительные коэффициенты регрессии свидетельствуют о том, что повышение метилирования этих генов ассоциировано с увеличением доли апоптотических лимфоцитов. Эти данные согласуются с результатами корреляционного анализа и указывают на возможную роль эпигенетической регуляции генов редокс-системы в формировании апоптотического фенотипа клеточной гибели.

Гиперметилирование *GSTP1* приводит к снижению экс-

прессии глутатион-S-трансферазы P1 – ключевого фермента антиоксидантной защиты, который инактивирует продукты перекисного окисления липидов и ксенобиотики. Уменьшение активности *GSTP1* может способствовать накоплению окислительного стресса и повышению чувствительности клеток к апоптозу.

Аналогично, хотя *MPO* традиционно считается прооксидантным ферментом, в лимфоцитах она выполняет защитную функцию. Согласно Cosic-Mujkanovic *et al.* (2023), *MPO* способна ингибировать апоптоз, активируя пути выживания (фосфорилирование AKT и ERK). Okada *et al.* (2016) показали, что в человеческих В- и Т-лимфоцитах *MPO* локализуется преимущественно в ядре и перинуклеарной области, что предполагает её участие в альтернативных, антиапоптотических механизмах. Таким образом, гиперметилирование *MPO* вероятно приводит к утрате этой протективной активности и усиливает апоптоз лимфоцитов [23, 24].

Заключение

В отдалённый период после хронического низкоинтенсивного радиационного воздействия у облучённых лиц выявлено статистически значимое повышение уровня некроза лимфоцитов периферической крови по сравнению с груп-

пой сравнения. Кроме того, некроз положительно коррелировал с накопленной дозой облучения ККМ и дозой облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, что позволяет рассматривать его как один из отдалённых клеточных эффектов хронического облучения.

Хотя не отмечено зависимостей апоптоза от дозы облучения ККМ, а также тимуса и периферических лимфоидных органов, апоптотическая гибель лимфоцитов ассоциировалась с эпигенетическими параметрами генов редокс-системы: с уровнем метилированием CpG динуклеотидов в промоторной области генов *GSTP1* и *MPO*.

Полученные данные свидетельствуют, что некротическая гибель лимфоцитов даже в отдалённые сроки после хронического облучения отражает долговременное нарушение клеточного гомеостаза, тогда как апоптотический ответ в большей степени связан с эпигенетической регуляцией генов редокс-системы.

Сведения о личном вкладе авторов в работу над статьей

Киселев О.С. – разработка дизайна исследования. Сбор, анализ и интерпретация полученных результатов, написание текста статьи.

Блинова Е.А. – разработка дизайна исследования; интерпретация полученных результатов; редактирование текста статьи.

Аклеев А.В. – научное руководство, редактирование текста статьи, интерпретация полученных данных, окончательное утверждение публикуемой версии рукописи.

Благодарности

Авторы выражают благодарность рецензентам за проделанную работу.

Информация о конфликте интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Сведения об источнике финансирования

Финансирование работы осуществлялось в рамках федеральной целевой программы «Обеспечение ядерной и радиационной безопасности на 2016–2020 годы и на период до 2030 года».

Литература

1. Ilnytsky Y., Kovalchuk O. Non-targeted radiation effects — an epigenetic connection // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2011. Vol. 714, No 1–2. P. 113–125. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.06.014.
2. Antwi D.A., Gabbara K.M., Lancaster W.D. et al. Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways // *Epigenetics*. 2013. Vol. 8, No 8. P. 839–848. DOI: 10.4161/epi.25498.
3. Kovalchuk O. Epigenetic changes and nontargeted radiation effects // *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2008. Vol. 49, No 1. P. 16–25. DOI: 10.1002/em.20358.
4. Belli M., Tabocchini M.A. Ionizing radiation-induced epigenetic modifications and their relevance to radiation protection // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, No 17. Article 5993. DOI: 10.3390/ijms21175993.
5. Последствия радиоактивного загрязнения реки Течи / под ред. А.В. Аклеева. Челябинск: Книга, 2016.
6. Аклеев А.В. Механизмы эффектов хронического радиационного воздействия. Патогенез хронического лучевого синдрома // *Хронический лучевой синдром у жителей прибрежных сёл реки Теча*. Челябинск: Книга, 2012. С. 79–163.
7. Akleyev A.V., Krestinina L.Y., Degteva M.O., Tolstykh E.I. Consequences of the radiation accident at the Mayak Production Association in 1949–1956 // *Journal of*

- Radiological Protection*. 2017. Vol. 37, No 3. P. R19–R42.
8. Verheij M., Bartelink H. Radiation-induced apoptosis // *Cell and Tissue Research*. 2000. Vol. 301. P. 133–142. DOI: 10.1007/s004410000188.
9. Harms-Ringdahl M., Nicotera P., Radford I.R. Radiation induced apoptosis // *Mutation Research*. 1996. Vol. 366, No 2. P. 171–179. DOI: 10.1016/S0165-1110(96)90038-X.
10. Блинова Е.А., Аклеев А.А. Анализ показателей апоптотической гибели лимфоцитов у хронически облучённых лиц // *Российский иммунологический журнал*. 2017. Т. 11 (20), № 2. С. 107–109.
11. Аклеев А.А., Блинова Е.А., Долгушин И.И. Влияет ли апоптоз лимфоцитов в отдалённые сроки после хронического радиационного воздействия на иммунный статус человека? // *Российский иммунологический журнал*. 2018. Т. 12 (21), № 3. С. 205–210. DOI: 10.31857/S102872210002382-5.
12. 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. Т. 65, № 4. С. 36–42. DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-4-36-42.
13. Никифоров В.С., Блинова Е.А., Котикова А.И., Аклеев А.В. Транскрипционная активность генов репарации, апоптоза и клеточного цикла (TP53, MDM2, ATM, BAX, BCL-2, CDKN1A, OGG1, XPC, PADI4, MAPK8, NF-KB1, STAT3, GATA3) у хронически облучённых людей с различной интенсивностью апоптоза лимфоцитов периферической крови // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022. Т. 26, № 1. С. 50–58. DOI: 10.18699/VJGB-22-08.
14. Блинова Е.А., Никифоров В.С., Котикова А.И. и др. Статус метилирования генов апоптоза и интенсивность апоптотической гибели лимфоцитов периферической крови у лиц, подвергавшихся хроническому радиационному облучению // *Молекулярная биология*. 2022. Т. 56, № 6. С. 1072–1082. DOI: 10.31857/S0026898422050032.
15. Greenberg M.V.C., Bourc'his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019. Vol. 20, No 10. P. 590–607. DOI: 10.1038/s41580-019-0159-6.
16. Edwards J.R., Yarychivska O., Boulard M., Bestor T.H. DNA methylation and DNA methyltransferases // *Epigenetics & Chromatin*. 2017. Vol. 10. Article 23. DOI: 10.1186/s13072-017-0130-8.
17. Блинова Е.А., Котикова А.И., Аклеев А.В. Влияние метилирования промоторов генов регуляции апоптоза на интенсивность клеточной гибели лимфоцитов у облучённых людей // *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2024. Т. 79, № 4. С. 346–352. DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-12.
18. Spitz D.R., Azzam E.I., Li J.J., Gius D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology // *Cancer and Metastasis Reviews*. 2004. Vol. 23, No 3–4. P. 311–322.
19. Azzam E.I., Jay-Gerin J.P., Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury // *Cancer Letters*. 2012. Vol. 327, No 1–2. P. 48–60.
20. Cyr A.R., Hitchler M.J., Domann F.E. Regulation of SOD2 in cancer by histone modifications and CpG methylation: closing the loop between redox biology and epigenetics // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013. Vol. 18, № 15. P. 1946–1955. DOI: 10.1089/ars.2012.4850.
21. Киселев О.С., Кореченкова А.В., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Уровень метилирования промоторов генов антиоксидантной и прооксидантной систем у хронически облучённых лиц // *Радиационная биология. Радиозекология*. 2026. Т. 66, № 1. С. 18–28. DOI: 10.7868/S3034590126010022.
22. Дегтева М.О., Напье Б.А., Толстых Е.И. и др. Распределение индивидуальных доз в когорте людей, облучённых в результате радиоактивного загрязнения реки Течи // *Медицинская радиология и радиационная безопасность*. 2019. Т. 64, № 3. С. 46–53. DOI: 10.12737/article_5cf2364cb49523.98590475.
23. Cosic-Mujanovic N., Valadez-Cosmes P., Maitz K. et al. Myeloperoxidase alters lung cancer cell function to benefit

their survival // Antioxidants. 2023. Vol. 12, No 8. Article 1587. DOI: 10.3390/antiox12081587..

Immunology. 2016. Vol. 301. P. 35-42. DOI: 10.1016/j.cellimm.2015.12.003.

24. Okada S.S., Oliveira E.M., Araújo T.H. et al. Myeloperoxidase in human peripheral blood lymphocytes // Cellular

Поступила: 14.05.2026

Киселев Олег Сергеевич – младший научный сотрудник, научно-исследовательская лаборатория молекулярной генетики и геномной инженерии, Южно-Уральского федерального научно-клинического центра медицинской биофизики Федерального медико-биологического агентства. **Адрес для переписки:** 456783, Россия, Челябинская область, Озерск, Озерское шоссе, д. 19; E-mail: kiselevoleg230@gmail.com; ORCID: 0009-0003-2826-1392, РИНЦ Author ID: 1319282

Блинова Евгения Андреевна – кандидат биологических наук, директор-главный научный сотрудник научно-исследовательского института радиационной биологии и радиационной медицины Южно-Уральского федерального научно-клинического центра медицинской биофизики Федерального медико-биологического агентства, Озерск, Россия; ORCID: 0000-0002-2567-7945, РИНЦ Author ID: 635868

Аклеев Александр Васильевич – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, исполняющий обязанности генерального директора Южно-Уральского федерального научно-клинического центра медицинской биофизики Федерального медико-биологического агентства, Озерск, Россия; ORCID: 0000-0003-2583-5808, РИНЦ Author ID: 119281

Для цитирования: Киселев О.С., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Влияние метилирования и транскрипционной активности генов редокс-системы на клеточную гибель лимфоцитов крови у хронически облучённых лиц // Радиационная гигиена. 2026. Т. 19, № 2. С. 27–33. DOI: 10.21514/1998-426X-2026-19-2-27-33

Association of methylation and transcriptional activity of redox system genes with apoptosis and necrosis of lymphocytes in chronically irradiated individuals

Oleg S. Kiselev^{1,2}, Evgenia A. Blinova^{1,2}, Alexander V. Akleyev^{1,2}

¹ Southern Urals Federal Research and Clinical Center for Medical Biophysics of the Federal Medical Biological Agency, Ozyorsk, Russia

² Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

Chronic radiation exposure can induce persistent epigenetic changes that affect the mechanisms of cell death and the development of long-term biological effects. The role of methylation of redox system genes in the regulation of apoptosis and necrosis of lymphocytes in chronically exposed individuals remains insufficiently studied. The aim of the study is to assess the association of promoter region methylation and transcriptional activity of redox system genes with the intensity of apoptosis and necrosis of peripheral blood lymphocytes in chronically exposed individuals. Materials and Methods: The study included 171 individuals: 99 persons exposed to chronic low-intensity radiation and 72 individuals from the comparison group who lived under similar social and living conditions. Apoptosis and necrosis of peripheral blood lymphocytes were assessed by flow cytometry. Molecular analysis included assessment of CpG dinucleotide methylation in the promoter regions of redox system genes and determination of their transcriptional activity. Results and Discussion: The level of lymphocyte necrosis was statistically significantly higher in the group of chronically exposed individuals compared with the comparison group ($p=0.033$). Necrosis positively correlated with radiation doses to red bone marrow ($p=0.24$; $p=0.001$), thymus and peripheral lymphoid organs ($p=0.19$; $p=0.013$). Analysis of apoptosis revealed statistically significant positive correlations with methylation levels of SOD2 ($p=0.18$; $p=0.017$), GPX1 ($p=0.26$; $p=0.001$), GSTP1 ($p=0.22$; $p=0.004$), MPO ($p=0.41$; $p<0.0001$), and CAT ($p=0.21$; $p=0.006$). According to multiple regression analysis, apoptosis was associated with GSTP1 and MPO methylation. Conclusion: Thus, in chronically exposed individuals in the long-term period after exposure, necrotic lymphocyte death is predominantly associated with radiation dose, whereas apoptosis is associated with hypermethylation of promoter regions of redox system genes.

Key words: chronic radiation exposure, peripheral blood lymphocytes, apoptosis; necrosis, redox system, DNA methylation, transcriptional activity, antioxidant system genes.

Authors' personal contribution

Kiselev O.S. – study design development, data collection, analysis and interpretation of the results, writing the original draft of the manuscript.

Blinova E.A. – study design development, interpretation of the results, review and editing of the manuscript.

Akleyev A.V. – scientific supervision, review and editing of the manuscript, interpretation of the data, final approval of the manuscript for publication.

Acknowledgements

The authors are grateful to reviewers for their work.

Oleg S. Kiselev

Southern Urals Federal Research and Clinical Center for Medical Biophysics

Address for correspondence: 19, Ozerskoye Shosse, Ozyorsk, Chelyabinsk Region, 456783, Russia; E-mail:

kiselevoleg230@gmail.com

Conflict of interests

The authors state that there is no potential conflict of interest.

Sources of funding

The work was carried out with the financial support of the Federal Medical and Biological Agency, within the framework of the Federal target program "Ensuring nuclear and radiation safety for 2016-2020 and for the period up to 2030".

References

1. Ilnytskyi Y, Kovalchuk O. Non-targeted radiation effects — an epigenetic connection. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2011;714(1–2): 113–125. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.06.014.
2. Antwi DA, Gabbara KM, Lancaster WD, Ruden DM, Zielske SP. Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways. *Epigenetics*. 2013;8(8): 839–848. DOI: 10.4161/epi.25498.
3. Kovalchuk O. Epigenetic changes and nontargeted radiation effects. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2008;49(1): 16–25. DOI: 10.1002/em.20358.
4. Belli M, Tabocchini MA. Ionizing radiation-induced epigenetic modifications and their relevance to radiation protection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(17): 5993. DOI: 10.3390/ijms21175993.
5. Consequences of radioactive contamination of the Techa River / ed. Akleyev AV. Chelyabinsk: Kniga; 2016. (In Russian).
6. Akleyev AV. Mechanisms of the effects of chronic radiation exposure. Pathogenesis of chronic radiation syndrome. In: Chronic radiation syndrome in residents of the Techa riverside villages. Chelyabinsk: Kniga; 2012. P. 79–163. (In Russian).
7. Akleyev AV, Krestinina LY, Degteva MO, Tolstykh EI. Consequences of the radiation accident at the Mayak Production Association in 1949–1956. *Journal of Radiological Protection*. 2017;37(3): R19–R42.
8. Verheij M, Bartelink H. Radiation-induced apoptosis. *Cell and Tissue Research*. 2000;301: 133–142. DOI: 10.1007/s004410000188.
9. Harms-Ringdahl M, Nicotera P, Radford IR. Radiation induced apoptosis. *Mutation Research*. 1996;366(2): 171–179. DOI: 10.1016/S0165-1110(96)90038-X.
10. Blinova EA, Akleyev AA. Analysis of apoptotic death indicators in lymphocytes of chronically exposed individuals. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal=Russian Journal of Immunology*. 2017;11(20)(2): 107–109. (In Russian).
11. Akleyev AA, Blinova EA, Dolgushin II. Does lymphocyte apoptosis in the long-term period after chronic radiation exposure affect human immune status? *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal=Russian Journal of Immunology*. 2018;12(21)(3): 205–210. (In Russian). DOI: 10.31857/S102872210002382-5.
12. Blinova EA, Kotikova AI, Yanishevskaya MA, Akleyev AV. Lymphocyte apoptosis and polymorphisms of apoptosis regulation genes in individuals exposed to chronic radiation. *Meditinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost=Medical Radiology and Radiation Safety*. 2020;65(4): 36–42. (In Russian). DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-4-36-42.
13. Nikiforov VS, Blinova EA, Kotikova AI, Akleyev AV. Transcriptional activity of repair, apoptosis and cell cycle genes (TP53, MDM2, ATM, BAX, BCL-2, CDKN1A, OGG1, XPC, PADI4, MAPK8, NF-KB1, STAT3, GATA3) in chronically exposed persons with different intensity of peripheral blood lymphocyte apoptosis. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii=Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(1): 50–58. (In Russian). DOI: 10.18699/VJGB-22-08.
14. Blinova EA, Nikiforov VS, Kotikova AI, Yanishevskaya MA, Akleyev AV. Methylation status of apoptosis genes and intensity of apoptotic death of peripheral blood lymphocytes in individuals exposed to chronic radiation. *Molekulyarnaya biologiya=Molecular Biology*. 2022;56(6): 1072–1082. (In Russian). DOI: 10.31857/S0026898422050032.
15. Greenberg MVC, Bourc'his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2019;20(10): 590–607. DOI: 10.1038/s41580-019-0159-6.
16. Edwards JR, Yarychkivska O, Boulard M, Bestor TH. DNA methylation and DNA methyltransferases. *Epigenetics & Chromatin*. 2017;10: 23. DOI: 10.1186/s13072-017-0130-8.
17. Blinova EA, Kotikova AI, Akleyev AV. Influence of methylation of apoptosis regulation gene promoters on the intensity of lymphocyte cell death in exposed individuals. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16. Biologiya=Lomonosov Biology Journal*. 2024;79(4): 346–352. (In Russian). DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-12.
18. Spitz DR, Azzam EI, Li JJ, Gius D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2004;23(3–4): 311–322.
19. Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters*. 2012;327(1–2): 48–60.
20. Cyr AR, Hitchler MJ, Domann FE. Regulation of SOD2 in cancer by histone modifications and CpG methylation: closing the loop between redox biology and epigenetics. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013;18(15): 1946–1955. DOI: 10.1089/ars.2012.4850.
21. Kiselev OS, Korechenkova AV, Blinova EA, Akleyev AV. Methylation level of promoter regions of antioxidant and prooxidant system genes in chronically exposed individuals. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya=Radiation Biology. Radioecology*. 2026;66(1): 18–28. (In Russian). DOI: 10.7868/S3034590126010022.
22. Degteva MO, Napier BA, Tolstykh EI, Shishkina E, Bougrov N, Krestinina L, et al. Distribution of individual doses in the cohort exposed due to radioactive contamination of the Techa River. *Medical Radiology and radiation safety*. 2019;64(3): 46–53. DOI: 10.12737/article_5cf2364cb49523.98590475.
23. Cosic-Mujanovic N, Valadez-Cosmes P, Maitz K, Lueger A, Mihalic ZN, Runtsch MC, et al. Myeloperoxidase alters lung cancer cell function to benefit their survival. *Antioxidants*. 2023;12(8): 1587. DOI: 10.3390/antiox12081587.
24. Okada SS, Oliveira EM, Araújo TH, Rodrigues MR, Albuquerque RCh, Mortara RA, et al. Myeloperoxidase in human peripheral blood lymphocytes. *Cellular Immunology*. 2016;301: 35–42. DOI: 10.1016/j.cellimm.2015.12.003.

Received: May 14, 2026

For correspondence: Oleg S. Kiselev – Junior Researcher, Laboratory of Molecular Genetics and Genetic Engineering, Southern Urals Federal Research and Clinical Center for Medical Biophysics of the Federal Medical Biological Agency (19, Ozerskoye Shosse, Ozyorsk, Chelyabinsk Region, 456783, Russia; E-mail: kiselevoleg230@gmail.com); ORCID: 0009-0003-2826-1392, RSCI Author ID: 1319282

Evgenia A. Blinova – Candidate of Biological Sciences, Director – Chief Researcher, Research Institute of Radiation Biology and Radiation Medicine, Southern Urals Federal Research and Clinical Center for Medical Biophysics of the Federal Medical Biological Agency, Ozyorsk, Russia; ORCID: 0000-0002-2567-7945, RSCI Author ID: 635868

Alexander V. Akleyev – Doctor of Medical Sciences, Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Acting Director General, Southern Urals Federal Research and Clinical Center for Medical Biophysics of the Federal Medical Biological Agency, Ozyorsk, Russia; ORCID: 0000-0003-2583-5808, RSCI Author ID: 119281

For citation: Kiselev O.S., Blinova E.A., Akleyev A.V. Association of methylation and transcriptional activity of redox system genes with apoptosis and necrosis of lymphocytes in chronically irradiated individuals. *Radiatsionnaya Gygiena=Radiation Hygiene*. 2026. Vol. 19, No. 2. P. 27–33. (In Russian). DOI: 10.21514/1998-426X-2026-19-2-27-33