

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ
ПОРУШЕННЯ ПРОЦЕСІВ АПОПТОЗУ
ТА КЛІТИННОГО СТАРІННЯ У ХВОРИХ
НА ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНУ ПАТОЛОГІЮ
У ВІДДАЛЕНОМУ ПЕРІОДІ
ПІСЛЯ ОПРОМІНЕННЯ**

Д. А. Базика, І. М. Ільєнко, К. М. Логановський,
С. А. Чумак, О. В. Лясківська, О. А. Беляєв, О. Л. Мазніченко

ДУ "Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України", м. Київ

Ключові слова: іонізуюча радіація, апоптоз, відносна довжина теломерів, flow-FISH, цереброваскулярна патологія, Чорнобиль.

Захворювання системи кровообігу, у т.ч. цереброваскулярні, на сьогоднішній день, відносяться до провідних порушень стану здоров'я в учасників ліквідації наслідків аварії (ЛНА) на ЧАЕС. Радіочутливість нервової системи підтверджена багатьма клінічними та фізіологічними дослідженнями. Однак, прояви, які супроводжують пострадіаційні зміни значною мірою залежать від дози опромінення та тривалості дії радіаційного фактору. Проте сьогодні серед науковців немає одностайної думки стосовно доз опромінення, при яких можливі морфологічні зміни ЦНС. Більшість авторів вважають, що радіаційні ураження нервової системи є нестохастичними ефектами опромінення, важкість яких пропорційна дозі загального опромінення, а також обумовлюється тривалістю його дії ступенем зрілості мозку на момент опромінення та індивідуальними адаптивними можливостями організму, його загальною реактивністю [1]. У діапазоні доз вище 1 Гр частота дисциркуляторної енцефалопатії зростає з дозою опромінення та діагностується практично у всіх постраждалих [2, 3]. Патогенез цих змін та зв'язок із прямою дією іонізуючого опромінення є предметом дискусій. Більш вірогідними є докази непрямої дії іонізуючої радіації та патогенетичної ролі нейро-імунної взаємодії, які описано у ранньому періоді після опромінення в дозах до 1 Гр [4, 5], в періоді формування середньо- та довгострокових наслідків після гострої променевої хвороби та опромінення в малих дозах, а також експериментальними дослідженнями

[6, 7]. Водночас, вірогідні докази зв'язку їх з клінічними проявами віддаленого періоду ще не отримано, а розуміння молекулярних неврологічних ефектів малих доз іонізуючого опромінення має важливе значення для оцінки ризиків для здоров'я: при медичній діагностиці опромінення, від побічних ефектів променевої терапії, для працівників атомної енергетики.

Мета дослідження — визначити особливості експресії генів-регуляторів апоптозу та теломеразного комплексу та оцінити зміни за програмованої клітинної загибелі та довжини теломер у лімфоцитах периферичної крові учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС.

Матеріал та методи дослідження

Обстежено 50 осіб. Основна група — 29 учасників ЛНА на ЧАЕС 1986–87 pp. із ЦВП та когнітивними розладами різного ступеню важкості, опромінених в інтервалі доз від 13,2 до 2800 мЗв; група порівняння — 8 неопромінених хворих з ЦВП та когнітивними розладами; контрольна група — 13 практично здорових осіб. Кількісна характеристика ступеню тяжкості ЦВП та психопатологічних розладів виконувалась за допомогою нейрофізіологічних методів, нейрометричних і психометричних шкал FSS, EDSS, MMSE, GHQ-28, BPRS, IDA, SDS та інших.

Імунологічне обстеження проводилось за допомогою прямого імунофлуоресцентного тесту з використанням комбінацій активаційних та диференційних антигенів. Панель антитіл включала: CD 3/19, CD4/8, CD3/HLA-DR, CD3/16/56 та додатково: CD4/25, CD3/4, CD34/38, які були мічені двома мітками: флуоресцеїнізотіоцианатом (FITC) та фікоеритрином (PE). Визначення відносної довжини теломер (RTL) проводили за допомогою флуоресцентної гібридизації *in situ* з використанням проточної цитометрії (flow-FISH) та набору Telomere PNA Kit/FITC (DakoCytometration, Denmark). В якості контролю, була використана клітинна лінія K562. Диференційний аналіз апоптозу проводили за допомогою Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Becton Dickinson, USA) та за експресією CD95 рецептору та внутрішньоклітинною експресією Bcl-2 та p53. Цитометричні дослідження виконувались за допомогою проточного цитометра FACScan (Becton Dickinson, USA). Дослідження відносного рівня генної експресії проводили методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі за допомогою роботизованої системи 7900HT (Applied Biosystems, USA).

Результати дослідження та їх обговорення

Результати субпопуляційного аналізу лімфоцитів периферичної крові УЛНА на ЧАЕС 1986–1987 pp. При аналізі популяційного складу лейко-

цитів ПК у осіб основної групи обстеження було встановлено зниження відсотку лімфоцитів, натомість відносний рівень гранулоцитарної та моноцитарної субпопуляцій був не змінений. Аналіз експресії основних диференційних та активаційних антигенів лімфоцитів ПК осіб груп обстеження показав тенденцію до зниження кількості $CD8^+$ клітин у ПК осіб основної групи обстеження, порівняно із контролем. Недостатня активність $CD8^+$ лімфоцитів сприяє більш сильній імунній відповіді з вираженою антитілопродукцією і/або тривалою активацією $CD4^+$ ефекторів). Можливим стає розвиток аутоімунних та алергічних процесів. В основній групі та групі порівняння підвищений відносний рівень $CD16^{+}56^{+}$ клітин, що свідчить про активність протипухлинного та противірусного імунітету. Також у групі учасників ЛНА на ЧАЕС встановлений позитивний кореляційний зв'язок відсотку $CD16^{+}56^{+}$ клітин із дозою опромінення, коефіцієнт кореляції Пірсона $r=0,51$, $p<0,005$. На користь гіперактивності клітинного імунітету, особливо у групі УЛНА на ЧАЕС, говорить зростання активованих Т-клітин, а саме $CD3^{+}DR^{+}$, що не спостерігається у групі порівняння.

Для визначення особливостей змін показників клітинного імунітету від дози опромінення група учасників ЛНА була перерозподілена за ступенем опромінення. Було виділено 2 групи: I — особи, опромінені у діапазоні малих доз ($146,2 \pm 75,7$; від 40 до 250 мЗв) та II — особи, які опромінені у діапазоні високих доз ($1002,6 \pm 312,4$; від 260 до 2800 мЗв) (рис. 1).

На підставі такого перерозподілу були визначені основні особливості змін параметрів клітинного імунітету в залежності від дози опромінення. I група обстежених осіб мала найбільш виражені зміни, а саме: підвищену кількість $CD4^+$ клітин та відповідно зниження експресії $CD8^+$ клітин, достовірне зниження відсотку NK-клітин.

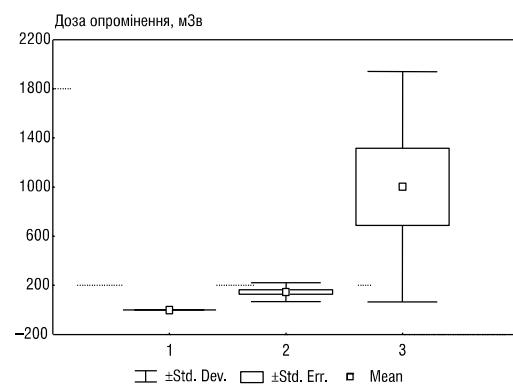


Рис. 1. Розподіл учасників ЛНА на ЧАЕС з когнітивними розладами за дозами опромінення: 1 — контрольна група, 2 — УЛНА опромінені у діапазоні малих доз (від 40 до 250 мЗв), 3 — УЛНА опромінені у діапазоні середніх та високих доз (від 260 до 2800 мЗв)

У II групі учасників ЛНА на ЧАЕС зміни в регуляторних субпопуляцій мали подібну напрямленість, але менш виражений характер, а відсоток NK-клітин достовірно не змінювався порівняно із контрольною групою.

Імунофенотипування клітин попередників: $CD34^{+}38^{-}$, $CD38^{+}34^{-}$, $CD34^{+}38^{+}$ не продемонструвало статистично достовірних змін порівняно з контролем. Також не визначені зміни відсотку клітин попередників в залежності від дози опромінення.

Характеристика рівня спонтанного апоптозу лімфоцитів периферичної крові УЛНА на ЧАЕС 1986–1987 pp.

Протягом останніх 10–15 років значно змінився погляд на природу та механізми радіаційної загибелі клітин. Було показане існування в клітині сигнальної системи, яка виявляє ушкодження ДНК (ATM, ATR), що призводить до активації гену TP53, який відповідає за апоптоз, або зупиняє проходження клітини по циклу для репарації післярадіаційних ушкоджень за рахунок активації генів INK4a/ARF та експресії інгібіторів циклінових кіназ — p21. Знайдені кореляції між радіочутливістю клітин та показниками, які характеризують механізми апоптозу [8–13]. У нашому дослідженні встановлено зростання відносної кількості $CD95^{+}$ клітин в основній групі та групі порівняння, що свідчить про підвищеною готовністю лімфоцитів до Fas-опосередкованого апоптозу. Також зафіксована тенденція до зниження рівня $Bcl-2^{+}$ клітин, порівняно з контролем, однак статистична достовірність зафіксована лише у групі порівняння. Експресія внутрішньоклітинного p53 у дослідних групах, порівняно з контролем не змінена.

Проведений аналіз дозової залежності цих показників. На рис. 2 представлена зміни у експресії CD95 рецептору в залежності від дози опромінення. У групі осіб опромінених в інтервалі 40–250 мЗв відсоток $CD95^{+}$ клітин зростає порівняно із контрольною групою. Тенденційно подібні, однак значно більш

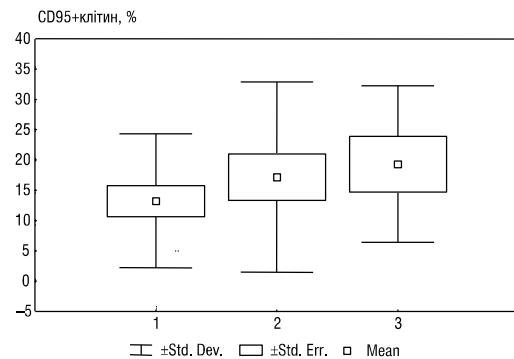


Рис. 2. Групові показники відсотку $CD95^{+}$ клітин в залежності від дози опромінення. 1 — контрольна група; 2 — опромінені в інтервалі 40–250 мЗв; 3 — опромінені в інтервалі 260–2800 мЗв

виражені зміни спостерігались і у групі осіб опромінених у діапазоні від 260 до 2800 мЗв (рис. 2).

При проведенні якісного аналізу запрограмованої клітинної загибелі було встановлено зростання рівня пізнього апоптозу лише у групі порівняння, по відношенню до контролю ($p<0,05$), що може бути пов'язаним із наявністю ЦВП. Вміст Анексин⁺PI⁻ клітин (ранній апоптоз) статистично не відрізнявся від показників контрольної групи, однак спостерігалась тенденція до зниження середніх значень цього показника. Проведене дослідження дозової залежності рівня Анексин⁺PI⁻ клітин. У групі осіб, опромінених у діапазоні малих доз рівень раннього апоптозу був знижений, що за направленастю змін відповідає загальногруповим показникам. Рівень пізнього апоптозу у групі осіб, опромінених у інтервалі до від 260 до 2800 мЗв був не змінений, порівняно із контролем.

Характеристика відносної довжини теломер лімфоцитів периферичної крові УЛНА на ЧАЕС 1986–1987 pp.

Наявність радіаційного старіння у постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС відноситься до найбільш контроверсійних аспектів біологічних ефектів дії опромінення. Прискорене старіння описано в учасників ЛНА на ЧАЕС, зокрема за показниками системи кровообігу. У інших роботах зі старінням пов'язують всі порушення імунної системи, підвищення захворюваності на аутоімунний тиреоїдит, алергічні захворювання та астму постійно зростають в забрудненій зоні у післяаварійний період. У відділі клінічної імунології у результаті проведених науково-дослідних робіт було встановлено зв'язок порушень апоптозу, довжини теломер, параметрів клітинного імунітету та радіогенних соматичних мутацій у людини при дії іонізуючого опромінення, залежність показників відносної довжини теломер мононуклеарів від дози опромінення та віку. Було показано, що скорочення теломерних послідовностей корелює із зростанням апоптозу, а також встановлений зворотний зв'язок між показником RTL (relative telomere length), деякими видами хромосомних aberracій та змінами параметрів клітинного імунітету у пізньому періоді після опромінення [14]. Однак вказані зміни не можуть вважатися остаточно доведеними. За результатами даної роботи встановлено зниження показнику RTL порівняно з контролем в основній групі та у групі порівняння (табл. 1).

Вірогідної різниці між груповими показниками в залежності від радіаційного анамнезу у пацієнтів з когнітивними розладами не знайдено. Встановлений негативний кореляційний зв'язок між показником RTL

Таблиця 1. Відносна довжина теломер лімфоцитів периферичної крові в групах обстеження

Групи обстеження	Показник RTL (умовні одиниці), M±SD
Контрольна (n=13)	20,9±4,38
Основна (n=29)	16,7±5,55*
Група порівняння, (n=8)	15,4±2,73**

Примітки: * — вірогідність розбіжностей з показниками контрольної групи $p<0,001$;
** — $p<0,02$.

та рівнем експресії гену TERF2 (ген, який кодує теломерний зв'язуючий фактор 2 ($r=-0,4$, $p<0,07$). Такий зв'язок є цілком віправданим, оскільки одноіменний протеїн TERF2 є інгібітором теломерази, яка сприяє подовженню теломер.

Особливості експресії генів TP53, TP53I3, FASLG, BAX та теломero-асоційованих генів TERT, TERF1, TERF2 у лімфоцитах периферичної крові учасників ЛНА на ЧАЕС 1986–1987 pp. у віддаленому періоді після опромінення

Експресія генів є дуже чутливим індикатором радіаційного впливу, а малі дози опромінення призводять до генетичних та цитогенетичних змін [15, 16].

Нами було визначено відносний рівень експресії генів регуляторів апоптозу, а саме TP53, TP53I3, FASLG, BAX, а також CCND1 (ген, який кодує G₁/S-специфічний циклін-D1 білок), які на транскрипційному, а потім і на трансляційному рівнях приймають участь у реалізації запрограмованої клітинної загибелі. Результати показника RQ (середнє значення відносного рівня експресії) по кожному із вищезазначених генів представлена на рис. 3.

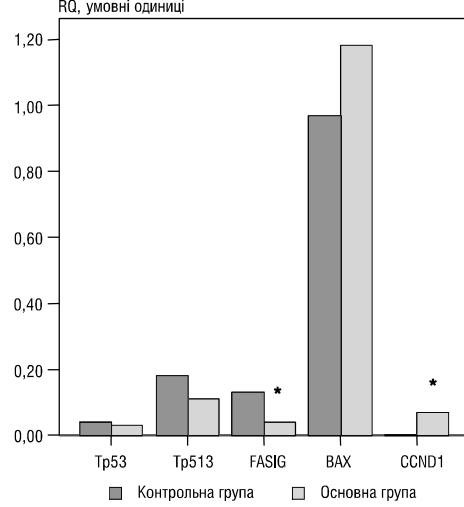


Рис. 3. Характеристика змін рівня експресії генів-регуляторів апоптозу TP53, TP53I3, FASLG, BAX, CCND1 у лімфоцитах периферичної крові осіб у групах обстеження

Ключовим геном-регулятором апоптозу вважається TP53, який кодує одноіменний білок p53, що відповідає за регуляцію клітинного циклу, у немутованому стані виконує функцію супресора злоякісної трансформації. У нашому дослідженні спостерігається тенденція до зниження експресії генів TP53 та TP53I3, хоча зміни порівняно з контролем статистично не достовірні. При інактивації p53 гіперекспресується білок сурвівін, який регулюється геном BIRC5 — інгібітором BAX та Fas-опосередкованого апоптозу. Це знайшло відображення у зафікованому нами зниженні експресії FASLG, однак із ступенем вірогідності $p < 0,5$. Fas-ліганд є трансмембраним протеїном II типу, який відноситься до TNF-родини. Його зв'язування з рецептором індукує Fas-опосередкований апоптоз. Однак існують дані, які свідчать про те, що передача апоптотичного сигналу, який індукується антитілом не є гарантованим, що знайшло відображення у нашому дослідженні (рівень Анексин+PI- клітин був не змінений). За літературними даними дефектний Fas-опосередкований апоптоз призводить до онкогенезу. Мутації FASLG також асоційовані із аутоімунним лімфопроліферативним синдромом. Також була зафікована гіперекспресія гену BAX, який кодує одноіменний білок із родини проапоптотичних протеїнів. Доведено, що експресія BAX зворотно регулюється протеїном p53. Гіперекспресія BAX, на наш погляд, є проявом інактивації p53-опосередкованого апоптозу, а також частиною клітинної відповіді на стрес (дія іонізуючого випромінення у віддаленому періоді).

В основній групі встановлений підвищений рівень експресії CCND1, який кодує білок G₁/S-специфічний циклін-D1 та приймає участь у регуляції проходження клітиною життевого циклу. Контроль клітинного циклу забезпечується також генною регуляцією та відповідними сигнальними молекулами. Серед них каскад Cdk, активізація або гальмування яких може стати стартом для розвитку злоякісної трансформації. Зокрема мутації, зростання або гіперекспресія гену CCND1 спостерігається досить часто при різних типах пухлин. Вважають, що гіперекспресія циклінів приводять до зниження транскрипції онкосупресорних генів типу BRCA1 та сприяє канцерогенезу [17].

Беззаперечно важливим є шлях реалізації генних змін. Передчасне клітинне старіння, апоптоз та бласттрансформація є ключовими та взаємопов'язаними реакціями клітини при наявності стресового фактору. Як і апоптоз, клітинне старіння є важливим механізмом пригнічення канцерогенезу у еукаріотів. Однак, на противагу апоптозу, при клітинному старінні не відбувається елімінація дисфункціональних,

ушкоджених або потенційно неопластичних клітин [9]. Вважають, що клітинне старіння робить клітини нездатними до пухлинної трансформації, однак такі “старі” клітини персистують у тканинах та сприяють малігнізації пренеопластичних клітин. Отже, клітинне старіння — це антагоністичний процес, з одного боку знижує розвиток раку, а з іншого — зменшує тривалість життя за рахунок накопичення старіючих клітин. Регуляція клітинного старіння забезпечується за допомогою білків, асоційованих із теломерами та теломеразою — TERF1 (негативний регулятор довжини теломер) та TERF2 (забезпечує кепінг теломер). За допомогою теломерази підтримується довжина теломер та їх функціональний стан. Складовими елементами теломерази є білки TERT та TERC, які регулюються відповідними генами. Одноіменні протеїни TERF1 та TERF2 відіграють ключову роль в інгібіції функції теломерази [14–17]. Нами встановлено зниження експресії TERF1 та TERF2 в основній групі опромінених осіб порівняно із контролем (рис. 4). При розподілі основної групи дослідження за ступенем опромінення, статистично достовірних змін в рівні експресії генів-регуляторів апоптозу та теломеро-асоційованих генів не встановлено.

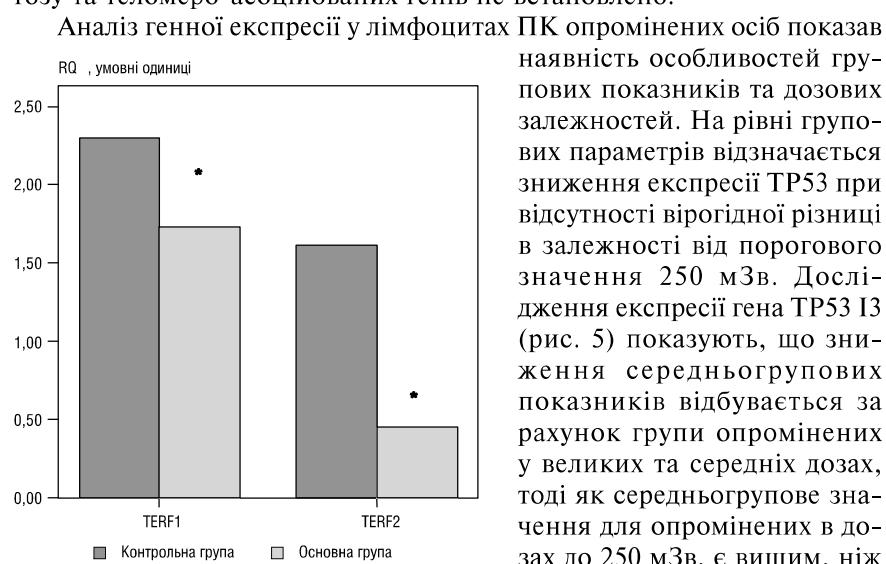


Рис. 4. Групові значення експресії генів асоційованих з теломерами — TERF1 та TERF2 у лімфоцитах ПК осіб груп обстеження

Аналіз генної експресії у лімфоцитах ПК опромінених осіб показав наявність особливостей групових показників та дозових залежностей. На рівні групових параметрів відзначається зниження експресії TP53 при відсутності вірогідної різниці в залежності від порогового значення 250 мЗв. Дослідження експресії гена TP53 I3 (рис. 5) показують, що зниження середньогрупових показників відбувається за рахунок групи опромінених у великих та середніх дозах, тоді як середньогрупове значення для опромінених в дозах до 250 мЗв, євищим, ніж у неопромінених.

Дослідження експресії FASLG показує зниження

групових показників в учасників ЛНА, найбільшою мірою визначене при високих дозах (рис. 6).

Вивчення дозової залежності експресії гену BAX не показало значних відмінностей. Для гену TERF2 встановлено зниження групових показників в залежності від дози з найбільшим зниженням показників серед опромінених з дозами, більшими за 250 мЗв (рис. 7). Вказані дані відображають порушення регуляції Т-петлевої регуляції теломерної функції і узгоджуються з даними про скорочення показника RTL.

Вивчення стану експресії цикліна D1 (ген CCND1) показують, що підвищення його експресії відбувається за рахунок групи опромінених в дозах менших за 250 мЗв (рис. 8), що підтверджує різницю механізмів відновлення імунної системи та формування ефектів віддаленого періоду в інтервалі малих доз.

Таким чином, в результаті проведеного дослідження встановлено наявність порушень параметрів клітинного імунітету, пов'язаних з дозою опромінення через 22–24 роки після опромінення. В цілому, встановлено вірогідне підвищення числа CD4⁺ лімфоцитів та зменшення CD8⁺ субпопуляції, що було

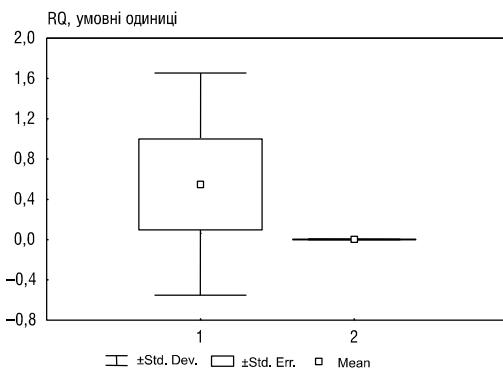


Рис. 5. Групові показники експресії гену TP53I3 в УЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після катастрофи: 1 — опромінені в інтервалі 40–250 мЗв; 2 — опромінені у інтервалі 260–2800 мЗв

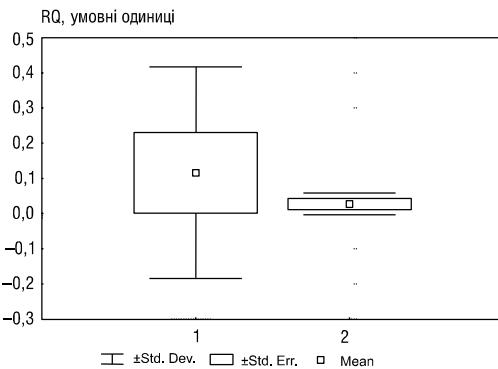


Рис. 6. Групові показники експресії гену FASLG УЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після катастрофи: 1 — опромінені в інтервалі 40–250 мЗв; 2 — опромінені у інтервалі 260–2800 мЗв

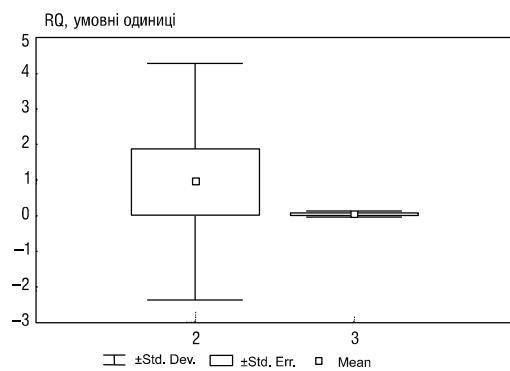


Рис. 7. Групові показники експресії гену TERF2 у УЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після катастрофи: 2 — опромінені в інтервалі 40–250 мЗв; 3 — опромінені у інтервалі 260–2800 мЗв

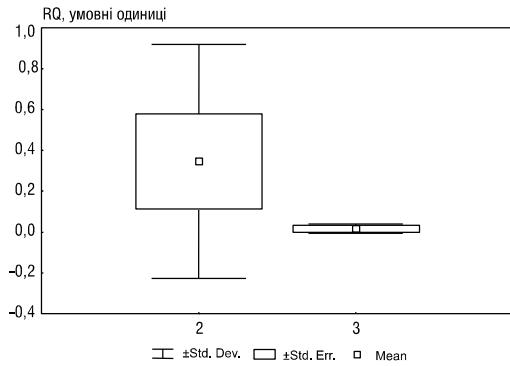


Рис. 8. Групові показники експресії гену CCND1 в УЛНА на ЧАЕС у віддаленому періоді після катастрофи: 2 — опромінені в інтервалі 40–250 мЗв; 3 — опромінені у інтервалі 260–2800 мЗв

ня числа цих клітин в залежності від дози опромінення. Підвищення числа CD95⁺ клітин не супроводжується вірогідними груповими змінами числа клітин на ранніх та пізніх стадіях апоптозу.

описано і раніше у віддаленому періоді після опромінення. Проведений аналіз в залежності від дози опромінення показав, що залежність для CD8⁺ клітин зберігається на груповому рівні у всьому діапазоні від 40 до 2800 мЗв. Для CD4⁺ клітин найвищі середні показники встановлено після опромінення в діапазоні малих доз. Для клітин природних кілерів результати були опозитними: найвищі середні показники продемонстровано після опромінення у високих дозах, що свідчить про відновлення у віддаленому періоді філогенетично найстаріших механізмів імунного нагляду. Після дії опромінення у дозах, менших за 250 мЗв, навпаки показано пригнічення числа природних кілерів, що може свідчити про дефект імунного нагляду.

Висновки. 1. Встановлено збільшення фракції клітин, здатних до апоптозу за відсотком CD95⁺ клітин, а також тенденцію до збільшен-

2. При вивченні показників відносного рівня експресії генів регуляторів апоптозу та теломер від дози у групі учасників ЛНА на ЧАЕС встановлено загальні механізми: зниження експресії генів, які регулюють p53-опосередкований апоптоз: TP53, TP53I3 та FASLG; гіперекспресія генів, асоційованих із злоякісною трансформацією клітин: BAX та CCND1; зниження експресії генів регуляторів довжини теломер TERF1 та TERF2.

3. Встановлено ряд особливостей генної експресії в залежності від дози опромінення. Найбільше зниження експресії TP53 відбувається після опромінення в дозах, менших за 250 мЗв та супроводжується підвищеннем в цьому діапазоні експресії TP53I3 та гену цикліну D1 (CCND1).

ЛІТЕРАТУРА

1. Коцан, І. Я. Вплив іонізуючої радіації на нервову систему [Текст] / І. Я. Коцан, О. А. Журавльов // Вісник київського університету. Фізіологія людини і тварини. — 2007. — № 5. — С. 5–14.
2. Логановский, К. Н. Неврологические и психопатологические синдромы в отдаленном периоде воздействия ионизирующих излучений [Текст] / К. Н. Логановский // Журн. невропатологии и психиатрии. — 2000, — № 4. — С. 15–21.
3. Метаболічні процеси [Текст] / Л. М. Овсяннікова [та ін.] // Гостра променева хвороба (медичні наслідки Чорнобильської катастрофи) під ред. О. М. Коваленка. — К.: І. Федоров, 1998. — С. 110–120.
4. Чаяло, П. П. Метаболические пострадиационные нарушения как основа развития нестохастических соматических последствий облучения? [Текст] / П. П. Чаяло // Отдаленные медицинские последствия Чернобыльской катастрофы: М-лы 2-й Межлунар. конф. — Киев, 1998. — С. 404–405.
5. Immune cells in Chernobyl radiation workers exposed to low-dose irradiation [Text] / A. Chumak [et al.] // Int J of Low Radiation. — 2003. — Vol. 1. — № 1. — P. 19–23.
6. Голярник, Н. А. Роль опійних пептидів в модуляції імунної відповіді хворих на лінгвокульторну енцефалопатію у віддалений період після опромінення [Текст]: дис. ... канд. біол. наук: 03.00.01 / Голярник Наталія Анатоліївна. — К., 2006. — 183 с.
7. Азарська, М. В. Пристосувальні реакції імунної системи у реконвалесцентів гострої променової хвороби у віддаленому періоді після опромінення [Текст]: дис. ... канд. мед. наук: 03.00.01 / Азарська Маріанна Валеріївна. — К., 2002. — 159 с.
8. Копнін, Б. П. Мишени дії онкогенів і опухолевих супрессорів: ключ до понимання базових механізмів канцерогенеза [Текст] / Б. П. Копнін // Біохімія. — 2000. — № 1. — Т. 65. — С. 5–33.
9. Zhivotovsky, B. Tumor radiosensitivity and apoptosis [Text] / B. Zhivotovsky, B. Joseph, S. Orrenius // Exp. Cell Res. — 1999. — № 10. — P. 10–7.
10. Is chromosome radiosensitivity and apoptotic response to irradiation correlated with cancer susceptibility [Text] / Z. Docherty [et al.] // Int. J. Radiat. Biol. — 2007. — Vol. 83. — P. 1–12.
11. Чумаков, П. М. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью [Текст] / П. М. Чумаков // Біохімія. — 2000. — № 65(1). — С. 34–47.
12. The ARF/p53 pathway [Text] / C. J. Sherr [et al.] // Current Opinion in Genetics & Development. — 2000. — Vol. 10. — P. 94–99.

13. Shiloh, Y. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage [Text] / Y. Shiloh // Current Opinion in Genetics & Development. — 2001. — Vol. 11. — P. 71–77.
14. Значення апоптозу та довжини теломерів мононуклеарів периферичної крові у формуванні клітинних ефектів іонізуючої радіації [Текст] / Д. А. Базика [та ін.] // Проблеми радіаційної медицини: Зб. наукових праць. — 2010. — Вип. 15. — С. 216–229.
15. Low-dose irradiation alters the transcript profiles of human lymphoblastoid cells including genes associated with cytogenetic radioadaptive response [Text] / M. A. Coleman [et al.] // Radiat. Res. — 2005. — Vol. 164. — P. 369–382.
16. Gene expression changes in mouse brain after exposure to low-dose ionizing radiation [Text] / E. Yin [et al.] // Int. J. Radiat. Biol. — 2003. — Vol. 79. — P. 759–775.
17. Multi-step process of human breast carcinogenesis: A role for BRCA1, BECN1, CCND1, PTEN and UVRAG [Text] / T. Wu [et al.] // Molecular Medicine Reports. — 2011. — Vol. 34. № 6. — P. 1–8.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ
ПРОЦЕССОВ АПОПТОЗА И КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ
ПРИ ЦЕРЕБРОВАСКУЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИИ
В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ.**

*Д. А. Базика, И. М. Ильенко, К. М. Логановский, С. А. Чумак,
О. В. Ляскivська, О. А. Беляев, А. Л. Мазниченко*

ГУ “Национальный Научный центр радиационной медицины НАМН Украины”, г. Киев

Исследованы особенности экспрессии генов-регуляторов апоптоза и теломеразного комплекса и изменения запрограммированной клеточной гибели и длины теломер в лимфоцитах периферической крови участников ликвидации последствий аварии на ЧАЭС.

Обследовано 50 человек (29 участников ЛПА на ЧАЭС 1986–1987 гг. с cerebrovascularной патологией и когнитивными расстройствами, облученных в интервале доз от 13,2 мЗв до 2800 мЗв, 8 необлученных больных с ЦВП и когнитивными расстройствами; контрольная группа — 13 практически здоровых лиц). Клиническая характеристика проведена с помощью нейрофизиологических методов, нейрометрических и психометрических шкал FSS, EDSS, MMSE, GHQ-28, BPRS, IDA, SDS. Иммунологическое обследование включало субпопуляционный анализ, определение относительной длины теломер (RTL) проводили с помощью flow-FISH, апоптоза с помощью Annexin V-теста, генной экспрессии — методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с помощью роботизированной системы 7900HT.

Установлено наличие нарушений CD8⁺ клеток через 22–24 года после облучения во всем диапазоне доз: от 40 до 2800 мЗв. Увеличение CD95⁺ фракции не сопровождается достоверными изменениями на ранних и поздних стадиях апоптоза. Установлено снижение экспрессии генов, регулирующих p53-опосредованный апоптоз: TP53, TP53I3 и FASLG; гиперэкспрессия генов BAX и CCND1; снижение экспрессии генов-регуляторов длины теломер TERF1 и TERF2. После действия облучения в дозах, меньших 250 мЗв, показано уменьшение числа естественных киллеров, что может свидетельствовать о дефекте иммунного надзора. Наибольшее снижение экспрессии TP53 сопровождается повышением в этом диапазоне экспрессии TP53I3 и CCND1.

Ключевые слова: теломеры, апоптоз, ионизирующая радиация, Чернобыль, экспрессия генов, объект “Укрытие”.

**MOLECULAR-GENETIC MECHANISMS APOPTOSIS
AND CELLULAR AGING CHANGES IN CEREBROVASCULAR
DISEASES AT THE LATE PERIOD AFTER RADIATION EXPOSURE**

*D. Bazuka, I. Ilyenko, K. Loganovsky, S. Chumak,
O. Lyaskivska, O. Belyaev, O. Maznychenko*

*SI "National Research Center for Radiation Medicine,
National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv*

Expression of genes-regulators of apoptosis and telomere activity were studied in complex with peripheral blood lymphocytes number at different stages of apoptosis and relative telomere length in 37 patients with cerebrovascular pathology and cognitive dysfunction including 29 Chernobyl clean-up workers of 1986–1987 with doses from 13.2 to 2800 mSv and 8 non-exposed patients. Control group included 13 volunteers of same age without CVD. Clinical investigation was carried out with neurophysiological, neuro- and psychometrical scales FSS, EDSS, MMSE, GHQ-28, BPRS, IDA, SDS. Cellular studies included subset analysis, relative telomere length (RTL) by flow-FISH, apoptosis by Annexin V-test, gene expression by RT-PCR using 7900HT station.

CD8⁺ cells changes were shown 22–24 years after exposure in dose interval from 40 to 2800 mSv. CD95⁺ fraction increase was not accompanied by changes at early and late apoptosis stages. Down-regulation was demonstrated for genes regulators of p53-mediated apoptosis: TP53, TP53I3 and FASLG; together with overexpression of BAX and CCND1 and downregulation of TERF1 and TERF2. After exposure below 250 mSv the decreased NK cell numbers could result in immune surveillance defect. Substantial TP53 downregulation in this dose interval is accompanied by TR53I3 and CCND1 upregulation.

Key words: *telomere, apoptosis, gene expression, ionising radiation, Chernobyl, "Shelter" object.*