

КЛІНІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 577.25/.27:616.831:616.89–092:616–001.28

Н. В. Беляева\*, Н. А. Голярник, О. А. Беляев, О. Л. Мазниченко

Государственное учреждение “Национальный научный центр радиационной медицины Национальной академии медицинских наук Украины”,  
ул. Мельникова, 53, г. Киев, 04050, Украина

**СУБПОПУЛЯЦИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК  
И АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ  
КРОВИ У ЛИЦ, ОБЛУЧЕННЫХ ВНУТРИУТРОБНО  
В РЕЗУЛЬТАТЕ АВАРИИ НА ЧАЭС,  
СТРАДАЮЩИХ В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ  
ВЕГЕТОСОСУДИСТОЙ ДИСТОНИЕЙ**

Целью исследования было — установить патогенетическую значимость изменений в феномене апоптоза лимфоцитов периферической крови (ПК) и статусе субпопуляций регуляторных Т-клеток у лиц, облученных внутриутробно вследствие аварии на ЧАЭС, страдающих в отдаленном периоде вегетососудистой дистонией (ВСД). Обследовано две группы пациентов с ВСД — внутриутробно облученные с дозовыми нагрузками на головной мозг от 0,022 мЗв до 24,3 мЗв (основная) и необлученные (группа сравнения); всего 48 лиц, родившихся в период с 26 апреля 1986 г. по 26 февраля 1987 г. Всем пациентам было проведено иммунофенотипирование и исследование апоптоза лимфоцитов ПК по экспрессии CD95 и в тесте с анексином V методом проточной цитометрии. Совокупность выявленных нарушений в структуре субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-хелперов и апоптозе лимфоидных клеток позволяет заподозрить наличие иммуновоспалительного процесса в ЦНС, считать снижение количества природных регуляторных Т-клеток и изменений Fas-зависимого апоптоза лимфоцитов патогенетически значимыми для ВСД и рассматривать “дефицит негативной иммунорегуляции” с повышенным риском развития аутоиммунных расстройств в числе других механизмов, формирующих патогенез ВСД у лиц, подвергшихся радиационному воздействию внутриутробно.

**Ключевые слова:** авария на ЧАЭС, облученные внутриутробно, апоптоз, регуляторные Т-лимфоциты.

Функциональные, по сути, сдвиги в феномене апоптоза и иммунорегуляции формируют иммунологические основы патологического процесса и под влиянием негативных внешних факторов с большей

\* Беляева Надежда Владимировна, e-mail: nbel@nbel@mail.ru

© Беляева Н. В., Голярник Н. А., Беляев О. А., Мазниченко О. Л., 2012

вероятностью могут способствовать патоморфозу развивающегося заболевания. К настоящему моменту имеется ряд доказательств ассоциативной связи клеточных и молекулярно-клеточных механизмов регуляции функций иммунной системы и апоптоза с “фактором облучения” [1–3]. Тем не менее, у лиц, подвергшихся радиационному воздействию и имеющих нарушения функций ЦНС, “субпопуляционно-клеточная патогенетическая ответственность” остается неопределенной, результаты по изучению феномена апоптоза чрезвычайно противоречивы. Немногочисленны данные и о различных типах регуляторных Т-лимфоцитов, в том числе и об активно изучаемых в последние годы естественных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> Т-клетках-регуляторах, которые играют важную роль в поддержании периферической толерантности [4] и представляются негативными регуляторами для ЦНС [5].

Настоящая работа была посвящена оценке апоптоза лимфоцитов периферической крови (ПК) и субпопуляционного статуса регуляторных Т-клеток как “участников” развития патологического процесса у лиц, облученных внутриутробно вследствие аварии на ЧАЭС в 1986 году, и страдающих в отдаленном периоде вегетососудистой дистонией (ВСД), с целью установления их патогенетической значимости.

**Материал и методы исследования.** В исследование были включены две группы, практически равные по числу пациентов с ВСД: внутриутробно облученные с дозовыми нагрузками на головной мозг от 0,022 мЗв до 24,3 мЗв (основная группа исследования) и необлученные (сравнительная группа исследования). Обследовано 48 лиц, родившихся в период с 26 апреля 1986 года по 26 февраля 1987 года. Всем пациентам было проведено иммунофенотипирование и исследование апоптоза лимфоцитов ПК по экспрессии CD95, в teste с аннексином V методом проточной цитометрии. Изучены содержание субпопуляций регуляторных Т-клеток — CD4<sup>+</sup>CD25<sup>total</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>, их соотношение CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>total</sup>, величины иммунорегуляторных индексов CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, численность лимфоцитов, экспрессирующих Fas/APO-1 рецептор (CD95), величины долей клеток, связывающих аннексин V. Для идентификации CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> Т-клеток проводили компьютерную обработку цитофлюориметрических измерений дискриминированных образцов лимфоцитов CD4FITC&CD25PE с помощью программы Win-MDI 2.8 (BD, США). В качестве “стратегии” логического ограничения региона CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup> Т-клеток использовали принцип, предложенный [6]. Статистическую обработку полученных цифровых результатов осуществляли методом вариационной статистики с применением

программных продуктов Excel 5.0, STATISTICA 6.0 в среде Microsoft. Определялось среднее значение ( $M$ ), стандартное отклонение ( $SD$ ) и достоверность статистических различий по  $t$ -критерию Стьюдента. В качестве тенденции к формированию достоверно значимых различий рассматривали те, для которых  $p$  превышал 0,05, но был менее 0,1.

**Результаты и их обсуждение.** Структура основных иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов у пациентов с дозовыми нагрузками на головной мозг от 0,022 мЗв до 24,3 мЗв, полученными в период внутриутробного развития, не отличалась от таковой в группе сравнения. Существенного влияния “фактора облучения” на дисперсию показателей, характеризующих содержание  $CD3^+CD4^+$  Т-лимфоцитов-хелперов и  $CD3^+CD8^+$  Т-лимфоцитов с супрессорной функцией в циркуляции, равно как и на величину соотношения этих клеток, выявлено не было (табл. 1).

Наибольшие изменения были установлены в структуре субпопуляции  $CD4^+$  Т-хелперов. Наблюдалась отчетливая тенденция к возрастанию содержания этих клеток с экспрессией на поверхности  $\alpha$ -цепи рецептора интерлейкина-2 ( $CD4^+CD25^{\text{total}}$  лимфоциты). Среди всех  $CD4^+CD25^+$  лимфоцитов доля естественных регуляторных Т-клеток ( $CD4^+CD25^{\text{bright}}$ ), характерным отличием которых является чрезвычайно высокая конститутивная экспрессия рецептора интерлейкина-2, составляла менее 1% и показала статистически значимое межгрупповое различие по показателю  $M \pm SD$  ( $p < 0,0001$ ). Значение соотношения  $CD4^+CD25^{\text{bright}}/CD4^+CD25^{\text{total}}$  Т-хелперов в группе пациентов с ВСД, подвергшихся радиационному воздействию в период внутриутробного развития, также было достоверно ниже по сравнению с аналогичным показателем в группе “необлученных” ( $p < 0,01$ ) (табл. 2). Эти данные могут свидетельствовать об иммуновоспалительной реакции в ЦНС,

Таблица 1. Качественные характеристики основных иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов ПК у обследованных пациентов с ВСД

Наименование показателя	Статистические значения показателей по группам исследования, ( $M \pm SD$ )	
	основная	сравнительная
Количество Т-хелперов ( $CD3^+CD4^+$ ), %	$35,57 \pm 7,98$	$37,98 \pm 10,58$
Количество Т-супрессоров ( $CD3^+CD8^+$ ), %	$31,63 \pm 6,81$	$32,55 \pm 7,42$
Соотношение $T_h/T_c$ , усл.ед.	$1,21 \pm 0,48$	$1,28 \pm 0,65$

Таблиця 2. Структура субпопуляции CD4<sup>+</sup> Т-хелперов ПК у обследованных пациентов с ВСД

Наименование показателя	Статистические значения показателей по группам исследования, (M±SD)	
	основная	сравнительная
Количество Т лимфоцитов-хелперов с экспрессией α-цепи рецептора интерлейкина-2	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>total</sup> клетки, %	3,38±2,32
	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>bright</sup> клетки, %	0,46±0,12*
Соотношение CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>bright</sup> /CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>total</sup> Т-хелперов, усл. ед.		0,17±0,12**
		0,38±0,16

Примечания: \* — различие значения показателя по отношению к значению в группе сравнения, p<0,001; \*\* — различие значения показателя по отношению к таковому в сравнительной группе, p<0,01.

опосредуемой активированными CD4+CD25low Т-клетками, с повышенным риском формирования аутоиммунной компоненты [7].

В популяциях лейкоцитов и лимфоцитов ПК пациентов с ВСД, подвергшиеся радиационному облучению в период внутриутробного развития, выявлено достоверно сниженное количество инициаторов апоптоза — Fas (CD95) положительных клеток (p<0,01 и p<0,0001, соответственно), которые по уровню поверхностно-мембранный экспрессии сигнальной молекулы CD95 имели фенотип CD45<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD33<sup>-</sup>CD95<sup>low</sup> (табл. 3).

В тесте с аннексином V уровень реализации апоптоза лимфоцитов ПК исследуемых лиц был средним (табл. 4). Сравнительный анализ до-

Таблица 3. Количество клеток с экспрессией Fas-антитела в популяциях ПК по группам исследования

Группа исследования	Содержание Fas-положительных клеток по популяциям, % (M±SD)	
	лейкоциты	лимфоциты
Основная	3,29±0,73*	0,39±0,10**
Сравнительная	4,48±0,78	1,04±0,29

Примечания: \* — различие значения показателя по отношению к значению в группе сравнения, p<0,01; \*\* — различие значения показателя по отношению к значению в сравнительной группе, p<0,0001.

Таблиця 4. Спонтанний рівень апоптоза/некроза лімфоцитів ПК по групам дослідження

Група дослідження	Ранній апоптоз по кількості аннексин- V <sup>+</sup> PI <sup>-</sup> лімфоцитів, %, (M±SD)	Поздній апоптоз по кількості аннексин- V <sup>+</sup> PI <sup>+</sup> лімфоцитів, %, (M±SD)	Некроз по кількості аннексин- V-PI <sup>+</sup> лімфоцитів, %, (M±SD)
Основна	10,14±1,93*	2,49±0,9**	6,19±1,15***
Сравнительна	11,65±1,91	3,95±1,33	2,15±0,59

Примечания: \* — различие значения показателя по отношению к значению в группе сравнения,  $p \leq 0,1$  (уровень тенденции); \*\* — различие значения показателя по отношению к таковому в сравнительной группе,  $p < 0,01$ ; \*\*\* — различие значения показателя по отношению к значению в сравнительной группе,  $p < 0,0001$ .

лей клеток, связывающих аннексин V, выявил статистически значимые межгрупповые различия значений показателей  $M \pm SD$ . Так, в группе лиц, облученных внутриутробно, содержание клеток, находящихся в ранней (аннексин V<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>) и поздней (аннексин V<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>) апоптотических фазах было сниженным с различным уровнем значимости ( $p \leq 0,1$  и  $p < 0,01$ , соответственно), тогда как процент некротических лимфоцитов в три раза превышал аналогичный показатель в группе сравнения ( $p < 0,0001$ ).

Такие отклонения в феномене апоптоза лімфоцитів ПК, так “Fas-рецепторная недостаточность”, “задержка” реализации на начальной стадии спонтанной апоптотической реакции с интенсивным конечным результатом в тесте с аннексином V в циркуляции, могут ассоциироваться с дисбалансом между уровнями мембрани і растворимої формами Fas-рецептора і з Fas-лігандом, чо, по даним літератури, являється возможним механизмом формування алергіческих і аутоімунних расстройств [8–11]. Ранее нами было показано, что в ПК рабочих зон ЧАЭС с эффективными дозами, не превышающими 15 мЗв, спонтанный мембранный FasL эффект достигается преимущественно за счет доли CD8<sup>+</sup> клеток, что также может быть свидетельством в пользу появления условий для развития (или персистенции) аллергического/аутоімунного воспаления [12]. Наиболее вероятное объяснение полученной картины могут дать исследования на молекулярно-генетическом и молекулярно-клеточном уровнях — от цитогенетических, как эпигеномных, так и мутационного плана, до

развития “немишеных” радиационно-индуцированных феноменов [13]. Так, к настоящему моменту появились доказательства гипотезы о том, что контакт “неспецифические Т-лимфоциты/bystander клетки” может временно блокировать  $\text{Ca}_2$ -зависимую передачу CD95—опосредованного апоптотического сигнала в целевые клетки [14].

**Вывод.** Установленные в группе пациентов, страдающих ВСД и имеющих дозовые нагрузки на головной мозг от 0,022 до 24,3 мЗв, полученные в период внутриутробного развития, нарушения в Fas-зависимом апоптозе лимфоцитов ПК и отклонения в структуре субпопуляции  $\text{CD4}^+$  Т-хелперов позволяют с большой вероятностью предполагать наличие иммунновоспалительного процесса в ЦНС, которое сопровождается снижением числа естественных регуляторных Т-лимфоцитов ( $\text{CD4}^+ \text{CD25}^{+bright}$ ) в ПК и их доли среди всех Т-хелперов, экспрессирующих  $\alpha$ -цепь рецептора интерлейкина-2 ( $\text{CD4}^+ \text{CD25}^{+total}$ ). Выявленные нарушения в совокупности могут быть определены как патогенетически значимые, и позволяют рассматривать “дефицит негативной иммунорегуляции” с повышенным риском развития аутоиммунных расстройств в числе других механизмов, формирующих патогенез ВСД у лиц, которые подверглись воздействию радиации внутриутробно. Характер этих нарушений — неспецифичен и отражает особенности комплекса иммунопатологических и иммуноморфологических проявлений, защитно-компенсаторных реакций иммунной системы, степени выраженности структурно-функциональной дезорганизации, которые определяются индивидуальной (генетически обусловленной) реактивностью и, в большей или меньшей мере, стадийностью иммунновоспалительного процесса в ЦНС. Развивающиеся структурно-функциональные изменения в иммунорегуляции и Fas-зависимом апоптозе лимфоцитов ПК можно рассматривать как механизм иммуномодулирующего действия “фактора облучения”.

#### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Effects of ionizing radiation. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation, UNSCEAR, 2006. Report to the General Assembly, with scientific annexes. — Vol. I; Vol. II: Scientific annexes C, D, E. United Nations sales publications E.08.IX.6 (2008); E.09.IX.5 (2009). — New York : United Nations, 2008, 2009.
2. Аклеев А. В. Реакции тканей на хроническое воздействие ионизирующего излучения / А. В. Аклеев // Радиац. биол. Радиоэкол. — 2009. — Т. 49, № 1. — С. 5–20.
3. Гриневич Ю. А. Иммунные и цитогенетические эффекты плотно- и редкоионизирующих излучений / Ю. А. Гриневич, Э. А. Демина ; под ред. А. А. Ярилина. — К. : Здоров'я, 2006. — 200 с.
4. Co-stimulatory pathways controlling activation and peripheral tolerance of human  $\text{CD4}^+ \text{CD28}^+$  T cells / W. Park, C. M. Weyand, D. Schmidt [et al.] // Eur. J. Immunol. — 2005. — Vol. 27(5). — P. 1082–1090.

5. Harness J. Increased levels of activated T-cells and reduced levels of CD4/CD25+ cells in peripheral blood of Guillain-Barré syndrome patients compared to controls / J. Harness, P. A. McCombe // J. Clin. Neuroscience. — 2008. — Vol. 15 (9). — P. 1031–1035.
6. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood / A. C. Baecher, J. A. Brown, G. J. Freeman [et al.] // J. Immunol. — 2001. — Vol. 167. — P. 1245–1253.
7. Glucocorticoid-induced TNF receptor-triggered T cells are key modulators for survival/death of neural stem/progenitor cells induced by ischemic stroke / M. Takata, T. Nakagomi, S. Kashiwamura [et al.] // Cell Death Differ. — 2012 . — Vol. 19(5). — P. 756–767.
8. Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis / L. A. O’ Reilly, L. Tai, L. Lee [et al.] // Nature. — 2009. — Vol. 461(7264). — P. 659–663.
9. Specific allergen induces Fas (CD95) and FasL (CD95L) expression on peripheral blood mononuclear cells from allergic subjects / T. Źak-Nejmark, J. Małolepszy, I. A. Nowak [et al.] // Centr. Eur. J. Immunol. — 2003. — Vol. 28, N 2. — P. 58–61.
10. Prevention of autoimmunity and control of recall response to exogenous antigen by Fas death receptor ligand expression on T cells / I. Mabrouk, S. Buart, M. Hasim [et al.] // Immunity. — 2008. — Vol. 29(6). — P. 922–933.
11. The naturally processed CD95L elicits a c-yes/calcium/Pi3K-driven cell migration pathway // S. Tauzin, B. Chaigne-Delalande, E. Selva [et al.] // PLoS Biol. — 2011. — Vol. 9(6). — P. e1001090.
12. Беляєва Н. В. Исследование частоты TCR-мутантных Т-хелперов и уровня иммунокомпетентных клеток с mFasL-маркером апоптоза при воздействии ионизирующего излучения // Лік. справа. — 2010. — № 5–6. — С. 82–87.
13. Trosko J. E. Adult stem cells, the Barker hypothesis, epigenetic events, and low-level radiation effects / J. E. Trosko, K. Suzuki // Radiation health risk sciences : Proceedings of the First International Symposium of the Nagasaki University Global COE Program “Global strategic center for radiation health risk control” / ed. M. Nakashima, N. Takamura, K. Tsukasaki [et al.]. — Springerlink, 2009. — Part 7. — P. 216–226.
14. The CD95 signaling pathway / A. Penna, N. Khadra, S. Tauzin [et al.] // Commun. Integr. Biol. — 2012. — Vol. 5(2). — P. 190–192.

Стаття надійшла до редакції 18.06.2012.

Н. В. Беляєва, Н. А. Голярник, О. А. Беляєв, О. Л. Мазниченко

Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини  
Національної академії медичних наук України”,  
вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна

**СУБПОПУЛЯЦІЇ РЕГУЛЯТОРНИХ Т-КЛІТИН І АПОПТОЗ  
ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ В ОСІБ, ОПРОМІНЕНІХ  
ВНУТРІШНЬОУТРОБНО В РЕЗУЛЬТАТИ АВАРІЇ НА ЧАЕС, ХВОРІХ  
У ВІДДАЛЕНОМУ ПЕРІОДІ НА ВЕГЕТОСУДИННУ ДИСТОНІЮ**

Метою дослідження було — встановити патогенетичну значущість змін у феномені апоптозу лімфоцитів периферичної крові (ПК) і статусі субпопуляцій регуляторних Т-клітин в осіб, опромінених внутрішньоутробно внаслідок аварії на ЧАЕС, які страждають у віддаленому періоді на вегетосудинну дистонію (ВСД). Обстежено дві групи пацієнтів з ВСД — внутрішньоутробно опромінені з дозовими навантаженнями на головний мозок від 0,022 мЗв до 24,3 мЗв (основна) і неопромінені

(порівняльна); всього 48 осіб, які народилися в період з 26 квітня 1986 року по 26 лютого 1987 року. Всім пацієнтам було проведено імунофенотипування і дослідження апоптозу лімфоцитів ПК за експресією CD95 та у тесті з анексином V методом проточноЯ цитометрії. Сукупність виявлених порушень в структурі субпопуляції CD4<sup>+</sup> T-хелперів та апоптозі лімфоїдних клітин дозволяє запідозрити наявність імунозапального процесу в ЦНС, вважати зниження кількості природних регуляторних Т-клітин і зміни Fas-залежного апоптозу лімфоцитів патогенетично значущими для ВСД та розглядати “дефіцит негативної імунорегуляції” з підвищеним ризиком розвитку аутоімунних розладів в числі інших механізмів, що формують патогенез ВСД у осіб, які зазнали радіаційного впливу внутрішньоутробно.

**Ключові слова:** аварія на ЧАЕС, опромінені внутрішньоутробно, апоптоз, регуляторні Т-лімфоцити.

N. V. Belyaeva, N. A. Golyarnik, O. A. Beliaev, O. L. Maznichenko

State Institution “National Research Center for Radiation Medicine  
of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”,  
Melnykov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

**REGULATORY T-CELLS SUBPOPULATIONS AND APOPTOSIS  
OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PERSONS EXPOSED  
IN UTERO AS A RESULT OF THE CHORNOBYL ACCIDENT,  
WITH VEGETOVASCULAR DYSTONIA IN REMOTE PERIOD**

The aim of the study was to reveal the pathogenetic significance of changes in the phenomenon apoptosis of peripheral blood (PB) lymphocytes and in status of subpopulations of regulatory T cells in persons exposed in utero as a result of the Chornobyl accident with vegetovascular dystonia (VVD) in remote period. Two groups of patients with VVD — prenatally exposed with doses to the brain from 0.022 mSv to 24.3 mSv (the main study group) and non-irradiated (the comparative study group) were included in the study; 48 persons in total who were born between April 26, 1986 to February 26, 1987. All patients carried out immunophenotyping and study of apoptosis of lymphocytes by CD95 expression and in Annexin V assay by flow cytometry. The set of identified changes in the structure of the subpopulation of CD4 T-helper and apoptosis of lymphocyte suggests the presence of immuno-inflammatory process in the CNS, allows us to assume that the decrease of natural regulatory T cells and disturbance of Fas-dependent apoptosis of lymphocytes in VVD are of pathogenetic significance. “Deficiency of negative immunoregulation” with an increased risk of autoimmune disorders can be considered among other mechanisms in the pathogenesis of VVD in patients who had been exposed in utero.

**Key words:** accident at Chornobyl, radiation-exposed in utero, apoptosis, regulatory T cells.