

УДК 575.113:577.21:616.155:616-001.28

І. М. Ільєнко✉

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

РОЛЬ ГЕНА *VEGF-A* У ФОРМУВАННІ ВІДДАЛЕНИХ ЕФЕКТІВ ОПРОМІНЕННЯ ПІСЛЯ ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ КАТАСТРОФИ

Мета. Охарактеризувати особливості експресії гена *VEGF-A* та його основні ефекти відносно клітин імунної системи учасників ліквідації наслідків аварії (УЛНА) на ЧАЕС.

Матеріали і методи. Проведено оцінку зміни рівня експресії гена *VEGF-A* у лейкоцитах периферичної крові 55 осіб методом полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі та імунофенотипування імунокомпетентних клітин.

Результати. Встановлені порушення у регуляції неоангіогенезу у віддаленому періоді після опромінення. Визначено підвищений рівень експресії гена *VEGF-A*, що корелює з експресією гена *TP53* у групі УЛНА на ЧАЕС. Встановлений зв'язок між відсотком імунорегуляторних субпопуляцій Т-клітин та експресією *VEGF-A* в групі опромінених осіб та продемонстровано пригнічення специфічної імунної відповіді CD4⁺8⁺ Т-клітин. Встановлено кореляційну залежність між відсотком CD4⁺25⁺ клітин та дозою опромінення у групі УЛНА на ЧАЕС, яка не пов'язана з експресією *VEGF-A*, що дає підстави охарактеризувати такий тип імунологічного реагування як прояв віддалених ефектів після опромінення.

Висновки. Визначено ряд показників, які характеризують стан та порушення у системі “імунітет-ангіогенез” та можуть бути перспективними у прогнозуванні пухлинного процесу у віддаленому періоді після опромінення.

Ключові слова: Чорнобиль, іонізуюча радіація, експресія гена *VEGF-A*, імунна система.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2013. Вип. 18. С. 190–199.

І. М. Ільєнко✉

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

Role of *VEGF-A* gene in the formation of late effects after the Chernobyl accident

Objective. To characterize the *VEGF-A* gene expression and its main effects on immune cells in the Chernobyl NPP accident clean-up workers.

Materials and Methods. *VEGF-A* gene expression and its main effects on immune cells were studied in 55 persons by a real-time PCR analysis and immunophenotyping of immune competent cells.

Results. Disorders of regulation of neoangiogenesis were found in remote period upon radiation exposure. Elevated levels of *VEGF-A* gene expression correlated with TP53 gene expression in the ChNPP accident clean-up workers. Correlation was established between the percentage of the immunoregulatory T-cell subpopulations and *VEGF-A* expressing in the group of exposed persons and there was demonstrated a suppression of specific immune response of CD4⁺8⁺ T cells. Correlation between the percentage of CD4⁺25⁺ cells and radiation dose in a group of Chernobyl clean-up workers is not related to *VEGF-A* expression, so this type of immune response can be regarded as a manifestation of long-term effects after exposure.

Conclusions. Some parameters were identified characterizing the state and abnormalities of the “immunity-angiogenesis” system. Those parameters could be promising in prediction of neoplastic process in remote period upon radiation exposure.

Key words: Chernobyl, ionizing radiation, *VEGF-A* gene expression, immune system.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2013;18:190–199.

✉ Ільєнко Ірина Миколаївна, e-mail ilyenko@ukr.net

© Ільєнко І. М., 2013

Ангіогенез має важливе значення в реалізації багатьох фізіологічних процесів, розвитку патологічних станів, а також регенеративній медицині. Клітини імунної системи є не тільки продуцентами ангіогенних факторів, але й мішенями для їх дії, а також регуляторами ангіогенезу [1]. Одним із основних ангіогенних факторів є VEGF – ендотеліальний фактор росту судин. Родина VEGF представлена п'ятьма основними факторами VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D та плацентарним фактором росту. Найбільш значущим та багатофункціональним є VEGF-A, який може стимулювати як фізіологічний, так і патологічний ангіогенез і є лігандом для двох рецепторів тирозинкінази VEGFR-1 (Flt-1) і VEGFR-2 (KDR/Flk-1). При зв'язуванні ліганда з рецептором відбувається його димеризація з наступною активацією каталітичної активності. Більшість біологічних функцій VEGF-A опосередковані через VEGFR-2, в той час як роллю VEGFR-1, сьогодні вважається, є негативна регуляція (блокування зв'язування VEGF з VEGFR-2). VEGF-C та VEGF-D, але не VEGF-A, є лігандами для третього рецептора (VEGFR-3), який є посередником лімфангіогенезу [1, 2].

Результати наукових досліджень підтверджують, що роль VEGF виходить за рамки васкуляризації. VEGF виконує імунорегуляторні функції, впливає на гемопоез, диференціювання та дозрівання дендритних клітин, а також Т- і В-лімфоцитів. Існує небагато відомостей, щодо фізіологічної ролі VEGF у відсутності будь-яких ушкоджень. Виявлено постійний синтез фактора росту в багатьох органах та тканинах, у тому числі в органах імунної системи [3]. Оскільки для здійснення практично всіх своїх функцій клітини імунної системи безпосередньо контактують із ендотелієм, як на шляху з кров'яного русла у тканини, так і на виході з тканин у лімфатичну систему, VEGF необхідно розглядати як важливий фактор фізіологічної імунорегуляції. В нормі вміст ендотеліального фактора є незначним, однак експресія VEGF зростає при стимуляції гіпоксією або активації деяких онкогенів. Клітинний кисневий дефіцит активує виробництво гіпоксія-індукованого фактора (HIF). HIF стимулює вивільнення циркулюючого VEGF, який потім зв'язується з VEGF рецептором на клітинах ендотелію, викликаючи активацію тирозинкіназних шляхів, що ведуть до ангіогенезу. α HIF1 і β HIF1 виробляються постійно, але α HIF1 надзвичайно нестійкий до кисню, і в аеробних умовах відбувається його деградація. Коли клітина стає гіпоксичною, α HIF1

Angiogenesis is essential in many physiological processes, development of pathological conditions, as well as in the regenerative medicine. Immune cells are not only the producers of angiogenic factors, but also the targets of their actions, as well as regulators of angiogenesis [1]. VEGF – the vascular endothelial growth factor is one of the major angiogenic factors. Family of VEGF proteins represents five major factors VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D and the placental growth factor. VEGF-A is the most significant and multifunctional one and can stimulate both physiological and pathological angiogenesis being a ligand for the two receptors of tyrosine kinase VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Binding of ligand to the receptor leads to its dimerization with subsequent activation of catalytic activity. Most of the biological functions of VEGF-A are mediated by VEGFR-2, whereas the role of VEGFR-1 now is considered to be a negative regulation (blocking the binding of VEGF with VEGFR-2). VEGF-C and VEGF-D, but not VEGF-A, are the ligands for the third receptor (VEGFR-3), which is a messenger within limphoangiogenesis [1, 2].

Research findings suggest the role of VEGF beyond vascularization. VEGF performs immunoregulatory functions, affects hematopoiesis, differentiation and maturation of dendritic cells and T- and B-lymphocytes. There is little information about the physiological role of VEGF in the absence of any damage. A constant growth factor synthesis is detected in many organs and tissues, including organs of the immune system [3]. As for almost all their functions the immune cells are in direct contact with endothelium, both on the way from the bloodstream into tissues and under output from the tissues of the lymphatic system, the VEGF should be considered as an important factor in physiological immunoregulation. Normally the content of endothelial factor is negligible, but the expression of VEGF increases when stimulated by hypoxia or activation of certain oncogenes. Cellular oxygen deficiency activates the production of hypoxia-induced factor (HIF). HIF stimulates the release of circulating VEGF, which then binds to VEGF receptor on endothelial cells causing activation of tyrosine kinase pathways leading to angiogenesis. α HIF1 and β HIF1 are produced constantly, but α HIF1 is extremely unstable to oxygen and undergoes degradation in aerobic conditions. When a cell becomes hypoxic the α HIF1

зберігається, і комплекс HIF1 α / β стимулює вивільнення VEGF [1, 2].

Клітини імунної системи здатні секретувати VEGF та регулювати процеси ангіогенезу. З іншого боку, вони мають специфічні рецептори для розпізнавання VEGF та можуть підлягати його дії, наприклад, при рості пухлин. Відомо, що за наявності пухлини рівень циркулюючого VEGF може значно зростати, а також спостерігаються істотні зміни гемо- та лімфопоезу на рівні кісткового мозку і тимусу. Підвищена експресія VEGF створює підґрунтя для розвитку імунodefіциту та може бути першим кроком у процесі метастазування раку. З іншого боку, клітини, які експресують активований p53, секретують білкові фактори, які пригнічують ангіогенез. Підвищена експресія p53 призводить до репресії транскрипції генів VEGF та HIF1 при одночасній активації гена антиангіогенного фактора тромбоспондину1, який в свою чергу, зв'язуючи специфічні рецептори на поверхні ендотеліоцитів, викликає апоптоз [4, 5]. Таким чином, клітини з активованим p53 гірше переносять нестачу кисню, перестають секретувати VEGF та починають секретувати інгібітори ангіогенезу, що перешкоджає утворенню нових судин [6, 7].

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Метою дослідження було визначити особливості експресії гена *VEGF-A* та його основні ефекти відносно клітин імунної системи УЛНА на ЧАЕС.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Сформовані дослідні групи: контрольна група – 12 практично здорових осіб (середній вік – 51,0 \pm 5,06 років, M \pm SD), основна група – 55 учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС 1986–1987 рр., опромієних в інтервалі доз від 0,01 до 2,8 Зв (середній вік – 57,0 \pm 7,4 років, M \pm SD).

Визначення відносного рівня експресії генів *VEGF-A* та *TP53* проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Виділення тотальної РНК проводили з лейкоцитів периферичної крові за допомогою автоматичної станції QIAcube (QIAGEN, Germany) для виділення нуклеїнових кислот та набору для виділення РНК – NucleoSpinRNAII (Macherey-Nagel, Germany). Синтез комплементарної ДНК (кДНК) із зразків виділеної РНК проводився із використанням HighCapacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). Ампліфікація кДНК проводилась на базі роботизованої станції 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) із

is preserved, and a set of HIF1 α / β stimulates the release of VEGF [1, 2].

Cells of the immune system are able to secrete VEGF and regulate the process of angiogenesis. On the other hand they have specific receptors for VEGF detection and may be subject to its action e.g. such as tumor growth. It is known that in the presence of tumor the circulating levels of VEGF can significantly increase, and there are significant changes in hemo- and lymphopoiesis at the level of the bone marrow and thymus. Increased VEGF expression forms the basis for development of immunodeficiency and may be the first step in the process of cancer metastasing. In addition the cells expressing activated p53 secrete the protein factors that inhibit angiogenesis. Increased expression of p53 leads to repression of VEGF and HIF1 gene transcription with a simultaneous activation of gene of thrombospondin 1 antiangiogenic factor which in its turn binds to specific receptors on the surface of endothelial cells inducing the apoptosis [4, 5]. Thus the cells with activated p53 worse tolerate the oxygen deficiency, cease to secrete VEGF and begin to secrete angiogenesis inhibitors that prevent the formation of new blood vessels [6, 7].

OBJECTIVE

To determine the characteristics of the *VEGF-A* gene expression and its main effects on the subsets of immune cells in ChNPP accident clean-up workers.

MATERIALS AND METHODS

The control group of 12 healthy individuals (mean age 51.0 \pm 5.06 (M \pm SD)) and the main group – 55 cleanup workers of the Chernobyl accident of 1986–87 period exposed to doses ranging from 0.01 to 2.8 Sv (mean age 57.0 \pm 7.4) were the studied population.

Assay of a level of relative expression of genes *VEGF-A* and *TP53* was performed using a real time polymerase chain reaction. Total RNA extraction was performed from the peripheral blood leukocytes using QIAcube robotic workstation (QIAGEN, Germany) and NucleoSpinRNAII kit for nucleic acid purification (Macherey-Nagel, Germany). Synthesis of complementary DNA (cDNA) from RNA samples was done using HighCapacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). Amplification of cDNA was performed using 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)

застосуванням наборів TagMan. Експресію генів стандартизували відносно експресії гена 18S рибосомальної субодиниці та β -субодиниці актину як ендogenous контролю. Аналіз отриманих даних проводили за допомогою програмного забезпечення SDS 2.3. Показники відносного рівня генної експресії (RQ) розраховували за допомогою $2^{-\Delta\Delta Ct}$ методу, де $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{ref}})_{\text{control}} - (Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{ref}})_{\text{irradiated}}$.

Визначення імунологічних показників проводилось методом прямої імуофлуоресценції. Панель антитіл включала: CD3/19, CD4/8, CD3/HLA-DR, CD3/16/56 та додатково: CD4/25, CD3/4. Аналіз проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі FACScan (Becton Dickinson, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведеного аналізу у групі УЛНА зафіксований підвищений рівень експресії гена *VEGF-A* порівняно з контролем. Показники відносного рівня експресії гена *VEGF-A* – RQ становили: контрольна група – $0,23 \pm 0,12$ (M \pm SD), група УЛНА – $1,34 \pm 1,84$ (M \pm SD), ($p < 0,04$). Для визначення залежності експресії гена *VEGF-A* від радіаційного фактора був проведений кореляційний аналіз. Встановлений слабкий рівень кореляції: $r = 0,18$. Незважаючи на те, що чіткої залежності між показниками RQ *VEGF-A* та дозою нами не встановлено, внесок радіаційної компоненти очевидний. Це є предметом дослідження та знаходить підтвердження в роботах інших авторів, оскільки ідентифікація підписів генів, які пов'язані із радіаційним фактором та відповідають за радіочутливість, з'ясування задіяних сигнальних шляхів сьогодні залишаються предметом обговорення. Дослідження механізму регулювання експресії *VEGF* іонізуючим випромінюванням на трьох людських клітинних лініях гліобластом показало, що регуляція гіперекспресії *VEGF* відбувається за участі позаклітинних сигнал-регульованих кіназ ERK1/2 опосередковано через активатор білка AP-1, що може призвести до подальшої неоваскуляризації і проліферації клітин гліобластоми, стійкої до радіаційної терапії [8].

Іншими дослідниками були отримані дані генної експресії з чотирьох платформ мікрочіпів, на лінії ракових клітин NCI-60. Були застосовані дані виживаності фракції після опромінення 2 Гр для визначення радіочутливості та модель лінійної регресії для виявлення генів або генних комплексів з кореляцією між експресією і радіочутливістю. Автори вважають, що інтегрини, VEGF, MAPK, p53, які були гіперекспресовані, та JAK-STAT і Wnt-сигнальні

and TagMan technology. Gene expression was standardized relatively to the 18S-ribosomal subunit and actin β -subunit applied as an endogenous control. Analysis of the received data was performed using the SDS 2.3 software. Relative quantification (RQ) of gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, where $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{ref}})_{\text{control}} - (Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{ref}})_{\text{irradiated}}$.

Studies of immunological parameters were performed by immunofluorescence test. The panel of antibodies included CD3/19, CD4/8, CD3/HLA-DR, CD3/16/56 and additionally CD4/25, CD3/4. Analysis was performed by flow cytometry FACScan (Becton Dickinson, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

In the group of Chernobyl cleanup workers the elevated levels of *VEGF-A* gene expression were found compared with control. The RQ parameters for *VEGF-A* were as follows: control group – 0.23 ± 0.12 , a main group – 1.34 ± 1.84 , ($p < 0.04$). To determine the dependence of the *VEGF-A* gene expression on a radiation factor the correlation analysis was performed. Low correlation level was set i.e. $r = 0.18$. Despite the fact that we have determined no clear correlation between RQ *VEGF-A* data and the radiation dose the contribution of radiation components is obvious. This is the subject of research and being supported in the works of other authors, as the identification of gene signatures that are associated with radiation factor and responsible for radiosensitivity and the determination of signaling pathways involved remains an issue of a debate. Investigation of the mechanism of regulation of *VEGF* expression by ionizing radiation in three glioblastoma human cell lines showed that regulation of *VEGF* overexpression is associated with the participation of extracellular signal-regulated protein kinases ERK 1/2 mediated through an activator protein AP-1, which may lead to subsequent neovascularization and proliferation of glioblastoma cells resistant to radiation therapy [8].

Other investigators have obtained the gene expression data from four microarray platforms using the NCI-60 cancer cell line. To determine the radiosensitivity data were used the survival fraction values after 2 Gy irradiation and linear regression model to identify the genes or gene complexes with correlation of expression and radiosensitivity. The authors suggest that integrins, VEGF, MAPK, p53 (overexpression detected), JAK-STAT and Wnt-signaling

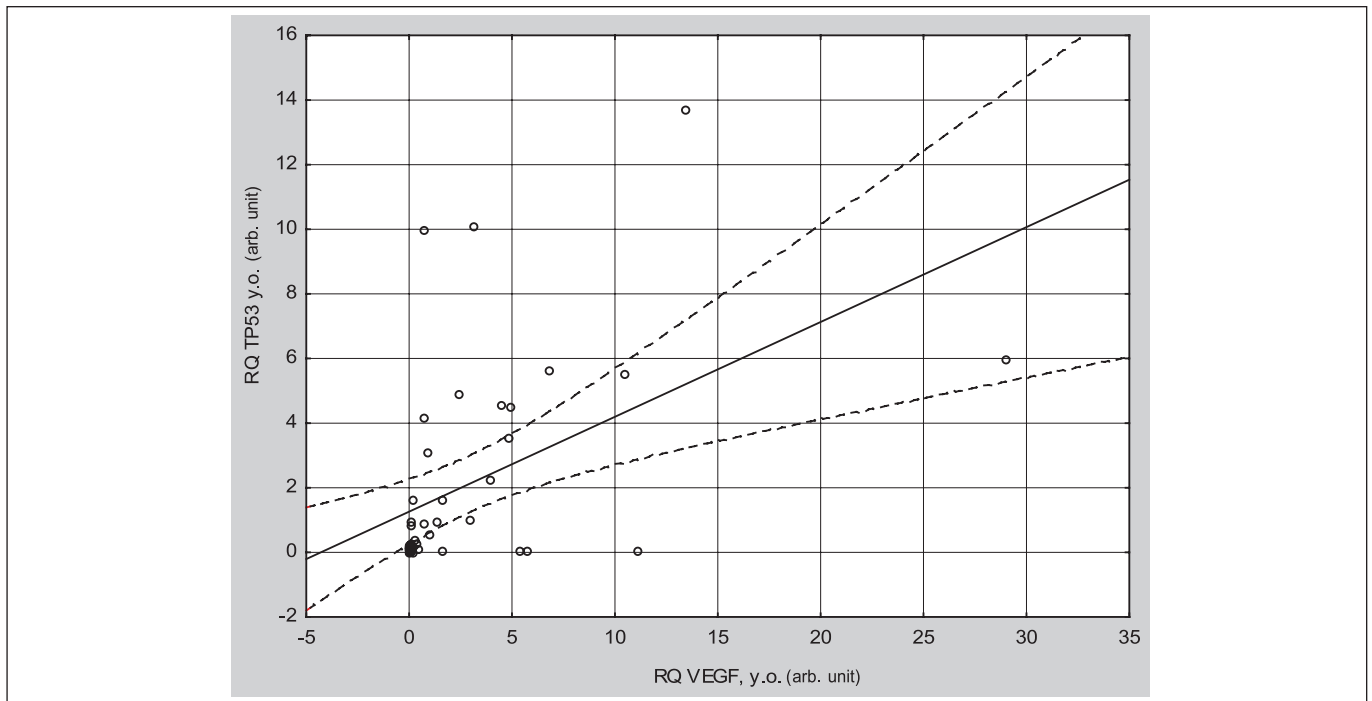


Рисунок 1. Кореляційна залежність між генами *VEGF* та *TP53* експресованих у лейкоцитах периферичної крові УЛНА на ЧАЕС

Figure 1. Correlation of *VEGF* and *TP53* gene expression in peripheral blood leukocytes of the Chernobyl NPP accident clean-up workers.

шляхи, є кандидатами у біомаркери радіочутливості і що сигнал через молекули адгезії може бути мішенню для радіосенсибілізації [9]. Інша група авторів припустили, що індуковані іонізуючим випроміненням судинні порушення пов'язані з дефектами ендотеліальних клітин-попередників (ЕРС), які відповідають за судинний гомеостаз. Після опромінення ЕРС були виснажені, що супроводжувалося зниженням функції ангиогенезу як *in vitro* так і *in vivo*. При такій реакції на стрес, опосередкованій іонізуючим випроміненням, зростала експресія p21Cip1 і знижувалась експресія *VEGF*, що було пов'язано з p53 транскрипційною активністю [10].

Ангиогенез відіграє важливу роль у розвитку пухлин. Значне місце серед негативних регуляторів ангиогенезу займає білок p53, який окрім функцій пухлинного супресора та “охоронця геному” відіграє важливу роль у регуляції новоутворення судин, оскільки зменшує експресію інгібіторів ангиогенезу [11]. Поряд з цим білок p53 може опосередковано регулювати експресію *VEGF*, як через протоонкоген c-Src, так і при безпосередній взаємодії з транскрипційним фактором Sp1, перешкоджаючи таким чином активації промотора цього гена. Показано, що мутаційні зміни гена *TP53* призводять до одночасного підвищення експресії c-Src та мРНК *VEGF* у хворих на рак молочної залози, товстого кишечника і рак яєчника [12].

pathways are candidates for biomarkers of radiosensitivity and the signal via adhesion molecules may be a target for radiosensitization [9]. Another group of authors have suggested that radiation-induced vascular disorders are associated with defects in endothelial progenitor cells (EPC), which are responsible for vascular homeostasis. After irradiation the EPC were exhausted, which was associated with decreased function of angiogenesis both *in vitro* and *in vivo*. In such stress reactions mediated by ionizing radiation the expression of p21Cip1 increased and expression of *VEGF* decreased, which was associated with p53 transcriptional activity [10].

Angiogenesis plays an important role in the development of tumors. Protein p53 is an important negative regulators of angiogenesis, which functions as a tumor suppressor and the “genome guardian” but also plays an important role in regulation of vascular neogenesis, because it reduces the expression of inhibitors of angiogenesis [11]. In addition, the p53 protein may indirectly regulate *VEGF* expression both through the proto-oncogene c-Src and a direct interaction with transcription factor Sp1, thus preventing activation of the promoter of this gene. It was shown that the *TP53* gene mutations result in a growth of c-Src and *VEGF* mRNA expression in patients with breast, colon and ovarian cancer [12].

Нами проведено дослідження експресії гена *TP53* у лейкоцитах периферичної крові УЛНА на ЧАЕС. Достовірної різниці порівняно з контролем не встановлено, однак середні значення RQ *TP53* у дослідній групі ($M=1,39$) були вищі контрольних ($M=0,43$). Також виявлений високий рівень кореляції між показниками відносного рівня експресії генів *VEGF-A* та *TP53* (рис. 1). Коефіцієнт кореляції Пірсона становив $r=0,48$ ($p<0,05$).

Підвищений рівень експресії може бути непрямим доказом мутаційних змін гена *TP53*, а у поєднанні з підвищеною експресією *VEGF-A* може свідчити про порушення реципрокних зв'язків між цими генами та свідченням порушень у регуляції неоангіогенезу у віддаленому періоді після опромінення. Поряд з цим існує припущення, що підвищений вміст ендотеліального фактора росту судин створює підґрунтя для розвитку імунodefіциту та сприяє тому, що пухлина ухиляється від імунного нагляду [1, 13]. Взаємодія процесів ангіогенезу із специфічною імунною відповіддю не вивчена, однак описана здатність Т-лімфоцитів людини та тварин синтезувати *VEGF* [14]. Синтез та продукція *VEGF* периферичними Т-лімфоцитами може підвищуватись при патологічних станах або в умовах пухлинного росту у людей та тварин [15].

При дослідженні показників клітинного імунітету нами встановлено зв'язки параметрів субпопуляційного складу Т-клітин із експресією *VEGF-A* у групі опромінених осіб. Виявлені позитивний кореляційний зв'язок між відносним рівнем експресії *VEGF-A* та кількістю $CD4^{+8-}$ та негативний – між відносним рівнем експресії *VEGF-A* та вмістом $CD4^{+8+}$ клітин Т-лімфоцитів (рис. 2). Коефіцієнти кореляції становили: $r=0,37$ ($p<0,05$) та $r=-0,33$ ($p<0,05$), відповідно. Такі дані підтверджують тісний зв'язок фактора росту судинного ендотелію та, відповідно, ангіогенезу з активацією клітинного імунітету у віддаленому періоді після опромінення.

Імунологічна недостатність, яка супроводжує патологічні процеси, в тому числі й пухлинний ріст, пов'язана з активацією Т-регуляторних $CD4^{+25+}$ клітин в організмі. Нами встановлена чітка кореляційна залежність між відсотком $CD4^{+25+}$ клітин та дозою опромінення у групі УЛНА на ЧАЕС (рис. 3), що дає підстави охарактеризувати такий тип імуннологічного реагування як прояв віддалених ефектів після опромінення. Коефіцієнт кореляції становив $r=0,35$ ($p<0,05$).

Поряд з цим слід врахувати імуномодулюючий ефект *VEGF*, в тому числі його здатність впливати

We studied the *TP53* gene expression in peripheral blood leukocytes of the ChNPP accident cleanup workers. No significant difference vs. control was found, but the average values of RQ *TP53* in the main group ($M=1.39$) were higher than control values ($M=0.43$). We also found high correlations between RQ data for *VEGF-A* and *TP53* (Fig. 1). Pearson's correlation coefficient was $r = 0.48$ ($p<0.05$).

Elevated expression may be an indirect evidence of mutational changes in gene *TP53* and in conjunction with increased *VEGF-A* expression may indicate to a violation of reciprocal relationships between these genes and in neoangiogenesis regulation in the remote period after irradiation. Along with that there is an assumption that high content of vascular endothelial growth factor is the basis for immunodeficiency development and promotes tumor evading the immune surveillance [1, 13]. Interaction of angiogenesis processes with a specific immune response has not been studied but the ability of human and animal T cells to synthesize *VEGF* was described [14]. Synthesis and production of *VEGF* by peripheral T-cells may increase in pathological conditions or under tumor growth in humans and animals [15].

We have established a relationships of the T-cell subsets parameters with *VEGF-A* expression in the group of individuals exposed to radiation. Positive correlation was demonstrated between the *VEGF-A* RQ and the number of $CD4^{+8-}$ and negative – between the *VEGF-A* RQ and $CD4^{+8+}$ T-cell percentage (Fig. 2). The correlation coefficients were: $r=0.37$ ($p<0.05$) and $r=-0.33$ ($p<0.05$) respectively. These data confirm the close relationship of a vascular endothelial growth factor and angiogenesis followed by activation of cellular immunity in the remote period after radiation exposure.

Immune system insufficiency that accompanies the pathological processes, including tumor growth, is associated with the activation of T-regulatory $CD4^{+25+}$ cells in vivo. We found a clear correlation between the percentage of $CD4^{+25+}$ cells and radiation dose in the main group (Fig. 3), supposing such type of immune response as a manifestation of long-term effects after irradiation. The correlation coefficient was $r = 0.35$ ($p<0.05$).

At the same time the immunomodulatory effect of *VEGF* should be considered, including its ability to

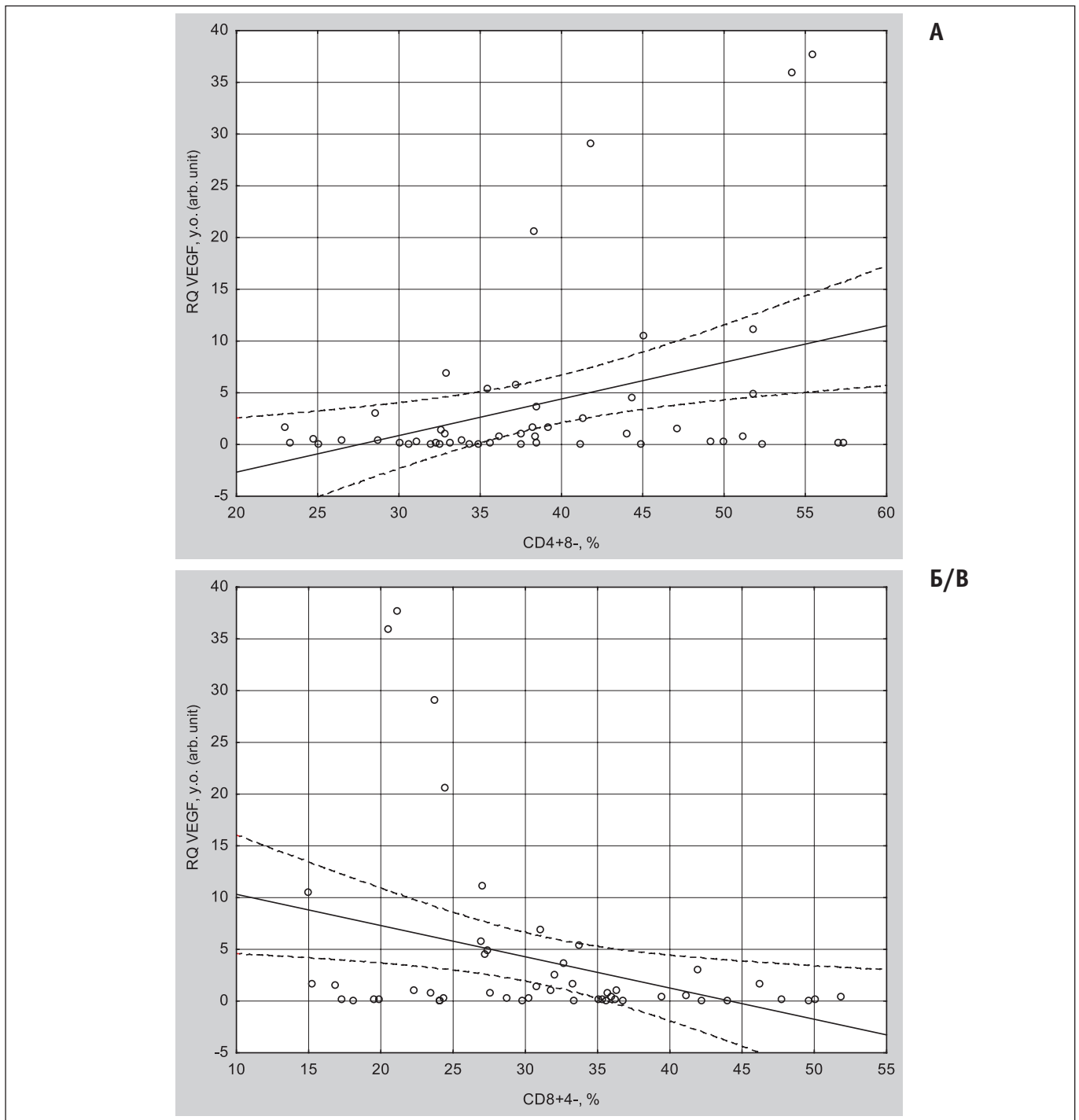


Рисунок 2. Кореляційна залежність експресії гена VEGF-A та відносною кількістю CD4+8- (А) та CD4+8+ (Б) клітин у периферичній крові УЛНА на ЧАЕС

Figure 2. Correlation of the VEGF-A gene expression and the number of CD4+8- (A) and CD4+8+ (B) cells in peripheral blood of the Chernobyl NPP accident clean-up workers

на проліферацію IL-2 залежних Т-лімфоцитів периферичної крові людини [1]. Незважаючи на те, що існує припущення, що *VEGF* бере участь у формуванні цього типу імунологічного реагування, нами не було встановлено залежності між змінами в експресії ендотеліального фактора росту та вмістом CD4⁺25⁺ клітин у периферичній крові УЛНА на ЧАЕС.

influence the proliferation of IL-2-dependent T-lymphocytes of human peripheral blood [1]. Despite the supposition that *VEGF* is involved in the formation of this type of immune response, we have found no relationship between changes in the expression of endothelial growth factor and content of CD4⁺25⁺ cells in peripheral blood of the Chernobyl clean-up workers.

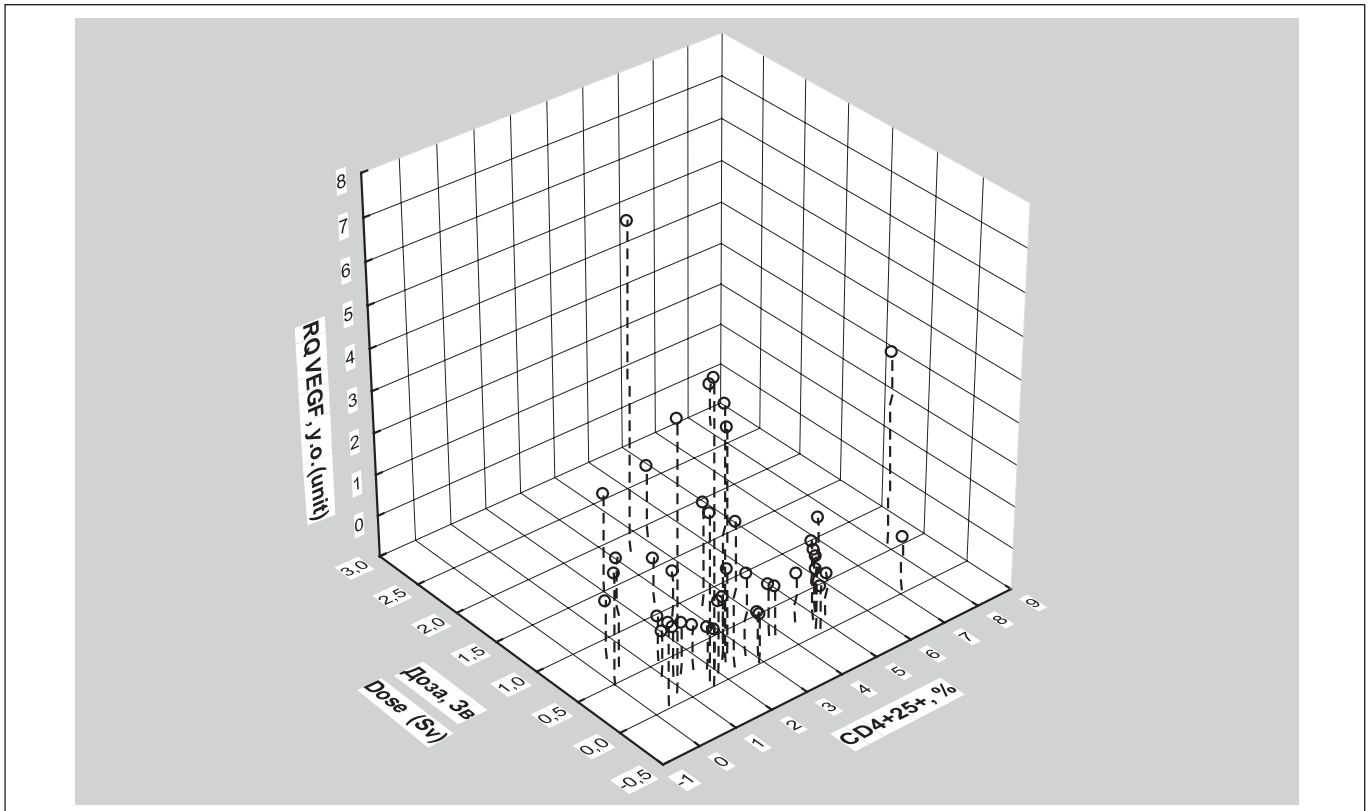


Рисунок 3. Кореляційна залежність: експресія гена VEGF vs відносна кількість CD4+25+ vs доза опромінення

Figure 3. Correlation dependence: VEGF gene expression vs. percentage of CD4+25+ vs radiation dose

ВИСНОВКИ

У результаті проведеної роботи визначено ряд порушень у регуляції неоангіогенезу у віддаленому періоді після опромінення. Встановлено підвищений рівень експресії гена *VEGF-A*, що корелює з експресією гена *TP53* у групі УЛНА на ЧАЕС. Слід зазначити, що зміни експресії ендотеліального фактора росту можуть бути пов'язані з наявністю ряду патологічних станів, зокрема цереброваскулярною патологією, однак внесок радіаційного фактору є очевидним і несе додаткове навантаження у зміни відносного рівня експресії *VEGF-A*. Встановлено зв'язки імунорегуляторних субпопуляцій Т-клітин із експресією *VEGF-A* в групі опромінених осіб та продемонстровано негативну кореляційну залежність з відносною кількістю CD4-8⁺ субпопуляції Т-клітин; позитивну кореляційну залежність між відсотком CD4⁺25⁺ клітин та дозою опромінення, що дає підстави охарактеризувати такий тип імунологічного реагування як прояв віддалених ефектів після опромінення.

Таким чином, визначено ряд показників, які характеризують стан та порушення у системі імунітет-ангіогенез та можуть бути перспективними у якості прогностичного маркера пухлинного процесу у віддаленому періоді після опромінення.

CONCLUSIONS

As a result of this work we have identified a number of disorders of neoangiogenesis regulation in the remote period after the radiation exposure. Elevated levels of *VEGF-A* gene expression correlate with *TP53* gene expression in a group of the ChNPP accident clean-up workers. It should be noted that abnormalities in the expression of endothelial growth factor may be associated with the presence of a number of pathological conditions, including cerebrovascular disease, but the contribution of a radiation factor is clear and carries an additional burden on the changing level of *VEGF-A* relative expression. Relationships of some T-cell subsets with *VEGF-A* gene expression in the group of exposed individuals are demonstrated with a negative correlation with the number of CD4-8⁺ subset of T cells and a positive correlation between the percentage of CD4⁺25⁺ cells and radiation dose.

Therefore, number of parameters that characterize the condition and violations in the system “immunity–angiogenesis” was identified being promising as a prognostic marker of tumorigenesis in the remote period after irradiation.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Фактор роста сосудистого эндотелия и иммунная система / Е. П. Киселева, А. В. Крылов, Э. А. Старикова, С. А. Кузнецова // *Успехи современной биологии*. – 2009. – Т. 129, № 4. – С. 1–12.
2. VEGF receptor signaling – in control of vascular function / A-K. Olsson, A. Dimberg, J. Kreuger, L. Claesson-Welsh // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2006. – Vol. 7. – P. 359–371.
3. Marti H. H. System hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptor / H.H. Marti, W. Risau // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 15809–15814.
4. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1 / K. M. Dameron, O. V. Volpert, M. A. Tainsky, N. Bouck // *Science.* – 1994. – Vol. 265. – P. 1582–1584.
5. p73 overexpression increases VEGF and reduces thrombospondin-1 production: implications for tumor angiogenesis / F. Vikhanskaya, M. R. Bani, P. Borsotti, C. Ghilardi // *Oncogene.* – 2001. – Vol. 20, No. 50. – P. 7293–7300.
6. Копнин Б. П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза / Б. П. Копнин // *Биохимия.* – 2000. – Т. 65. – С. 5–33.
7. Чумаков П. М. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью / П. М. Чумаков // *Биохимия.* – 2000. – Т. 65. – С. 34–47.
8. Mitogen-activated protein kinase, ERK1/2, is essential for the induction of vascular endothelial growth factor by ionizing radiation mediated by activator protein-1 in human glioblastoma cells / K. Mori, M. Tani, K. Kamata [et al.] // *Free Radic. Res.* – 2000. – Vol. 33. – P. 157–166.
9. Identification of a radiosensitivity signature using integrative meta-analysis of published microarray data for NCI-60 cancer cells / H. S. Kim, S. C. Kim, S. J. Kim [et al.] // *BMC Genomics.* – 2012. – Vol. 13. – P. 348.
10. In vitro ultraviolet A irradiation decreases both release ability and gene-expression of vascular endothelial growth factor-A from mast cells / G. Delfino, L. Di Costanzo, A. de Paulis [et al.] // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* – 2012. – Vol. 28. – P. 165–168.
11. Експресія p53, VEGF та CD34 у пухлинній тканині та виживаність хворих на серозний рак яєчника / Л. Г. Бучинська, В. М. Грінкевич, Н. П. Юрченко, Л. І. Воробйова // *Онкологія.* – 2009. – Т. 11, № 2. – С. 109–112
12. Kohn E. C. Angiogenesis in ovarian carcinoma / E. C. Kohn // *Cancer.* – 1997. – Vol. 80. – P. 1452–1463.
13. Экспрессия генов VEGF A и VEGF C и их рецепторов в лимфоцитах и макрофагах мышей / О. И. Степанова, А. В. Крылов, В. И. Людыно, Е. П. Киселева // *Биохимия.* – 2007. – Т. 72, № 11. – С. 1468–1473.
14. Mor F. Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization / F. Mor, F. J. Quintana, I. R. Kohan // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172. – P. 4618–4623.
15. Upregulation of matrix metalloproteinase 9 in T lymphocytes of mammary tumor bearers: Role of vascular endothelial growth factor / J. Owen,

REFERENCES

1. Kiselev EP, Krylov AV, Starikova EA, Kuznetsova SA. [Vascular endothelial growth factor and the immune system]. *Uspekhi sovremennoi biologii*. 2009;129(4):1–12. Russian.
2. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signaling – in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7:359–71.
3. Marti HH, Risau W. System hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptor. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1998;95:15809–14.
4. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*. 1994;265:1582–4.
5. Vikhanskaya F, Bani MR, Borsotti P, Ghilardi C. p73 overexpression increases VEGF and reduces thrombospondin-1 production: implications for tumor angiogenesis. *Oncogene*. 2001;20(50):7293–300.
6. Kopnin BP. [Target of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis]. *Biochemistry (Mosc)*. 2000;65:5–33. Russian.
7. Chumakov PM. [Function of the p53 gene: the choice between life and death]. *Biochemistry (Mosc)*. 2000;65:34–47. Russian.
8. Mori K, Tani M, Kamata K, Kawamura H, Urata Y, Goto S, et al. Mitogen-activated protein kinase, ERK1/2, is essential for the induction of vascular endothelial growth factor by ionizing radiation mediated by activator protein-1 in human glioblastoma cells. *Free Radic Res*. 2000;33:157–66.
9. Kim HS, Kim SC, Kim SJ, Park CH, Jeung HC, Kim YB, et al. Identification of a radiosensitivity signature using integrative meta-analysis of published microarray data for NCI-60 cancer cells. *BMC Genomics*. 2012;13:348.
10. Delfino G, Di Costanzo L, de Paulis A, Fabbrocini G, Monfrecola G. In vitro ultraviolet A irradiation decreases both release ability and gene-expression of vascular endothelial growth factor-A from mast cells. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2012;28:165–8.
11. Buchynska LG, Grinkevych VM, Yurchenko NP, Vorobjova LI. [p53, VEGF, and CD34 expression in tumor tissue and survival of patients with advanced ovarian carcinoma]. *Oncology*. 2009;11(2):109–12. Ukrainian.
12. Kohn EC. Angiogenesis in ovarian carcinoma. *Cancer*. 1997;80:1452–63.
13. Stepanova OI, Krylov AV, Lyudyno VI, Kyselva EP. [Gene expression VEGF A and VEGF C_ and their receptors in lymphocytes and macrophages of mice]. *Biochemistry*. 2007;72(11):1468–73. Russian.
14. Mor F, Quintana FQ, Kohan IR. Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J Immunol*. 2004;172:4618–23.

V. Iragavarapu-Charyulu, Z. Gunja-Smith [et al.] // J. Immunol. – 2003. – Vol. 171. – P. 4340–4351.

15. Owen JL, Iragavarapu-Charyulu V, Gunja-Smith Z, Herbert LM, Grosso JF, Lopez DM. Upregulation of matrix metalloproteinase 9 in T lymphocytes of mammary tumor bearers: Role of vascular endothelial growth factor. J Immunol. 2003;171:4340–51.

Стаття надійшла до редакції 29.07.2013

Received: 29.07.2013