

УДК: 616.98:612.112:616-001.28

І. М. Ільєнко✉, О. В. Лясківська, О. А. Беляєв, О. Я. Плєскач, В. І. Шинкаренко, Д. А. Бази́ка
Державна установа «Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії
медичних наук України», вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна

ВПЛИВ ХРОНІЧНОЇ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ НА ДОВЖИНУ ТЕЛОМЕР ЛІМФОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ УЧАСНИКІВ ЛІКВІДАЦІЇ АВАРІЇ НА ЧАЕС У ВІДДАЛЕНОМУ ПЕРІОДІ ПІСЛЯ ОПРОМІНЕННЯ

Мета. Оцінити вплив хронічної вірусної інфекції на показник відносної довжини теломер лімфоцитів периферичної крові (ПК) учасників ліквідації наслідків аварії (ЛНА) на ЧАЕС у віддалений період після опромінення (30 років потому) та визначити роль вірусного носійства у розвитку прискореного клітинного старіння.

Матеріали і методи. Основна група обстеження включала 70 учасників ЛНА на ЧАЕС чоловічої статі, у віддаленому періоді після опромінення – 30 років потому {доза зовнішнього опромінення складала $(602,67 \pm 114,19)$ мЗв ($M \pm m$), вік $(59,75 \pm 0,82)$ років}. Аналіз проводили залежно від наявності або відсутності антитіл до хронічної фази вірусної інфекції. Визначення відносної довжини теломер (relative telomere length – RTL) лімфоцитів ПК проводили за допомогою flow-FISH методу (проточно-цитометрична флуоресцентна гібридизація *in situ*), субпопуляції імункомпетентних клітин досліджували з використанням проточної цитометрії (FacsCalibur, BD) і стандартних комбінацій моноклональних антитіл (CD45/14, CD3/19, CD4/8, CD3/HLADR, CD3/16/56, TCR $\gamma\delta$); визначення статусу протівірусного імунітету проводили за допомогою імуоферментного аналізу, зокрема визначали антитіла до хронічної фази захворювання, а саме до вірусу гепатиту С (ВГС), цитомегаловірусної інфекції (ЦМВ), токсоплазми гондії (ТОКС), вірусу простого герпесу (ВПГ) та вірусу Епштейн-Барр (ВЕБ-VCA IgG та ВЕБ-NA IgG). Об'єкт дослідження – ПК учасників ЛНА на ЧАЕС.

Результати. Скорочення відносної довжини теломер пов'язане з носійством вірусної інфекції на груповому рівні. Статистично достовірні зміни показника RTL було продемонстровано між дослідними групами ($M \pm SD$) (ВГС-негативна $15,27 \pm 3,35$, ВГС-позитивна $13,09 \pm 3,05$, $p < 0,08$, $n = 12/52$) та визначено тенденцію (ЦМВ-негативна $15,99 \pm 5,41$, ЦМВ-позитивна $14,86 \pm 3,46$ ($M \pm SD$), $p < 0,57$, $n = 11/53$; ВПГ-негативна $17,01 \pm 1,35$, ВПГ-позитивна $14,79 \pm 3,80$, $p < 0,33$, $n = 13/51$; ТОКС-негативна $15,94 \pm 3,41$, ТОКС-позитивна $14,30 \pm 3,81$ ($M \pm SD$), $p < 0,23$, $n = 27/37$). Ці односпрямовані зміни можуть бути пов'язані з передчасним старінням імункомпетентних клітин. Опозитні зміни було продемонстровано в групі учасників ЛНА на ЧАЕС з носійством ВЕБ-NA. Визначено статистично достовірне підвищення показника RTL порівняно з групою учасників ЛНА на ЧАЕС з відсутністю антитіл до хронічної фази ВЕБ-NA (EBV-NA-негативна $11,25 \pm 3,02$ ($M \pm SD$), EBV-NA-позитивна $16,15 \pm 3,08$ ($M \pm SD$), $p < 0,001$, $n = 15/49$).

Висновки. Дослідження підтвердило припущення про зв'язок між довжиною теломер лімфоцитів периферичної крові, хронічною вірусною інфекцією та пізніми радіоіндукованими ефектами в імункомпетентних клітинах. Зміни довжини теломер на тлі імунної дисфункції можуть бути ознакою клітинного старіння, а супутня хронічна вірусна інфекція, така як вірус гепатиту С і вірус Епштейн-Барр, може створювати підґрунтя для «помилкової» репарації ДНК, створюючи умови для зл�акісної трансформації.

Ключові слова: радіація, відносна довжина теломер, хронічні вірусні інфекції.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2017. Вип. 22. С. 372–381.

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

I. M. Iliencko✉, O. V. Lyaskivska, O. A. Belayev, O. Y. Pleskach, V. I. Shinkarenko, D. A. Bazyka

State Institution «National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 53 Melnykova str., Kyiv, 04050, Ukraine

Impact of chronic blood viral infection on lymphocyte telomere length in Chernobyl clean-up workers in a remote period after radiation exposure

Objective. To assess whether telomere length in lymphocytes of Chernobyl clean-up workers at a late period 30 years after the exposure to ionizing radiation is influenced by a chronic blood viral infection and to determine role of viral carriage in cellular senescence.

Patients and Methods. Study group included 70 Chernobyl cleanup male workers 30 years after exposure {doses of external exposure (602.67 ± 114.19) mSv ($M \pm m$); age (59.75 ± 0.82) yrs}. Relative telomere length (RTL) was analysed by fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry, immune cell subsets by standard combinations of monoclonal antibodies (CD45/14, CD3/19, CD4/8, CD3/HLADR, CD3/16/56, TCR $\gamma\delta$) and flow cytometry; antiviral immunity was performed determining the chronic phase antibodies to viruses: Hepatitis C (HCV), Cytomegalovirus (CMV), *Toxoplasma gondii* (TOX), Herpes simplex (HSV) and Epstein-Barr virus (EBV-VCA IgG and EBV-NA IgG). The object of the study was peripheral blood (PB) of clean-up workers.

Results. RTL changes were associated at the group level with the carrier state of the viral infection. RTL shortening was demonstrated as a significant difference between the groups ($M \pm SD$) (HCV-negative 15.27 ± 3.35 , HCV-positive 13.09 ± 3.05 , $p < 0.08$, $n = 12/52$) or as a tendency (CMV-negative 15.99 ± 5.41 , CMV-positive 14.86 ± 3.46 ($M \pm SD$), $p < 0.57$, $n = 11/53$; HSV-negative 17.01 ± 1.35 , HSV-positive 14.79 ± 3.80 , $p < 0.33$, $n = 13/51$; TOX-negative 15.94 ± 3.41 , TOX-positive 14.30 ± 3.81 ($M \pm SD$), $p < 0.23$, $n = 27/37$). These unidirectional changes can be associated with premature early cell aging of immune cells. To the contrary the significant RTL elongation was demonstrated in the group of EBV-NA chronic carriers (EBV-NA-negative 11.25 ± 3.02 ($M \pm SD$), EBV-NA-positive 16.15 ± 3.08 ($M \pm SD$), $p < 0.001$, $n = 15/49$).

Conclusion. The study confirmed the assumption on a relationship existing between the telomere length, chronic viral infection and late effects in immune cells. The changes of telomeres length on the background of immune dysfunction may be a sign of cellular aging, and concomitant chronic blood viral infection such as Hepatitis C, Epstein-Barr viruses carriage could form a background for an error-prone DNA repair system as a factor of accumulation of pathological conditions, including malignant transformation.

Key words: radiation, relative telomere length, chronic blood virus infections.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2017;22:372–381.

ВСТУП

Чорнобильська катастрофа спричинила низку ефектів для здоров'я людини, починаючи від молекулярних і клітинних до підвищення захворюваності населення, особливо в учасників ліквідації наслідків аварії (ЛНА) на ЧАЕС, які є найбільшою групою опромінених осіб. Іонізуюче випромінювання може модифікувати функцію лімфоцитів через оксидативний стрес, розриви ДНК і, як наслідок, призводити до порушень проліферативної активності, апоптозу та клітинного старіння, в яких теломеро-теломеразний комплекс може відігравати вирішальну роль.

Теломери є ДНК-білковим комплексом у кінцевих ділянках хромосом, які скорочуються з кожним поділом клітини. У клітинах крові ранніх стадій диференціювання довжина теломер частково відновлюється за високої активності теломерази, спеціалізованого внут-

INTRODUCTION

The Chernobyl (Chernobyl) accident induced a set of different health effects starting from molecular and cellular to different pathological conditions among the population, especially in clean-up workers, who represent the largest group of exposed by the radiation doses. Ionizing radiation could modify lymphocyte function via oxidative damage, DNA breaks, and resulting changes of proliferation, apoptosis and cellular senescence, where telomere-telomerase complex may play a critical role.

Telomeres, the DNA-protein complexes at the end regions of chromosomes, decrease in length with every cell division. In primary blood cells, telomeres are partly reconstructed by the activity of telomerase, a specialized intracellular enzyme

рішньоклітинного ферменту, що додає певні повторювані фрагменти ДНК до теломер [1]. Незважаючи на активність теломерази, теломери продовжують скорочуватись з кожним поділом клітин, що призводить до порушення їх функціональності та клітинного старіння [2].

Вважається, що скорочення теломер лейкоцитів змінює імунну відповідь, що асоціюється з процесами синтезу прозапальних цитокінів та з більш слабкою реакцією антитіл на вакцини [3]. Продемонстровано, що коротша довжина теломер лейкоцитів пов'язана з розвитком захворювань, асоційованих зі старінням, а також з розвитком імунологічних патологій, включаючи інфекційні захворювання [4, 5], раком [6] і серцево-судинними захворюваннями [7].

Серологічні дослідження показали поширеність вірусних інфекцій у крові (ВГС, ЦМВ) серед різних груп постраждалих після Чорнобильської катастрофи в поєднанні з підвищеною частотою соматичних захворювань, наприклад, тиреоїдитом, зобом щитоподібної залози, артеріальною гіпертонією, діабетом I типу, хронічним гепатитом / гастритом. Найбільшою є частота носійства ЦМВ інфекції та її зв'язок з хронічними захворюваннями – гастритами, артритами, бронхітами у пацієнтів після гострої променевої хвороби. В учасників ЛНА на ЧАЕС частота менша, але перевищує показники неопроміненого контролю. Незважаючи на гостроту ЦМВ-інфекції, на думку деяких авторів, існує й чітка залежність між частотою захворювань та фактом опромінення в 1986 р. [8].

МЕТА

Метою дослідження було оцінити вплив носійства хронічної вірусної інфекції на довжину теломер у лімфоцитах периферичної крові (ПК) учасників ЛНА на ЧАЕС через 30-років після опромінення і визначити роль вірусного носійства у розвитку передчасного клітинного старіння.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ

Основна група обстеження включала 70 учасників ЛНА на ЧАЕС чоловічої статі, у віддаленому періоді після опромінення (30 років потому). Середні дози зовнішнього опромінення становили $(602,67 \pm 114,19)$ мЗв ($M \pm m$), середній вік – $(59,75 \pm 0,82)$ років ($M \pm m$). Група учасників ЛНА на ЧАЕС була розподілена та проаналізована залежно від наявності (1) та відсутності (0) антитіл до хронічної фази вірусної інфекції. Об'єкт дослідження – ПК учасників ЛНА на ЧАЕС.

that adds subunit repeats to telomeres [1]. Despite the activity of telomerase, telomeres continue to shorten with repeated cell divisions, leading to disrupted cell function and eventual cell senescence [2].

Leukocyte telomere shortening is supposed to have implications for immunocompetence and is associated with increased synthesis of proinflammatory cytokines and poorer antibody response to vaccines [3]. Shorter leukocyte telomere length also is demonstrated to be associated with aging-related morbidity and mortality from conditions with immune system involvement, including infectious diseases [4, 5], cancer [6], and cardiovascular disease [7].

Serological studies have shown prevalence of blood viral infections (HCV, CMV) among different groups of exposed after Chernobyl with association of a higher incidence with selected somatic diseases, for example, thyroiditis, goiter, arterial hypertension, type 1 diabetes, chronic hepatitis/gastritis, in the clean-up workers. A similar scenario with respect to CMV was also seen, i.e., lower prevalence rates relative to in ARS patients and «association» between CMV status and incidence of chronic gastritis, arthritis, and bronchitis, in the clean-up workers and IR-non-exposed controls. Further, irrespective of CMV status, to authors opinion there was a clear delineation between incidence rate(s) of each of the pathologies and whether or not the person was/was not exposed in 1986 [8].

OBJECTIVE

Aim of the study was to assess whether telomere length in lymphocytes of Chernobyl clean-up workers at a late period 30 years after the exposure to ionizing radiation is influenced by a chronic blood viral infection and to determine role of viral carriage in cellular senescence.

MATERIALS AND METHODS

Study group included 70 Chernobyl clean-up male workers in a remote period after exposure (30 years later). Doses of external exposure were available in patients with average external dose exposure of (602.67 ± 114.19) mSv ($M \pm m$) and mean age 59.75 ± 0.82 ($M \pm m$). Study group of Chernobyl clean-up workers was analyzed due to the presence (1) or absence (0) of antibodies to the chronic phase of viruses infection. The object of the study was PB of clean-up workers.

Дослідження відносної довжини теломер лімфоцитів ПК людини за допомогою flow-FISH методу. Визначення відносної довжини теломер RTL лімфоцитів ПК проводили за допомогою набору Telomere PNA Kit/FITC (Dako Cytometry, Denmark) і flow-FISH методу (проточно-цитометрична флуоресцентна гібридизація in situ). Набір рекомендовано для визначення теломер в ядерних гемопоетичних клітинах з використанням зв'язаних із флуоресцеїном зразків пептиду нуклеїнової кислоти (PNA). В якості контрольних клітин використана лінія лейкемічних клітин K562. Методика проведення flow-FISH аналізу складалась з декількох етапів, а саме: попередня обробка, денатурація, гібридизація (1-й день); промивання, фарбування ДНК, аналіз (2-й день). У результаті проведеної методики зразки, які гібридизуються із PNA кон'югованою з FITC, демонстрували флуоресцентний сигнал по FL1, який вищий ніж фоновий. Робочі гейти були виділені як для дослідних (лімфоцити ПК), так і для контрольних (лінія K562) клітин. Показник RTL був розрахований за формулою 1:

$$RTL = \frac{\text{середнє значення FL1 у дослідних клітин із PNA зондом} - \text{середнє значення FL1 у дослідних клітин без PNA зонду}}{\text{середнє значення FL1 у контрольних клітин із PNA зондом} - \text{середнє значення FL1 у контрольних клітин без PNA зонду}} \times 100$$

Проточна цитометрія. Аналіз субпопуляційного складу та поверхневого фенотипу імунокомпетентних клітин ПК учасників ЛНА на ЧАЕС досліджено методом проточної цитофлуориметрії у прямому імунофлуоресцентному тесті за допомогою панелі моноклональних антитіл (BD, США). Панель МКАТ включала: CD45/14, CD3/19, CD4/8, CD3/HLADR, CD3/16/56, TCRγδ (BD, США), які були мічені двома флуорохромами: флуоресцеїнізоціанатом (FITC) та фікоеритрином (PE). Аналіз проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі FACSCalibur (BD, США).

Імуноферментний аналіз. Визначення антивірусного імунітету проводили методом імуноферментного аналізу. Оптичну густину вимірювали за допомогою мікропланшетних рідерів «SUMAL», «Labline-22» і діагностичних систем Diaprof-Med, Vitrotest. Визначали антитіла до хронічної фази захворювання, а саме до вірусу гепатиту С (ВГС), цитомегаловірусної інфекції (ЦМВ), токсоплазми (ТОКС), вірусу простого герпесу (ВПГ) та вірусу Епштейн-Барр (ВЕБ-VCA IgG та ВЕБ-NA IgG).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Попередніми дослідженнями в лабораторії імуноцитології ННЦРМ показаний зв'язок між RTL, клітинним імунітетом і віком учасників ЛНА на ЧАЕС, однак до-

Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. The relative telomere length (RTL) was studied using the Telomere PNA Kit / FITC (DakoCytometry, Denmark) for hematopoietic cells using PNA probe labeled with FITC. The kit is recommended for determination of telomeres in nuclear hematopoietic cells using fluorescein-bound nucleic acid peptide samples (PNA). As control cells, the line of leukemic cells K562 was used. FISH stage included several stages, more specifically the preprocessing, denaturation, hybridization (the 1st day), washing, DNA staining, and analysis (the 2nd day). The K562 cell line with long and determined telomere length was used as control cells. Hybridized samples with FITC-labelled PNA were counted at FACSCalibur cytometer. RTL was calculated by the equation as follows:

Формула 1 / Equation 1

$$RTL = \frac{\text{mean FL1 sample cells with probe PNA} - \text{mean FL1 sample cells without probe PNA}}{\text{mean FL1 control cells with probe PNA} - \text{mean FL1 control cells without probe PNA}} \times 100$$

Flow cytometry study. Investigation of the state of cellular immunity of the Chernobyl nuclear power plant accident clean-up workers was performed by flow cytometry by standard protocol for surface flow cytometry technology using a combination of monoclonal antibodies: CD45/14, CD3/19, CD4/8, CD3/HLADR, CD3/16/56, TCRγδ (BD, USA), which were labeled with two fluorochromes, namely the fluorescein isocyanate (FITC) and phycoerythrin (PE). Analysis was performed on laser flow cytometer FACSCalibur (BD, USA).

Enzyme immunoassay. Determination of antiviral immunity was performed by the enzyme immunoassay. The optical density was measured using microplate readers «SUMAL» and «Labline-22» and diagnostic systems (Diaprof-Med, Vitrotest). We determined the chronic phase antibodies to viruses: hepatitis C (HCV), cytomegalovirus (CMV), toxoplasma (TOX), herpes simplex (HSV) and Epstein-Barr virus (EBV-VCA IgG and EBV-NA IgG).

RESULTS AND DISCUSSION

As previous studies have demonstrated connection between the RTL, cellular immunity and age a descriptive analysis of possible dependencies was

Таблиця 1
Вікова характеристика груп обстеження.

Table 1
Mean age by study groups.

Групи обстеження / Groups		Вік, роки / Age, years (M ± SD)
ВГС / HCV	0 – негативна / negative	60,66 ± 6,45
	1 – позитивна / positive	56,66 ± 6,02
ТОКС / TOX	0 – негативна / negative	60,07 ± 6,73
	1 – позитивна / positive	59,74 ± 6,45
ЦМВ / CMV	0 – негативна / negative	57,45 ± 6,37
	1 – позитивна / positive	60,39 ± 6,50
ВПГ / HV	0 – негативна / negative	61,0 ± 6,68
	1 – позитивна / positive	59,62 ± 6,52
ВЕБ-VCA / EBV-VCA	0 – негативна / negative	57,0 ± 7,54
	1 – позитивна / positive	61,80 ± 6,34
ВЕБ-NA / EBV-NA	0 – негативна / negative	60,20 ± 8,54
	1 – позитивна / positive	59,78 ± 5,84

слідження таких залежностей з показниками гуморального імунітету не проводились. На першому етапі дослідження, був проведений аналіз середніх значень віку у групах обстеження (антитіло-позитивних по відношенню до антитіло-негативних пацієнтів) з метою виключення впливу вікового фактору. Не визначено статистично значущої різниці між середніми значеннями віку у групі вірус-позитивних учасників ЛНА на ЧАЕС порівняно з групою вірус-негативного контролю (табл. 1).

Дослідження стану клітинного імунітету в учасників ЛНА на ЧАЕС показало ряд статистично достовірних змін (табл. 2). Виявлено підвищення середніх значень показників відносної кількості CD3⁺19⁺ та CD4⁺8⁺ лімфоцитів ПК у групі учасників ЛНА на ЧАЕС із встановленою хронічною фазою ВПГ у порівнянні з учасниками ЛНА на ЧАЕС, які не контактували з цим

performed. To exclude the influence of the age factor, a descriptive analysis of the mean age by groups was conducted regarding the virus positive related to virus negative patients. There was no statistically significant difference between the mean age values in the group of virus positive clean-up workers of the Chernobyl nuclear power plant accident and the group of virus negative control (Table 1).

A study of the status of cellular immunity in the clean-up workers showed a number of statistically confirmed changes (Table 2). The increase the relative number of CD3⁺19⁺ and CD4⁺8⁺ PB lymphocytes was determined in the group clean-up workers with the established chronic phase of the HCV virus in comparison with clean-up workers

Таблиця 2
Характеристика показників клітинного імунітету учасників ЛНА на ЧАЕС залежно від носійства хронічної вірусної інфекції.

Table 2
Changes in cellular immunity of Chernobyl clean-up workers, depending on the presence of a chronic viral infection.

Показники / Indices	Групи обстеження / Groups	
CD3-19+ (%) CD4-8+ (%)	0 – ВГС негативна / 0 – HCV negative	1 – ВГС позитивна / 1 – HCV positive
	8,29 ± 4,51 [#] 28,04 ± 8,13 [#]	11,67 ± 5,35 ^{##} 34,95 ± 7,65 ^{###}
CD3-16+56+ (%)	0 – ТОКС негативна / 0 – TOX negative	1 – ТОКС позитивна / 1 – TOX positive
	7,65 ± 5,60 [#]	13,47 ± 9,55 ^{###}
CD3-19+ (%)	0 – ЦМВ негативна / 0 – CMV negative	1 – ЦМВ позитивна / 1 – CMV positive
	12,47 ± 5,97 [#]	8,20 ± 4,27 ^{##}
TCRγδ (%)	0 – ВЕБ-NA негативна / 0 – EBV-NA negative	1 – ВЕБ-NA позитивна / 1 – EBV-NA positive
	6,60 ± 3,84 [#]	3,43 ± 2,47 ^{###}

Примітки. * – p < 0,05; ** – p < 0,001; # – (M ± SD).
Notes. * – p < 0.05; ** – p < 0.001; # – (M ± SD).

вірусом. Імунна дисфункція виявлена в групі учасників ЛНА на ЧАЕС з носійством ТОКС, що проявлялось у підвищенні функціональної активності CD3⁻16⁺56⁺ природних кілерів. Група учасників ЛНА на ЧАЕС, позитивних на ЦМВ-інфекцію, характеризувалась депресією В-клітинної ланки імунітету (табл. 2).

Наявність анти-ВЕБ-NA IgG асоціювалась зі зниженням рівня експресії рецептора TCRγδ. Попередні дослідження продемонстрували зменшення кількості Т-клітин і пригнічення CD3-опосередкованої проліферативної відповіді. Ці дані демонструють зміни по відношенню до попереднього етапу імунологічних досліджень учасників ЛНА на ЧАЕС, які проводились через 15 років після опромінення і продемонстрували відсутність залежностей між носійством ВЕБ та активацією природних кілерів [9, 10].

Проведено порівняльний аналіз показників RTL лімфоцитів ПК у групах учасників ЛНА на ЧАЕС з носійством хронічної вірусної інфекції порівняно з групою вірус-негативного контролю (рис. 1). Було

who did not have contact with this virus. Immune dysfunction manifested in the TOX positive group in increasing the functional activity of CD3⁻16⁺56⁺ natural killers. A group of clean-up workers with a chronic carriage of CMV infection was characterized by depression of the B-cell immunity.

Presence of the anti-EBV-NA IgG was associated with a decrease in the level of expression of the TCRγδ receptor. Previous studies have demonstrated decreased number of T-cells and CD3-antigen mediated proliferative immune response. These findings demonstrate the difference with previous our studies in clean-up workers 15 years after exposure, that have shown an absence of dependencies between EBV and natural killer cells activation [9, 10].

A comparative analysis of RTL indexes of lymphocytes was performed in groups of clean-up workers with chronic viral carriage vs. clean-up workers without a viral infection (Figure 1). It was estab-

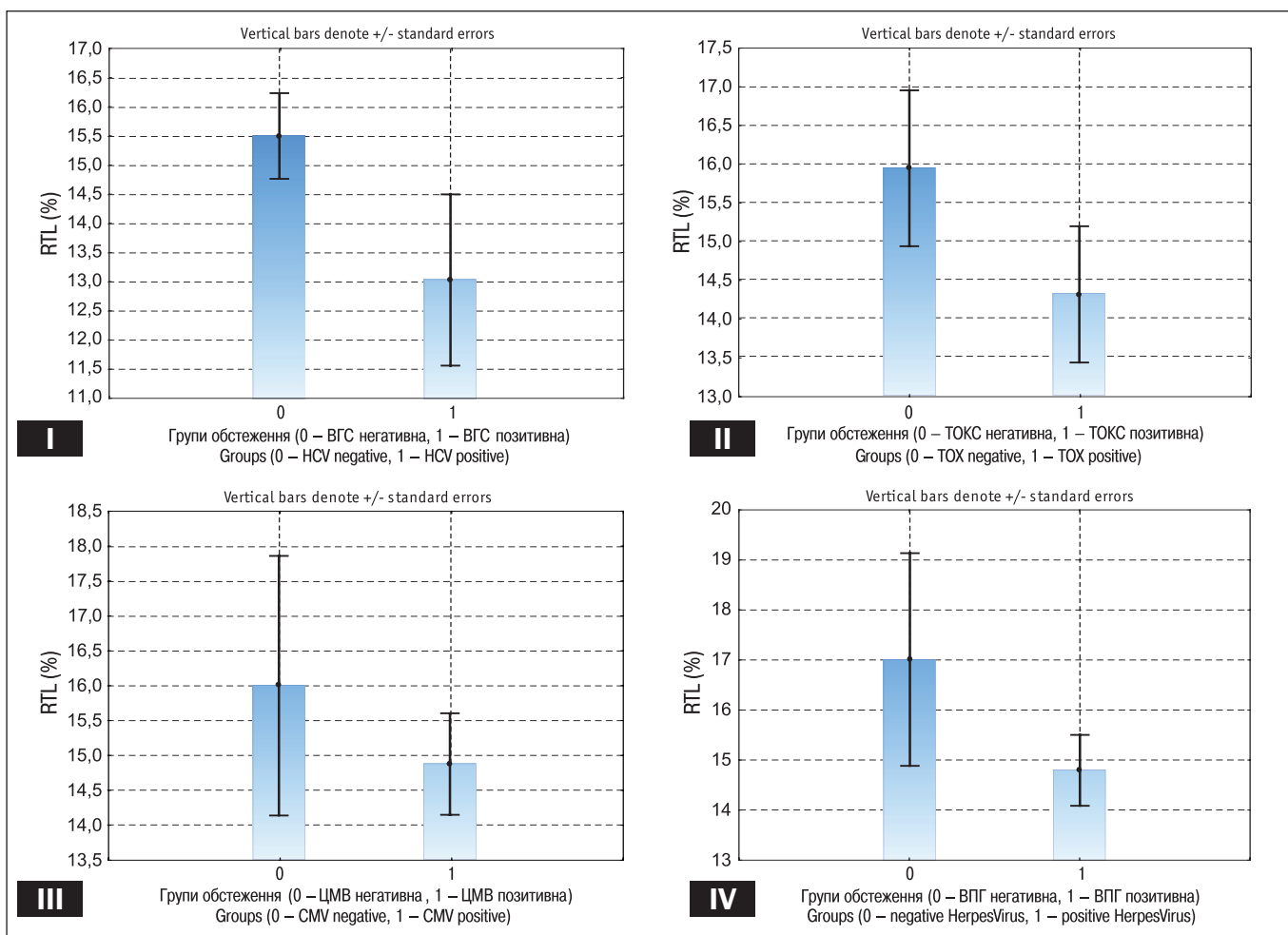


Рисунок 1. Скорочення відносної довжини теломер у лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС залежно від носійства хронічної вірусної інфекції (I – ВГС; II – ТОКС; III – ЦМВ; IV – ВПГ).

Figure 1. Shortening of the RTL of PB lymphocytes in Chernobyl clean-up workers, depending on the carrier of the viral infection (I – HCV; II – TOX; III – CMV; IV – HV).

встановлено скорочення відносної довжини теломер лімфоцитів ПК в учасників ЛНА на ЧАЕС залежно від статусу носійства вірусної інфекції. Такі зміни були односторонніми та показані у групах осіб з хронічним носійством вірусів ВГС, ТОКС, ЦМВ, ВПГ, що може бути пов'язаним з передчасним старінням імункомпетентних клітин. Не виявлено подібного характеру змін показника RTL у групі учасників ЛНА на ЧАЕС з носійством хронічної ВЕБ-ВСА інфекції.

Протилежні зміни показника RTL визначено у групі учасників ЛНА на ЧАЕС з носійством хронічної ВЕБ-НА IgG інфекції (рис. 2), а саме показано збільшення середнього значення RTL в даній групі. Інфекція вірусу Епштейн-Барр призводить до широкого спектру проліферативних розладів, від інфекційного мононуклеозу до агресивної проліферації, наприклад, гемофагоцитарного синдрому, а також до злоякісної трансформації клітин лімфоїдної та епітеліальної тканин [11]. Імунодефіцитні стани при Епштейн-Барр інфекції можуть супроводжуватися підвищеною частотою розвитку вірус-лімфоцитарної лімфоми. Частота лімфопроліферативних синдромів відповідає ступеню імуносупресії. Інгибування функції Т-лімфоцитів, безсумнівно, дозволяє вірусу уникнути імунного нагляду [12, 13].

Відомо, що тривалу елонгацію теломерних послідовностей вважають однією з ознак злоякісно трансформованих клітин. Виявлене подовження теломер лімфоцитів ПК учасників ЛНА на ЧАЕС, асоційоване з носійством хронічної ВЕБ-НА IgG інфекції на тлі зниженої експресії TCR $\gamma\delta$ рецептора, може бути основою для злоякісної трансформації, і, ймовірно, що хронічне носійство цього вірусу може збільшити ризик онкологічних перетворень у

lished shortening of the relative telomeres length of PB lymphocytes in Chernobyl clean-up workers, depending on the carrier state of the viral infection. Such changes are shown for groups of individuals with HCV, TOX, CMV, HSV and were unidirectional, that can be associated with premature cell aging of immune cells. There is no similar character of changes in the index of RTL in the group of clean-up workers with EBV-VCA chronic carriers.

Opposite to the directional changes in the index of RTL are established in the group of clean-up workers with chronic carrier of the EBV-NA IgG (Figure 2). It was shown the increase of mean value of RTL in this group. Epstein-Barr virus infection leads to a wide spectrum of proliferative disorders, from usually self-healing benign diseases such as infectious mononucleosis, to aggressive non-tumor proliferation, such as hemophagocytic syndrome, and to malignant tumors from lymphoid and epithelial tissues [11]. A number of immunodeficiencies are accompanied by an increased frequency of neoplasms associated with the Epstein virus-lymphocytic lymphoma. Frequency of lymphoproliferative syndromes corresponds to the degree of immunosuppression. Inhibition of T-lymphocyte function undoubtedly allows the virus to evade immune surveillance [12, 13].

It is known that a permanent elongation of telomeres' sequences – a sign of malignantly transformed cells. That fact that telomeres are lengthened in the PB lymphocytes clean-up workers with a chronic form of the EBV-NA IgG against a background of reduced expression of the TCR $\gamma\delta$ can be the basis for malignant transformation and it is likely that the carrier of the virus can increase the risk of oncological transformation in

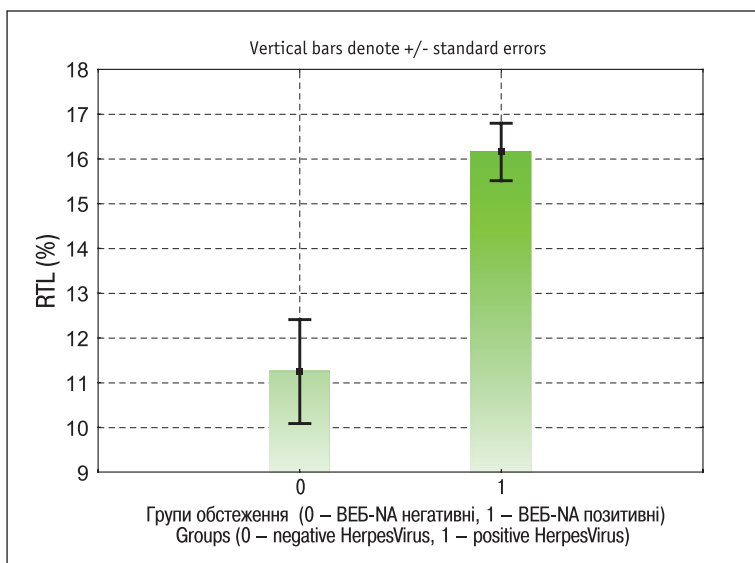


Рисунок 2. Відносна довжина теломер у лімфоцитах ПК учасників ЛНА на ЧАЕС залежно від носійства хронічної ВЕБ-НА IgG вірусної інфекції.

Figure 2. RTL of PB lymphocytes in Chernobyl clean-up workers, depending on the carriage of the EBV-NA IgG.

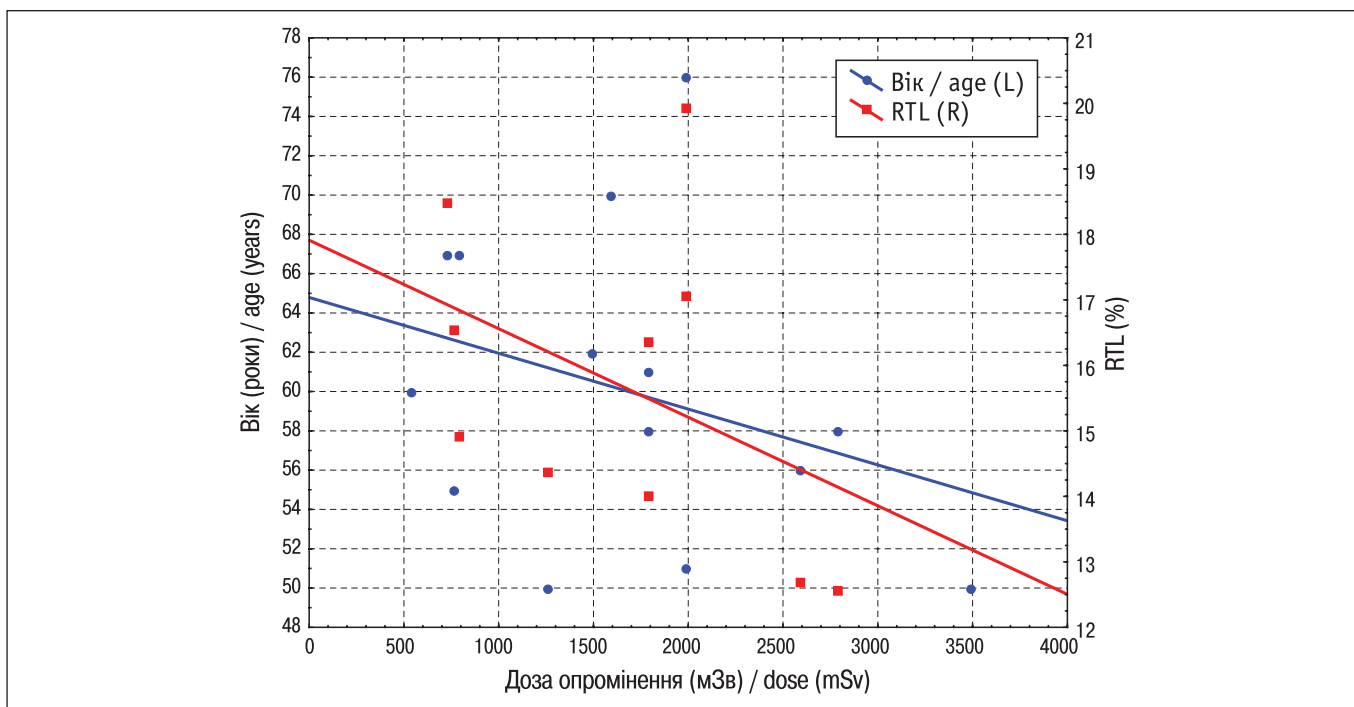


Рисунок 3. Кореляційна залежність між віком, відносною довжиною теломер і дозою зовнішнього опромінення в групі учасників ЛНА на ЧАЕС, опроміненних у дозах понад 500 мЗв.

Figure 3. Correlation between age of clean-up workers, lymphocytes RTL and dose of external irradiation in group of Chernobyl clean-up workers with dose more than 500 mSv.

віддаленому періоді після опромінення в широкому діапазоні доз.

Проведене дослідження також продемонструвало залежність між віком, відносною довжиною теломер та дозою зовнішнього опромінення у групі учасників ЛНА з носійством хронічної вірусної інфекції у віддаленому періоді після опромінення у дозах > 500 мЗв (рис. 3). Клітинне старіння відноситься до найбільш контрверсійних процесів, оскільки, з одного боку, в таких клітинах зменшується метаболічна активність і клітина не бере активну участь в імунній відповіді. З іншого боку, така клітина може стати місцем зберігання мутацій і на тлі зменшення імунного нагляду зростає ризик розвитку злякисного перетворення. Опромінення, особливо в інтервалі високих доз, є додатковим фактором ризику, який впливає як на довжину теломер імунокомпетентних клітин, так і на показники гуморального та клітинного імунітету.

ВИСНОВКИ

Отримані результати частково підтвердили наше припущення про зв'язок між зміною довжини теломер лімфоцитів ПК, хронічною вірусною інфекцією та дозою зовнішнього опромінення в учасників ЛНА на ЧАЕС через 30 років після катастрофи. Зміни довжини теломер на фоні імунної дисфункції можуть бу-

the long-term period after irradiation in a wide range of doses.

The study shows the influence of radiation factor in the dose more than 500 mSv on telomere length of PB lymphocytes and human aging in remote period after exposure in persons with chronic viral infection (Figure 3). Multicomponent confirmed in the development of cellular senescence and aging in general. Cellular aging refers to the most controversial processes, because on the one hand in such cells decreases metabolic activity and the cell does not take an active part in the immune response. On the other hand, such cell can become a storage of mutations and on the background of a decrease in immune surveillance, the risk of malignant transformation increases. An additional risk factor that affects both the length of telomeres and on the indices of humoral and cellular immunity is irradiation, especially high-dose.

CONCLUSIONS

Results partly confirmed our assumption about a relationship between the telomeres length changes, chronically viral infection and radiation dose more than 30 years after the exposure. The changes of telomere length on the background of immune dysfunction may be a signal to start cell

ти сигналом для прискореного клітинного старіння, блокування системи репарації ДНК. Також це може призвести до патологічних станів, включаючи злоякісні перетворення, і не останню роль у цих процесах відіграє носійство хронічних вірусних інфекцій, таких як гепатит С. Такі асоціації були виявлені лише як тенденції у випадку носійства цитомегаловірусної інфекції, токсоплазмозу та вірусу простого герпесу і повинні бути підтверджені у майбутньому. Вплив носійства хронічної Епштейн-Барр вірусної інфекції на довжину теломер є протилежним і може стати відправною точкою для трансформації клітин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Kipling D., Wynford-Thomas D., Jones C.J., Akbar A., Aspinall R., Bacchetti S. et al. Telomere-dependent senescence. *Nat. Biotechnol.* 1999. Vol. 17. no. 4. P. 313-314.
2. Effros R. B. Ageing and the immune system. *Novartis Found Symp.* 2001. Vol. 235. P. 130-139.
3. Cohen S., Janicki-Deverts D., Turner R. B., Casselheldonbrant M. L., Ha-Sheng Li-Korotky, Epel E. S., Doyle W. J. Association between telomere length and experimentally induced upper respiratory viral infection in healthy adults. *JAMA.* 2013. Vol. 30, no. 7. P. 699-705.
4. Cawthon R. M., Smith K. R., O'Brien E., Sivatchenko A., Kerber R. A. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet.* 2003. Vol. 361(9355). P. 393-395.
5. Fitzpatrick A. L., Kronmal R. A., Kimura M., Gardner J. P., Psaty B. M., Jenny N. S. et al. Leukocyte telomere length and mortality in the Cardiovascular Health Study. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2011. Vol. 66, no.4. - P. 421-429.
6. Willeit P., Willeit J., Mayr A., Weger S., Oberhollenzer F., Brandstatter A., et al. Telomere length and risk of incident cancer and cancer mortality. *JAMA.* 2010. Vol. 304, no. 1. P. 69-75.
7. Weischer M., Bojesen S. E., Cawthon R. M., Freiberg J. J., Freiberg J. J., Tybjaerg-Hansen A., Nordestgaard B. G. Short telomere length, myocardial infarction, ischemic heart disease, and early death. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012. Vol. 32, no. 3. P. 822-829.
8. Chumak A. A., Abramenko I. V., Bilous N. I., Filonenko I. A., Kostin O. V., Pleskach O. Y., Pleskach G. V., Efremova N., Yanko J. Persistent infections and their relationship with selected oncologic and non-tumor pathologies. *J. Immunotoxicol.* 2010. Vol. 7, no. 4. P. 279-288.
9. Chumak A. A., Abramenko I. V., Belous N. I., Bazyka D. A., Azarskova M. V. [The presence of the genome of the Epstein-Barr virus in peripheral blood mononuclear cells of Chernobyl clean-up workers does not correlate with the proliferation of natural killer cells]. *International Journal of Radiation Medicine.* 2001. No. 3-4. P. 97-105. Russian.
10. Chumak A. A., Bazyka D. A., Abramenko I. V., Belyaeva N. V., Pleskach O. Ya., Boychenko P. K. [Flow cytometry in assessing cellular immunity in persons affected by the Chernobyl disaster with chronic viral infections]. *Interdistrict Collection «Hematology and Blood Transfusion».* 2004. Iss. 32. P. 92-96. Russian.

aging, closed to violations DNA reparation system in the remote period after irradiation can lead to pathological conditions, including malignant transformation, and the possible contributive role in these processes of chronic viral infections such as Hepatitis C. For Cytomegalovirus, Toxoplasma gondii and Herpes Simplex such associations were revealed only as tendencies and have to be confirmed in future. The influence of Epstein-Barr virus carriage on telomere length is the opposite and could be a starting point for cell transformation.

REFERENCES

1. Kipling D, Wynford-Thomas D, Jones CJ, Akbar A, Aspinall R, Bacchetti S, et al. Telomere-dependent senescence. *Nat Biotechnol.* 1999;17(4):313-4.
2. Effros RB. Ageing and the immune system. *Novartis Found Symp.* 2001;235:130-9.
3. Cohen S, Janicki-Deverts D, Turner RB, Casselheldonbrant ML, Ha-Sheng Li-Korotky, Epel ES, Doyle WJ. Association between telomere length and experimentally induced upper respiratory viral infection in healthy adults. *JAMA.* 2013;30(7):699-705.
4. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet.* 2003;361(9355):393-5.
5. Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Kimura M, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, et al. Leukocyte telomere length and mortality in the Cardiovascular Health Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2011;66(4):421-9.
6. Willeit P, Willeit J, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Brandstatter A, et al. Telomere length and risk of incident cancer and cancer mortality. *JAMA.* 2010;304(1):69-75.
7. Weischer M, Bojesen SE, Cawthon RM, Freiberg JJ, Freiberg JJ, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Short telomere length, myocardial infarction, ischemic heart disease, and early death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(3):822-9.
8. Chumak AA, Abramenko IV, Bilous NI, Filonenko IA, Kostin OV, Pleskach OY, Pleskach GV, Efremova N, Yanko J. Persistent infections and their relationship with selected oncologic and non-tumor pathologies. *J Immunotoxicol.* 2010;7(4):279-88.
9. Chumak AA, Abramenko IV, Belous NI, Bazyka DA, Azarskova MV. [The presence of the genome of the Epstein-Barr virus in peripheral blood mononuclear cells of Chernobyl clean-up workers does not correlate with the proliferation of natural killer cells]. *International Journal of Radiation Medicine.* 2001;(3-4):97-105. Russian.
10. Chumak AA, Bazyka DA, Abramenko IV, Belyaeva NV, Pleskach O.Ya., Boychenko PK. [Flow cytometry in assessing cellular immunity in persons affected by the Chernobyl disaster with chronic viral infections]. *Interdistrict Collection «Hematology and Blood Transfusion».* 2004;32:92-6. Russian.

11. Avdeenko T. V., Matveenko O. A. [Characteristics of humoral immune response to epstein-barr virus and helicobacter pylori infection in patients with gastric epithelial dysplasia and gastric cancer]. In: Choynzonov E. L., Galazhinskiy E. V., Cherdyntseva N. V., editors. [Current issues in experimental and clinical oncology: Proceedings of the All-Russian Conference of young scientists in memory of Academician N.V. Vasilyev]; 2016 May 13; Tomsk, Russia. Tomsk: Tomsk University press; 2016. p. 11-13. Russian.
12. Albanese M., Tagawa T., Bouvet M., Maliqi L., Maliqi L., Lutter D., Hoser J., et al.. Epstein-Barr virus microRNAs reduce immune surveillance by virus-specific CD8+ T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. Vol. 113, no. 42. P. E6467-E6475.
13. Kayamba V., Monze M., Asombang A. W., Zyambo K., Kelly P. Serological response to Epstein-Barr virus early antigen is associated with gastric cancer and human immunodeficiency virus infection in Zambian adults: a case-control study. Pan. Afr. Med. J. 2016. doi: 10.11604
11. Avdeenko TV, Matveenko OA. [Characteristics of humoral immune response to epstein-barr virus and helicobacter pylori infection in patients with gastric epithelial dysplasia and gastric cancer]. In: Choynzonov EL, Galazhinskiy EV, Cherdyntseva NV, editors. [Current issues in experimental and clinical oncology: Proceedings of the All-Russian Conference of young scientists in memory of Academician N.V. Vasilyev]; 2016 May 13; Tomsk, Russia. Tomsk: Tomsk University press; 2016. p. 11-3. Russian.
12. Albanese M, Tagawa T, Bouvet M, Maliqi L, Maliqi L, Lutter D, Hoser J, et al.. Epstein-Barr virus microRNAs reduce immune surveillance by virus-specific CD8+ T cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2016;113(42):E6467-E6475.
13. Kayamba V., Monze M., Asombang AW., Zyambo K., Kelly P. Serological response to Epstein-Barr virus early antigen is associated with gastric cancer and human immunodeficiency virus infection in Zambian adults: a case-control study. Pan. Afr. Med. J. 2016, doi: 10.11604

Стаття надійшла до редакції 31.08.2017

Received: 31.08.2017