

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ БЕЛКА FOXP3 В ЛИЗАТАХ МИТОГЕН-СТИМУЛИРОВАННЫХ МОНОНУКЛЕАРОВ КРОВИ

Е. А. Кодинцева^{1,2} ✉, А. А. Аклеев³¹ Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства, Челябинск, Россия² Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия³ Южно-Уральский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия

Нарушения процессов дифференцировки и функционирования Тreg могут быть одним из важнейших звеньев в патогенезе радиационно-индуцированных злокачественных новообразований у людей из когорты реки Теча, хронически облученных в диапазоне малых и средних доз с преимущественным поражением красного костного мозга (ККМ). Целью работы было определить влияние радиационного воздействия, пола, возраста на момент обследования и этнической принадлежности на концентрацию белка FOXP3 в лизатах митоген-стимулированных мононуклеарных клеток периферической крови у хронически облученных людей в период реализации канцерогенных эффектов. Основную группу составили 30 человек в возрасте 67–80 лет, среди них преобладали женщины и лица тюркской этнической группы. В группу сравнения вошли 10 необлученных человек аналогичного возраста, пола, этнической группы. В основной группе средняя доза облучения ККМ составила 867 мГр; тимуса и периферических лимфоидных органов — 125 мГр. После 24-часовой стимуляции ФГА *in vitro* мононуклеары лизировали, измеряли концентрацию общего белка и количественным иммуноферментным анализом — концентрацию FOXP3. Концентрация белка FOXP3 в митоген-стимулированных мононуклеарах статистически значимо не различалась у людей из разных дозовых групп (до стимуляции: 0 пг/мл в группе сравнения и $3,50 \pm 1,50$ (0–27,19) пг/мл в основной группе при $p = 0,349$; после стимуляции, соответственно: $1,54 \pm 1,51$ (0–15,16) пг/мл и $9,71 \pm 3,86$ (0–77,92) пг/мл, $p = 0,512$). Вариабельность индивидуальных значений несколько выше у людей из основной группы, чем в группе сравнения. По предварительным результатам, статистически значимого влияния дозы облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов, возраста на момент обследования, а также пола, этнической принадлежности на концентрацию белка FOXP3 в лизатах митоген-стимулированных мононуклеаров периферической крови хронически облученных людей не выявлено.

Ключевые слова: хроническое радиационное воздействие, река Теча, внутриклеточная концентрация, фактор транскрипции FOXP3, мононуклеарные клетки периферической крови, фитогемагглютинин

Финансирование: научно-исследовательская работа выполнена в рамках государственного задания ФМБА России по теме «Состояние клеточного иммунитета человека в период реализации отдаленных эффектов хронического радиационного воздействия».

Благодарности: заведующему отделом Базы данных «Человек» ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России Н. В. Старцеву за предоставленные данные, старшему лаборанту лаборатории молекулярно-клеточной радиобиологии Н. П. Литвиненко ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России за помощь в проведении эксперимента.

Вклад авторов: Е. А. Кодинцева — разработка концепции и дизайна исследования, экспериментальная работа, анализ и статистическая обработка данных, написание статьи; А. А. Аклеев — разработка концепции исследования, интерпретация результатов, редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России (протокол № 3 от 8 июня 2023 г.). Участники исследования подписали добровольное информированное согласие в рамках Хельсинкской декларации 2013 г.

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Александровна Кодинцева
ул. Воровского, д. 68А, г. Челябинск, 454141, Россия; ovcharova.cat@mail.ru

Статья получена: 31.07.2023 **Статья принята к печати:** 22.08.2023 **Опубликована онлайн:** 28.09.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.032

THE EFFECT OF CHRONIC EXPOSURE ON THE FOXP3 CONCENTRATION IN LYSATES OF THE MITOGEN-STIMULATED MONONUCLEAR CELLS

Kodintseva EA^{1,2} ✉, Akleyev AA³¹ Urals Research Center for Radiation Medicine of Federal Medical and Biological Agency, Chelyabinsk, Russia² Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia³ South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Disruptions of the Treg differentiation and functioning processes can play one of the crucial roles in the pathogenesis of radiation-induced malignant neoplasms in residents of the Techa riverside villages, who were chronically exposed in the low-to-medium dose range with predominant damage to the red bone marrow (RBM). This study aimed to determine the effect of radiation exposure, gender, age at the time of examination, and ethnicity on concentration of FOXP3 protein in lysates of mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells in chronically exposed individuals in the period of cancer effects development. The main group consisted of 30 people aged 67–80 years, predominantly female and Turks. The comparison group included 10 unexposed individuals of similar age, gender, and ethnicity. In the main group, the mean dose to RBM was 867 mGr, to the thymus and peripheral lymphoid organs — 125 mGr. After 24-hour *in vitro* PHA stimulation, mononuclears were lysed, and the concentrations of the total protein and FOXP3 (using quantitative enzyme immunoassay) were measured. Among the different dose groups, there were no significant differences in FOXP3 concentration in mitogen-stimulated mononuclears (prior to the stimulation: 0 pg/ml in the comparison group and 3.50 ± 1.50 (0–27.19) pg/ml in the main group at $p = 0.349$; after the stimulation, respectively: 1.54 ± 1.51 (0–15.16) pg/ml and 9.71 ± 3.86 (0–77.92) pg/ml, $p = 0.512$). The variability of individual values is slightly higher in the main group than in the comparison group. Preliminary results allow concluding that the dose to RBM, thymus and peripheral lymphoid organs, age at the time of examination, gender, and ethnicity have no statistically significant effect on the concentration of FOXP3 protein in the lysates of the mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells of chronically exposed people.

Keywords: chronic radiation exposure, the Techa River, intracellular concentration, FOXP3 transcription factor, peripheral blood mononuclear cells, Phytohemagglutinin

Funding: this study was carried out in the framework of state assignment of the FMBA of Russia, subject "State of human cellular immunity during realization of long-term effects of chronic radiation exposure."

Acknowledgments: authors thank Startsev NV, Head of the "Human Being" Database Department of the Urals Research Center for Radiation Medicine of the FMBA of Russia, for the data provided; Litvinenko NP, senior laboratory assistant at the Laboratory of Molecular Cellular Radiobiology of the Urals Research Center for Radiation Medicine of the FMBA of Russia, for assistance in conducting the experiment.

Author contribution: Kodintseva EA — study concept and design, experimental work, analysis and statistical processing of the data, article authoring; Akleyev AA — study concept, interpretation of the results, article editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Urals Research Center for Radiation Medicine of the FMBA of Russia (Minutes #3 of June 8, 2023). Participants of the study signed a voluntary informed consent in conformity with the 2013 Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina A. Kodintseva
Vorovskogo, 68A, Chelyabinsk, 454141, Russia; ovcharova.cat@mail.ru

Received: 31.07.2023 **Accepted:** 22.08.2023 **Published online:** 28.09.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.032

Актуальной задачей современной радиобиологии является поиск маркеров индивидуальной радиочувствительности в контексте реализации отдаленных эффектов облучения [1–3]. Одним из наиболее значимых эффектов воздействия ионизирующих излучений на человека является радиационно-индуцированный канцерогенез, патогенетические механизмы которого в настоящее время активно исследуют. Повышенный риск онкопатологии в отдаленные сроки после радиационного воздействия отмечается в разных когортах людей: у лиц, переживших атомные бомбардировки [4], ликвидаторов радиационных аварий [5], в когортах профессионалов [6], у проживающего на радиационно загрязненных территориях населения [7, 8]. В частности, в когорте облученных на реке Тече лиц выявлены повышенные риски заболеваемости и смертности от злокачественных опухолей и лейкозов [9].

Идентификация и верификация маркеров предрасположенности к развитию радиационно-индуцированной онкопатологии важна для оптимизации подходов к формированию групп повышенного риска в когортах людей, пострадавших в результате облучения, с целью максимально полного медицинского наблюдения за лицами с повышенным риском развития злокачественных новообразований (ЗНО) [2]. Показатели иммунитета, в первую очередь, характеризующие состояние Т-клеток, в отдаленные сроки после радиационного воздействия могут быть рассмотрены в качестве таких маркеров. Так, у жителей сел, расположенных вдоль побережья реки Течи, перенесших хронический лучевой синдром (ХЛС), через 65 лет после начала облучения отмечено снижение абсолютного количества CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺-лимфоцитов в периферической крови и повышение сывороточных концентраций IL4 и ФНО α по сравнению с людьми аналогичного возраста и пола, облученными в сопоставимых дозах, но не имевших ХЛС в анамнезе [10].

В контексте патогенетических механизмов радиационно-индуцированного канцерогенеза гетерогенная субпопуляция Т-регуляторных клеток (Трег или CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-лимфоциты [11]) представляет особый интерес. Фактор транскрипции FOXP3 специфичен для Трег и обеспечивает контроль дифференцировки и функционирования этой субпопуляции лимфоцитов [12]. Определение уровней этого белка может быть перспективно в качестве одного из потенциальных маркеров предрасположенности к развитию радиационно-индуцированной онкопатологии человека в отдаленном периоде после хронического радиационного воздействия с преимущественным поражением центрального органа гемопоэза — красного костного мозга (ККМ). Ген FOXP3 доминантно контролирует функцию Трег, а его непрерывная экспрессия гарантирует сохранение полной супрессивной способности этих клеток [11]. Фактор транскрипции FOXP3 репрессирует транскрипцию IL2, повышает экспрессию CD25 и других маркеров Трег. Механизмы Трег-опосредованной супрессии до сих пор обсуждают, но известно, что регуляция экспрессии белка FOXP3 критически важна для контроля иммунных реакций, включая противоопухолевый надзор [12].

В норме белок FOXP3 взаимодействует с ключевыми транскрипционными факторами Т-лимфоцитов, включая NFAT, NFkB и AML1/Runx1 и др. Экспрессию гена FOXP3 контролирует транскрипционная и эпигенетическая регуляция. Изменение экспрессии гена FOXP3 приводит к смене фенотипа Т-клеток и изменению их функций [12]. У человека экспрессия гена FOXP3 в большинстве CD4⁺-Т-

клетках может быть вызвана продолжительной стимуляцией Т-клеточного рецептора. При этом большинство FOXP3⁺ Т-клеток имеют низкий уровень фактора FOXP3 [12]. Транскрипция гена FOXP3 может быть инициирована в эффекторных Т-клетках при распознавании антигена в процессе воспаления [13]. За счет способности к ингибированию противоопухолевого иммунитета Трег способствуют развитию и прогрессированию опухолей. Высокая инфильтрация опухолевой ткани Трег клетками связана с плохой выживаемостью пациентов при различных типах ЗНО [14]. Регуляторные функции Трег, инфильтрирующих опухоль, осуществляются посредством сигнального пути COX2 / PGE2 [15]. В настоящее время Трег активно изучают как потенциальные терапевтические мишени при онкотерапии [14], однако исследования модулирующих эффектов ионизирующих излучений на фенотип и функции Трег-клеток, включая экспрессию гена FOXP3, концентрации и функциональную активность фактора транскрипции FOXP3, в доступной научной литературе представлены в ограниченном объеме [16].

Пластичность субпопуляции Трег, участие фактора транскрипции FOXP3 в дифференцировке Трег, а также роль регуляторных Т-клеток в радиационно-индуцированном канцерогенезе определяют актуальность количественного исследования белка FOXP3 в мононуклеарах периферической крови у людей из когорты реки Течи.

Целью данной работы было исследование влияния радиационного воздействия, пола, возраста на момент обследования и этнической принадлежности на концентрацию белка FOXP3 в лизатах митоген-стимулированных мононуклеарных клеток периферической крови у хронически облученных жителей прибрежных сел реки Течи в период реализации канцерогенных эффектов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование образцов крови сельских жителей, постоянно проживающих в прибрежной зоне реки Течи и подвергшихся хроническому низкоинтенсивному облучению преимущественно за счет остетропных радионуклидов (ККМ — орган-мишень), проводили во ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России. Доза облучения каждого пациента была оценена с помощью дозиметрической системы TRDS-2016 [17].

Перед взятием крови пациенты в установленном порядке проходили медицинский осмотр. Критерии включения в исследование: отсутствие острых и хронических воспалительных заболеваний в стадии обострения; отсутствие почечной или печеночной недостаточности. Критерии исключения: приступы острого нарушения мозгового кровообращения или черепно-мозговые травмы в течение трех месяцев до исследования; наличие подтвержденных онкологических и аутоиммунных заболеваний; наличие курсов гормоно-, антибиотико-, химио- и (или) радиотерапии; проведение медицинских процедур с применением ионизирующих излучений в течение шести месяцев перед исследованием.

В группу облученных людей (основная группа) были включены 30 человек в возрасте 67–80 лет, средний возраст которых составил $72,4 \pm 0,5$ года. Средняя накопленная доза облучения, рассчитанная на ККМ, у людей из данной группы составила 876 ± 136 МГр с диапазоном значений 87–3716 МГр. Средняя накопленная доза облучения, рассчитанная на тимус и периферические

Таблица. Концентрации фактора транскрипции FOXP3 в лизатах МНК после митогенной стимуляции

Концентрация, пг/мл		Группа сравнения, доза облучения ККМ: менее 0,07 Гр, $n = 10$	Основная группа, доза облучения ККМ: от 0,07 до 3,72 Гр, $n = 30$	Подгруппы основной группы, доза облучения ККМ:		
				от 0,07 до 0,49 Гр, $n = 10$	от 0,50 до 0,84 Гр, $n = 10$	от 0,85 до 3,72 Гр, $n = 10$
FOXP3 через 24 ч инкубации	без ФГА	0	3,50 ± 1,50 (0–27,19)	2,63 ± 2,63 (0–26,33)	6,78 ± 3,52 (0–27,19)	1,09 ± 0,78 (0–7,32)
	с ФГА	1,54 ± 1,51 (0–15,16)	9,71 ± 3,86 (0–77,92)	5,97 ± 4,88 (0–48,84)	13,42 ± 8,00 (0–77,92)	9,73 ± 7,28 (0–73,2)

Примечание: данные представлены в формате $M \pm m$ (min–max).

лимфоидные органы (ТиПЛО) — 125 ± 20 МГр с разбросом значений от 28 до 446 МГр.

Для изучения дозовых зависимостей основная группа пациентов была разбита на три группы пациентов с минимальными (0,07–0,49 Гр включительно), средними (0,50–0,84 Гр включительно) и высокими (0,85–3,72 Гр включительно) дозами облучения, рассчитанными на ККМ, по десять человек аналогичного возраста, пола и этноса в каждой группе. Статистически значимых различий по качественным характеристикам между тремя дозовыми группами и группой сравнения не обнаружено.

Группу сравнения составили 10 человек в возрасте 63–82 лет, не подвергавшихся радиационному воздействию в результате деятельности промышленных предприятий. Средний возраст людей в этой группе был равен $71,2 \pm 2,0$ года. Средняя накопленная доза облучения ККМ у людей из этой группы составила 27 ± 4 МГр с диапазоном значений 15–49 МГр. Средняя накопленная доза облучения ТиПЛО — 12 ± 3 МГр с интервалом значений 2–34 МГр.

В каждой группе преобладали женщины: 73,3% (22 человека) — в основной группе и 90,0% (9 человек) — в группе сравнения. В основной группе присутствовало 80,0% (24 человека) людей тюркской этнической группы, в группе сравнения — 70,0% (7 человек). Статистически значимые различия в возрастном, половом, этническом составе основной группы и группы сравнения не выявлены.

Образцы крови (4 мл) получали по стандартной технологии [18] из локтевой вены утром натощак в вакуэты, содержащие гепарин натрия. Фракцию моноклеарных клеток (МНК) выделяли на градиенте плотности $1,077 \text{ г/см}^3$ («Биолот»; Россия), дважды отмывали модифицированным по Дульбекко фосфатно-солевым буфером («Биолот»; Россия). Для инкубации МНК в течение 24 ч при $37,0 \pm 0,5$ °C использовали среду RPMI-1640 (HEPES 25 мМ, NaHCO_3 24 мМ) («Панэко»; Россия) с витаминами («Панэко»; Россия), L-глутамином 2 мМ («Панэко»; Россия), в которую добавляли 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот»; Россия). В тестовую пробу МНК вносили фитогемагглютинин-П (ФГА) («Панэко»; Россия) в конечной концентрации 20 мкг/мл, в контрольную пробу МНК — равное раствору митогена количество воды очищенной. После стимуляции МНК осаждали, удаляли супернатант и хранили при минус 80 °C до следующего этапа. Оттаивание МНК проводили при температуре 2–8 °C, гемолиз примеси эритроцитов индуцировали охлажденным хлоридом аммония раствором pH 7,27,4 [19]. МНК отмывали холодным фосфатно-солевым буфером (pH 7,4) (Sigma-Aldrich; США). Оценивали концентрацию клеток с помощью счетчика клеток «Countess II FL» (Thermo Scientific; США). Лизировали МНК, трижды замораживая при температуре минус 20 °C и размораживая пробы при комнатной температуре согласно рекомендациям производителя тест-системы для иммуноферментного анализа (ИФА). Количественно общий белок в лизатах клеток

анализировали в реакции с бидинхониновой кислотой (тест-система фирмы «Merck»; США) в 96-луночном планшете с помощью анализатора «Lazurite» (Dynex Technologies Inc.; США). Содержание фактора транскрипции FOXP3 в пробах определяли методом количественного ИФА (тест-система фирмы «Blue gene»; Китай) на том же анализаторе с последующим пересчетом результата на 1 мкг общего белка в пробе.

При статистическом анализе данных использовали программное обеспечение SigmaPlot (демоверсия; SYSTAT Software, США). Гипотезу о нормальном распределении частот в выборках проверяли по критерию Колмогорова–Смирнова. Фактическое распределение частот отличалось от нормального во всех выборках. Для максимальной наглядности (медианное значение равно нулю в случаях, когда концентрация фактора транскрипции FOXP3 во всех или в большинстве исследуемых проб выборки была ниже предела количественного определения ИФА тест-системы) данные описательной статистики выражали как среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего (m) и диапазон значений (min–max). Выборки данных сравнивали при помощи U -критерия Уилкоксона–Манна–Уитни. Качественные показатели — методом χ^2 . Корреляционный анализ выполняли методом Спирмена. Статистическую значимость различий или связей оценивали при 95%-м уровне доверительной вероятности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты количественного определения фактора транскрипции FOXP3 в лизатах лимфоцитов после 24 ч инкубации с ФГА и без митогена представлены в таблице.

Не установлено статистически значимых различий при сравнении концентраций белка FOXP3 в лизатах МНК после 24 ч инкубации с ФГА и без митогена у обследованных людей из основной группы (до стимуляции: $p = 0,349$, после стимуляции $p = 0,512$), из трех дозовых подгрупп (до стимуляции: $p = 0,706$, $p = 0,257$, $p = 0,450$; после стимуляции: $p = 0,940$, $p = 0,326$, $p = 0,597$ в порядке возрастания дозы облучения ККМ в подгруппе) и группы сравнения.

Вариация индивидуальных значений внутриклеточной концентрации фактора транскрипции FOXP3 в группах хронически облученных лиц с разными накопленными дозами облучения после митогенной стимуляции МНК *in vitro* несколько выше, чем в группе сравнения.

При анализе дозовых зависимостей не выявлено статистически значимых связей между концентрацией фактора транскрипции FOXP3 в исследуемых лизатах стимулированных (SR = 0,13; $p = 0,414$) и не стимулированных (SR = 0,18; $p = 0,263$) митогеном МНК в течение 24 ч и дозами облучения, рассчитанными на ККМ, а также на тимус и периферические лимфоидные органы (до стимуляции: SR = 0,23, $p = 0,183$; после стимуляции: SR = 0,09, $p = 0,602$).

Корреляционный анализ Спирмена не выявил влияния пола (до стимуляции: $SR = -0,08$, $p = 0,609$, после стимуляции: $SR = -0,03$, $p = 0,856$), возраста на момент обследования (до стимуляции: $SR = 0,02$, $p = 0,915$; после стимуляции: $SR = 0,11$, $p = 0,484$), этнической принадлежности (до стимуляции: $SR = 0,05$, $p = 0,767$; после стимуляции: $SR = -0,01$, $p = 0,966$) на исследуемые показатели у обследованных людей из основной группы и из группы сравнения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Особенностью радиационно-индуцированного канцерогенеза является длительный период реализации эффекта, что может быть обосновано дополнительным влиянием комплекса факторов нерадиационной природы на организм облученного человека, в том числе и факторов риска развития ЗНО. В организме, облученном в сублетальных дозах, включаются компенсаторно-приспособительные механизмы, адекватное функционирование которых препятствует, в частности, онкотрансформации нормальных клеток [10]. Имунокомпетентные клетки являются основными эффекторами противоопухолевого иммунного надзора, нарушение их функций — один из ключевых аспектов патогенеза ЗНО [20].

У практически здоровых жителей сел, расположенных вдоль техногенно загрязненной радионуклидами поймы реки Течи и подвергшихся многолетнему низкоинтенсивному воздействию ионизирующих излучений вследствие производственной деятельности ПО «Маяк», в отдаленном периоде после начала облучения обнаружены стойкие изменения иммунного статуса, наиболее выраженные со стороны Т-звена иммунитета. Сообщается о снижении количества лейкоцитов (в основном, за счет нейтрофилов и лимфоцитов) в периферической крови, повышении лизосомной активности нейтрофилов, некоторой супрессии внутриклеточного кислород-зависимого метаболизма моноцитов [1] и смещении баланса системы цитокинов в сторону провоспалительного ответа [21].

Регуляторные Т-клетки, с одной стороны, могут напрямую ингибировать активность цитотоксических Т-клеток, с другой стороны — эти клетки могут быть рекрутированы или индуцированы онкотрансформированными клетками и клетками микроокружения опухоли, что позволяет им избегать иммунной атаки. Трег-лимфоциты могут препятствовать активации и дифференцировке $CD4^{+}$ - и $CD8^{+}$ -Т-клеток, индуцируют реактивность против аутологических и опухолевых антигенов [11].

В микроокружении опухоли индукция и дифференцировка Трег происходят из Т-лимфоцитов с сильной иммунодепрессивной функцией, которые подавляют противоопухолевый иммунитет, способствуя возникновению и развитию опухолей. Трег из опухолевого микроокружения, в свою очередь, могут подавлять функцию иммунных эффекторных клеток с помощью различных механизмов и являются важными факторами уклонения опухоли от иммунного надзора [22–25]. Трег микроокружения опухоли могут секретировать $TGF\beta$, IL10 и IL35 [26], которые угнетают противоопухолевый иммунный ответ, подавляют антигенную презентацию в дендритных клетках, функцию Т-хелперов и генерируют опухолеспецифичные $CD8^{+}$ -цитотоксические Т-лимфоциты. Цитокины IL10 и IL35 по-разному экспрессируются субпопуляциями Трег клеток микроокружения опухоли и синергически способствуют истощению внутриопухолевых Т-клеток, регулируя

экспрессию нескольких ингибирующих рецепторов [27]. Трег способны к непосредственному цитолизу других клеток за счет секреции перфорина и гранзимов, а также синтезируют и продуцируют циклический аденозин-фосфат, влияя на метаболизм других клеток [11, 14].

Экспериментальные данные, полученные на мышах, свидетельствуют об увеличении доли опухолевых и селезеночных Трег после локального облучения в дозах 10 и 20 Гр и снижении общего количества $CD4^{+}FOXP3^{+}$ -Трег в лимфатических узлах после общего облучения мышей в дозе 1,25 Гр [28].

При воздействии ионизирующего излучения жизнеспособность $CD4^{+}$ -лимфоцитов человека дозозависимо уменьшается. Отмечена более высокая радиорезистентность Трег по сравнению с $CD4^{+}$ -лимфоцитами и зависимое от дозы снижение экспрессии гена $FOXP3$ в Трег человека при дозах облучения 0,940 Гр и 1,875 Гр. Натуральные (нТрег) и $TGF\beta$ -индуцированные (iTрег) регуляторные Т-клетки проявляют повышенную устойчивость к облучению в дозе 10 Гр по сравнению с обычными $CD4^{+}$ -лимфоцитами. Через 48 ч после облучения клеток в дозе 10 Гр экспрессия гена $FOXP3$ снижается в нТрег и в iTрег (более выражено). Пониженная после облучения *in vitro* экспрессия гена $FOXP3$ в iTрег не влияет на дифференцировку в Т-хелперы первого или второго типа. В $CD4^{+}CD25^{+}$ -iTрег экспрессия гена $T-BET$, участвующего в процессе дифференцировки клеток в Т-хелперы первого типа, была низкой до и после облучения в дозе 10 Гр, а экспрессия гена $GATA3$, участвующего в дифференцировке лимфоцитов в Т-хелперы второго типа, снижалась через 48 ч после такого облучения. Облучение изменяет экспрессию характерных молекул iTрег. При воздействии ионизирующего излучения в iTрег увеличивается экспрессия гена $LAG-3$, снижается экспрессия молекул $CD25$, $CTLA-4$, а также способность клеток угнетать пролиферацию $CD3^{+}CD8^{+}$ -лимфоцитов [16].

Полученные в настоящем исследовании данные позволяют говорить о сохранности в отдаленном периоде функционала Трег-клеток, циркулирующих в периферической крови практически (или «условно») здоровых хронически облученных людей, в том числе процессов их дифференцировки, реализуемых посредством гена $FOXP3$ и его ключевого фактора транскрипции — белка $FOXP3$. Это может быть обусловлено высоким адаптационным потенциалом иммунной и гемопозитической системы человека, реализуемым в отдаленные сроки после хронического низкоинтенсивного радиационного воздействия с преимущественным поражением ККМ [1, 10, 21]. Однако представленные данные не позволяют исключать возможность aberrантных местных иммунных ответов с участием Трег на этапе инициации ЗНО у облученных пациентов из групп повышенного онкологического риска. Данная проблема требует более детального изучения.

Результаты выполненного исследования не противоречат современным научным данным, но позволяют пополнить их сведениями о реакции МНК, выделенных из периферической крови хронически облученных людей на митогенную стимуляцию *in vitro* в период реализации канцерогенных эффектов облучения у изучаемой когорты населения.

ВЫВОДЫ

Значения концентрации факторов транскрипции $FOXP3$ в лизатах МНК через 24 ч инкубации с митогеном и без добавления ФГА статистически значимо не различались в

группах хронически облученных и необлученных людей. Не выявлено влияния доз облучения ККМ, а также тимуса и периферических лимфоидных органов на внутриклеточные концентрации фактора транскрипции FOXP3 в МНК периферической крови человека после стимулирования митогеном. Статистически значимых взаимосвязей между полом, возрастом на момент обследования, этнической принадлежностью обследованных людей на концентрацию белка FOXP3 в лизатах митоген-стимулированных МНК не обнаружено. Высокая вариация у практически здоровых хронически облученных людей индивидуальных значений внутриклеточной концентрации фактора транскрипции FOXP3 после стимуляции МНК митогеном *in vitro* косвенно

подтверждает гипотезу о наличии латентных и, по-видимому, компенсированных функциональных изменений в зрелых иммунокомпетентных клетках. Показатель может быть рассмотрен в качестве одного из потенциальных маркеров при оценке индивидуальной радиочувствительности человека в условиях хронического облучения в диапазоне малых и средних доз с преимущественным поражением ККМ. Необходимо продолжить работу по изучению ключевых факторов транскрипции, участвующих в дифференцировке иммунокомпетентных клеток и обеспечивающих их функционирование в норме у хронически облученного населения, а также изучение их роли при радиационно-индуцированном канцерогенезе.

Литература

1. Аклев А. А. Иммунный статус человека в отдаленном периоде хронического радиационного воздействия. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020; 4 (65): 29–35. DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-4-29-35.
2. Akleyev AV. Specific features of medical care provision to the population of the Techa riverside settlements. Journal of Radiological Protection. 2021; 41 (4): S342. DOI: 10.1088/1361-6498/ac0c02.
3. Rybkina VL, Bannikova MV, Adamova GV, Dörr H, Scherthan H, Azizova TV. Immunological Markers of Chronic Occupational Radiation Exposure. Health Physics. 2018; 115 (1): 108–13. DOI: 10.1097/HP.0000000000000855.
4. Ozasa K, Cullings HM, Ohishi W, Hida A, Grant EJ. Epidemiological studies of atomic bomb radiation at the Radiation Effects Research Foundation. International Journal of Radiation Biology. 2019; 95 (7): 879–91. DOI: 10.1080/09553002.2019.1569778.
5. Bazyka DA, Phsyazhnyuk AY, Gudzenko NA, Fuzik MM, Trotsyuk NK, Babkina NG, et al. Late oncological aftereffects of radiation exposure caused by the chornobyl accident. Probl Radiac Med Radiobiol. 2022; 27: 138–49. English, Ukrainian. DOI: 10.33145/2304-8336-2022-27-138-149.
6. Adliene D, Gričienė B, Skovorodko K, Laurikaitienė J, Puiso J. Occupational radiation exposure of health professionals and cancer risk assessment for Lithuanian nuclear medicine workers. Environmental Research. 2020; 183: 109–44. DOI: 10.1016/j.envres.2020.109144.
7. Крестинина Л. Ю., Силкин С. С., Микрюкова Л. Д., Елифанова С. Б., Аклев А. В. Риск заболеваемости солидными злокачественными новообразованиями в Уральской когорте аварийно-облученного населения: 1956–2017. Радиационная гигиена. 2020; 13 (3): 6–17. DOI: 10.21514/1998-426X-2020-13-3-6-17.
8. Drozdovitch V. Radiation exposure to the thyroid after the chernobyl accident. Frontiers in Endocrinology (Lausanne). 2021 Jan [cited 2023 Apr 20]; 11: 569041. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33469445/>. DOI: 10.3389/fendo.2020.569041.
9. Крестинина Л. Ю., Силкин С. С., Дегтева М. О., Аклев А. В. Риск смерти от болезней системы кровообращения в Уральской когорте аварийно-облученного населения за 1950–2015 годы. Радиационная гигиена. 2019; 12 (1): 52–61. DOI: 10.21514/1998-426X-2019-12-1-52-61.
10. Аклев А. А., Долгушин И. И. Особенности иммунного статуса у людей, перенесших хронический лучевой синдром, в отдаленные сроки. Радиация и риск. 2018; 27 (2): 7666–85. DOI: 10.21870/0131-3878-2018-27-2-76-85.
11. Li C, Jiang P, Wei S, Xu X, Wang J. Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. Molecular Cancer. 2020 Jul [cited 2023 Apr 20]; 19 (1): 116. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32680511/> DOI: 10.1186/s12943-020-01234-1.
12. Ono M. Control of regulatory T–cell differentiation and function by T–cell receptor signalling and Foxp3 transcription factor complexes. Immunology. 2020; 160 (1): 24–37. DOI: 10.1111/imm.13178
13. Bending D, Paduraru A, Ducker CB, Prieto Martin P, Crompton T, Ono M. A temporally dynamic Foxp3 autoregulatory transcriptional circuit controls the effector Treg programme. EMBO Journal. 2018 Aug [cited 2023 Apr 20]; 37: e99013. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29991564/>. DOI: 10.15252/embj.201899013.
14. Ohue Y, Nishikawa H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? Cancer Science. 2019; 110 (7): 2080–9. DOI:10.1111/cas.14069.
15. Emel S, Mehmet S. Epigenetical targeting of the FOXP3 gene by S-adenosylmethionine diminishes the suppressive capacity of regulatory T cells ex vivo and alters the expression profiles. Journal of Immunotherapy. 2019; 42 (1): 11–22. DOI: 10.1097/CJI.0000000000000247.
16. Beauford SS, Kumari A, Garnett-Benson C. Ionizing radiation modulates the phenotype and function of human CD4+ induced regulatory T cells. BMC Immunology. 2020 Apr [cited 2023 Apr 20]; 21 (1): 18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32299365/> DOI: 10.1186/s12865-020-00349-w, DOI: 10.1186/s12865-020-00363-y.
17. Дегтева М. О., Напье Б. А., Толстых Е. И., Шишкина Е. А., Бугров Н. Г., Крестинина Л. Ю. и др. В. Распределение индивидуальных доз в когорте людей, облученных в результате радиоактивного загрязнения реки Течи. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019; 64 (3): 46–53. DOI: 10.12737/article_5cf2364cb49523.98590475.
18. Кишкун А. А. Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019; 1000 с.
19. Клаус Дж., редактор. Лимфоциты: методы. М.: Мир, 1990; 395 с.
20. Слепов Ю. К., Лаушкин М. А., Деев Р. В. Гипотеза о роли иммунной системы в канцерогенезе. Гены & Клетки. 2021; 16 (1): 82–91. DOI: 10.23868/202104013.
21. Козинцева Е. А., Аклев А. А., Блинова Е. А. Цитокиновый профиль лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, в отдаленные сроки после облучения. Радиационная биология. Радиоэкология. 2021; 5 (61): 506–14. DOI: 10.31857/S0869803121050076.
22. Sakaguchi S, Mikami N, Wing JB, Tanaka A, Ichiyama K, Ohkura N. Regulatory T cells and human disease. Annual Review of Immunology. 2020; 38: 541–66. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042718-041717.
23. Toker A, Ohashi PS. Expression of costimulatory and inhibitory receptors in FoxP3(+) regulatory T cells within the tumor microenvironment: implications for combination immunotherapy approaches. Advances in Cancer Research. 2019; 144: 193–261. DOI: 10.1016/bs.acr.2019.05.001.
24. Campbell C, Rudensky A. Roles of regulatory T cells in tissue pathophysiology and metabolism. Cell Metabolism. 2020; 31: 18–25. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.09.010.
25. Cuadrado E, van den Biggelaar M, de Kivit S, Chen YY, Slot M, Doubal I, Meijer A, van Lier RAW, Borst J, Amsen D. Proteomic analyses of human regulatory T cells reveal adaptations in signaling pathways that protect cellular identity. Immunity. 2018;

- 48: 1046–6. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.04.008.
26. Sullivan JA, Tomita Y, Jankowska-Gan E, Lema DA, Arvedson MP, Nair A et al. Treg-cell-derived IL-35-coated extracellular vesicles promote infectious tolerance. *Cell Reports*. 2020; 30: 1039–51. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.12.081.
 27. Sawant DV, Yano H, Chikina M, Zhang Q, Liao M, Liu C et al. Adaptive plasticity of IL-10(+) and IL-35(+) Treg cells cooperatively promotes tumor T cell exhaustion. *Nature Immunology*. 2019; 20: 724–35. DOI: 10.1038/s41590-019-0346-9.
 28. Muroyama Y, Nirschl TR, Kochel CM, Lopez-Bujanda Z, Theodros D, Mao W, et al. Stereotactic Radiotherapy Increases Functionally Suppressive Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment. *Cancer Immunology Research*. 2017; 5 (11): 992–1004. DOI: 10.1158/2326-6066.
- ## References
1. Akleev AA. Immunnyj status cheloveka v otdalennom periode xronicheskogo radiacionnogo vozdejstviya. *Medicinskaya radiologiya i radiacionnaya bezopasnost'*. 2020; 4 (65): 29–35. DOI: 10.12737/1024-6177-2020-65-4-29-35. Russian.
 2. Akleyev AV. Specific features of medical care provision to the population of the Techa riverside settlements. *Journal of Radiological Protection*. 2021; 41 (4): S342. DOI: 10.1088/1361-6498/ac0c02.
 3. Rybkina VL, Bannikova MV, Adamova GV, Dörr H, Scherthan H, Azizova TV. Immunological Markers of Chronic Occupational Radiation Exposure. *Health Physics*. 2018; 115 (1): 108–13. DOI: 10.1097/HP.0000000000000855.
 4. Ozasa K, Cullings HM, Ohishi W, Hida A, Grant EJ. Epidemiological studies of atomic bomb radiation at the Radiation Effects Research Foundation. *International Journal of Radiation Biology*. 2019; 95 (7): 879–91. DOI: 10.1080/09553002.2019.1569778.
 5. Bazyka DA, Pryszazhnyuk AY, Gudzenko NA, Fuzik MM, Trotsyuk NK, Babkina NG, et al. Late oncological aftereffects of radiation exposure caused by the chornobyl accident. *Probl Radiac Med Radiobiol*. 2022; 27: 138–49. English, Ukrainian. DOI: 10.33145/2304-8336-2022-27-138-149.
 6. Adliene D, Gričienė B, Skovorodko K, Laurikaitienė J, Puiso J. Occupational radiation exposure of health professionals and cancer risk assessment for Lithuanian nuclear medicine workers. *Environmental Research*. 2020; 183: 109–44. DOI: 10.1016/j.envres.2020.109144.
 7. Krestinina LYu, Silkin SS, Mikryukova LD, Epifanova SB, Akleev AV. Risk zabolevaemosti solidnymi zlokachestvennymi novooobrazovaniyami v Ural'skoj kogorte avarijno-obluchennogo naseleniya: 1956–2017. *Radiacionnaya gigiena*. 2020; 13 (3): 6–17. DOI: 10.21514/1998-426X-2020-13-3-6-17. Russian.
 8. Drozdovitch V. Radiation exposure to the thyroid after the chernobyl accident. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*. 2021 Jan [cited 2023 Apr 20]; 11: 569041. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33469445/>. DOI: 10.3389/fendo.2020.569041.
 9. Krestinina LYu, Silkin SS, Degteva MO, Akleev AV. Risk smerti ot boleznej sistemy krovoobrashcheniya v Ural'skoj kogorte avarijno-obluchennogo naseleniya za 1950-2015 gody. *Radiacionnaya gigiena*. 2019; 12 (1): 52–61. DOI: 10.21514/1998-426X-2019-12-1-52-61. Russian.
 10. Akleev AA, Dolgushin II. Osobennosti immunnogo statusa u lyudej, perenessih hronicheskij luchevoj sindrom, v otdalennye sroki. *Radiaciya i risk*. 2018; 27 (2): 766–85. DOI: 10.21870/0131-3878-2018-27-2-76-85. Russian.
 11. Li C, Jiang P, Wei S, Xu X, Wang J. Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Molecular Cancer*. 2020 Jul [cited 2023 Apr 20]; 19 (1): 116. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32680511/> DOI: 10.1186/s12943-020-01234-1.
 12. Ono M. Control of regulatory T-cell differentiation and function by T-cell receptor signalling and Foxp3 transcription factor complexes. *Immunology*. 2020; 160 (1): 24–37. DOI: 10.1111/imm.13178
 13. Bending D, Paduraru A, Ducker CB, Prieto Martin P, Crompton T, Ono M. A temporally dynamic Foxp3 autoregulatory transcriptional circuit controls the effector Treg programme. *EMBO Journal*. 2018 Aug [cited 2023 Apr 20]; 37: e99013. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29991564/>. DOI: 10.15252/emboj.201899013
 14. Ohue Y, Nishikawa H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Science*. 2019; 110 (7): 2080–9. DOI:10.1111/cas.14069.
 15. Emel S, Mehmet S. Epigenetical targeting of the FOXP3 gene by S-adenosylmethionine diminishes the suppressive capacity of regulatory T cells ex vivo and alters the expression profiles. *Journal of Immunotherapy*. 2019; 42 (1): 11–22. DOI: 10.1097/CJI.0000000000000247.
 16. Beauford SS, Kumari A, Garnett-Benson C. Ionizing radiation modulates the phenotype and function of human CD4+ induced regulatory T cells. *BMC Immunology*. 2020 Apr [cited 2023 Apr 20]; 21 (1): 18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32299365/> DOI: 10.1186/s12865-020-00349-w, DOI: 10.1186/s12865-020-00363-y.
 17. Degteva MO, Napier BA, Tolstykh EI, Shishkina EA, Bougrov NG, Krestinina LYu, i dr. Raspredelenie individual'nyh doz v kogorte lyudej, obluchennyh v rezul'tate radioaktivnogo zagryazneniya reki Tечи. *Medicinskaya radiologiya i radiacionnaya bezopasnost'*. 2019; 64 (3): 46–53. DOI: 10.12737/article_5cf2364cb49523.98590475. Russian.
 18. Kishkun AA. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika: uchebnoe posobie*. M.: GEHOTAR-Media, 2019; 1000 s. Russian.
 19. Klaus Dzh, redaktor. *Limfocity: metody*. M.: Mir, 1990; 395 s. Russian.
 20. Slepov YuK, Laushkin MA, Deev RV. Gipoteza o roli immunnnoj sistemy v kancerogeneze. *Geny & Kletki*. 2021; 16 (1): 82–91. DOI: 10.23868/202104013. Russian.
 21. Kodintseva EA, Akleyev AA, Blinova EA. Citokinovyy profil' lic, podvergshihsia hronicheskomu radiacionnomu vozdejstviyu, v otdalennye sroki posle oblucheniya. *Radiacionnaya biologiya. Radioehkologiya*. 2021; 5 (61): 506–14. DOI: 10.31857/S0869803121050076. Russian.
 22. Sakaguchi S, Mikami N, Wing JB, Tanaka A, Ichihama K, Ohkura N. Regulatory T cells and human disease. *Annual Review of Immunology*. 2020; 38: 541–66. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042718-041717.
 23. Toker A, Ohashi PS. Expression of costimulatory and inhibitory receptors in FoxP3(+) regulatory T cells within the tumor microenvironment: implications for combination immunotherapy approaches. *Advances in Cancer Research*. 2019; 144: 193–261. DOI: 10.1016/bs.acr.2019.05.001.
 24. Campbell C, Rudensky A. Roles of regulatory T cells in tissue pathophysiology and metabolism. *Cell Metabolism*. 2020; 31: 18–25. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.09.010.
 25. Cuadrado E, van den Biggelaar M, de Kivit S, Chen YY, Slot M, Doubal I, Meijer A, van Lier RAW, Borst J, Amsen D. Proteomic analyses of human regulatory T cells reveal adaptations in signaling pathways that protect cellular identity. *Immunity*. 2018; 48: 1046–6. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.04.008.
 26. Sullivan JA, Tomita Y, Jankowska-Gan E, Lema DA, Arvedson MP, Nair A et al. Treg-cell-derived IL-35-coated extracellular vesicles promote infectious tolerance. *Cell Reports*. 2020; 30: 1039–51. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.12.081.
 27. Sawant DV, Yano H, Chikina M, Zhang Q, Liao M, Liu C et al. Adaptive plasticity of IL-10(+) and IL-35(+) Treg cells cooperatively promotes tumor T cell exhaustion. *Nature Immunology*. 2019; 20: 724–35. DOI: 10.1038/s41590-019-0346-9.
 28. Muroyama Y, Nirschl TR, Kochel CM, Lopez-Bujanda Z, Theodros D, Mao W, et al. Stereotactic Radiotherapy Increases Functionally Suppressive Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment. *Cancer Immunology Research*. 2017; 5 (11): 992–1004. DOI: 10.1158/2326-6066.