

МЕТИЛИРОВАНИЕ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И АПОПТОЗА У ОБЛУЧЕННЫХ ЛИЦ, ВПОСЛЕДСТВИИ ЗАБОЛЕВШИХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ

Е. А. Блинова^{1,2}✉, А. В. Кореченкова¹, В. С. Никифоров^{1,2}, А. В. Аклеев^{1,2}

¹ Уральский научно-практический центр радиационной медицины Федерального медико-биологического агентства России, Челябинск

² Челябинский государственный университет, Челябинск

Метилирование ДНК играет важную роль в канцерогенезе, в литературе встречается достаточно много исследований уровня метилирования всего генома, промоторов генов и некодирующих элементов в раковых клетках. При этом данных об изменении паттерна метилирования в клетках крови и связи с развитием злокачественных новообразований (ЗНО) существенно меньше. Цель работы — исследование уровня метилирования промоторных регионов генов контроля клеточного цикла и апоптоза (*BAX*, *MDM2*, *TP53*, *NFKB1*) в клетках периферической крови лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в латентном периоде развития злокачественных новообразований. Исследование проводили у 200 человек, подвергшихся аварийному хроническому радиационному воздействию в результате сбросов радиоактивных отходов в реку Теча. Уровень метилирования оценивали методом ПЦР в реальном времени. Было установлено, что распределение облученных лиц с ЗНО в латентном периоде по уровню метилирования промоторных регионов генов *BAX*, *MDM2* и *NFKB1* статистически значимо отличалось от распределения в группы сравнения ($p < 0,001$; $p < 0,001$; $p = 0,004$ соответственно). Установлено, что в группе облученных лиц, которые впоследствии заболели ЗНО, доля лиц с уровнем метилирования до 10% промоторной области гена *BAX* была статистически значимо больше и составила 98% относительно группы сравнения, в которой доля таких людей не превышала 73% ($p < 0,00001$).

Ключевые слова: хроническое радиационное воздействие, метилирование генов, CpG-динуклеотиды, канцерогенез, река Теча

Благодарности: статья подготовлена в рамках выполнения Федеральной целевой программы «Модернизация высокотехнологичных методов, направленных на выявление медицинских последствий радиационных воздействий на персонал ПО «Маяк» и население Уральского региона» контракт № 27.501.21.2 от 11.06.2021.

Вклад авторов: Е. А. Блинова — планирование исследования, обобщение первичного материала, анализ и обсуждение результатов, подготовка текста статьи; А. В. Кореченкова — выполнение лабораторных методов исследования, подготовка текста статьи; В. С. Никифоров — выполнение лабораторных методов исследования, подготовка текста статьи; А. В. Аклеев — планирование исследования, редакция текста статьи, подготовка окончательного варианта статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУН УНПЦ РМ ФМБА России (протокол № 2 от 20 июля 2021 г.). Все обследованные лица подписали информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Евгения Андреевна Блинова
ул. Воровского, д. 68А, г. Челябинск, 154141, Россия; blinova@urcrm.ru

Статья получена: 03.10.2023 **Статья принята к печати:** 13.11.2023 **Опубликована онлайн:** 25.12.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.051

METHYLATION OF CELL CYCLE AND APOPTOSIS GENES' PROMOTERS IN EXPOSED INDIVIDUALS WITH SUBSEQUENT MALIGNANT NEOPLASMS

Blinova EA^{1,2}✉, Korechenkova AV¹, Nikiforov VS¹, Akleyev AV^{1,2}

¹ Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia

² Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

DNA methylation plays an important role in carcinogenesis; there are many studies that investigate the degree of methylation of the entire genome, gene promoters, and non-coding elements in cancer cells, but much less information about changes of the methylation patterns in blood cells and links with the development of malignant neoplasms (MN). This study aimed to investigate the degree of methylation of promoter regions of cell cycle control and apoptosis genes (*BAX*, *MDM2*, *TP53*, *NFKB1*) in peripheral blood cells of persons chronically exposed to radiation with MN developing latently. The study included 200 persons chronically exposed to radiation from the Techa River, contaminated with nuclear wastes dumped into it. The level of methylation was assessed by real-time PCR. The participants were divided into exposed and control groups; comparing them, we found that in the former, the distribution of exposed individuals with latent MN by the degree of methylation of promoter regions of *BAX*, *MDM2* and *NFKB1* genes was significantly different from that in the latter ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p = 0.004$, respectively). It was established that, compared to the control group, the share of the test group participants with subsequent MN who had up to 10% of the *BAX* gene promoter regions methylated was significantly higher, and amounted to 98%, while in the control group this figure did not exceed 73% ($p < 0.00001$).

Keywords: chronic radiation exposure, gene methylation, CpG dinucleotides, carcinogenesis, the Techa River

Acknowledgements: the article was prepared in the context of the Federal Target Program "Modernization of high-tech methods of identification of medical consequences of exposure to radiation of personnel of the Mayak Production Association and population of the Ural region," Contract № 27.501.21.2 of 11.06.2021.

Author contributions: E.A. Blinova — study planning, generalization of primary material, analysis and discussion of the results, article drafting; A.V. Korechenkova — laboratory tests, article drafting; V.S. Nikiforov — laboratory tests, article drafting; A.V. Akleyev — study planning, article editing, authoring of the final version of the article.

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 #2 of July 20, 2021). All participants signed the informed consent form to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Evgenia A. Blinova
Vorovskogo, 68A, Chelyabinsk, 454141, Russia; blinova@urcrm.ru

Received: 03.10.2023 **Accepted:** 13.11.2023 **Published online:** 25.12.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.051

На сегодняшний день достаточно хорошо оценен потенциал генетических факторов в прогнозировании рисков развития злокачественных новообразований (ЗНО). Так, для некоторых видов ЗНО установлены генетические маркеры с высокой степенью надежности, например, мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* для ЗНО молочной железы и яичников [1], в гене *TP53* — для ЗНО молочной железы, легких, желудка и кишечника [2], или в гене *ATM* — для ЗНО поджелудочной и молочной желез [3]. Тем не менее их вклад в радиационно-индуцированный канцерогенез остается неопределенным из-за полигенной природы ЗНО. Дополнительным подходом к прогнозированию риска развития ЗНО могут быть эпигенетические показатели, один из которых — метилирование ДНК, способное модифицироваться факторами окружающей среды, в том числе ионизирующим излучением.

Эпигенетические модификации, включая метилирование, влияют на экспрессию генов, участвующих в канцерогенезе на разных стадиях: от инициации до прогрессии [4]. В опухолевых клетках регистрируется гиперметилирование как генов супрессоров, так и мобильных генетических элементов, а также онкогенов. Например, гиперметилирование генов супрессоров опухолевого роста было установлено для немелкоклеточного рака легких, колоректального рака, ЗНО молочной железы, предстательной железы и мочевого пузыря [5–7]. Гипометилирование мобильных генетических элементов, таких как *Alu* и *LINE-1*, а также отдельных областей генов регистрировали при ЗНО молочной железы, яичников, гепатоцеллюлярном раке и ЗНО желудочно-кишечного тракта [8, 9].

Следует отметить, что эпигенетические метки отражают как врожденный генетический фон, так и воздействие факторов окружающей среды, что важно с точки зрения понимания механизмов влияния экзогенных факторов на канцерогенез [10].

Несомненно, метилирование ДНК тканеспецифично, в связи с чем паттерны метилирования, полученные из доступных тканей, например, кровь, не могут быть легко экстраполированы на ткани, в которых развивается рак [11]. Однако это возможно, поскольку соответствие между метилированием ДНК в разных тканях зависит от локуса и степени межтканевой корреляции, кроме того, метильные метки могут наследоваться или возникать на ранних этапах развития, вследствие чего будут определяться во многих тканях [12]. Изменение метилирования в генах, связанных со старением (эпигенетические часы), также может быть ассоциировано с риском развития различных патологий, в том числе рака [13–15].

В литературе имеется информация о разработке алгоритмов прогнозирования риска развития ЗНО на основе анализа метилирования ДНК в клетках крови. Было показано, что алгоритмы анализа фенотипического старения и оценки риска смертности, основанные на уровне метилирования CpG-динуклеотидов ДНК, связаны с возрастом, уровнем белка в плазме крови, курением, а также ключевыми факторами заболевания и могут быть использованы как для оценки общего риска развития ЗНО, так и риска развития различных типов ЗНО (рака легкого, предстательной железы, молочной железы, колоректального рака) [16–18]. В систематическом обзоре опубликованных исследований, посвященных изучению метилирования ДНК крови человека, установлена устойчивая тенденция связи глобального гипометилирования ДНК клеток крови и эпигенетического возраста с повышенным риском развития ЗНО молочной железы [19].

Однако, несмотря на представленные исследования, надежные доказательства предполагаемой связи между моделями метилирования ДНК и риском развития ЗНО все еще отсутствуют.

В связи с тем что остановка клеточного цикла и апоптоз — одни из барьеров на пути клетки к онкотрансформации, в настоящем исследовании была проведена оценка уровня метилирования промоторных регионов генов контроля клеточного цикла и апоптоза (*BAX*, *MDM2*, *TP53*, *NFkB1*) в крови лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию и впоследствии заболевших ЗНО.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Характеристика обследованных лиц

Исследование уровня метилирования CpG-динуклеотидов в промоторных регионах генов *BAX*, *MDM2*, *TP53* и *NFkB1* в клетках периферической крови проводили у лиц, подвергшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию вследствие сбросов жидких радиоактивных отходов в реку Течу производственным объединением «Маяк» в 1950–1960 гг. Для каждого обследованного человека были рассчитаны индивидуальные накопленные дозы облучения красного костного мозга (ККМ) в соответствии с дозиметрической системой TRDST 2016 [20]. Все обследованные люди были разделены на две группы: основная группа — 100 облученных лиц, у которых впоследствии были диагностированы злокачественные новообразования (забор крови у пациентов проводили проспективно в латентном периоде, за 5 лет до развития ЗНО) и группа сравнения — облученные лица без онкологических заболеваний. В настоящем исследовании выбор латентного периода (до 5 лет) был обусловлен тем, что уровень метилирования зависит от разных факторов окружающей среды и может меняться со временем, в результате чего увеличение времени наблюдения могло стать причиной слабой связи с риском развития рака или ее отсутствия. Так, в систематическом обзоре было показано, что в различные периоды наблюдения могут изменяться паттерны метилирования ДНК [19].

Критерии включения людей в обследованные группы: проживание в одном из 41 села, расположенного на побережье реки Течи, в период с 01.01.1950 по 31.12.1960 и наличие рассчитанных индивидуальных кумулятивных доз облучения красного костного мозга на основе дозиметрической системы Techa River Dosimetry System-2016 (TRDS-2016) [20]. Критерии исключения: наличие на момент забора крови аутоиммунных заболеваний, гемобластозов и злокачественных новообразований (в том числе на 2023 г. для группы сравнения).

В основной группе облученных лиц в период с 2002 по 2020 г. были диагностированы следующие виды ЗНО: злокачественные новообразования губы (код по МКБ 10: C00 — 3 случая), органов пищеварения (пищевода: C15 — 1 случай; желудка: C16 — 14 случаев; поперечноободочной кишки C18.4 — 5 случаев; ректосигмоидного соединения: C19 — 3 случая; поджелудочной железы: C25.9 — 8 случаев), органов дыхания и грудной клетки (трахеи, бронха, легкого: C34 — 19 случаев), молочной железы (C50 — 16 случаев), женских половых органов (шейки матки: C53 — 7 случаев; тела матки: C54 — 4 случая; яичника и придатков матки: C56 — 3 случая), мужских половых

Таблица 1. Характеристика исследуемых групп

Характеристика групп	Основная группа (лица с ЗНО в латентном периоде)	Группа сравнения				
		<i>BAX</i>	<i>MDM2</i>	<i>TP53</i>	<i>NFκB1</i>	
Количество участников	<i>n</i> = 100	<i>n</i> = 73	<i>n</i> = 140	<i>n</i> = 69	<i>n</i> = 90	
Возраст на момент обследования, лет: M ± SE (min–max)	68,3 ± 0,7 (51–86)	71,7 ± 0,8 (59–87)	71,8 ± 0,5 (56–87)	70,4 ± 0,8 (58–84)	71,5 ± 0,7 (59–84)	
Пол, человек (%)	Мужчины	46 (46)	26 (36)	51 (36)	17 (25)	29 (32)
	Женщины	54 (54)	47 (64)	89 (64)	52 (75)	61 (68)
Накопленная доза облучения красного костного мозга (ККМ), мГр: M ± SE (min–max)	722,5 ± 69,3 (10,1–3507,1)	542,4 ± 63,4 (10,1–2869,8)	617,6 ± 52,2 (10,1–3179,7)	507,6 ± 62,0 (10,0–2869,8)	765,8 ± 83,3 (10,1–3715,5)	

Примечание: ККМ — красный костный мозг; M — средняя; SE — ошибка средней; *n* — количество человек; (min–max) — диапазон значений.

органов (предстательной железы: С61 — 8 случаев); мочевых путей (мочевого пузыря: С67 — 6 случаев; почек: С64 — 3 случая).

Характеристика исследуемых групп представлена в табл. 1.

Средний возраст обследованных лиц с ЗНО составил 68,3 ± 0,7 лет (от 51 до 86 лет). В группе преобладали женщины (54%). Средняя накопленная доза облучения ККМ в группе лиц с ЗНО составила 731,5 ± 68,3 мГр (диапазон доз: 10,1–3507 мГр).

Количество обследованных лиц в группе сравнения по каждому гену различалось, однако основная группа и группы сравнения были сопоставимы по возрасту на время проведения обследования, половому составу и дозе облучения ККМ (табл. 1).

Методы исследования

Выделенную из образцов замороженной крови геномную ДНК денатурировали и подвергали бисульфитной конверсии с использованием набора реагентов EpiJET Bisulfite Conversion Kit (Thermo Scientific; США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. После обработки ДНК бисульфитом проводили амплификацию с праймерами, специфичными для метилированных участков ДНК. Последовательности праймеров для ПЦР фрагментов промоторных регионов генов *BAX*, *MDM2*, *TP53*, *NFκB1* были сконструированы с использованием программы Methyl Primer Express Software V.1.0 (Applied Biosystems; США). Выбор генов был основан на результатах ранее проведенных исследований транскрипционной активности генов и уровня метилирования промоторных участков генов у облученных лиц [21, 22].

Олигонуклеотиды были синтезированы фирмой ДНК-Синтез (Россия). В табл. 2 представлены последовательности

олигонуклеотидов, специфичных для метилированной последовательности ДНК.

Определение статуса метилирования промоторов генов было осуществлено с использованием метода ПЦР в реальном времени с применением анализа кривых плавления высокого разрешения (HRM-анализ). Реакцию проводили в объеме 20 мкл, включающем в себя 5х реакционную смесь qPCRmix-HS («Евроген»; Россия), состоящую из высокопроцессивной Taq-ДНК полимеразы со специфичными моноклональными антителами, красителя SYBR Green I, смеси дНТФ, Mg₂⁺ и ПЦР буфера. ПЦР-ПВ проводили с использованием амплификатора StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Scientific; США). Температурный и временной режимы ПЦР-ПВ: первая денатурация (95°, 5 мин), денатурация (95°, 30 с), отжиг (температура отжига для каждого гена представлена в табл. 2, 30 сек.) и элонгация (72°, 30 с) — 50 циклов; построение кривой плавления (95°, 10 с; 60°, 1 мин; 95°, 15 с; 60°, 15 с).

В качестве контролей для оценки метилирования исследуемых CpG-островков промоторных регионов генов использовали подвергнутые бисульфитной конверсии образцы коммерческой, полностью метилированной ДНК CpG Methylated Human Genomic DNA (Thermo Fisher Scientific; США) и неметилированной ДНК Human Genomic DNA: Male (Promega; США). Контроли смешивали в следующем соотношении: 0/100, 5/95, 10/90, 25/75, 50/50, 75/25 и 100/0 соответственно. Уровни метилирования для каждого контрольного образца составили: 0%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75% и 100%. Анализ был проведен в программе HRM-Software (Applied Biosystems; США) и основан на сравнении профилей кривых плавления экспериментальных образцов ДНК со стандартами (образцы ДНК с известным уровнем метилирования). На основе стандартов выделяли следующие диапазоны уровня

Таблица 2. Характеристика используемых в работе олигонуклеотидов

Ген	Последовательности праймеров (5'-3')	Количество CpG-сайтов	Длина ампликона	Длина праймеров	Ta
<i>BAX</i>	F: GAGGGGTAGAAATTTTCGGAT R: ATAATACGAACGACAAACCCG	10	181	21 21	59
<i>MDM2</i>	F: TTTGTCGGGTATTAGTGTGAAC R: CCTTTTACTACAATTCGAAACGTA	6	130	23 25	60
<i>TP53</i>	F: GTAGTTTGAACGTTTTATTTTGGC R: CCTACTACGCCCTCTACAAACG	11	135	25 22	61
<i>NFκB1</i>	F: GTAGGAAGAGGAGGTTTCGTTATC R: ACCGATACTACGTACAAACCGA	14	122	24 23	60

Примечание: F — прямой праймер; R — обратный праймер; Ta — температура отжига.

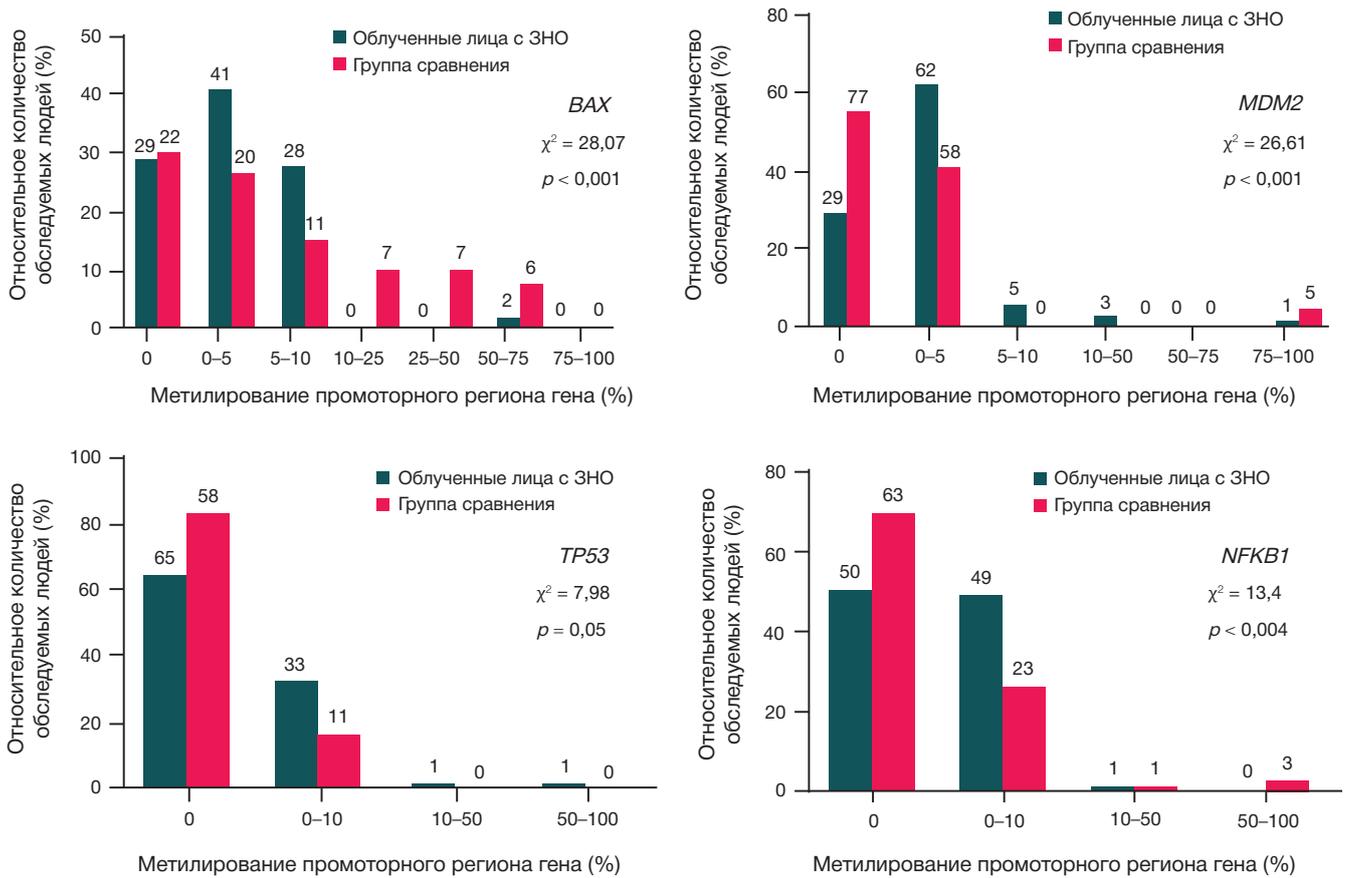


Рис. Распределение обследованных лиц по уровню метилирования CpG-динуклеотидов промоторных регионов исследуемых генов. Значение χ^2 указано с учетом поправки Йейтса

метилирования: 0%; 0–5%; 5–10%; 10–25%; 25–50%; 50–75%; 75–100%, в которые попадали экспериментальные образцы.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием программного комплекса SPSS Statistics 17.0. Для сравнения распределений обследованных лиц по уровню метилирования использовали Хи-квадрат с поправкой Йетса (статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,01$). Сравнение групп обследованных лиц по уровню метилирования от 0 до 10% и более 10% проводили с использованием точного критерия Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$. Корреляционный анализ с целью оценки влияния дозы облучения ККМ и возраста на уровень метилирования проводили путем расчета коэффициентов ранговой корреляции (R) по Спирмену, статистически значимыми считали корреляции при доверительной вероятности $\leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Распределение облученных лиц в латентном периоде развития ЗНО по уровню метилирования промоторных регионов генов *BAX*, *MDM2* и *NFkB1* статистически значимо отличалось от группы сравнения (рис.). Стоит отметить, что у подавляющего большинства обследованных лиц, которые впоследствии заболели ЗНО, уровень метилирования промоторных участков генов *BAX*, *MDM2*, *TP53* и *NFkB1* не превышал 10%, и основные различия в распределении с группой сравнения были характерны для этого диапазона.

Так, доля облученных лиц в латентном периоде развития ЗНО, имеющих уровень метилирования промоторного региона гена *NFkB1* от 0 до 10%, составила 100% против 87% в группе сравнения. При этом количество лиц с гипометилированным промотором гена *NFkB1* (уровень метилирования 0%) и уровнем метилирования до 5% в группе облученных пациентов, впоследствии заболевших ЗНО, было примерно равным и составило 50% и 49% соответственно, в то время как в группе сравнения 63% имели гипометилированный промотор и только 23% — уровень метилирования от 0 до 5%. Для гена *MDM2* различия также находились в диапазоне от 0 до 5%, в основной группе облученных лиц 29% имели гипометилированные промоторы, а у 62% уровень метилирования составил от 0 до 5%, в то время как в группе сравнения распределение было примерно равным, 55% и 41% соответственно. Для гена *BAX* наблюдали сходную тенденцию, у 98% облученных лиц, находящихся в латентном периоде развития ЗНО, уровень метилирования не превышал 10%, а для 2% было отмечено гиперметилирование промотора гена *BAX* (уровень метилирования — от 50 до 75%). При этом обращает на себя внимание тот факт, что в группе сравнения регистрировались все диапазоны метилирования промотора гена *BAX*.

Учитывая небольшое количество случаев в разных диапазонах уровней метилирования, на следующем этапе работы все обследованные лица были разделены на две группы: 1) уровень метилирования до 10%; 2) уровень метилирования более 10% (табл. 3).

Согласно полученным результатам, статистически значимые различия наблюдались только для проапоптотического гена *BAX*. В группе облученных лиц,

Таблица 3. Случаи метилирования CpG-островков промоторных регионов генов *BAX*, *MDM2*, *TP53*, *NFKB1* у обследованных лиц

Ген	Уровень метилирования	Группа сравнения N (%)	Облученные лица с ЗНО в латентном периоде N (%)	p-значение
<i>BAX</i>	0–10%	53 (72,6)	98 (98)	$p < 0,00001$
	Более 10 %	20 (27,4)	2 (2)	
<i>TP53</i>	0–10%	69 (100)	98 (98)	$p = 0,51$
	Более 10 %	0 (0)	2 (2)	
<i>MDM2</i>	0–10%	135 (96,4)	96 (96)	$p = 0,99$
	Более 10 %	5 (3,6)	4 (4)	
<i>NFKB1</i>	0–10%	87 (96,6)	100 (100)	$p = 0,10$
	Более 10 %	3 (3,6)	0 (0)	

Примечание: p — уровень статистической значимости различий между группами по точному критерию Фишера.

которые впоследствии заболели ЗНО, количество человек с уровнем метилирования до 10% было статистически значимо больше по сравнению с контрольной группой ($p < 0,00001$).

Метилирование — динамический процесс, который может зависеть от ряда факторов, в том числе от возраста и дозы облучения. В связи с этим в обследованных группах был проведен корреляционный анализ связи уровня метилирования с дозой облучения ККМ и возрастом на время обследования. В результате анализа в группе облученных лиц с ЗНО в латентном периоде не было выявлено зависимости изменения паттерна метилирования от дозы облучения ККМ и возраста на момент обследования, при этом в группе сравнения наблюдали слабую отрицательную корреляционную связь уровня метилирования промоторов гена *BAX* и *TP53* и возраста обследованных лиц ($R = -0,35$; $p = 0,002$ и $R = -0,28$; $p = 0,02$ соответственно) (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проведенном нами исследовании были изучены гены регуляции клеточного цикла (*MDM2*, *TP53*) и апоптоза (*BAX*, *NFKB1*). Распределение по уровню метилирования промоторных регионов генов *BAX*, *MDM2* и *NFKB1* у облученных лиц в латентном периоде развития ЗНО статистически значимо отличалось от группы сравнения. Однако при анализе частоты встречаемости обследованных лиц с уровнем метилирования промоторов изученных генов до 10% и более 10% статистически значимые различия наблюдали только для гена *BAX*. Доля лиц с уровнем метилирования от 0 до 10% в группе облученных пациентов, впоследствии заболевших ЗНО, составила 98%, в то время как в группе сравнения доля таких людей не превышала 73%.

Продукт гена *BAX* — член семейства белков bcl2, участвует в индукции апоптоза и считается потенциальным супрессором опухолей [23]. В норме в ответ на генотоксическое повреждение белок p53 изменяет уровень

экспрессии генов, участвующих в митохондриально-опосредованном апоптозе, в том числе активируя ген *BAX* [24]. В то же время в опухолевых клетках наблюдается подавление проапоптотических генов, что способствует выживанию и метастазированию опухоли. Важно отметить, что снижение концентрации белка *bax* связано с мутациями в гене *Trp53* [25]. По результатам проведенных нами исследований, у облученных людей в латентном периоде развития ЗНО наблюдается гипометилирование промотора гена *BAX* в клетках крови, что, вероятно, может отражаться на транскрипционной активности этого гена. Интересно отметить, что в ранее проведенных исследованиях экспрессии мРНК апоптотических генов у лиц, облученных на реке Тече с накопленными дозами облучения ККМ, превышающими 522 мГр, было обнаружено статистически значимое увеличение транскрипционной активности гена *BAX*. [21]. Кроме того, по результатам исследования гибели лимфоцитов периферической крови, у жителей прибрежных сел реки Течи наблюдали повышение частоты апоптоза лимфоцитов у облученных лиц с облигатными формами предраковых заболеваний по сравнению с облученными людьми без предраков [26].

В литературе встречается достаточно много работ, посвященных изучению профиля метилирования ДНК в раковых клетках, при этом наиболее часто рассматривают рак толстой кишки, молочной железы и легких [27]. При этом ретроспективных работ, посвященных изучению метилирования ДНК нормальной ткани (например, крови) до возникновения заболевания, с целью поиска предикторов риска развития рака, существенно меньше и в большинстве из них рассматривают гены, связанные с изменением хронологического возраста (эпигенетические часы) [13, 15, 17]. Однако есть единичные исследования протоонкогенов и генов-супрессоров опухолей. Так, в результате анализа паттерна метилирования 17-ти генов-кандидатов предрасположенности к раку молочной железы, включая гены регуляции клеточного цикла, было выявлено гиперметилирование внутригенного повторяющегося

Таблица 4. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (R) процента метилирования промоторных регионов исследуемых генов от поглощенной дозы облучения ККМ и возраста пациента на момент исследования. В скобках указано p-значение для коэффициентов корреляции Спирмена

Ген	Группа сравнения		Облученные лица с ЗНО в латентном периоде	
	Доза облучения ККМ	Возраст на момент исследования	Доза облучения ККМ	Возраст на момент исследования
<i>MDM2</i>	-0,03 (0,69)	0,09 (0,31)	-0,06 (0,53)	-0,05 (0,64)
<i>BAX</i>	-0,55 (0,64)	-0,35 (0,002)	0,08 (0,44)	0,08 (0,45)
<i>TP53</i>	-0,08 (0,53)	-0,28 (0,02)	-0,01 (0,99)	0,07 (0,48)
<i>NFKB1</i>	0,14 (0,19)	0,10 (0,34)	0,04 (0,70)	-0,02 (0,86)

элемента гена *ATM* в крови женщин с раком молочной железы по сравнению с контрольной группой [28].

Таким образом, полученные в настоящем исследовании результаты демонстрируют потенциальную возможность использования эпигенетических модификаций (уровень метилирования) в ДНК периферической крови в качестве маркера радиационно-индуцированного канцерогенеза. Кроме того, выявление эпигенетических изменений в тканях и клетках, не вовлеченных в патологический процесс, позволяет прояснить причинно-следственную связь возникновения патологических состояний. Однако для установления эпигенетических маркеров канцерогенных эффектов облучения требуется проведение дополнительных исследований на расширенной выборке пациентов, с учетом анализа уровня метилирования генов в опухолевой ткани.

Литература

- Smith P, McGuffog L, Easton DF, Mann GJ, Pupo GM, Newman B, et al. A genome wide linkage search for breast cancer susceptibility genes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006; 45 (7): 646–55. DOI: 10.1002/gcc.20330.
- Barnoud T, Parris JLD, Murphy ME. Common genetic variants in the TP53 pathway and their impact on cancer. *J Mol Cell Biol*. 2019; 11 (7): 578–85. DOI: 10.1093/jmcb/mjz052.
- Hall MJ, Bernhisel R, Hughes E, Larson K, Rosenthal ET, Singh NA, et al. Germline Pathogenic Variants in the Ataxia Telangiectasia Mutated (*ATM*) Gene are Associated with High and Moderate Risks for Multiple Cancers. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2021; 14 (4): 433–40. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-20-0448.
- Verma M, Rogers S, Divi RL, Schully SD, Nelson S, Joseph Su, et al. Epigenetic research in cancer epidemiology: trends, opportunities, and challenges. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014; 23 (2): 223–33. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0573.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Research*. 2001; 61 (8): 3225–9. PubMed PMID: 11309270.
- Belinsky SA. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4 (9): 707–17. DOI: 10.1038/nrc1432.
- Park JY. Promoter hypermethylation in prostate cancer. *Cancer Control*. 2010; 17(4): 245–55. DOI: 10.1177/107327481001700405.
- Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A, Alonso S, Horiuchi S, Yamashita K, et al. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell*. 2006; 9(3): 199–207. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.02.016.
- Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*. 2009; 1 (2): 239–59. DOI: 10.2217/epi.09.33
- Wild CP, Scalbert A, Herceg Z. Measuring the exposome: a powerful basis for evaluating environmental exposures and cancer risk. *Environ Mol Mutagen*. 2013; 54 (7): 480–99. DOI: 10.1002/em.21777.
- Relton CL, Davey SG. Epigenetic epidemiology of common complex disease: prospects for prediction, prevention, and treatment. *PLoS Med*. 2010; 7 (10): e1000356. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000356.
- Suter CM, Martin DI, Ward RL. Germline epimutation of *MLH1* in individuals with multiple cancers. *Nat Genet*. 2004; 36 (5): 497–501. DOI: 10.1038/ng1342.
- Zheng Y, Joyce BT, Colicino E, Liu L, Zhang W, Dai Q, et al. Blood epigenetic age may predict cancer incidence and mortality. *EBioMedicine*. 2016; 5: 68–73. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.02.008.
- Durso DF, Bacalini MG, Sala C, Pirazzini C, Marasco E, Bonafé M, et al. Acceleration of leukocytes' epigenetic age as an early tumor and sex-specific marker of breast and colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017; 8 (14): 23237–45. DOI: 10.18632/oncotarget.15573.
- Kresovich JK, Xu Z, O'Brien KM, Weinberg CR, Sandler DP, Taylor JA. Methylation-based biological age and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst*. 2019; 111 (10): 1051–8. DOI: 10.1093/jnci/djz020.
- Dugué PA, Bassett JK, Wong EM, Joo JE, Li S, Yu C. Biological aging measures based on blood DNA methylation and risk of cancer: a prospective study. *JNCI Cancer Spectr*. 2020; 5 (1): pkaa109. DOI: 10.1093/jncics/pkaa109.
- Wang C, Ni W, Yao Y, Just A, Heiss J, Wei Y. DNA methylation-based biomarkers of age acceleration and all-cause death, myocardial infarction, stroke, and cancer in two cohorts: The NAS, and KORA F4. *EBioMedicine*. 2021; 63: 103151. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.103151.
- Li X, Schöttker B, Holleczeck B, Brenner H. Associations of DNA methylation algorithms of aging and cancer risk: Results from a prospective cohort study. *EBioMedicine*. 2022; 81: 104083. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.104083.
- Ennour-Idrissi K, Dragic D, Durocher F, Diorio C. Epigenome-wide DNA methylation and risk of breast cancer: a systematic review. *BMC Cancer*. 2020; 20 (1): 1048. DOI: 10.1186/s12885-020-07543-4.
- Дегтева М. О., Напье Б. А., Толстых Е. И., Шишкина Е. А., Бугров Н. Г., Крестинина Л. Ю. и др. 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.
- Никифоров В. С. Содержание матричной РНК генов, вовлеченных в клеточный гомеостаз человека, в отдаленные сроки после хронического облучения [диссертация]. Обнинск: 2021.
- Blinova EA, Nikiforov VS, Kotikova AI, Yanishevskaya MA, Akleyev AV. Methylation Status of Apoptosis Genes and Intensity of Apoptotic Death of Peripheral Blood Lymphocytes in Persons Chronically Exposed to Radiation. *Mol Biol (Mosk)*. 2022; 56 (6): 1072–82. DOI 10.1134/S002689332205003X.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993; 74 (4): 609–19. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90509-o.
- Gopisetty G, Ramachandran K, Singal R. DNA methylation and apoptosis. *Mol Immunol*. 2006; 43 (11): 1729–40. DOI: 10.1016/j.molimm.2005.11.010.
- Alipour M, Zargar SJ, Safarian S, Fouladdel S, Azizi E, Jafarholizadeh N. The study of DNA methylation of *BAX* gene promoter in breast and colorectal carcinoma cell lines. *Iran J Cancer Prev*. 2013; 6 (2): 59–64.
- Блинова Е. А., Котикова А. И., Аклев А. В. Интенсивность апоптоза лимфоцитов крови у облученных лиц с облигатными

Выводы

Распределение по уровню метилирования промоторных регионов генов *BAX*, *MDM2* и *NFkB1* у облученных лиц, подвергшихся аварийному хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию в диапазоне доз облучения ККМ от 10,1 до 3507 мГр и находящихся в латентном периоде до манифестации ЗНО, статистически значимо отличалось от группы сравнения. Доля лиц с уровнем метилирования промоторного региона гена *BAX* от 0 до 10% была статистически значимо больше и составила 98% относительно группы сравнения, в которой доля таких людей не превышала 73%. Не выявлено зависимости уровня метилирования промоторных регионов изученных генов от дозы облучения ККМ.

- формами предраковых заболеваний. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2023; 176 (8): 233–6.
27. Verma M, Rogers S, Divi RL, Schully SD, Nelson S, Joseph Su L, et al. Epigenetic research in cancer epidemiology: trends, opportunities, and challenges. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014; 23 (2): 223–33. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0573.
28. Flanagan JM, Munoz-Alegre M, Henderson S, Tang T, Sun P, Johnson N, et al. Gene-body hypermethylation of ATM in peripheral blood DNA of bilateral breast cancer patients. *Hum Mol Genet.* 2009; 18 (7): 1332–42. DOI: 10.1093/hmg/ddp033.

References

- Smith P, McGuffog L, Easton DF, Mann GJ, Pupo GM, Newman B, et al. A genome wide linkage search for breast cancer susceptibility genes. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006; 45 (7): 646–55. DOI: 10.1002/gcc.20330.
- Barnoud T, Parris JLD, Murphy ME. Common genetic variants in the TP53 pathway and their impact on cancer. *J Mol Cell Biol.* 2019; 11 (7): 578–85. DOI: 10.1093/jmcb/mjz052.
- Hall MJ, Bernhisel R, Hughes E, Larson K, Rosenthal ET, Singh NA, et al. Germline Pathogenic Variants in the Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Gene are Associated with High and Moderate Risks for Multiple Cancers. *Cancer Prev Res (Phila).* 2021; 14 (4): 433–40. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-20-0448.
- Verma M, Rogers S, Divi RL, Schully SD, Nelson S, Joseph Su, et al. Epigenetic research in cancer epidemiology: trends, opportunities, and challenges. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014; 23 (2): 223–33. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0573.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Research.* 2001; 61 (8): 3225–9. PubMed PMID: 11309270.
- Belinsky SA. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4 (9): 707–17. DOI: 10.1038/nrc1432.
- Park JY. Promoter hypermethylation in prostate cancer. *Cancer Control.* 2010; 17(4):245–55. DOI: 10.1177/107327481001700405.
- Suzuki K, Suzuki I, Leodolter A, Alonso S, Horiuchi S, Yamashita K, et al. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage. *Cancer Cell.* 2006; 9(3): 199–207. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.02.016.
- Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics.* 2009; 1 (2): 239–59. DOI: 10.2217/epi.09.33
- Wild CP, Scalbert A, Herceg Z. Measuring the exposome: a powerful basis for evaluating environmental exposures and cancer risk. *Environ Mol Mutagen.* 2013; 54 (7): 480–99. DOI: 10.1002/em.21777.
- Relton CL, Davey SG. Epigenetic epidemiology of common complex disease: prospects for prediction, prevention, and treatment. *PLoS Med.* 2010; 7 (10): e1000356. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000356.
- Suter CM, Martin DI, Ward RL. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet.* 2004; 36 (5): 497–501. DOI: 10.1038/ng1342.
- Zheng Y, Joyce BT, Colicino E, Liu L, Zhang W, Dai Q, et al. Blood epigenetic age may predict cancer incidence and mortality. *EBioMedicine.* 2016; 5: 68–73. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.02.008.
- Durso DF, Bacalini MG, Sala C, Pirazzini C, Marasco E, Bonafé M, et al. Acceleration of leukocytes' epigenetic age as an early tumor and sex-specific marker of breast and colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017; 8 (14): 23237–45. DOI: 10.18632/oncotarget.15573.
- Kresovich JK, Xu Z, O'Brien KM, Weinberg CR, Sandler DP, Taylor JA. Methylation-based biological age and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 2019; 111 (10): 1051–8. DOI: 10.1093/jnci/djz020.
- Dugué PA, Bassett JK, Wong EM, Joo JE, Li S, Yu C. Biological aging measures based on blood DNA methylation and risk of cancer: a prospective study. *JNCI Cancer Spectr.* 2020; 5 (1): pkaa109. DOI: 10.1093/jncics/pkaa109.
- Wang C, Ni W, Yao Y, Just A, Heiss J, Wei Y. DNA methylation-based biomarkers of age acceleration and all-cause death, myocardial infarction, stroke, and cancer in two cohorts: The NAS, and KORA F4. *EBioMedicine.* 2021; 63: 103151. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.103151.
- Li X, Schöttker B, Holleczer B, Brenner H. Associations of DNA methylation algorithms of aging and cancer risk: Results from a prospective cohort study. *EBioMedicine.* 2022; 81: 104083. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.104083.
- Ennour-Idrissi K, Dragic D, Durocher F, Diorio C. Epigenome-wide DNA methylation and risk of breast cancer: a systematic review. *BMC Cancer.* 2020; 20 (1): 1048. DOI: 10.1186/s12885-020-07543-4.
- Degteva MO, Napier BA, Tolstykh EI, Shishkina EA, Bougrov NG, Krestinina LYu, et al. Individual dose distribution in cohort of people exposed as a result of radioactive contamination of the Techa River. *Medical Radiology and Radiation Safety.* 2019; 64 (3): 46–53. Russian.
- Nikiforov VS. Soderzhanie matrichnoy RNK genov, vovlechenykh v kletochnyy gomeostaz cheloveka, v otdalennyye sroki posle khronicheskogo oblucheniya [dissertation]. Obninsk; 2021. Russian.
- Blinova EA, Nikiforov VS, Kotikova AI, Yanishevskaya MA, Akleyev AV. Methylation Status of Apoptosis Genes and Intensity of Apoptotic Death of Peripheral Blood Lymphocytes in Persons Chronically Exposed to Radiation. *Mol Biol (Mosk).* 2022; 56 (6): 1072–82. DOI 10.1134/S002689332205003X.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993; 74 (4): 609–19. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90509-o.
- Gopisetty G, Ramachandran K, Singal R. DNA methylation and apoptosis. *Mol Immunol.* 2006; 43 (11): 1729–40. DOI: 10.1016/j.molimm.2005.11.010.
- Alipour M, Zargar SJ, Safarian S, Fouladdel S, Azizi E, Jafargholizadeh N. The study of DNA methylation of BAX gene promoter in breast and colorectal carcinoma cell lines. *Iran J Cancer Prev.* 2013; 6 (2): 59–64.
- Blinova EA, Kotikova AI, Akleev AV. The intensity of blood lymphocytes apoptosis in exposed individuals with obligate forms of precancerous conditions. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2023; 176 (8): 233–6. Russian.
- Verma M, Rogers S, Divi RL, Schully SD, Nelson S, Joseph Su L, et al. Epigenetic research in cancer epidemiology: trends, opportunities, and challenges. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014; 23 (2): 223–33. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0573.
- Flanagan JM, Munoz-Alegre M, Henderson S, Tang T, Sun P, Johnson N, et al. Gene-body hypermethylation of ATM in peripheral blood DNA of bilateral breast cancer patients. *Hum Mol Genet.* 2009; 18 (7): 1332–42. DOI: 10.1093/hmg/ddp033.