

## ИССЛЕДОВАНИЕ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ И ИНДУКЦИИ АДАПТИВНОГО ОТВЕТА В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ ВТОРИЧНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА

© 2023 г. О.М. Розанова<sup>\*,#</sup>, Е.Н. Смирнова<sup>\*</sup>, Т.А. Белякова<sup>\*\*</sup>, Н.С. Стрельникова<sup>\*\*,##</sup>

<sup>\*</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

<sup>#</sup>E-mail: rozanova.iteb@gmail.com

<sup>\*\*</sup>Филиал «Физико-технический центр» Физического института им. П.Н. Лебедева РАН,  
ул. Мира, 1Н, Протвино Московской области, 142281, Россия

<sup>##</sup>E-mail: strelnikova.ns@lebedev.ru

Поступила в редакцию 03.07.2023 г.

После доработки 18.07.2023 г.

Принята к публикации 21.07.2023 г.

Исследованы радиочувствительность к низким и высоким дозам рентгеновского излучения и способность к индукции радиационного адаптивного ответа лимфоцитов при облучении *in vitro* периферической крови пациентов с синдромом вторичного иммунного дефицита и здоровых доноров разного возраста. Критерием цитогенетического повреждения служила частота микроядер в цитохалазин-блокированных двуядерных лимфоцитах в культуре. Было обнаружено, что спонтанный уровень цитогенетических повреждений в лимфоцитах пациентов с синдромом вторичного иммунного дефицита в 2.5 раза выше, чем у здоровых молодых и возрастных волонтеров, а также наблюдалась значительная межиндивидуальная вариабельность значений по сравнению с контрольными когортами. Не было выявлено различий в средних значениях по радиочувствительности к низким и высоким дозам рентгеновского излучения между исследуемыми группами. Показано отсутствие корреляции между спонтанным уровнем микроядер в лимфоцитах и радиочувствительностью индивидумов во всех группах. Радиационный адаптивный ответ индуцировался с той же частотой и в той же степени в лимфоцитах как у пациентов с синдромом вторичного иммунного дефицита, так и у здоровых доноров разного возраста.

**Ключевые слова:** радиационный адаптивный ответ, лимфоциты человека, микроядра, ионизирующее излучение

DOI: 10.31857/S0006302923050137, EDN: PHESWE

В последние годы активно исследуется клиническое применение ряда специфических немешенных эффектов, обнаруженных в 1980–90 гг. при изучении действия малых доз радиации на живые объекты [1, 2]. Наибольший интерес из них представляют феномены индуцированной гиперчувствительности в области низких доз (до 40 сГр) и радиационный адаптивный ответ (РАО), который проявляется в том, что предварительное облучение биологических объектов в малых дозах ионизирующего излучения приводит к повышению устойчивости организма к последующему воздействию в больших повреждающих

дозах радиации или других генотоксических агентов [3]. Способность к индукции РАО показана в настоящее время на организменном уровне *in vivo* на представителях практически всех таксономических уровней животного и растительного мира [4]. Поскольку индукция РАО приводит к снижению повреждения на 40–75%, и эта величина сравнима или превосходит эффективность известных современных химических радиопротекторов [5], то многими исследователями РАО рассматривается как способ повышения общей устойчивости организмов к различным неблагоприятным факторам окружающей среды, метод защиты здоровых тканей и органов при радиотерапии рака, сахарном диабете и модуляции воспалительных иммунных реакций при острых и хронических заболеваниях опорно-двигательного аппарата, иммунодефицитных состояниях, ле-

**Сокращения:** РАО — радиационный адаптивный ответ, ЦБДЛ — цитохалазин-блокированные двуядерные лимфоциты, СВИД — синдром вторичного иммунного дефицита, БПНЦ РАН — больница Пущинского научного центра РАН.

чения коронавируса [6]. Ранее нами при облучении двухмесячных мышей линии SHK в дозе 10 сГр была показана индукция РАО, который сохранялся не только на протяжении всей жизни животных, но и приводил к снижению спонтанного уровня цитогенетических повреждений, связанных со старением, что обусловлено эпигенетическими изменениями генома, которые приводили к повышению стабильности генома [7, 8]. В связи с этим активно продолжаются исследования механизмов и закономерностей индукции РАО у человека в условиях *in vivo* и *in vitro*. В ряде работ, проведенных в основном на здоровых донорах, была выявлена большая индивидуальная вариабельность регистрируемых показателей и зависимость от генетических и эпигенетических факторов [3, 9]. Совсем немного публикаций существует о возможности индукции РАО в зависимости от возраста и диагноза пациентов, поскольку как правило исследуют только уровень спонтанного уровня генетических повреждений и радиочувствительность клеток пациентов с разными заболеваниями. К настоящему моменту показано, что повышенный уровень этих показателей наблюдается у онкологических пациентов, жителей областей с повышенным радиационным фоном и сотрудников предприятий, работающих с радиоактивными материалами [10, 11]. В качестве биомаркера геномной нестабильности в работах по изучению индивидуальной радиочувствительности человека чаще всего используется метод определения количества микроядер в цитохалазин-блокированных двуядерных лимфоцитах (ЦБДЛ) человека, который является чувствительным, воспроизводимым и унифицированным методом, позволяет быстро оценивать уровень хромосомных повреждений, накапливать индивидуальные данные в течение нескольких лет, объединять и сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях [12–14].

В последние годы в мире растет количество людей с синдромом вторичной иммунной недостаточности, в основе которого лежит расстройство функционирования иммунной системы, развивающееся в постнатальном периоде или у взрослых, которое отличается нарушением процессов дифференцировки, пролиферации и адаптации клеток иммунной системы и не является результатом генетических нарушений [15]. Хотя синдром вторичного иммунодефицита (СВИД) не является болезнью, это состояние представляет собой существенный фактор риска преждевременного старения, рака, атеросклероза, аутоиммунных, аллергических и хронических инфекционных заболеваний. Исследование населения, проживающего в экологически неблагоприятных регионах, показало, что в большинстве случаев недостаточность иммунной системы клинически проявляется часто рецидивирующими бактери-

альными, грибковыми, вирусными инфекциями (обычно сочетанными герпетическими инфекциями), плохо поддающимися традиционным методам лечения [16]. Важное участие различных сигнальных путей иммунной системы в реакциях организма при действии низких доз радиации показано во многих исследованиях [17].

Целью данной работы являлось исследование радиочувствительности и способности к индукции РАО в лимфоцитах периферической крови пациентов с синдромом вторичного иммунного дефицита.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

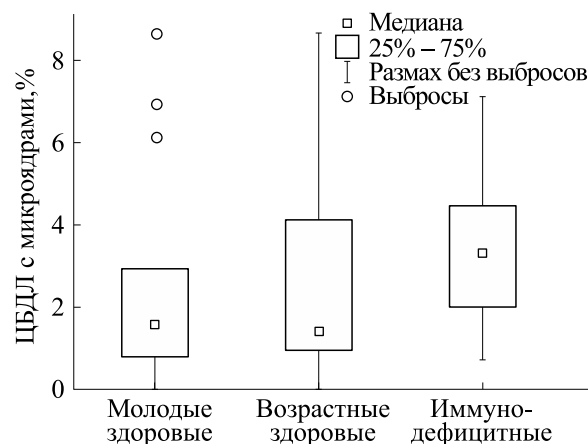
В исследовании участвовали 12 пациентов (все женщины, средний возраст 59 лет) с СВИД, которые были клинически обследованы в отделении иммунологии Больницы Пущинского научного центра РАН (БПНЦ РАН) и находились в стадии ремиссии. Две контрольные группы включали 15 молодых волонтеров (женщины и мужчины, средний возраст 24 года) и 12 возрастных волонтеров (женщины и мужчины, средний возраст 55 лет). Все участники не имели вредных привычек (курение, алкоголь), придерживались традиционной диеты и образа жизни, а также не подвергались в течение месяца рентгеновским обследованиям или компьютерной томографии.

Образцы крови (5 мл) отбирали у волонтеров утром натощак из локтевой вены в стерильные флаконы с гепарином (10 ед/мл) на базе отделения иммунологии БПНЦ РАН, а также процедурных кабинетов БПНЦ РАН и Протвинской городской больницы (Протвино Московской области).

Изучение радиочувствительности и индукции РАО проводили при облучении рентгеновскими лучами *in vitro* гепаринизированной цельной периферической крови человека. Полученный объем венозной крови делился на аликвоты объемом 0.5 мл для следующих вариантов в двух повторениях: 1) необлученный контроль; 2) облучение рентгеновским излучением в дозе 10 сГр; 3) облучение в дозе 2 Гр; 4) облучение по схеме РАО — сначала в адаптирующей дозе 10 сГр, а затем через 5 ч — в выявляющей дозе 2 Гр. Величины доз и время между облучением было подобрано на основе предыдущих исследований по определению условий, необходимых для индукции АО на мышах и дозовых зависимостей индукции хромосомных повреждений, полученных при облучении лимфоцитов здоровых доноров [19, 20]. Облучение образцов крови проводили при комнатной температуре рентгеновским излучением (200 кВ, 2 кэВ/мкм, 1 Гр/мин) на установке



**Рис. 1.** Спонтанная частота ЦБДЛ с микроядрами (в %) у здоровых и иммунодефицитных индивидуумов. Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона. Различия между группами статистически достоверны (\* –  $p \leq 0.0001$ , \*\* –  $p \leq 0.001$ ).



**Рис. 2.** Количество микроядер в ЦБДЛ здоровых и иммунодефицитных доноров после рентгеновского облучения в дозе 10 сГр. Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона.

РУТ в ЦКП «Источники излучения» (ИБК РАН, Пушкино Московской области).

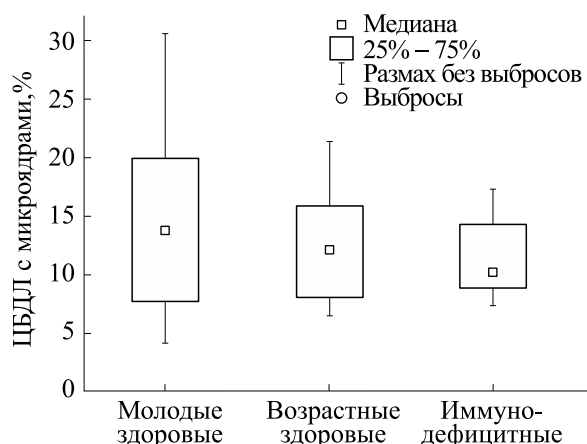
Для определения цитогенетического повреждения в лимфоцитах использовали методику Фенеша [21] с небольшими модификациями. После облучения аликвоты цельной крови культивировали при 37°C в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 20% термоинактивированной эмбриональной сыворотки («ПанЭко», Россия), 1% антибиотической смеси и 7 мкг/мл фитогемагглютинаина («ПанЭко», Россия), который необходим для стимуляции лимфоцитов к делению. Через 44 ч после начала культивирования в среду добавляли блокатор цитоплазматического деления в концентрации 7 мкг/мл цитохалазин В (Sigma Aldrich, США) для накопления двуядерных лимфоцитов. После 72 ч инкубации готовили цитогенетические препараты по стандартному протоколу для подсчета двуядерных лимфоцитов с микроядрами, которые окрашивались 4%-м красителем азур-эозином по Романовскому. Критерием повреждения служила частота микроядер в цитохалазин-блокированных двуядерных лимфоцитах. При анализе микроядер в ЦБДЛ использовали критерии, описанные в работе [12]. На каждую экспериментальную точку отдельного донора подсчитывали не менее 1000 ЦБДЛ.

Статистические различия между группами оценивались с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Степень разброса значений внутри группы определяли с помощью коэффициента вариации. Парный корреляционный анализ проводили с помощью корреляции Пирсона.

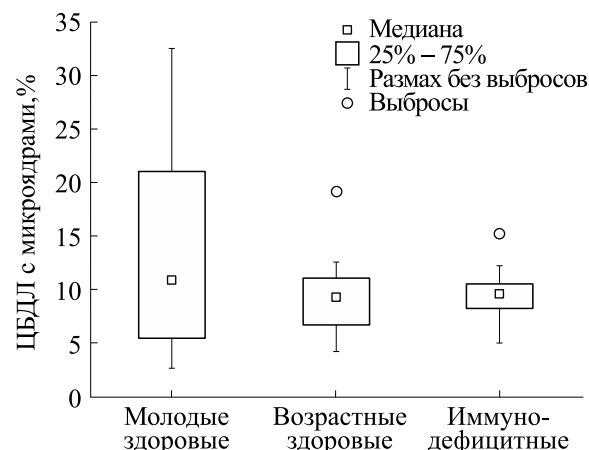
## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 показаны спонтанная частота микроядер ЦБДЛ у пациентов с СВИД и здоровых доноров разного возраста. Индивидуальные значения частоты микроядер в контрольной молодой группе находились в диапазоне 0.80–2.28%, в контрольной возрастной группе – 0.60–3.50%, а в группе с СВИД – 1.50–10.90%. Средние значения спонтанного уровня хромосомных повреждений в лимфоцитах контрольных групп не зависели от возраста индивидуумов. Среднее значение спонтанного уровня цитогенетических повреждений в группе с СВИД в 2.6 раза превышало таковое в группе молодых и в 2.4 раза в группе возрастных волонтеров. Кроме повышенного среднего спонтанного уровня микроядер у пациентов с СВИД наблюдалась значительная вариабельность значений по сравнению с когортой здоровых доноров обоих возрастов.

Далее мы исследовали чувствительность лимфоцитов цельной крови индивидуумов к облучению рентгеновским излучением в дозе 10 сГр. На рис. 2 показаны средние значения количества микроядер в лимфоцитах после облучения низкой дозой всех трех когорт. Индивидуальные значения количества микроядер в лимфоцитах контрольной молодой группы находились в диапазоне 0.0–8.63%, в контрольной возрастной группе – 0.0–8.63%, а в группе с СВИД – 0.7–7.10%. Высокая внутригрупповая вариабельность значений наблюдалась у молодых волонтеров, а низкая – в группе с СВИД. Средняя радиочувствительность к дозе 10 сГр у пациентов с СВИД не отличалась от здоровых доноров обоих возрастов. Медианные значения в контрольных группах были близки (1.6 и 1.4), а в группе иммунодефицитных это значение было выше (3.3).



**Рис. 3.** Значения количества ЦБДЛ с микроядрами у здоровых и иммунодефицитных доноров после рентгеновского облучения в дозе 2 Гр. Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона.



**Рис. 4.** Количество микроядер в ЦБДЛ здоровых и иммунодефицитных доноров после облучения по схеме РАО (10 сГр + 2 Гр). Данные представлены в виде медианы и межквартильного диапазона.

На рис. 3 представлено количество микроядер в лимфоцитах, облученных в дозе 2 Гр, у пациентов с СВИД и здоровых индивидуумов. Индивидуальные значения количества микроядер в лимфоцитах контрольной молодой группы находились в диапазоне 4.10–30.69%, в контрольной возрастной группе – 6.50–21.4%, а в группе пациентов с СВИД – 7.40–17.3%. Достоверных отличий в радиочувствительности лимфоцитов к дозе 2 Гр между группами выявлено не было. В группе здоровых молодых волонтеров наблюдалась наиболее выраженная межиндивидуальная вариабельность по сравнению с другими группами. Анализ полученных данных показал также, что отсутствует корреляция между спонтанным уровнем микроядер в ЦХБЛ и радиочувствительностью индивидуумов во всех группах.

Следующим этапом было исследование способности к индукции РАО при облучении лимфоцитов пациентов с СВИД и здоровых доноров по схеме РАО. На рис. 4 показаны средние значения выхода микроядер в лимфоцитах здоровых волонтеров и пациентов с СВИД при последовательном облучении в дозе 10 сГр, а через 5 ч (минимальное время, необходимое для развития РАО) в дозе 2 Гр. Как и при облучении в малых и терапевтических дозах, при комбинированном лучевом воздействии в группах наблюдали значительный индивидуальный разброс значений: в контрольной молодой группе значения находились в диапазоне 2.60–32.51%, в контрольной возрастной группе 4.20–19.20%, а в группе с СВИД 5.00–15.20%. Наибольшая внутригрупповая вариабельность значений наблюдалась в группе молодых доноров. Достоверных отличий в

радиочувствительности при облучении по схеме РАО между группами выявлено не было.

Во многих работах индукцию РАО в лимфоцитах крови людей определяют по статистически достоверным различиям между группой, облученной только выявляющей дозой и группой комбинированного облучения [22]. Мы величину РАО определяли по формуле:

$$РАО = ((D_1 - D_0) + (D_2 - D_0)) / (D_{1+2} - D_0),$$

где  $D_1$  – количество микроядер в лимфоцитах при облучении в дозе 10 сГр;  $D_2$  – количество микроядер в лимфоцитах при облучении в дозе 2 Гр;  $D_0$  – количество микроядер в необлученных лимфоцитах;  $D_{1+2}$  – количество микроядер в лимфоцитах при облучении в дозе 10 сГр+2 Гр. Поскольку индукция РАО рассматривается как механизм, который приводит к значительному радиопротекторному эффекту, то мы рассматривали наличие РАО только у тех волонтеров, у которых его величина была больше 1.2. При сочетанном облучении лимфоцитов наблюдались три вида ответа: снижение радиочувствительности (наличие РАО), повышение радиочувствительности и отсутствие реакции на адаптирующее воздействие.

Как видно из табл. 1, во всех группах у индивидуумов выявлена высокая способность к индукции РАО. В группе молодых волонтеров у 80% индуцировался РАО (максимальное значение равнялось 3.51), в группе возрастных – 75% (максимальное значение – 3.50), в группе с СВИД – 83.4% (максимальное значение 3.12). Средняя величина РАО была одинакова во всех

**Таблица 1.** Частота микроядер в двуядерных лимфоцитах человека, облученных разными дозами рентгеновского излучения

| Молодые здоровые волонтеры |                     |            |            | Возрастные здоровые волонтеры |                     |            |            | Иммунодефицитные волонтеры |                     |            |            |
|----------------------------|---------------------|------------|------------|-------------------------------|---------------------|------------|------------|----------------------------|---------------------|------------|------------|
| №                          | Микроядра в ЦБДЛ, % |            | Тип ответа | №                             | Микроядра в ЦБДЛ, % |            | Тип ответа | №                          | Микроядра в ЦБДЛ, % |            | Тип ответа |
|                            | 2 Гр                | 0.1 + 2 Гр |            |                               | 2 Гр                | 0.1 + 2 Гр |            |                            | 2 Гр                | 0.1 + 2 Гр |            |
| 1                          | 9.70                | 7.10       | +          | 1                             | 6.50                | 4.20       | +          | 1                          | 14.50               | 8.50       | +          |
| 2                          | 7.70                | 3.80       | +          | 2                             | 12.94               | 6.14       | +          | 2                          | 9.50                | 9.80       | +          |
| 3                          | 4.10                | 2.60       | +          | 3                             | 16.70               | 10.50      | +          | 3                          | 8.90                | 10.50      | +          |
| 4                          | 6.50                | 4.20       | +          | 4                             | 15.10               | 12.50      | +          | 4                          | 10.30               | 10.20      | +          |
| 5                          | 6.58                | 5.43       | +          | 5                             | 21.40               | 11.30      | +          | 5                          | 14.70               | 8.60       | +          |
| 6                          | 26.44               | 28.04      | +          | 6                             | 11.70               | 10.70      | +          | 6                          | 10.30               | 5.00       | +          |
| 7                          | 30.69               | 25.19      | +          | 7                             | 6.80                | 7.00       | —          | 7                          | 14.00               | 10.60      | +          |
| 8                          | 14.93               | 10.93      | +          | 8                             | 6.50                | 5.70       | —          | 8                          | 17.30               | 15.20      | —          |
| 9                          | 23.75               | 21.08      | +          | 9                             | 9.60                | 7.90       | +          | 9                          | 10.28               | 7.83       | +          |
| 10                         | 13.93               | 13.83      | —          | 10                            | 12.80               | 9.60       | +          | 10                         | 7.37                | 12.23      | ПР         |
| 11                         | 14.60               | 13.10      | —          | 11                            | 10.85               | 9.20       | +          | 11                         | 8.92                | 9.61       | +          |
| 12                         | 16.62               | 17.52      | +          | 12                            | 17.10               | 19.20      | —          | 12                         | 7.90                | 6.20       | +          |
| 13                         | 19.95               | 32.51      | ПР         |                               |                     |            |            |                            |                     |            |            |
| 14                         | 12.94               | 6.14       | +          |                               |                     |            |            |                            |                     |            |            |
| 15                         | 12.25               | 7.65       | +          |                               |                     |            |            |                            |                     |            |            |

Примечание. «+» — РАО, «—» — нет РАО, «ПР» — повышение радиочувствительности.

когортах (1.61 у молодых, 1.65 у возрастных и 1.64 в группе с СВИД), то есть по этому критерию не было выявлено зависимости от возраста и наличия иммунодефицитного состояния.

В группах волонтеров с СВИД и молодых здоровых наблюдали по одному человеку с проявлением повышенной радиочувствительности, в группе возрастных такой эффект не наблюдался. Следует отметить, что в каждой группе были индивидуумы, у которых не было изменений в реакции клеток при облучении по схеме РАО. Доля таких людей была наиболее выражена в группе возрастных здоровых доноров и составляла 25%, в группе молодых — 13.4%, в группе с СВИД — 8.3%.

## ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании спонтанного уровня цитогенетических повреждений в культивируемых лимфоцитах человека в нашей работе было показано, что среднее значение спонтанного уровня цитогенетических повреждений в группе больных с СВИД в 2.6 раза превышало таковое в группе молодых и в 2.4 раза — в группе возрастных волонтеров. Кроме повышенного спонтанного уровня микроядер между пациентами с СВИД наблюдалась значительная вариабельность значений по сравнению с когортой здоровых доноров, что свидетельствует о накоплении спонтанных генетических нарушений, которые могут быть

обусловлены хроническим заболеванием или наличием воспалительных процессов, что характерно для людей с СВИД. Выявленный уровень спонтанных повреждений у этих пациентов сравним с повышенным уровнем микроядер в ЦБДЛ сотрудников атомной промышленности, получивших в результате хронического облучения дозу порядка 20 сГр и у медицинских сотрудников, работающих в рентгеновских кабинетах и с диагностическими радионуклидами [23, 24]. Повышенные спонтанные уровни микроядер в ЦБДЛ были выявлены также у больных сахарным диабетом, заболеванием щитовидной железы и раком [25, 26]. В большом многолетнем межлабораторном исследовании 7000 индивидуальных значений спонтанного уровня микроядер в ЦБДЛ было показано, что для условно здоровых людей разного возраста значения находятся в диапазоне 1–6% [13]. В этом и других исследованиях с использованием метода подсчета хромосомных aberrаций не удалось доказать связь роста спонтанного уровня повреждений в лимфоцитах с возрастом человека, курением [27] или проживанием в неблагоприятных экологических условиях [11], но отмечается четкая связь повышенного спонтанного уровня микроядер в ЦБДЛ у пациентов с риском индукции онкологических заболеваний [13, 28, 29]. В настоящее время по мере накопления индивидуальных данных по спонтанному уровню микроядер в лимфоцитах человека происходит переоценка представлений о причинах роста генетических повреждений в различных тканях организма с возрастом, и многие исследователи связывают эти изменения не с естественным старением, а с развитием воспалительных или других заболеваний.

Облучение низкими дозами рентгеновского излучения моделирует чувствительность индивидуумов при уровнях радиационных нагрузок, связанных с загрязнением окружающей среды, профессиональной деятельностью, а также при КТ-сканировании, маммографии [30] и других рентгеновских обследованиях, применение которых в диагностике выросло многократно в течение последнего десятилетия [31]. В нашем исследовании показано, что если средняя радиочувствительность лимфоцитов к дозе 10 сГр у пациентов с СВИД не отличалась от таковой у здоровых доноров обоих возрастов, то медианные значения в контрольных группах были близки и составляли 1.6 и 1.4, а в группе иммунодефицитных доноров это значение было выше в два раза. Ранее нами [20, 32] и другими исследователями [33] при изучении дозовых зависимостей при действии острого и хронического гамма-излучения было показано, что при облучении лимфоцитов здоровых доноров в диапазоне доз 0–40 сГр, наблюдается индуцированная гиперчувствительность по сравнению с ожидаемой при экстраполяции эффек-

тов, полученных при высоких дозах. Можно предположить, что у пациентов с СВИД в этом диапазоне доз также наблюдается индуцированная гиперчувствительность.

В связи с развитием подходов к разработке персонализированной медицины, поисков адекватных и чувствительных биомаркеров, принципов отбора персонала для работы в условиях повышенного радиационного риска в последние десятилетия проблема определения индивидуальной радиочувствительности становится все более актуальной. В большинстве работ, посвященных этой теме, используются дозы 1–2 Гр, которые соответствуют третьему участку нелинейных дозовых зависимостей, полученных для этого объекта с помощью различных маркеров повреждения хромосом и характеризуют клеточный ответ, который определяется в основном участием стресс-индуцированных систем репарации ДНК. Нами было выявлено, что в радиочувствительности лимфоцитов при облучении в дозе 2 Гр достоверных отличий между исследуемыми группами нет. Следует только отметить, что в группе здоровых молодых волонтеров наблюдалась наиболее выраженная межиндивидуальная вариабельность по сравнению с возрастными группами. Анализ полученных данных показал также, что отсутствует корреляция между спонтанным уровнем микроядер в ЦБДЛ и радиочувствительностью индивидуумов во всех группах. Уровень цитогенетических повреждений, вызванный окислительным стрессом при облучении рентгеновским излучением в дозе 2 Гр, примерно в 10 раз превышает спонтанный уровень цитогенетических повреждений, и поскольку периферические лимфоциты распределены по всему телу и находятся в постоянной циркуляции, то исследуемый биомаркер демонстрирует степень повреждения наиболее чувствительных клеток нормальной ткани при дозе, равной однократной фракции облучения при радиотерапии опухолей. Полученные нами показатели также сопоставимы с уровнями хромосомных повреждений, которые наблюдаются в крови больных такими заболеваниями как сахарный диабет и щитовидной железы, являющиеся индукторами постоянного окислительного стресса [34].

В работе [35] было показано, что радиочувствительность лимфоцитов человека, определенная с помощью микроядерного теста в ЦБДЛ, при облучении *in vivo* и *in vitro* до 3 Гр совпадает, что позволяет рассматривать облучение цельной крови *in vitro* в дозе 2 Гр как адекватную тест-систему для определения индивидуальной радиочувствительности. Полученные при облучении в дозе 2 Гр данные индивидуальной и средней радиочувствительности отражают генетическую нестабильность клеток иммунной системы на острый окислительный стресс, что является результатом

активации и взаимодействия антиоксидантных и репарационных систем организма, что в конечном счете определяет защиту организма от неблагоприятных факторов. В исследованиях радиочувствительности людей, работающих или живущих в условиях повышенного радиационного фона, пациентов, страдающих различными патологиями, было показано снижение, повышение радиочувствительности или отсутствие изменений по сравнению с контролем, а также высокая вариабельность индивидуальных значений [36, 37]. Авторы отмечают, что данные о корреляции спонтанного уровня цитогенетических повреждений с радиочувствительностью лимфоцитов *in vitro* также противоречивы и связывают выявленные реакции с индивидуальной вариабельностью и сложностью подбора адекватных когорт для сравнения.

За 40 лет со времени введения термина РАО установилось мнение, что этот феномен эволюционно существует у всех организмов, а при исследовании закономерностей его реализации было выявлено участие специфических механизмов репарации, пролиферации и клеточной гибели [4]. Установлено, что условия, необходимые для индукции РАО, зависят от величины адаптирующего и выявляющего воздействий, качества этих агентов, интервала между облучениями, чувствительности объекта к облучению низкими и высокими дозами, метода регистрации повреждений, происходило ли облучение *in vivo* или *in vitro* [3]. В данной работе при облучении цельной крови при сочетанном облучении по схеме РАО нами не было выявлено различий в чувствительности лимфоцитов между группами. При анализе частоты индукции РАО и величины его значения, обнаружено, что средняя величина РАО была также одинакова во всех когортах и равнялась 1.61 у молодых, 1.65 у возрастных и 1.64 в группе с СВИД; таким образом, по этому критерию не было выявлено зависимости от возраста и наличия иммунодефицитного состояния. При этом, в каждой группе были индивидуумы, у которых не было изменений в реакции клеток при облучении по схеме РАО по сравнению с облучением только в дозе 2 Гр. Доля таких людей была наиболее выражена в группе возрастных здоровых доноров и составляла 25%, в группе молодых — 13.4%, в группе с СВИД — 8.3%. При анализе анкет возрастных доноров, у которых не было выявлено изменений радиочувствительности, было установлено, что они более 30 лет работали в области ядерной физики и дозиметрии на ускорителях. Возможно, в результате профессиональной деятельности некоторые из этих волонтеров получили достаточную дозу хронического облучения, что привело к адаптации, и при дополнительном облучении в нашем эксперименте уже не происходило снижения уровня повреждения. Аналогичные наблюде-

ния об отсутствии РАО были показаны при исследовании жителей, проживающих на загрязненных в результате техногенных аварий районах, сотрудниках предприятий атомной промышленности [10, 11, 23]. Известно также, что на индукцию РАО, влияют такие факторы внешней среды, как кратковременная диета, прием антиоксидантных добавок и витаминов [38]. Мы предполагаем, что выявленная разнонаправленная реакция клеток при облучении по схеме РАО может свидетельствовать также об индукции генетической нестабильности, которая может выявиться только в экспериментальных условиях путем дооблучения лимфоцитов в стрессовой нелетальной дозе или по схеме РАО.

Полученные в нашей работе результаты показали, что спонтанный уровень цитогенетических повреждений в лимфоцитах пациентов с СВИД в 2.5 раза выше, чем у здоровых доноров того же возраста. При этом не было выявлено различий в радиочувствительности к низким и средним дозам рентгеновского излучения между исследуемыми группами, а РАО индуцировался с той же частотой в лимфоцитах пациентов с СВИД и в той же степени, как и у здоровых доноров разного возраста. Эти данные могут свидетельствовать о том, что процессы, обуславливающие возникновение и развитие вторичного иммунодефицитного состояния, не затрагивают механизмы, участвующие в формировании РАО, в частности, связанные с индукцией безошибочной репарации повреждений ДНК, которая индуцируется в узком диапазоне низких доз радиации, специфическом для каждого биологического объекта, а также регуляцией апоптоза, который приводит к гибели наиболее поврежденных клеток при облучении более высокими дозами. Использование в нашей работе показателей, которые характеризуют индивидуальную генетическую нестабильность лимфоцитов человека в условиях окислительного уровня стресса разного уровня, на наш взгляд, является полезным для оценки отдаленных последствий иммунодефицитных состояний, а также их вклада в формирование РАО. Таким образом, определение частоты микроядер в ЦБДЛ при облучении цельной крови человека *in vitro* может служить как прогностическим биомаркером состояния пациентов при заболеваниях иммунной системы, так и критерием индивидуальной радиочувствительности, что может быть полезным для персонификации лечения пациентов при радиотерапии.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность заведующей отделением иммунологии БПНЦ РАН д.м.н. Н.И. Косяковой за подбор когорты пациентов, медицинский персонал процедурных

кабинетов БПНЦ РАН и Протвинской городской больницы за взятие образцов, а также сотрудников ИТЭБ РАН и ФИАН РАН, которые участвовали в исследовании в качестве доноров.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН № 075-01027-22-00.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проводили в соответствии с соответствующими национальными и международными руководящими принципами медицинской этики, изложенными в Этических принципах медицинских исследований с участием человека Всемирной медицинской ассоциации (Хельсинкская декларация 2013) и было одобрено Комиссией по биоэтике и биобезопасности ИТЭБ РАН (№ 36/22). У всех волонтеров было получено информированное согласие на участие в исследовании.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- G. Olivieri, J. Bodycote, and S. Wolff, *Science*, **223** (4636), 594 (1984).
- И. Н. Когарко, А. В. Аксеев, В. В. Петушкова и др., *Радиация и риск*, **31** (1), 93 (2022).
- И. И. Пелевина, В. В. Петушкова, В. А. Бирюков и др., *Радиационная биология. Радиоэкология*, **59** (3), 261 (2019).
- Y. Guéguen, A. Bontemps, and T.G. Ebrahimian, *Cell Mol Life Sci.*, **76** (7), 1255 (2019).
- F. Cortese, D. Klovov, A. Osipov, et al., *Oncotarget*, **9** (18), 14692 (2018).
- F. Rödel, B. Frey, U. Gaipl, et al., *Curr. Med. Chem.*, **19** (12), 1741 (2012).
- V. E. Balakin, S. I. Zaichkina, O. M. Rozanova, et al., *Dokl. Biol. Sci.*, **374**, 488 (2000).
- S. I. Zaichkina, O. M. Rozanova, G. F. Aptikaeva, et al., *Int. J. Low Radiat.*, **2** (1–2), 1 (2006).
- S. M. J. Mortazavi, T. Ikushima, and H. Mozdarani, *Iran. J. Radiat. Res.*, **1** (1), 55 (2003).
- J. F. Barquinero, L. Barrios, M. R. Caballín, et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, **67** (2), 187 (1995).
- M. Ghiassi-nejad, S. M. Mortazavi, J. R. Cameron, et al., *Health Phys.*, **82** (1), 87 (2002).
- M. Fenech, W. P. Chang, M. Kirsch-Volders, et al., *Mutat. Res.*, **534** (1–2), 65 (2003).
- S. Bonassi, A. Znaor, M. Cepi, et al., *Carcinogenesis*, **28** (3), 625 (2006).
- J. Hall, P. A. Jeggo, C. West, et al., *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, **771**, 59 (2017).
- R. S. Tuano, N. Seth, and J. Chinen, *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, **127** (6), 617 (2021).
- P. M. Хаитов, *Иммунология* (ГЭОТАР-Медиа, М., 2016).
- K. Lumniczky, N. Impens, G. Armengol, et al., *Environ. Int.*, **149**, 106212 (2021).
- World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects, *J. Am. Med. Association*, **310** (20), 2191 (2013).
- V. E. Balakin, S. I. Zaichkina, D. Y. Klovov, et al., *Докл. РАН*, **363** (6), 843 (1998).
- S. I. Zaichkina, O. M. Rozanova, G. F. Aptikaeva, et al., *Nonlinearity Biol. Toxicol. Med.*, **2** (3), 213 (2004).
- M. Fenech, *Mutation Res.*, **455** (1–2), 81 (2000).
- А. М. Серебрянный, А. В. Алещенко, В. Я. Готлиб и др., *Радиационная биология. Радиоэкология*, **47** (1), 93 (2007).
- M. Gerić, J. Popić, G. Gajski, et al., *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **843**, 46 (2019).
- Z. Siama, M. Zosang-Zuali, A. Vanlalruati, et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, **95** (6), 697 (2019).
- S. Ban, C. Konomi, M. Iwakawa, et al., *J. Radiat. Res.*, **45** (4), 535 (2004).
- M. G. Andreassi, R. Barale, P. Iozzo, et al., *Mutagenesis*, **26** (1), 77 (2011).
- S. Bonassi, M. Neri, C. Lando, et al., *Mutat. Res.*, **543** (2), 155 (2003).
- S. Bonassi, R. El-Zein, C. Bolognesi, et al., *Mutagenesis*, **26** (1), 93 (2011).
- R. El-Zein, A. Vral, and C. J. Etzel, *Mutagenesis*, **26** (1), 101 (2011).
- J. Depuydt, A. Baert, V. Vandersickel, et al., *Int. J. Radiat. Biol.*, **89** (7), 532 (2013).
- M. Khatib, D. M. Walker, R. J. Albertini, et al., *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **820**, 8 (2017).
- S. I. Zaichkina, G. F. Aptikaeva, O. M. Rozanova, et al., *Environ. Health Perspect.*, **105** (Suppl 6), 1441 (1997).
- I. Seth, M. C. Joiner, and J. D. Tucker, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **91** (1), 82 (2015).
- M. Gerić, A. M. Domijan, V. Gluščić, et al., *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **810**, 22 (2016).
- H. W. Gantenberg, K. Wuttke, C. Streffer, et al., *Radiat. Res.*, **128** (3), 276 (1991).
- И. И. Пелевина, А. А. Алещенко, М. М. Антошина и др., *Радиационная биология. Радиоэкология*, **47** (6), 658 (2007).
- T. I. Ivanova, V. A. Khorokhorina, N. I. Sychenkova, et al., in *Proc. 3rd Rus. Conf. with international participation "Radiobiological Foundations of Radiation Therapy"* (2019), pp. 66–68.
- S. S. Sorokina, S. I. Zaichkina, O. M. Rozanova, et al., *Biophysics*, **61** (1), 144 (2016).

## **A Study on the Radiosensitivity and Induction of Adaptive Response in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Secondary Immunodeficiency Syndrome**

**O.M. Rozanova\*, E.N. Smirnova\*, T.A. Belyakova\*\*, and N.S. Strelnikova\*\***

*\*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,  
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

*\*\*Branch "Physical-Technical Center" of P.N. Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences,  
ul. Mira 1H, Protvino, Moscow Region, 142281 Russia*

This study examined radiosensitivity at low and high dose exposure to X-rays in human lymphocytes and the ability of low and high dose radiation to induce radioadaptive response when the peripheral blood cells from patients with secondary immune deficiency syndrome and healthy donors of different ages were irradiated *in vitro*. The frequency of micronuclei in cytochalasin-blocked binuclear lymphocytes in culture served as an indication of cytogenetic damage. It was found that the spontaneous level of cytogenetic damage in blood lymphocytes of patients with secondary immune deficiency syndrome was 2.5 times greater than that of healthy young and older volunteers and there was also a substantial interindividual variability in outcome parameters as compared to the data of control groups. There were no differences in mean values for radiosensitivity at low and high dose exposure of X-rays between the groups. In all groups, no correlation was shown between the spontaneous level of micronuclei in lymphocytes and the radiosensitivity of individuals. The adaptive response was induced with the same frequency and to the same extent in lymphocytes in patients with secondary immune deficiency syndrome and in healthy donors of different ages.

*Keywords: radioadaptive response, human lymphocytes, micronuclei, ionizing radiation*