

А.И. Котикова, В.С. Никифоров, Е.А. Блинова, А.В. Аклев

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ПУЛА РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-КЛЕТОК И ЭКСПРЕССИИ ГЕНА FOXP3 У ХРОНИЧЕСКИ ОБЛУЧЕННЫХ ЛИЦ

Уральский научно-практический центр радиационной медицины
ФМБА России, Челябинск

Челябинский государственный университет, Челябинск

Контактное лицо: Алиса Игоревна Котикова, e-mail: kotikova@urcrm.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Провести пилотное исследование количества регуляторных Т-клеток (Treg) в периферической крови и оценку транскрипционной активности гена *FOXP3* у хронически облученных лиц.

Материал и методы: В исследовании количества Treg в периферической крови приняло участие 77 чел., которые были разделены на две группы: облученные лица – 45 чел. со средней накопленной дозой облучения красного костного мозга (ККМ) $641,21 \pm 80,41$ мГр, и группа сравнения – 32 чел. со средней накопленной дозой облучения ККМ $20,38 \pm 2,51$ мГр. Исследование оценки экспрессии гена *FOXP3* проводилось у 298 чел.: группа облученных лиц составила 163 чел. (средняя накопленная доза облучения ККМ составила $702 \pm 43,10$ мГр); группа сравнения включала 135 чел. (средняя накопленная доза облучения ККМ в группе составила $17,30 \pm 1,40$ мГр). Группы исследования достоверно не отличались по возрасту, полу и этнической принадлежности. Количественная оценка регуляторных Т-клеток в периферической крови была проведена с использованием метода проточной цитометрии по наличию маркеров Т-хелперов CD3 и CD4, высокой экспрессией маркера CD25 и низкой экспрессией маркера CD127. Таким образом, фенотип регуляторных Т-лимфоцитов описывался как CD3+CD4+CD25highCD127low. Транскрипционная активность гена *FOXP3* была оценена методом ПЦР-ВР по относительному содержанию мРНК.

Результаты: Спустя более 70 лет после начала хронического радиационного воздействия у облученных лиц не выявлено статистически значимых изменений в пуле регуляторных Т-клеток: содержание абсолютного и относительного количества Treg статистически значимо не различалось между исследуемыми группами ($p=0,91$ и $p=0,29$ соответственно); не обнаружено статистически значимых связей показателей Treg с накопленными дозами облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов. Не выявлено статистически значимых различий в экспрессии мРНК гена *FOXP3* между облученными лицами и группой сравнения. Была показана линейная положительная зависимость экспрессии мРНК гена *FOXP3* от относительного количества регуляторных Т-клеток ($p=0,007$).

Ключевые слова: хроническое облучение, регуляторные Т-клетки, иммунитет, экспрессия генов, *FOXP3*

Для цитирования: Котикова А.И., Никифоров В.С., Блинова Е.А., Аклев А.В. Количественная оценка пула регуляторных Т-клеток и экспрессии гена *FOXP3* у хронически облученных лиц // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2024. Т. 69. № 5. С. 59–65. DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-5-59-65

A.I. Kotikova, V.S. Nikiforov, E.A. Blinova, A.V. Akleyev

Assessment of T-Regulatory Cell Population and FOXP3 Gene Expression in Chronically Exposed Residents of the Urals Region

Urals Research Center for Radiation Medicine, Chelyabinsk, Russia
Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia

Contact person: Alisa Igorevna Kotikova, e-mail: kotikova@urcrm.ru

ABSTRACT

Purpose: To conduct a pilot study on the quantity of regulatory T-cells (Treg) in the peripheral blood and to assess transcriptional activity of *FOXP3* gene in chronically exposed persons.

Material and methods: The study included 77 participants who were divided into two groups: exposed people – 45 individuals, with an average accumulated dose to red bone marrow (RBM) of 641.21 ± 80.41 mGy, and a comparison group – 32 individuals, with an average accumulated RBM dose of 20.38 ± 2.51 mGy. The study on the assessment of *FOXP3* gene expression was conducted on 298 individuals: the irradiated group consisted of 163 individuals with an average accumulated dose to RBM of 702 ± 43.10 mGy; the comparison group included 135 individuals with an average accumulated dose to RBM of 17.30 ± 1.40 mGy. The study groups did not differ significantly by age, sex and ethnicity. Quantitative assessment of regulatory T-cells in the peripheral blood was performed using flow cytometry method by the presence of T-helper markers CD3 and CD4, high expression of marker CD25 and low expression of marker CD127. Thus, the phenotype of T-regulatory lymphocytes was described as CD3+CD4+CD25highCD127low. The relative mRNA content of the *FOXP3* gene was assessed by PCR-RT.

Results: More than 70 years after the onset of chronic radiation, no statistically significant changes in the pool of regulatory T-cells were detected in the exposed persons: the content of absolute and relative amount of Treg did not differ statistically significantly between the studied groups ($p=0.91$ and $p=0.29$, respectively); no statistically significant relationship of Treg indices with the accumulated doses to RBM and thymus and peripheral lymphoid organs were found. No statistically significant differences in *FOXP3* gene mRNA expression were found between exposed individuals and the comparison group. A linear positive dependence of *FOXP3* gene mRNA expression on the relative number of regulatory T-cells was shown ($p=0.007$).

Keywords: *chronic exposure, regulatory T cells, immunity, gene expression, FOXP3*

For citation: Kotikova AI, Nikiforov VS, Blinova EA, Akleyev AV. Assessment of T-Regulatory Cell Population and FOXP3 Gene Expression in Chronically Exposed Residents of the Urals Region. Medical Radiology and Radiation Safety. 2024;69(5):59–65. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-5-59-65

Введение

Регуляторные Т-клетки (Treg) составляют около 5–10 % от всех CD4⁺-клеток в периферической крови человека [1] и принимают участие в поддержании иммунного гомеостаза организма [2]: регуляторные Т-клетки контролируют большинство типов иммунных реакций, включая аллергическую, аутоиммунную, воспалительную реакции [3], а также обеспечивают иммунный ответ при взаимодействии с патогеном [2]. Подавление функции Treg может способствовать формированию хронического течения заболевания [2]. Кроме того, регуляторные Т-клетки могут принимать участие в процессах канцерогенеза, подавляя иммунные реакции, вызванные тканями опухоли [4, 5].

В настоящее время активное исследование характеристик пула Treg проводятся в моделях различных заболеваний, а также при реакции «трансплантат против хозяина». Влияние ионизирующей радиации на пул регуляторных Т-клеток вызывает разногласия в современном научном мире. Так, одни исследователи сообщают о более высокой радиорезистентности регуляторных Т-клеток к воздействию радиации относительно других Т-клеток [4, 6], другие говорят о снижении функциональной активности регуляторных Т-лимфоцитов [7].

Фактор транскрипции FOXP3 специфично экспрессируется регуляторными Т-клетками, а также опосредовано участвует в процессах пролиферации и нормального функционирования новых Treg [8]. Считается, что FOXP3 включает сложную транскрипционную сеть, которая приводит к стабилизации фенотипа Treg. Данные показывают, что в условиях радиационного воздействия FOXP3 способен выполнять свои функции совместно с другими факторами транскрипции, многие из которых связаны с линиями Т-хелперов [9]. В публикации [10] было отмечено дозозависимое снижение экспрессии FOXP3 в клетках Treg человека. Также было выявлено значительное снижение экспрессии FOXP3 в nTreg и iTreg через 48 ч после воздействия в дозе 10 Гр *in vitro* [11]. При этом через 48 ч после аналогичного облучения CD4⁺CD25⁺iTreg клеток не выявлено увеличения экспрессии TBX21, связанного с их дифференцировкой в Th1, или GATA3, обуславливающего дифференцировку клеток в Th2 [11].

У жителей прибрежных сел реки Течи, подвергшихся хроническому радиационному воздействию вследствие сброса жидких радиоактивных отходов ПО «Маяк», на протяжении последующих лет после начала облучения регистрировались изменения отдельных параметров иммунной системы, указывающие на снижение активности Т-звена и естественной цитотоксичности [12]. Более поздние исследования лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, выявили функциональные изменения в иммунной системе, проявляющиеся в изменении цитокинового спектра, носящего провоспалительный характер [13].

Целью пилотного исследования являлась количественная оценка пула регуляторных Т-клеток в периферической крови хронически облученных лиц, а также оценка транскрипционной активности гена FOXP3.

Материал и методы

Анализ абсолютного и относительного количества регуляторных Т-клеток

В исследование были включены 77 чел., подвергшиеся хроническому радиационному воздействию, условия и характер радиационного облучения которых были ранее подробно описаны [14]. Вследствие несовершенства технологии хранения отработанного ядерного топлива с высоким содержанием делящихся материалов, ПО «Маяк» осуществляло сбросы жидких радиоактивных отходов в реку Течу на протяжении нескольких лет. Жители прибрежных сел реки Течи подвергались как внешнему гамма-излучению, так и внутреннему облучению (в основном за счет ⁹⁰Sr и ¹³⁷Cs), при этом накопленные дозы облучения в основном сформировались в период с 1951 по 1960 гг. [14, 15].

Основную исследуемую группу составили 45 человек, подвергшихся хроническому радиационному воздействию в широком диапазоне доз, а в группу сравнения вошли 32 чел., проживавшие в схожих социально-экономических условиях, с накопленной дозой облучения красного костного мозга (ККМ) менее 70 мГр за весь период своей жизни [16]. Критерии включения лиц в исследование представлены в работе [17]. Расчет индивидуальных суммарных накопленных поглощенных доз облучения (далее «накопленная доза облучения») ККМ и тимуса и периферических лимфоидных органов был произведен биофизической лабораторией УНПЦ РМ с использованием дозиметрической системы реки Течи (TRDS-2016D) [15].

Исследование проводилось в соответствии с действующими международными нормами (Хельсинкская декларация 1964 г.). Все участники исследования подписывали добровольное информированное согласие на проведение исследования, утвержденное локальным этическим комитетом Уральского научно-практического центра радиационной медицины.

В табл. 1 представлена характеристика исследуемых лиц.

Таблица 1

Характеристика исследуемых лиц
Characteristics of the studied persons

Характеристика группы		Облученные лица N ¹ =45	Группа сравнения N=32
Возраст на момент обследования, лет: M±SE ² (min-max)		73,26±0,58 (67–84)	70,44±0,84 (65–80)
Пол, человек (%)	мужчины	12 (27)	13 (41)
	женщины	33 (73)	19 (59)
Этническая принадлежность, человек (%)	славяне	17 (38)	5 (16)
	тюрки	28 (62)	27 (84)
Накопленная доза облучения ККМ, мГр: M±SE (min-max)		641,21±80,41 (73,20 – 2443,09)	20,38±2,51 (0,78 – 56,98)
Накопленная доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, мГр: M±SE (min-max)		92,79±14,05 (7,20 – 460,30)	8,78±1,60 (0,28 – 31,09)

Примечания: ¹ N – количество исследуемых лиц, ² M±SE – среднее ± погрешность среднего

Для исследования у пациентов натошак проводилось взятие крови в вакуумную пробирку с наполнителем КЗ-EDTA в объеме 9 мл. Методом проточной цитометрии проводилась оценка относительного количества регуляторных Т-лимфоцитов по наличию маркеров Т-хелперов CD3 и CD4, высокой экспрессией маркера CD25 и низкой экспрессией маркера CD127. Таким образом, фенотип регуляторных Т-лимфоцитов описывался как CD3+CD4+CD25^{high}CD127^{low} [2, 18]. Исследование проводилось методом проточной цитометрии на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter, США) с использованием следующих моноклональных антител: CD3-FITC, CD4-APC, CD25-PE, CD127-PC7 (все производства Beckman Coulter, США), которые добавлялись по 10 мкл к пробе объемом 100 мкл. После окраски проба инкубировалась в темноте 25 мин при комнатной температуре. Затем производился лизис эритроцитов с помощью лизирующего буфера VersaLyse (Beckman Coulter, США) в объеме 1 мл. Проба также инкубировалась в темноте 10 мин, после чего была готова к анализу. Оценка абсолютного и относительного количества Т-регуляторных клеток осуществлялась относительно общей популяции Т-хелперов (CD3+CD4+-клеток). Важно заметить, что в данной работе проводился анализ общей популяции регуляторных Т-клеток без разделения на естественные (nTreg) и индуцированные (iTreg) клетки.

Анализ транскрипционной активности гена FOXP3

Исследование оценки экспрессии гена FOXP3 проводилось у 298 чел., подвергавшихся хроническому низкоинтенсивному радиационному воздействию [14]. В выборку облученных лиц вошло 163 чел., средняя накопленная доза облучения КKM составила 702±43,1 мГр (диапазон доз: 73,4–3507 мГр), а средняя накопленная доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов – 94,50±7,84 мГр (диапазон доз: 2,83–645 мГр). Средний возраст облученных лиц составил 71,53±0,45 лет (от 60 до 87 лет). Группа сравнения включала 135 чел., выбранных по описанным выше критериям. Средняя накопленная доза облучения КKM в группе составила 17,30±1,40 мГр (диапазон доз: 0–56,1 мГр); средняя накопленная доза облучения тимуса и периферических органов – 7,24±0,84 мГр (диапазон доз: 0–39,50 мГр). Средний возраст в группе сравнения составил 65,67±0,66 лет (от 50 до 87 лет).

Материалом для количественной оценки экспрессии гена FOXP3 служили образцы периферической крови, собранные в стерильные вакуумные пробирки Tempus

Blood RNA Collection Tubes (Applied Biosystem, США). Экстракция РНК проводилась на колонках с помощью набора GeneJET Stabilized and Fresh Whole Blood RNA Kit (Thermo Scientific™, США) по стандартной методике. Исходным количеством для анализа было 100 нг/мкл РНК каждого образца. Реакцию обратной транскрипции для синтеза кДНК проводили с использованием коммерческого набора реагентов High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, США). Относительное количественное содержание мРНК определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени с использованием амплификатора CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, USA).

Количественную оценку экспрессии анализируемых генов проводили по методу 2-ΔΔCt [19]. Данные оценивали относительно уровня мРНК генов «домашнего хозяйства» (housekeeping genes) ACTB и B2M. Анализ кривых амплификации производили в программе Bio-Rad CFX Manager 2.1 (Bio-Rad Laboratories, США) методом пороговой линии. Расчет проводился с учетом трех повторов для каждого гена. В работе были использованы коммерческие наборы праймеров/зондов от ООО «ДНК-синтез» (Россия): FOXP3 (Forward: 5'-CCTTCACGTTCAACATCAAGC-3', Reverse: 5'-GCTCTGGGTACAGGTCCTCATC-3', Probe3: FAM-BHQ1 - 5'-CCAGTCCCGTGAACGCCCA-3').

Анализ зависимости транскрипционной активности гена FOXP3 и абсолютного и относительного количества регуляторных Т-клеток периферической крови было проведено для 11 чел. из описанной выше выборки (накопленная доза облучения КKM составила 443±118 мГр; накопленная доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов – 39,7±11,7 мГр).

Статистическая обработка

Статистическая обработка данных проводилась в программе SigmaPlot. Проверка нормальности распределения показателей проводилась с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Массивы непараметрических данных сравнивали при помощи U-критерия Манна–Уитни. Наличие корреляционных связей оценивали путем расчета коэффициентов ранговой корреляции по Спирмену. При оценке достоверности результатов был принят уровень значимости 5 %.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования количества регуляторных Т-клеток представлены на рис. 1.

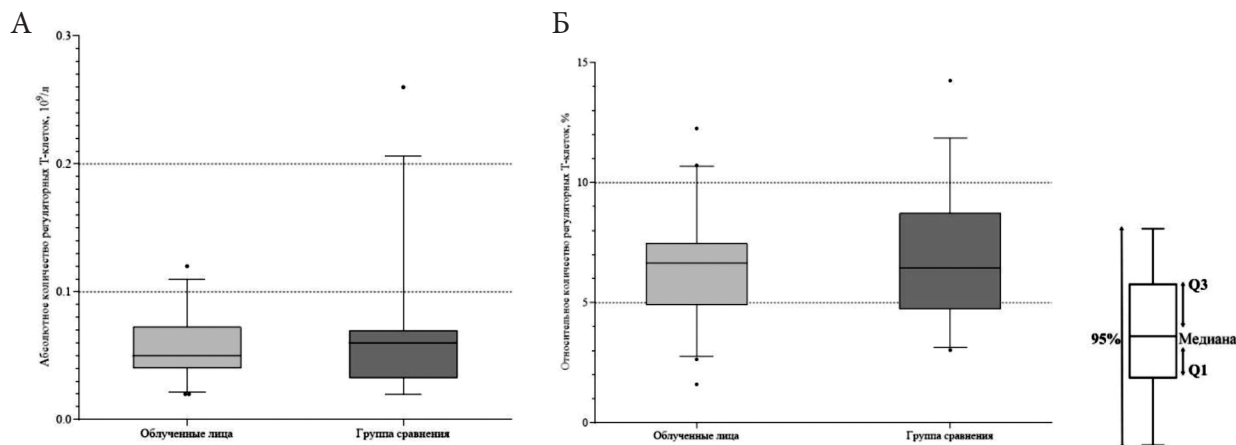


Рис. 1. Абсолютное (А) и относительное (Б) количество регуляторных Т-клеток в периферической крови исследуемых лиц

Fig. 1. Absolute (A) and relative (B) number of regulatory T cells in the peripheral blood of the studied individuals

Не было обнаружено статистически значимых различий абсолютного ($p=0,91$) и относительного ($p=0,29$) количества регуляторных Т-клеток между облученными лицами и группой сравнения (рис. 1).

Был проведен корреляционный анализ связи возраста с абсолютным и относительным количеством регуляторных Т-клеток в периферической крови исследуемых лиц (табл. 2). Не было обнаружено статистически значимой возрастной зависимости содержания исследуемых показателей в периферической крови как в группе облученных лиц, так и в группе сравнения.

Таблица 2

Возрастная зависимость содержания регуляторных Т-клеток в периферической крови облученных лиц

Age dependence of the content of regulatory T cells in the peripheral blood of irradiated individuals

Показатель	Облученные лица	Группа сравнения
	SR (<i>p</i>)	
Регуляторные Т-клетки, 10 ⁹ /л	0,12 (0,43)	−0,34 (0,06)
Регуляторные Т-клетки, %	−0,07 (0,65)	−0,16 (0,42)

Примечание: SR (p) – коэффициент корреляции Спирмена (уровень значимости корреляционной связи)

В связи с широким диапазоном значений накопленных доз облучения ККМ, тимуса и периферических

лимфоидных органов исследуемых лиц было принято решение разделить облученных лиц на дозовые подгруппы. Так, в отношении накопленной дозы облучения ККМ были выделены две дозовые подгруппы: лица, облученные в дозе от 70 до 500 мГр (25 чел.), и лица, облученные в дозе свыше 500 мГр (20 чел.). В отношении накопленной дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов также были выделены две дозовые подгруппы: лица, облученные в дозе до 100 мГр (<100 мГр; 28 чел.), и лица, облученные в дозе свыше 100 мГр (>100 мГр; 17 чел.). Результаты представлены на рис. 2 (А и Б) и 3 (А и Б) в виде медианы, квартилей 25 % и 75 %, а также доверительного интервала 95 % (ДИ).

В результате проведенного исследования не было выявлено статистически значимых различий абсолютного и относительного количества регуляторных Т-клеток в разных дозовых подгруппах, выделенных и относительно накопленной дозы облучения ККМ (рис. 2А и 2Б), а также накопленных доз облучения тимуса и периферических лимфоидных органов (рис. 3А и 3Б).

Для исследования связи количества Тreg в периферической крови с накопленными дозами облучения корреляционный анализ проводился отдельно в группе облученных лиц, а также совместно с лицами из группы сравнения. Результаты представлены в табл. 3.

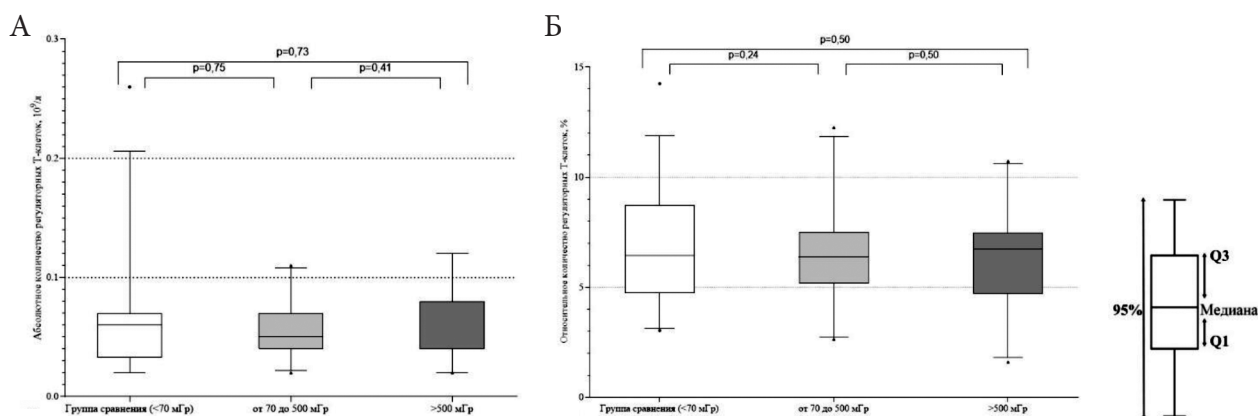


Рис. 2. Сравнение показателей регуляторных Т-клеток в разных дозовых подгруппах относительно накопленной дозы облучения ККМ: А) абсолютное количество Тreg; Б) относительное количество Тreg

Fig. 2. Comparison of the indicators of regulatory T cells in different dose subgroups relative to the accumulated dose of CMC radiation: А) the absolute number of Treg; Б) the relative number Treg

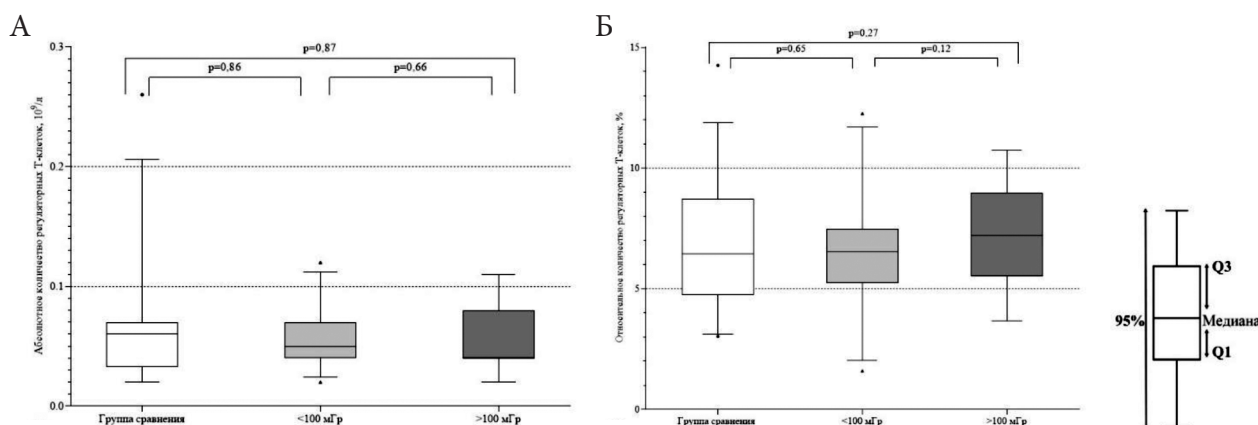


Рис. 3. Сравнение показателей регуляторных Т-клеток в разных дозовых подгруппах относительно накопленной дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов: А) абсолютное количество Тreg; Б) относительное количество Тreg

Fig. 3. Comparison of the indicators of regulatory T cells in different dose subgroups relative to the accumulated radiation dose of the thymus and peripheral lymphoid organs: А) the absolute amount of Treg; Б) figure for the relative amount Treg

Таблица 3

Корреляционная связь накопленных доз облучения и содержания регуляторных Т-клеток в периферической крови облученных лиц

Correlation between accumulated radiation doses and the content of regulatory T cells in the peripheral blood of irradiated individuals

Показатель	Облученные лица		Объединенная группа	
	Доза облучения ККМ	Доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов	Доза облучения ККМ	Доза облучения тимуса и периферических лимфоидных органов
	SR (p)			
Регуляторные Т-клетки, 10 ⁹ /л	-0,24 (0,12)	-0,08 (0,62)	-0,07 (0,56)	-0,01 (0,93)
Регуляторные Т-клетки, %	0,04 (0,79)	0,34 (0,06)	0,006 (0,96)	0,15 (0,19)

Примечание: SR (p) – коэффициент корреляции Спирмена (уровень значимости корреляционной связи).

Не было обнаружено статистически значимых связей между абсолютным и относительным количеством Treg и накопленными дозами облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов как отдельно в группе облученных лиц, так и в объединенной группе (табл. 3).

Экспрессия гена *FOXP3* в отдаленные сроки у хронически облученных людей не отличалась от таковой в группе сравнения. Распределение показателей продемонстрировано на рис. 4А.

Так как кумулятивные дозы облучения у обследованных лиц находились в достаточно широком диапазоне значений, было важным произвести оценку экспрессии гена *FOXP3* в зависимости от величины поглощенных дозы облучения ККМ. С этой целью люди, включенные в выборку облученных лиц, были условно поделены на три дозовые подгруппы: облученные в диапазоне промежуточных значений доз: 70–500 мГр (71 чел.), 500–1000 мГр (58 чел.) и облученные в диапазоне высоких значений доз >1 000 мГр (34 чел.). Данные, представленные на рис. 4Б, указывают на отсутствие статистически значимых различий между лицами с разными накопленными дозами облучения ККМ.

Согласно результатам корреляционного анализа, также не было отмечено статистически значимых связей

между относительным содержанием мРНК *FOXP3* и величинами накопленных доз облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов.

Выявлена положительная корреляция между абсолютным ($S=0,60$, $p=0,04$) и относительным ($S=0,82$, $p=0,002$) количеством регуляторных Т-клеток и уровнями экспрессии гена *FOXP3*. При этом ассоциация между абсолютным количеством Т-регуляторных клеток и уровнями экспрессии гена *FOXP3* не может быть описана линейной регрессионной моделью ($p=0,19$), что представлено на рис. 5А.

На рис. 5Б представлено графическое отображение линейной зависимости частоты регуляторных Т-клеток от транскрипционной активности гена *FOXP3* у обследованных лиц. Уравнение регрессии имеет вид: $y=0,03+0,08 \times x$ ($R^2=0,57$, $p=0,007$).

Хотя лимфоциты являются клетками, особенно чувствительными к ионизирующему излучению, существует большая вариабельность радиочувствительности отдельных субпопуляций лимфоцитов. Исследования радиочувствительности регуляторных Т-клеток показывают более высокую радиорезистентность популяции Treg относительно других, более чувствительных к действию ионизирующего излучения, популяций Т- и В-клеток [4]. Так, в эксперименте селезеночные регуляторные Т-клетки обнаруживаются даже после облучения организма в летальных дозах [20], а у мышей, подвергшихся γ -облучению в дозе 5 Гр, наблюдается смещение иммунного баланса в сторону CD4+CD25+Treg-клеток, причем именно в регуляторных Т-клетках была отмечена повышенная экспрессия фактора Bcl-2, подавляющего апоптотические процессы в лимфоидных клетках [6]. Аналогичные результаты были получены и для человеческих Treg, выделенных из цельной периферической крови: облучение клеточной суспензии в дозе 1,2 Гр *in vitro* повышает уровень апоптоза Treg, однако данный показатель всё еще ниже уровня апоптоза эффекторных Т-клеток при тех же условиях облучения [21]. Одним из механизмов, ответственных за повышенную радиорезистентность Treg по сравнению с другими Т-клетками, может быть более эффективная активация контрольной точки и последующая остановка клеточного цикла, позволяющая восстановить разрывы ДНК, что также было показано на культуре регуляторных Т-клеток человека [22].

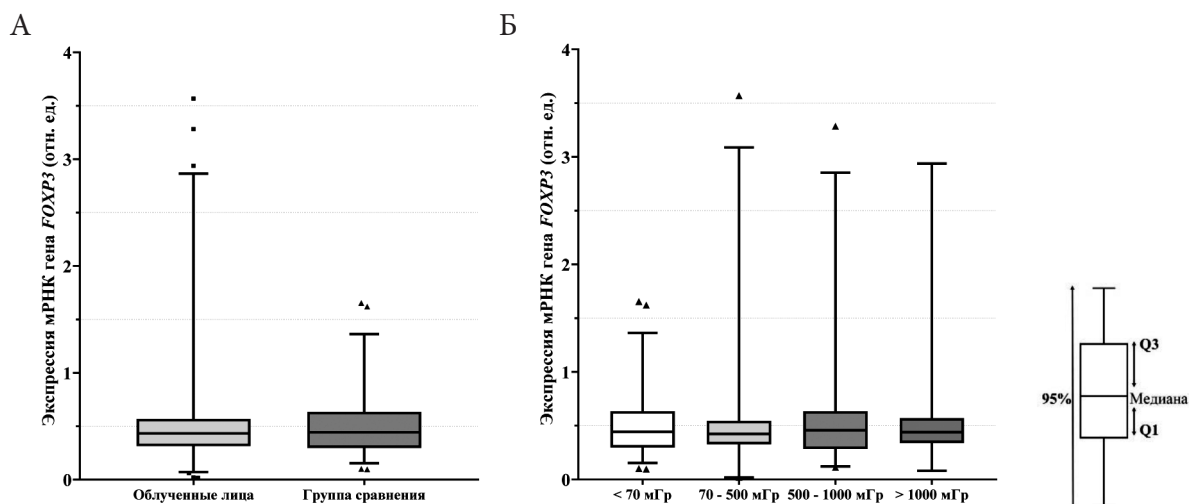


Рис. 4. Профиль экспрессии мРНК гена *FOXP3*: А – между облученными лицами и группой сравнения, Б – между лицами с разными накопленными поглощенными дозами облучения красного костного мозга

Fig. 4. The mRNA expression profile of the *FOXP3* gene: А – between irradiated individuals and the comparison group, Б – between individuals with different accumulated absorbed doses of red bone marrow irradiation

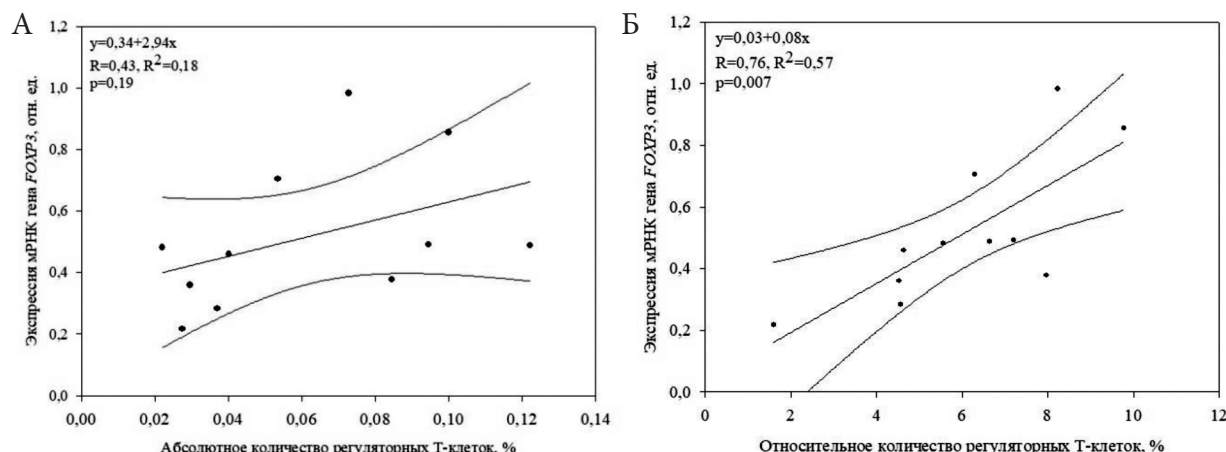


Рис. 5. Линейная регрессионная модель зависимости абсолютного (А) и относительного (Б) количества регуляторных Т-клеток от экспрессии мРНК гена *FOXP3*

Fig. 6. Linear regression model of the dependence of the absolute (A) and relative (B) number of regulatory T cells on the expression of the mRNA of the *FOXP3* gene

Ранее сообщалось о наличии признаков иммунного дисбаланса у жителей загрязненных территорий [12], и развитии провоспалительного профиля у хронически облученных лиц в отдаленном периоде [23], а также было показано дозозависимое снижение частоты Т-хелперов 2-го типа, входящих в состав Т-хелперов центральной памяти [24]. Однако в данном исследовании спустя более 70 лет после начала хронического радиационного воздействия у облученных лиц не выявлено статистически значимых количественных изменений регуляторных Т-клеток, можно лишь отметить некоторое увеличение относительного количества Treg, связанное увеличением накопленной дозы облучения тимуса и периферических лимфоидных органов, на уровне тенденции ($p=0,06$). Не выявлено статистически значимых различий в экспрессии мРНК гена *FOXP3* между облученными лицами и группой сравнения. Также мы обнаружили линейную положительную зависимость экспрессии мРНК гена *FOXP3* от относительного количества регуляторных Т-клеток ($p=0,007$). Таким образом, полученные нами результаты косвенно подтверждают представленные в мировой литературе вы-

воды о большей радиоустойчивости пула регуляторных Т-клеток. Однако для подтверждения полученных нами результатов требуется увеличение выборки и продолжение исследований.

Заключение

В отдаленные сроки после хронического низкоинтенсивного радиационного воздействия при поглощенной дозе облучения ККМ не обнаружено статистически значимых различий содержания абсолютного и относительного количества регуляторных Т-клеток в периферической крови между облученными лицами и группой сравнения. Также не выявлено статистически значимой корреляционной связи между накопленными дозами облучения ККМ, тимуса и периферических лимфоидных органов с количественными показателями регуляторных Т-клеток.

Экспрессионная активность гена *FOXP3* облученных лиц статистически значимо не отличалась от таковой в группе сравнения. Нами была обнаружена линейная зависимость экспрессии мРНК гена *FOXP3* от относительного количества регуляторных Т-клеток.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

- Sebe A, Anliker B, Rau J, Renner M. Genetisch Modifizierte Regulatorische T-Zellen: Therapiekonzepte und Ihr Regulatorischer Rahmen [Genetically Modified Regulatory T Cells: Therapeutic Concepts and Regulatory Aspects]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2020;63;11:1403-1411. doi:10.1007/s00103-020-03230-8.
- Rakebrandt N, Littringer K, Joller N. Regulatory T-cells: Balancing Protection Versus Pathology. *Swiss Med Wkly*. 2016;146:w14343. doi:10.4414/sm.w.2016.14343
- Panduro M, Benoist C, Mathis D. Tissue Tregs. *Annu Rev Immunol*. 2016;34:609-633. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095948.
- Persa E, Balogh A, Sáfrány G, Lumniczky K. The Effect of Ionizing Radiation on Regulatory T Cells in Health and Disease. *Cancer Lett*. 2015;368;2:252-261. doi:10.1016/j.canlet.2015.03.003.
- Song D, Ding Y. A New Target of Radiotherapy Combined with Immunotherapy: Regulatory T Cells. *Front Immunol*. 2024;14:1330099. doi:10.3389/fimmu.2023.1330099.
- Nakamura N, Kusunoki Y, Akiyama M. Radiosensitivity of Cd4 or Cd8 Positive Human T-Lymphocytes by an in Vitro Colony Formation Assay. *Radiat. Res*. 1990;123;2:224-227.
- Qu Y, Jin S, Zhang A., et al. Gamma-Ray Resistance of Regulatory cd4+cd25+foxp3+ T Cells in Mice. *Radiation Research*. 2010;173:148-157.
- Baba N., Rubio M., Kenins L., et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Ligand Vaf347 Selectively Acts on Monocytes and Naive Cd4(+) Th Cells to Promote the Development of IL-22-Secreting Th Cells. *Hum. Immunol*. 2012;73:795-800.
- Gremy O., Benderitter M., Linard C. Acute and Persisting Th2-Like Immune Response after Fractionated Colorectal Gamma-Irradiation. *World J. Gastroenterol*. 2008;14:7075-7085.
- Hori S., Nomura T., Sakaguchi S. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3. *Science*. 2003;299:5609:1057-1061.
- Haribhai D., Williams J. B., Jia S., et al. A Requisite Role for Induced Regulatory T Cells in Tolerance Based on Expanding Antigen Receptor Diversity. *Immunity*. 2011;35;1:109-122.
- Beauford S.S., Kumari A., Garnett-Benson C. Ionizing Radiation Modulates the Phenotype and Function of Human CD4+ Induced Regulatory T Cells. *BMC Immunol*. 2020;21;36:18.
- Аклеев А.В., Силкина Л.А., Веремеева Г.А. Радиационно-индуцированные изменения иммунитета и их возможная роль в развитии отдаленных последствий облучения че-

- ловека // Радиация и риск. Бюллетень НРЭР. 1997. №10. С.137-146 [Akleyev A.V., Silkina L.A., Veremeyeva G.A. Radiation-Induced Immunity Changes and their Potential Role in the Development of Late Radiation Effects in Humans. *Radiatsiya i Risk. Byulleten' Natsional'nogo Radiatsionno-Epidemiologicheskogo Registra* = Radiation & Risk. Bulletin of the National Radiation and Epidemiological Registry. 1997;10:137-146 (In Russ.)].
14. Аклеев А.А. Иммунный статус человека в отдалённом периоде хронического радиационного воздействия // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2020. Т. 65. №4. С. 29-35 [Akleyev A.A. Immune Status of a Man Long after Chronic Radiation Exposure. *Meditsinskaya Radiologiya i Radiatsionnaya Bezopasnost* = Medical Radiology and Radiation Safety. 2020;65(4):29-35 (In Russ.)]. doi: 10.12737/1024-6177-2020-65-4-29-35.
 15. Последствия радиоактивного загрязнения реки Течи / Под ред. А.В. Аклеева. Челябинск, 2016. 390 с. [*Posledstviya Radioaktivnogo Zagryazneniya Reki Tечи* = Consequences of Radioactive Contamination of the Techa River. Ed. Akleyev A.V. Chelyabinsk Publ., 2016. 390 p. (In Russ.)].
 16. Дегтева М.О., Напье Б.А., Толстых Е.И., Шишкина Е.А., Бугров Н.Г., Крестинина Л.Ю., Аклеев А.В. Распределение индивидуальных доз в когорте людей, облученных в результате радиоактивного загрязнения реки Течи // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т.64. №3. С.46-53 [Degteva MO, Nap'e BA, Tolstykh EI, Shishkina EA, Bugrov NG, Krestinina LYu, Akleyev AV. Individual Dose Distribution in Cohort of People Exposed as a Result of Radioactive Contamination of the Techa River. *Meditsinskaya Radiologiya i Radiatsionnaya Bezopasnost* = Medical Radiology and Radiation Safety. 2019;64(3):46-53 (In Russ.)]. doi: 10.12737/article_5cf2364cb49523.98590475.
 17. СанПин 2.6.1.2523-09 «Нормы радиационной безопасности (НРБ-99/2009)». М., 2009. 225 с. [Sanitary Rules and Regulations Sanpin 2.6.1.2523-09. Standards of Radiation Safety (NRB-99/2009)». Moscow Publ., 2009. 225 p. (In Russ.)].
 18. Котикова А.И., Блинова Е.А., Аклеев А.В. Субпопуляционный состав Т-хелперов в периферической крови хронически облученных лиц в отдаленном периоде // Медицина экстремальных ситуаций. 2022. Т.24. №2. С.65-73 [Kotikova AI, Blinova EA, Akleyev AV. Subpopulation Composition of T-Helpers in the Peripheral Blood of Persons Chronically Exposed to Radiation in the Long Term. *Meditsina Ekstremal'nykh Situatsiy* = Extreme medicine. 2022;24(2):65-73 (In Russ.)]. doi: 10.47183/mes.2022.018.
 19. Селькова М.С., Селютин А.В., Сельков С.А. Особенности содержания Т-регуляторных лимфоцитов и NK-клеток у пациентов с хроническим гепатитом С // Инфекция и иммунитет. 2012. Т.2. №4. С.715-722 [Selkova M.S., Selutin A.V., Selkov S.A. Patterns of Regulatory T-Cells and NK-Cells Levels in Patients with Hepatitis C Virus Infection. *Infektsiya i Immunitet* = Infection and Immunity. 2014;2;4:715-722 (In Russ.)]. doi: 10.15789/2220-7619-2012-4-715-722.
 20. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25;4:402-408.
 21. Котинцева Е.А., Аклеев А.А., Блинова Е.А. Цитокиновый профиль лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию, в отдаленные сроки после облучения // Радиационная биология. Радиоэкология. 2021. Т. 61. №5. С.506-514 [Kodintseva E.A., Akleyev A.A., Blinova E.A. The Cytokine Profile of Chronically Irradiated People in Long Terms after the Beginning of Irradiation. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya* = Radiation Biology. Radioecology. 2021;61;5:506-514 (In Russ.)]. doi: 10.31857/S0869803121050076.
 22. Anderson BE, McNiff JM, Matte C, Athanasiadis I, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. Recipient CD4 + T Cells that Survive Irradiation Regulate Chronic Graft-Versus-Host Disease. *blood*. 2004;104;5:1565-1573. doi:10.1182/blood-2004-01-0328.
 23. Winzler C, Fantinato M, Giordan M, Calore E, Basso G, Messina C. CD4(+) T Regulatory Cells are More Resistant to DNA Damage Compared to CD4(+) t Effector Cells as Revealed by Flow Cytometric Analysis. *Cytometry A*. 2011;79;11:903-911. doi:10.1002/cyto.a.21132.
 24. Pantelias G.E., Terzoudi G.I. A Standardized G2-Assay for the Prediction of Individual Radiosensitivity. *Radiother. Oncol*. 2011;101:28-34.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках прикладной научно-исследовательской работы по теме: «Исследование влияния хронического радиационного воздействия на состояние Т-клеточного звена иммунной системы человека».

Участие авторов. А.И. Котикова – лабораторные исследования, статистическая обработка, написание текста статьи; В.С. Никифоров – лабораторные исследования, статистическая обработка, написание текста статьи; Е.А. Блинова – написание текста статьи; А.В. Аклеев – концепция исследования, написание текста статьи, научное руководство.

Поступила: 20.05.2024. Принята к публикации: 25.06.2024.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The work was carried out as part of the: «Study on the effect of chronic radiation exposure on the state of the human T-cell immune system».

Contribution. Kotikova AI – laboratory research, statistical processing, article authoring; Nikiforov VS – laboratory research, statistical processing, article authoring; Blinova EA – article authoring; Akleyev AV – development of the research concept, scientific supervision, article authoring.

Article received: 20.05.2024. Accepted for publication: 25.06.2024.