

# КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ДВУЦЕПОЧЕЧНЫХ РАЗРЫВОВ ДНК ПРИ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Г.А. СМАГУЛОВА<sup>1</sup>, М.А. АЙТМАГАМБЕТОВА<sup>1</sup>, Г.В. ВЕКЛЕНКО<sup>1</sup>, Н.М. КЕРЕЕВА<sup>1</sup>,  
А.Н. ЖЕКСЕНОВА<sup>1</sup>, А. АМАНЖОЛКЫЗЫ<sup>1</sup>, А.Б. ТУЛЯЕВА<sup>1</sup>, Г.Б. БАКЫТЖАНОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НАО «Западно-Казахстанский медицинский университет им. Марата Оспанова», Актобе, Республика Казахстан

## АННОТАЦИЯ

**Актуальность:** Наиболее опасным типом повреждений ДНК являются двуцепочечные разрывы ДНК. Анализ очагов фосфорилированного гистонового белка H2AX ( $\gamma$ H2AX) в настоящее время является наиболее чувствительным методом обнаружения двуцепочечных разрывов ДНК (ДЦР). Эта модификация белка может стать индивидуальным биомаркером клеточного стресса, особенно при диагностике и мониторинге неопластических заболеваний. В этом исследовании нами были использованы новые алгоритмы распознавания образов на платформе AKLIDES® для автоматического анализа иммунофлуоресцентных изображений фокусов  $\gamma$ H2AX и сравнения результатов с визуальными оценками. Изучено формирование очагов  $\gamma$ H2AX на мононуклеарных клетках периферической крови женщин с раком молочной железы (РМЖ) и доброкачественными образованиями молочных желез.

**Цель исследования** – провести количественную оценку двуцепочечных разрывов ДНК в лимфоцитах периферической крови у женщин с раком молочной железы и доброкачественными образованиями молочных желез для определения возможного биомаркера.

**Методы:** Проведение анализа очагов  $\gamma$ -H2AX в лимфоцитах на автоматизированной системе AKLIDES у женщин с РМЖ ( $n=29$ ) и доброкачественными образованиями молочных желез ( $n=24$ ).

**Результаты:** При сравнении показателей основной и контрольной групп в канале разрывов «FITC» обнаружена статистически значимая разница показателей «Средний диаметр ядра» ( $p=0,0382$ ), «Среднее значение интенсивности для всех очагов» ( $p=0,0166$ ), «Количество перекрывающихся очагов в двух каналах» ( $p=0,0486$ ). В канале репарации «APC» выявлены достоверные различия показателей «Ядра с повышенной интенсивностью свечения» ( $p=0,0166$ ) и «Среднее значение интенсивности для всех очагов» ( $p=0,0118$ ).

**Заключение:** Выявленные изменения показателей двуцепочечных разрывов ДНК по каналам разрывов FITC и репарации APC между основной и контрольной группами, возможно, могут служить биомаркером для выявления РМЖ.

**Ключевые слова:** двуцепочечные разрывы ДНК, гистоновый белок H2AX, рак молочной железы (РМЖ).

**Введение:** Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее часто диагностируемым инвазивным раком среди женщин во всем мире, а также причиной номер один женской смертности от рака [1].

Гистон H2AX подвергается фосфорилированию в ответ на двуцепочечные разрывы (ДЦР) ДНК, которые, в свою очередь, являясь частью онкогенной процедуры. Чтобы предотвратить катастрофические последствия стойких двуцепочечных разрывов ДНК, эукариотические клетки разработали набор сложных сигнальных сетей, которые обнаруживают эти повреждения ДНК, организуют контрольные точки клеточного цикла и в конечном итоге приводят к их восстановлению. В совокупности эти сигнальные сети составляют реакцию на повреждение ДНК [2,3]. Двуцепочечные разрывы являются одними из первых процедур, происходящих при формировании и прогрессировании рака в результате действия эндогенных и экзогенных факторов. Вариант гистона H2AX подвергается фосфорилированию по сирину 139 из-за двуцепочечных разрывов, а гамма-H2AX формируется в результате нестабильности генома [4, 5]. Существует два основных пути репарации ДЦР, а именно, негомологичное соединение концов и гомо-

логичная рекомбинация; выбор пути частично контролируется посттрансляционными модификациями гистонов, включая убиквитинирование [6, 7]. Таким образом, активированные компоненты пути повреждения и восстановления ДНК могут быть использованы в качестве биомаркеров рака, причем H2AX является наиболее чувствительным. Следовательно, измерения уровня H2AX могут помочь обнаружить предраковые поражения или рак на ранних стадиях [8-10]. Иммунофлуоресцентное окрашивание с антителом анти- $\gamma$ H2AX обеспечивает визуализацию этих ядерных очагов, которые были найдены и коррелирует с количеством ДЦР [11, 12].

Флуоресцентный микроскопический подход был реализован для создания быстрого и стандартизированного анализа  $\gamma$ H2AX, а также использовался для обеспечения быстрой оценки повреждений ДНК в клинической практике. Платформа, названная AKLIDES (Medipan, Германия), позволяет не только полностью автоматизировать оценку скрининга антинуклеарных иммунофлуоресцентных антител [13], но и проводить вычислительный анализ очагов  $\gamma$ -H2AX, который в настоящее время успешно подтвержден несколькими независимыми исследовательскими группами [14-18].

**Цель исследования** – провести количественную оценку двуцепочечных разрывов ДНК в лимфоцитах периферической крови у женщин с раком молочной железы и доброкачественными образованиями молочных желез для определения возможного биомаркера.

**Материалы и методы:** Данное проспективное когортное исследование было проведено на двух группах пациенток: основная группа – 29 пациенток с первично верифицированным диагнозом РМЖ; контрольная группа – 24 пациентки с гистологически верифицированным доброкачественным образованием молочной железы. Исследование проводилось на базе Медицинского Центра и Научно-Практического Центра ЗКМУ имени Марата Оспанова (Актобе, Республика Казахстан). Письменное информированное согласие было получено от всех субъектов исследования. Проект был одобрен локальной комиссией по биоэтике (протокол №57, 17.01.2020 г.).

В основной группе (29 пациенток с РМЖ) средний возраст составил  $56,10 \pm 12,23$  лет. По стадиям заболевания: II стадия была диагностирована у 25 (86,2%) пациенток, III стадия – у 4 (13,8%). По иммуногистохимии опухоли: у 3 (10,3%) больных обнаружен Люминальный тип А, у 21 (72,4%) – Люминальный тип В, у 4 (13,8%) выявлен трижды негативный тип опухоли и у одной (3,4%) пациентки – HER-позитивный рак.

В контрольную группу вошли 24 пациентки с верифицированным диагнозом «Доброкачественное образование молочных желез» (M2 по BI-RADS), средний возраст составил  $43,08 \pm 10,12$  лет.

Материал исследования – периферическая венозная кровь в объеме 10 мл (пробирка ЭДТА), содержащая мононуклеарные клетки. Анализ очагов  $\gamma$ -H2AX в лимфоцитах проводили с использованием набора для иммунофлуоресцентного окрашивания  $\gamma$ -H2AX (AKLIDES Nuk Human Lymphocyte Complete, Medipan).

#### Анализ фокусов $\gamma$ -H2AX

Анализ очагов  $\gamma$ -H2AX в лимфоцитах проводили с использованием набора для иммунофлуоресцентного окрашивания  $\gamma$ -H2AX (AKLIDES Nuk Human Lymphocyte Complete, Medipan). Анализ  $\gamma$ -H2AX проводили в соответствии с инструкциями производителя.

Система AKLIDES основана на моторизованном обратном флуоресцентном микроскопе в сочетании с различными аппаратными и программными модулями, позволяющими полностью автоматизировать получение, анализ и оценку изображений. Для каждого образца анализировали минимум 80-100 клеток. Для оценки очагов  $\gamma$ -H2AX ДЦР ДНК использовали 12 параметров в канале разрывов (FITC) и в канале репарации (APC) автоматизированной системы AKLIDES:

1. ядра с повышенной интенсивностью свечения;
2. средний диаметр ядра;
3. среднее значение интенсивности для всех очагов;
4. количество клеток с очагами;
5. общее количество очагов;
6. среднее количество очагов в клетке;
7. количество обнаруженных кластеров;
8. среднее значение всех очагов в клетке;
9. процент поврежденных клеток;
10. среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью;
11. процент ядер с очагами в кластерах с низкой интенсивностью;
12. количество перекрывающихся очагов в двух каналах.

Статистический анализ включал сравнение двух групп по числовым переменным с помощью непараметрического метода Манна-Уитни. Статистическая значимость различий групп для бинарных и категориальных показателей определялась с использованием метода Хи-квадрат Пирсона.

Уровень статистической значимости был зафиксирован на уровне 0,05. Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью пакетов прикладных программ Statistica 10 и SAS JMP 11.

**Результаты:** Анализ результатов автоматизированной системы AKLIDES показал, что среднее количество подсчитанных клеток в основной группе пациенток с РМЖ (113) и в контрольной группе (108) соответствовало минимальному количеству (100) клеток, необходимых для проведения исследования.

В таблицах 1-2 представлены результаты анализа очагов  $\gamma$ -H2AX в контрольной и основной группе (этап 1) по каналу разрывов (FITC) и каналу репарации (APC).

**Таблица 1 – Сравнение показателей в основной (РМЖ) и контрольной группах по каналу разрывов FITC (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение)**

Показатель	Группа		Значение, p
	РМЖ (n=29)	Контроль (n=24)	
Средний диаметр ядра	$7,34 \pm 0,68$	$7,00 \pm 0,52$	0,0382
Ядра с повышенной интенсивностью свечения	$35,95 \pm 10,84$	$39,13 \pm 10,25$	0,1921
Количество клеток с очагами	$55,66 \pm 37,00$	$58,25 \pm 31,50$	0,5918
Общее количество очагов	$167,17 \pm 219,72$	$141,67 \pm 119,92$	0,7342
Среднее значение интенсивности для всех очагов	$69,88 \pm 17,97$	$81,83 \pm 19,28$	0,0166
Количество обнаруженных кластеров	$0,24 \pm 0,79$	$0,12 \pm 0,45$	0,5477
Среднее количество очагов в клетке	$1,45 \pm 1,58$	$1,29 \pm 1,10$	0,9005
Среднее значение всех очагов в клетке	$1,46 \pm 1,59$	$1,30 \pm 1,10$	0,8863
Процент поврежденных клеток	$51,13 \pm 29,87$	$53,22 \pm 27,89$	0,8025
Среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью	$2,45 \pm 1,81$	$2,10 \pm 1,40$	0,5554
Процент ядер с очагами в кластерах с низкой интенсивностью	$72,46 \pm 27,92$	$74,27 \pm 23,13$	0,8442
Количество перекрывающихся очагов в двух каналах	$18,62 \pm 19,12$	$9,71 \pm 13,69$	0,0486

Выявлено, что в канале разрывов «FITC» три показателя статистически значимо различаются между двумя сравниваемыми группами. Статистическая разница обнаружена для показателя «Средний диаметр ядра», который в основной группе был выше показателя в контрольной группе ( $p=0,0382$ ), и показателя

«Среднее значение интенсивности для всех очагов»; данный показатель в основной группе был ниже, чем в контрольной группе ( $p=0,0166$ ). Показатель «Количество перекрывающихся очагов в двух каналах» в основной группе был выше, чем в контрольной группе ( $p=0,0486$ ) (рисунки 1-3).

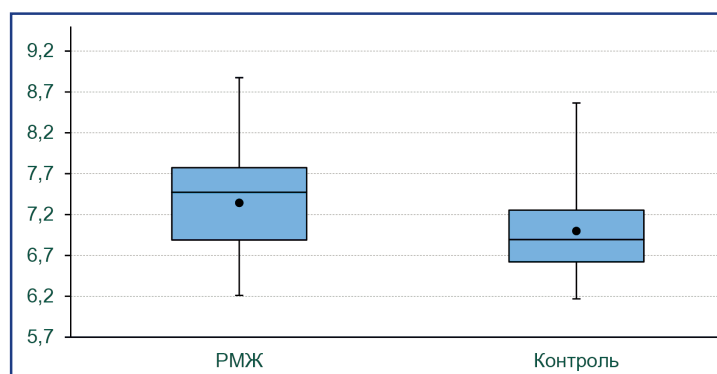


Рисунок 1 – Сравнение показателя «Средний диаметр ядра» в основной и контрольной группах

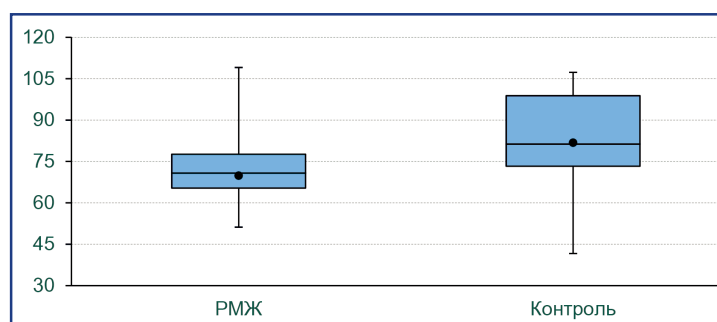


Рисунок 2 – Сравнение показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» в основной и контрольной группах

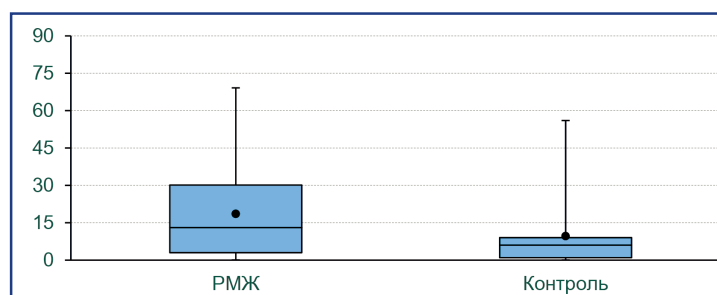


Рисунок 3 – Сравнение показателя «Количество перекрывающихся очагов в двух каналах» в основной и контрольной группах

**Таблица 2 – Сравнение показателей в основной (PMJ) и контрольной группах на канале репарации APC (среднее значение ± стандартное отклонение)**

Показатель	Группа		Значение, p
	PMJ (n=29)	Контроль (n=24)	
Ядра с повышенной интенсивностью свечения	455,23±286,58	738,93±512,67	0,0166
Количество клеток с очагами	76,79±25,57	76,04±20,51	0,7749
Общее количество очагов	288,10±251,77	217,88±141,48	0,5494
Средний диаметр очагов	0,56±0,05	0,54±0,03	0,0830
Среднее значение интенсивности для всех очагов	302,94±81,62	369,91±109,65	0,0118
Количество обнаруженных кластеров	49,34±80,94	46,50±100,59	0,9712
Среднее количество очагов в клетке	2,81±2,96	2,00±1,28	0,7750
Среднее значение всех очагов в клетке	8,05±13,26	6,68±11,43	0,9715
Процент поврежденных клеток	70,38±23,74	69,99±17,44	0,6551
Среднее значение всех очагов в кластере с низкой интенсивностью	3,17±2,83	2,28±1,18	0,2918
Процент ядер с очагами в кластерах с низкой интенсивностью	81,74±16,52	79,40±10,93	0,1333

При сравнении показателей в основной и контрольной группах на канале репарации «APC» выявлены два статистически значимых показателя. Так, достоверные различия обнаружены для показателя «Ядра с повышенной интенсивностью свечения», ко-

торый в основной группе был ниже показателя контрольной группы ( $p=0,0166$ ), и показатель «Среднее значение интенсивности для всех очагов» в основной группе был ниже, чем в контрольной группе ( $p=0,0118$ ) (рисунки 4-5).

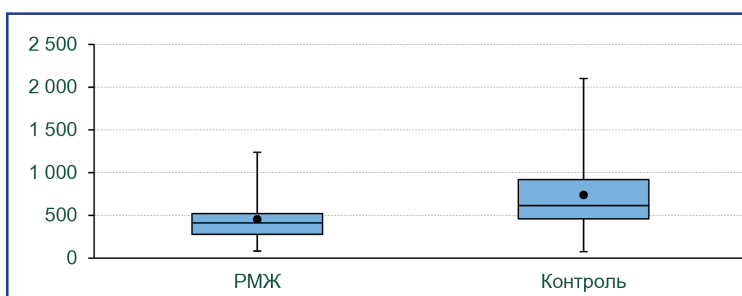


Рисунок 4 – Сравнение показателя «Ядра с повышенной интенсивностью свечения» в основной и контрольной группах

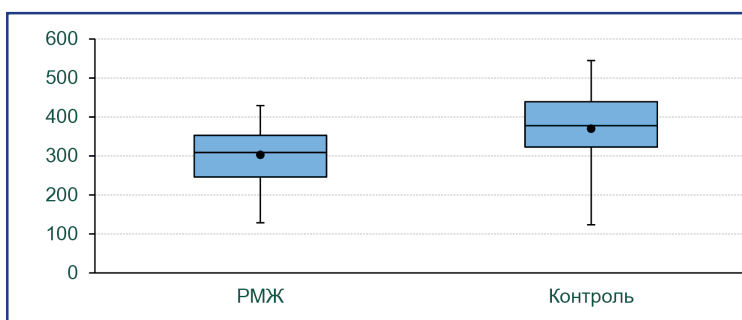


Рисунок 5 – Сравнение показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» в основной и контрольной группах

Далее мы решили определить значимые факторы, влияющие на развитие РМЖ. Нами получены результаты статистического однофакторного прогнозирования целевого показателя развития РМЖ «РМЖ(+)» для количественных и бинарных факторов.

В таблице 3 представлен ТОП-12 перечень рисков факторов показателя «РМЖ(+)».

Таблица 3 – ТОП-12 ключевых факторов влияния на риск развития РМЖ

Фактор	РМЖ(+): частота (риск, %)		Изменение риска, % (95% ДИ)	Относительный риск (95% ДИ)	Значение, р
	Фактор: Нет	Фактор: Есть			
Возраст, $\geq 48,0$ лет	5 (23,8%)	24 (75,0%)	51,2 (27,6; 74,8)	3,15 (1,43; 6,95)	0,0003
Среднее значение интенсивности для всех очагов (Этап 1) $< 341,6$	8 (32,0%)	21 (75,0%)	43,0 (18,7; 67,3)	2,34 (1,27; 4,31)	0,0017
Среднее значение интенсивности для всех очагов (Этап 1) $< 77,8$	7 (31,8%)	22 (71,0%)	39,1 (14,0; 64,3)	2,23 (1,16; 4,28)	0,0048
Ядра с повышенной интенсивностью свечения (Этап 1) $< 574,8$	6 (30,0%)	23 (69,7%)	39,7 (14,2; 65,2)	2,32 (1,15; 4,71)	0,0049
Средний диаметр очагов (Этап 1) $\geq 0,5$	21 (46,7%)	8 (100,0%)	53,3 (38,8; 67,9)	2,14 (1,57; 2,93)	0,0052
Средний диаметр ядра (Этап 1) $\geq 7,5$	15 (41,7%)	14 (82,4%)	40,7 (16,4; 64,9)	1,98 (1,27; 3,08)	0,0055
Процент поврежденных клеток (Этап 1) $\geq 89,3$	19 (45,2%)	10 (90,9%)	45,7 (23,0; 68,4)	2,01 (1,37; 2,94)	0,0068
Количество перекрывающихся очагов в двух каналах (Этап 1) $\geq 9,0$	11 (39,3%)	18 (72,0%)	32,7 (7,5; 58,0)	1,83 (1,09; 3,09)	0,0169
Средний диаметр очагов (Этап 1) $\geq 0,5$	9 (37,5%)	20 (69,0%)	31,5 (5,8; 57,1)	1,84 (1,04; 3,26)	0,0220
Ядра с повышенной интенсивностью свечения (Этап 1) $< 35,6$	12 (41,4%)	17 (70,8%)	29,5 (3,9; 55,0)	1,71 (1,03; 2,83)	0,0320
Процент ядер с очагами в кластерах с низкой интенсивностью (Этап 1) $\geq 87,3$	15 (44,1%)	14 (73,7%)	29,6 (3,7; 55,5)	1,67 (1,05; 2,66)	0,0381

На основании однофакторного прогнозирования можно сделать вывод, что 12 факторов имеют статистическую значимость влияния на риск развития «РМЖ(+)» с диапазоном уровней рисков от 69,0% до 100,0%. Лидирующими статистически значимыми факторами развития РМЖ с риском от 75,0% до 81,0% являются «Возраст,  $\geq 48,0$  лет», «Среднее значение интенсивности для всех очагов (Этап 1)  $< 341,6$ ». Замыкают список статистически значимых факторов «Процент ядер с очагами в кластерах с низкой интенсивностью (Этап 1)  $\geq 87,3$ », «Ядра с повышенной интенсивностью свечения (Этап 1)  $< 35,6$ » и «Средний диаметр очагов

(Этап 1)  $\geq 0,5$ », которые повышают уровень риска с 69,0% до 73,7%.

В таблице 4 и на рисунке 6 представлены результаты проведенного РОС анализа по каналам разрывов FITC и репарации APC целевого показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» для определения чувствительности и специфичности методики.

В ходе исследования умерли 2 из 29 пациенток основной группы. У одной пациентки причиной смерти явилось прогрессирование опухолевого процесса, вторая умерла от ковидной пневмонии. Одногодичная выживаемость составила 93%.

**Таблица 4 – Прогностические показатели для целевого показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» по каналу разрывов FITC и каналу репарации APC**

Показатель	Значение	
	по каналу разрывов FITC	по каналу репарации APC
Точка отсечения	341,6	77,83
Площадь под рабочей характеристикой приемника (AuROC)	0,70	0,69
Чувствительность	72,41%	75,86%
Специфичность	70,83%	62,50%
Эффективность	71,62%	69,18%

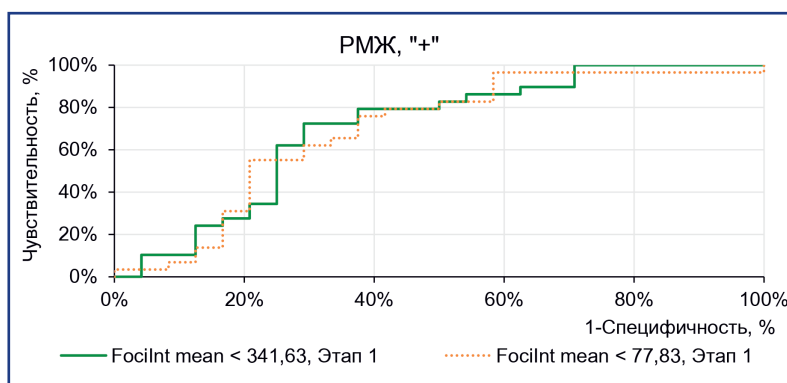


Рисунок 6 – Прогностические показатели для целевого показателя «Среднее значение интенсивности для всех очагов» по каналу разрывов FITC и репарации APC

В нашем исследовании при анализе очагов  $\gamma$ -H2AX у больных РМЖ в канале разрывов FITC показатели «Средний диаметр ядра», «Количество перекрывающихся очагов в двух каналах» оказались выше, чем у больных с доброкачественными образованиями, в то время как показатель «Среднее значение интенсивности для всех очагов» был ниже, чем в контрольной группе. В канале репарации APC показатели «Ядра с повышенной интенсивностью свечения», «Среднее значение интенсивности для всех очагов» у больных РМЖ оказались ниже, чем у больных с доброкачественными образованиями. Выявленные изменения показателей по каналу разрывов FITC и каналу репарации APC позволяют говорить о том, что основная и контрольная группа отличаются друг от друга, и это, возможно, может служить диагностическим маркером для выявления РМЖ.

**Обсуждение:** Повреждение ДНК и стабильность генома являются хорошо известными факторами, связанными с переходом нормальных тканей в предраковые и далее в злокачественные состояния.  $\gamma$ -H2AX, маркер геномной нестабильности, может функционировать как маркер образования и прогрессирования рака [19].

Наиболее распространенный метод анализа очагов двуцепочечных разрывов ДНК – визуальная оценка иммунофлуоресцентно-меченных очагов  $\gamma$ -H2AX – требует много времени. Кроме того, метод не стандартизирован и характеризуется высокой внутри- и межлабораторной вариабельностью оценок [18].

Нами был разработан дизайн пилотного исследования для проверки возможности обнаружения двуцепочечных разрывов, представленных фокусами  $\gamma$ -H2AX, в крови человека с помощью автоматизированной флуоресцентной микроскопии и автоматизированной системы AKLIDES у больных с РМЖ. Анализ очагов  $\gamma$ H2AX был проведен на мононуклеарных клет-

ках периферической крови (лимфоциты) у 29 больных с впервые верифицированным РМЖ и у 24 женщин контрольной группы с верифицированным доброкачественным заболеванием молочных желез.

В исследовании В. Wang с соавт. сообщалось о высокой положительной частоте  $\gamma$ -H2AX в опухолевых клетках по сравнению с нормальными тканями молочной железы у тех же больных с РМЖ. Значительная разница в опухолевых и соседних здоровых тканях демонстрирует, что  $\gamma$ -H2AX может помочь повысить эффективность ранней диагностики [20].

Однако эти исследования были проведены в тканях, а в большинстве случаев сбор образцов опухоли является сложной медицинской процедурой, особенно когда требуются повторные образцы. Поэтому врачам часто приходится обращаться к более безопасным и менее инвазивным процедурам, которые можно рутинно использовать в клинике для оценки реакции на терапию с возможностью получения воспроизводимых результатов. В связи с этим был использован более безопасный метод обнаружения очагов  $\gamma$ -H2AX в мононуклеарных клетках периферической крови у больных с РМЖ при помощи автоматизированной системы AKLIDES.

Полученные нами результаты анализа очагов  $\gamma$ H2AX показали статистически значимую разницу в основной и контрольной группах. Так, в канале разрывов «FITC» показатель «Средний диаметр ядра» был незначительно выше, чем в контрольной группе ( $p=0,0382$ ). Показатель «Количество перекрывающихся очагов в двух каналах» в основной группе оказался выше, чем в контрольной группе ( $p=0,0486$ ). Показатель «Среднее значение интенсивности для всех очагов» был ниже в группе РМЖ ( $p=0,0166$ ) (Таблица 1). В канале репарации «APC» показатель «Ядра с повышенной интенсивностью свечения» в основной группе был ниже, чем в контрольной группе ( $p=0,0166$ ).

Показатель «Среднее значение интенсивности для всех очагов» в канале разрывов и репарации были ниже в основной группе, чем в контрольной группе ( $p=0,0118$ ) (Таблица 2).

В изученной нами литературе не было найдено исследований количественной оценки по двуцепочечным разрывам ДНК у больных раковым заболеванием и доброкачественными новообразованиями.

В результате поиска нами было обнаружено, что проводились исследования потенциального генотоксического радиочастотного воздействия мобильно-го телефона на мононуклеарные клетки периферической крови человека *in vitro* на автоматизированной системе AKLIDES [21].

Также были проведены исследования анализа очагов  $\gamma$ -H2AX на автоматизированной системе AKLIDES у спортсменов во время покоя после физической нагрузки. Показателями являлись анализ диаметра очагов  $\gamma$ -H2AX и количество очагов  $\gamma$ -H2AX на пораженной клетке [22].

Имеется опыт применения автоматизированной системы AKLIDES в Казахстане для диагностики системных аутоиммунных заболеваний, где изучались антинуклеарные антитела, цитоплазматические антинейтрофильные антитела, перинуклеарные антинейтрофильные антитела у пациентов с ревматоидными заболеваниями [23].

Поскольку наше исследование является пилотным проектом, мы понимаем, что оно имеет некоторые ограничения и лимиты. Ограничениями нашего пилотного исследования явились:

- 1) отсутствие стандартной методики проведения исследования;
- 2) не проводились исследования отдаленных результатов;
- 3) использование малой выборки;
- 4) отсутствие стандартных референсных показателей, позволяющих интерпретировать результаты и делать заключения.

ДЦР ДНК являются персонализированным ответом организма на определенные факторы риска, поэтому могут варьироваться индивидуально, и это может создавать препятствия для валидации данного маркера при использовании у населения. Как и любой другой биомаркер,  $\gamma$ H2AX имеет биологическую изменчивость, которая может быть предсказуемой и циклической [24].

Отсутствие экспериментальной стандартизации анализа  $\gamma$ H2AX приводит к широкой неоднородности полученных результатов и проблемам в их интерпретации, что затрудняет его использование в качестве рутинного биомаркера в популяционных исследованиях. Необходимы дальнейшие исследования для стандартизации результатов, строгая организация исследования и индивидуальное обучение персонала [25].

По утверждению Z. Zhang [26], «лабораторная медицина направлена на предоставление тестов для принятия клинических решений». Результаты применения прогностического биомаркера в данном пилотном исследовании послужат основой для проведения более крупного исследования по изучению очагов  $\gamma$ H2AX у пациенток с РМЖ в целях разработки мето-

дов выявления новообразований в режиме реального времени.

**Заключение:** Выявлено повышение показателей «Средний диаметр ядра» ( $p=0,0382$ ), «Количество перекрывающихся очагов в двух каналах» ( $p=0,0486$ ) в группе РМЖ в канале разрывов «FITC». В канале репарации «АРС» показатели «Ядра с повышенной интенсивностью свечения» ( $p=0,0166$ ), «Среднее значение интенсивности для всех очагов» ( $p=0,0118$ ) в группе РМЖ оказались ниже, чем в контрольной группе.

Обнаруженные изменения показателей двуцепочечных разрывов ДНК по каналам разрывов «FITC» и репарации «АРС» между основной и контрольной группами, возможно, могут служить биомаркером для выявления РМЖ.

#### Список использованных источников

1. Shah R., Rosso K., Nathanson S.D. Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer // *World J. Clin. Oncol.* – 2014. – Vol. 5(3). – P. 283-298. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.283>
2. Varvara P.V., Karaolanis G., Valavanis C., Stanc G., Tzaida O., Trihia H., Patapis P., Dimitroulis D., Perrea D. gamma-H2AX: A potential biomarker in breast cancer // *Tumor Biology.* – 2019. – Vol. 41(9). <https://doi.org/10.1177/1010428319878536>
3. Vitor A.C., Huertas P., Legube G., de Almeida S.F. Studying DNA Double-Strand Break Repair: An Ever-Growing Toolbox // *Front. Mol. Biosci.* – 2020. – Vol. 21(7). – Art. no. 24. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00024>
4. Palla V.V., Karaolanis G., Katafigiotis I., Anastasiou I., Patapis P., Dimitroulis D., Perrea D. gamma-H2AX: Can it be established as a classical cancer prognostic factor? // *Tumor Biol.* – 2017. – Vol. 39(3). <https://doi.org/10.1177/1010428317695931>
5. Ma A., Dai X. The relationship between DNA single-stranded damage response and double-stranded damage response // *Cell Cycle.* – 2018. – Vol. 17(1). – P. 73-79. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1403681>
6. Sekiguchi M., Matsushita N. DNA Damage Response Regulation by Histone Ubiquitination // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23(15). – Art. no. 8187. <https://doi.org/10.3390/ijms23158187>
7. Aquila L., Atanassov B.S. Regulation of Histone Ubiquitination in Response to DNA Double Strand Breaks // *Cells.* – 2020. – Vol. 9(7). – Art. no. 1699. <https://doi.org/10.3390/cells9071699>
8. Hopp N., Hagen J., Aggeler B., Kalyuzhny A.E. Express  $\gamma$ -H2AX Immunocytochemical Detection of DNA Damage // *Methods Mol. Biol.* – 2017. – Vol. 1644. – P. 123-128. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7187-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7187-9_10)
9. Shah K., Boghozian R.A., Kartsonaki C., Shah K.A., Vallis K.A.  $\gamma$ H2AX expression in cytological specimens as a biomarker of response to radiotherapy in solid malignancies // *Diagn. Cytopathol.* – 2016. – Vol. 44(2). – P. 141-146. <https://doi.org/10.1002/dc.23396>
10. Solarczyk K., Kordon-Kiszala M. Let's not take DNA breaks for granted. The importance of direct detection of DNA breaks for the successful development of DDR inhibitors // *Front. Cell. Dev. Biol.* – 2023. – Vol. 9(11). – P. 1118716. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1118716>
11. Van Oorschot B., Hovingh S., Dekker A., Stalpers L.J., Franken N.A. Predicting Radiosensitivity with Gamma-H2AX Foci Assay after Single High-Dose-Rate and Pulsed Dose-Rate Ionizing Irradiation // *Radiat. Res.* – 2016. – Vol. 185(2). – P. 190-198. <https://doi.org/10.1667/RR14098.1>
12. Zhao H., Qu M., Li Y., Wen K., Xu H., Song M., Xie D., Ao X., Gong Y., Sui L., Guan H., Zhou P., Xie J. An estimate assay for low-level exposure to ionizing radiation based on mass spectrometry quantification of  $\gamma$ -H2AX in human peripheral blood lymphocytes // *Front. Public Health.* – 2022. – Vol. 28(10). – P. 1031743. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1031743>
13. Bizzaro N., Antico A., Platzgummer S., Tonutti E., Bassetti D., Pesente F., Tozzoli R., Tampoia M., Villalta D. Automated antinuclear immunofluorescence antibody screening: a comparative study of six computer-aided diagnostic systems // *Autoimmun. Rev.* – 2014. – Vol. 13. – P. 292-298. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.10.015>
14. Köcher S., Volquardsen J., Perugachi Heinsohn A., Petersen C., Roggenbuck D., Rothkamm K., Mansour W.Y. Fully automated counting of DNA damage foci in tumor cell culture: A matter of cell separation // *DNA Repair (Amst).* – 2021. – Vol. 102. – Art. no. 103100. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103100>

15. Kudabayeva K., Kosmuratova R., Bazargaliyev Y., Sartayeva A., Kereyeva N. Effects of metformin on lymphocyte DNA damage in obese individuals among Kazakh population // *Diabetes Metab. Syndr.* – 2022. – Vol. 16(8). – Art. no. 102569. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2022.102569>
16. Hohmann T., Kessler J., Grabiec U., Bache M., Vordermark D., Dehghani F. Automatic detection of DNA double strand breaks after irradiation using an  $\gamma$ H2AX assay // *Histol. Histopathol.* – 2018. – Vol. 33(5). – P. 475-485. <https://doi.org/10.14670/HH-11-945>
17. Cinquanta L., Bizzaro N., Pesce G. Standardization and Quality Assessment Under the Perspective of Automated Computer-Assisted Hep-2 Immunofluorescence Assay Systems // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 638863. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.638863>
18. Memmel S., Sisario D., Zimmermann H., Sauer M., Sukhorukov V.L., Djuzenova C.S., Flentje M. FocAn: automated 3D analysis of DNA repair foci in image stacks acquired by confocal fluorescence microscopy // *BMC Bioinformatics.* – 2020. – Vol. 21(1). – P. 27. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-3370-8>
19. Oberdoerfer P., Miller K.M. Histone H2A variants: Diversifying chromatin to ensure genome integrity // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2023. – Vol. 15(135). – P. 59-72. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.03.011>
20. Wang B., Zhang Z., Xia S., Jiang M., Wang Y. Expression of  $\gamma$ -H2AX and patient prognosis in breast cancer cohort // *J. Cell Biochem.* – 2019. – Vol. 120. – P. 12958-12965. <https://doi.org/10.1002/jcb.28567>
21. Danese E., Lippi G., Buonocore R., Benati M., Bovo C., Bonaguri C., Salvagno G.L., Brocco G., Roggenbuck D., Montagnana M. Mobile phone radiofrequency exposure has no effect on DNA double strand breaks (DSB) in human lymphocytes // *Ann. Transl. Med.* – 2017. – Vol. 5(13). – P. 272. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.04.35>
22. Kozioł K., Zebrowski J., Betlej G., Bator E., Czarny W., Bajorek W., Czarnota B., Czaja R., Król P., Kwiatkowska A. Reliability of a Fully Automated Interpretation of  $\gamma$ -H2AX Foci in Lymphocytes of Moderately Trained Subjects under Resting Conditions // *J. Nutr. Metab.* – 2014. – Vol. 2014. – Art. no. 478324. <https://doi.org/10.1155/2014/478324>
23. Нурахова А.Д., Маймакова А.М., Абдилова Г.Б. Опыт применения аппарата «Аклидес» в Казахстане для диагностики системных аутоиммунных заболеваний // *Вестник хирургии Казахстана.* – 2019. – №3. – С. 10-17 [Nurakhova A.D., Majmakova A.M., Abdilova G.B. Opyt primeneniya apparata «Aklides» v Kazaxstane dlya diagnostiki sistemnykh autoimmunnykh zaboolevaniy // *Vestnik xirurgii Kazaxstana.* – 2019. – №3. – S. 10-17 (in Russ.).] <https://vhk.kz/wp-content/uploads/2021/04/vestnik3201920.pdf>
24. Fraser C.G. Biological variation: a rapidly evolving aspect of laboratory medicine // *J. Lab. Precis. Med.* – 2017. – Vol. 2. – P. 35. <https://doi.org/10.21037/jlpm.2017.06.09>
25. Wiwanitkit V. Errors in medical laboratory but still forgotten // *J. Lab. Precis. Med.* – 2017. – Vol. 2. – P. 65. <https://doi.org/10.21037/jlpm.2017.08.01>
26. Zhang Z. The role of big-data in clinical studies in laboratory medicine // *J. Lab. Precis. Med.* – 2017. – Vol. 2. – P. 34. <https://doi.org/10.21037/jlpm.2017.06.07>

## АНДАТПА

## СҮТ БЕЗІНІҢ ҚАТЕРСІЗ ЖӘНЕ ҚАТЕРЛІ ІСІК АУРУЛАРЫНДА ДНҚ ҚОС ТІЗБЕКТИ ҮЗІЛІСТЕРІН САНДЫҚ АНЫҚТАУ

Г.А. Смагулова<sup>1</sup>, М.А. Айтмагамбетова<sup>1</sup>, Г.В. Векляко<sup>1</sup>, Н.М. Кереева<sup>1</sup>, А.Н. Жексенова<sup>1</sup>,  
А. Аманжолқызы<sup>1</sup>, А.Б. Туляева<sup>1</sup>, Г.Б. Бакытжанов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>«Марат Оспанов атындағы Батыс Қазақстан медицина университеті» КеАҚ, Ақтөбе, Қазақстан Республикасы

**Өзектілігі:** ДНҚ зақымдануының ең қауіпті түрі – ДНҚ қос тізбекті үзілуі. Фосфорланған гистон ақуызының H2AX ( $\gamma$ H2AX) ошақтарын талдау қазіргі уақытта ДНҚ қос тізбекті үзілістерін анықтаудың ең сезімтал әдісі болып табылады. Бұл ақуыз модификациясы жасушалық стресстің жеке биомаркеріне айналуы мүмкін, әсіресе ісік ауруларының диагностикасы мен мониторингінде. Бұл зерттеуде біз  $\gamma$ H2AX ошақтарының иммунофлуоресцентті кескіндерін автоматты түрде талдау және нәтижелерді көрнекі ұпайлармен салыстыру үшін AKLIDES® платформасында жаңа үлгіні таңу алгоритмдерін қолдандық. Сүт безінің қатерлі ісігі бар науқастар мен сүт безінің қатерсіз ісігі бар әйелдердің шеткергі қан мононуклеарлы жасушаларында  $\gamma$ H2AX ошақтарының түзілуі зерттелді.

**Зерттеудің мақсаты:** мүмкін болатын биомаркерді анықтау үшін сүт безі қатерлі ісігі және сүт безінің қатерсіз ауруы бар әйелдердегі шеткергі қан лимфоциттеріндегі ДНҚ қос тізбекті үзілістерін сандық түрде анықтау.

**Әдістері:** Сүт безінің қатерлі ісігі (n=29) және сүт безінің қатерсіз ісіктері (n=24) бар науқастарда автоматтандырылған AKLIDES жүйесін қолдану арқылы лимфоциттерде  $\gamma$ -H2AX ошақтарын талдау.

**Нәтижелер:** «FITC» үзілу арнасындағы негізгі және бақылау топтарының көрсеткіштерін салыстыру кезінде «Орташа өзек диаметрі» (p=0,0382), «Барлық ошақтар үшін орташа қарқындылық мәні» (p=0,0166), «Екі арнадағы қабаттасатын ошақтардың саны» (p=0,0486) көрсеткіштерінде статистикалық маңызды айырмашылық анықталды. «APC» жондеу арнасында «Люминесценция қарқындылығы жоғары ядролар» (p=0,0166) және «Барлық ошақтар үшін орташа қарқындылық мәні» (p=0,0118) көрсеткіштерде айтарлықтай айырмашылықтар анықталды.

**Қорытынды:** Негізгі және бақылау топтары арасындағы FITC үзіліс және «APC» жондеу арналары бойынша ДНҚ қос тізбекті үзілу жылдамдығының анықталған өзгерістері сүт безі обырын анықтау үшін диагностикалық маркер ретінде қызмет етуі мүмкін.

**Түйінді сөздер:** ДНҚ қос тізбекті үзілуі, H2AX гистон протейні, сүт безі қатерлі ісігі.

## ABSTRACT

## QUANTIFICATION OF DNA DOUBLE-STRAND BREAKS IN BENIGN AND MALIGNANT BREAST DISEASES

G.A. Smagulova<sup>1</sup>, M.A. Aitmagambetova<sup>1</sup>, G.V. Veklenko<sup>1</sup>, N.M. Kereeva<sup>1</sup>, A.N. Zheksenova<sup>1</sup>,  
A. Amanzholkzy<sup>1</sup>, A.B. Tulyaeva<sup>1</sup>, G.B. Bakytzhanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>«West Kazakhstan Marat Ospanov Medical University» NSJSC, Aktobe, the Republic of Kazakhstan

**Relevance:** Double-strand DNA breaks are the most dangerous DNA damage. Analysis of foci of phosphorylated histone protein H2AX ( $\gamma$ H2AX) is currently the most sensitive method for detecting DNA double-strand breaks. This protein modification can become a biomarker of cellular stress, especially in diagnosing and monitoring neoplastic diseases. In this study, we utilized novel pattern recognition algorithms on the AKLIDES® platform to automatically analyze immunofluorescent images of  $\gamma$ H2AX foci and compare the results with visual scores. The  $\gamma$ H2AX foci formation on peripheral blood mononuclear cells of women with breast cancer or benign breast tumors was studied.

*The article aimed to quantify DNA double-strand breaks in peripheral blood lymphocytes in women with breast cancer and benign breast masses to identify a possible biomarker.*

**Methods:**  $\gamma$ -H2AX foci in lymphocytes were analyzed using the automated AKLIDES system in patients with breast cancer ( $n=29$ ) and benign breast tumors ( $n=24$ ).

**Results:** When comparing the indicators of the main and control groups in the channel of ruptures "FITC," a statistically significant difference was found in the indicators "Foci dia" ( $p=0.0382$ ), "FocInt mean" ( $p=0.0166$ ), "Colocalisation" ( $p=0.0486$ ). In the repair channel "APC," significant differences were found in the indicators "Nuclei BGInt" ( $p=0.0166$ ) and the indicator "FocInt mean" ( $p=0.0118$ ).

**Conclusion:** The revealed changes of DNA double-strand breaks along the FITC break channels and APC repair between the main and control groups can possibly serve as a breast cancer diagnostic marker.

**Keywords:** DNA double-strand breaks, H2AX histone protein, breast cancer.

---

**Прозрачность исследования:** Авторы несут полную ответственность за содержание данной статьи.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование:** Исследование выполнено в рамках внутривузовского НТП ЗКМУ имени Марата Оспанова «Роль микроэлементного статуса, повреждений ДНК в развитии онкопатологии (на примере Актыубинской области)», руководитель Батырова Г.А. (2020 г.).

**Вклад авторов:** вклад в концепцию – Смагулова Г.А., Айтмагамбетова М.А., Векленко Г.В., Кереева Н.М.; научный дизайн – Смагулова Г.А., Айтмагамбетова М.А., Векленко Г.В., Кереева Н.М.; исполнение заявленного научного исследования – Смагулова Г.А., Айтмагамбетова М.А.; интерпретация заявленного научного исследования – Смагулова Г.А., Айтмагамбетова М.А., Векленко Г.В., Кереева Н.М., Жексенова А.Н., Аманжолкызы А., Туляева А.Б., Бакытжанов Г.; создание научной статьи – Смагулова Г.А., Айтмагамбетова М.А., Векленко Г.В., Кереева Н.М., Жексенова А.Н., Аманжолкызы А., Туляева А.Б., Бакытжанов Г.

**Сведения об авторах:**

**Смагулова Газиза Ажмагиевна** – рук. каф. клинической фармакологии ЗКМУ им. Марата Оспанова, Актобе, Республика Казахстан, тел: +77023096306, e-mail: smagaziza@gmail.com, ORCID ID: 0000-0001-7222-620X;

**Айтмагамбетова Маржан Алтынбековна (корреспондирующий автор)** – асс. каф. онкологии ЗКМУ им. Марата Оспанова, Актобе, Республика Казахстан, тел: +77026780057, e-mail: inzhumarzhan90@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-0346-5829;

**Векленко Галина Викторовна** – рук. каф. пропедевтики внутренних болезней ЗКМУ им. Марата Оспанова, Актобе, Республика Казахстан, тел: +77776784158, e-mail: veklenko@zkgmu.kz, ORCID ID: 0000-0002-7764-7713;

**Кереева Нургуль Мейримовна** – доцент каф. онкологии ЗКМУ им. Марата Оспанова, Актобе, Республика Казахстан, тел: +77014536721, e-mail: Nrgl230777@gmail.com, ORCID ID: 0000-0001-6205-4029;

**Жексенова Ажар Николаевна** – рук. каф. патофизиологии ЗКМУ им. Марата Оспанова, Актобе, Республика Казахстан, тел: +77013183729, e-mail: azhar.nikolaevna@mail.ru, ORCID ID: 0000-0003-3697-2445;

**Аманжолкызы Айну́р** – доцент каф. нормальной физиологии ЗКМУ им. Марата Оспанова, Актобе, Республика Казахстан, тел: +77052882799, e-mail: a.ainur.82@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-1980-9032;

**Туляева Анар Балкашевна** – асс. каф. онкологии ЗКМУ им. Марата Оспанова, Актобе, Республика Казахстан, тел: +77016599861, e-mail: dekart\_85@mail.ru, ORCID ID: 0000-0001-7149-0121;

**Бакытжанов Габит Бакытжанович** – врач-онколог, ЗКМУ им. Марата Оспанова, Актобе, Республика Казахстан, тел: +77023317711, e-mail: gabit040489@mail.ru, ORCID ID: 0009-0001-7967-693X.

**Адрес для корреспонденции:** Айтмагамбетова М.А., Западно-Казахстанский медицинский университет имени Марата Оспанова, ул. Маресьева 68, г. Актобе 030019, Республика Казахстан.