

ДВУЦЕПОЧЕЧНЫЕ РАЗРЫВЫ И РЕПАРАЦИИ ДНК ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ

М.Г. БУЛЕГЕНОВА¹, А. ДУНАЕВА¹, С.С. САЛИЕВА¹, А.А. УСКЕНБАЕВА¹

¹АО «Научный центр педиатрии и детской хирургии», Алматы, Республика Казахстан

АННОТАЦИЯ

Актуальность: Ошибки в системе репарации повреждений, таких как двуцепочечные разрывы ДНК, могут привести к возникновению мутаций, которые передадутся последующим поколениям клеток. Некоторые из таких мутаций могут обладать онкогенным потенциалом.

Цель исследования – анализ количества двуцепочечных разрывов и репараций ДНК лимфоцитов периферической крови в группе условно здоровых детей и у пациентов с диагнозом «острый лейкоз» (ОЛ) для оценки степени повреждения ДНК.

Методы: Лимфоциты периферической крови были взяты у: а) 38 условно здоровых детей (контрольная группа); б) 100 пациентов с диагнозом ОЛ; в) 14 детей с рецидивом заболевания были исследованы методом непрямого иммунофлуоресцентного анализа (НИФ) и исследованы с помощью системы Aklides (MEDIPAN, Германия), состоящей из флуоресцентного анализатора и программного обеспечения AKLIDES Nuk.

Результаты: У пациентов с Т-лимфобластным лейкозом как на момент поступления, так и на конец 7-го дня госпитализации количество репарационных очагов 53BP1 в среднем в 3 раза превышало количество повреждений ДНК. Среди пациентов с В-линейными лейкозами в большинстве случаев отношения показателей разрывов/репараций в ходе лечения не изменились. Двуцепочечные разрывы ДНК преобладали над репарациями, как при впервые установленном заболевании, так и на 7-й, 15-й день, 3-й месяц лечения.

Заключение: Уровень повреждений ДНК лимфоцитов у пациентов с В-ОЛЛ оказался выше ожидаемого. Кроме того, на всех этапах терапии больных В-ОЛЛ отношение двуцепочечных разрывов к репарациям сохранилось. Предполагаемые нами изменения у данных пациентов могут наблюдаться на этапе поддерживающей терапии и/или после ее окончания. Мониторинг двуцепочечных разрывов/репараций являлся первоначальным этапом для разработки метода прогнозирования исхода заболевания и определения эффективности терапии. Полученные результаты вызывают непосредственный интерес, и требуют дальнейших исследований.

Ключевые слова: двуцепочечные разрывы, репарация ДНК, острый лейкоз (ОЛ), лимфоциты, иммунофлуоресценция.

Введение: Среди основных типов повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) наиболее серьезной формой являются двуцепочечные разрывы (double-stranded breaks, DSB). Двуцепочечные разрывы (ДР) образуются либо в результате прямого разрыва двух комплементарных участков – так называемые «прямые» ДР, либо формируются из других повреждений, из однонитевых разрывов, как результат нарушений репарации в процессе работы репарационных ферментов.

Ответом организма на возникновение повреждения ДНК служит репарация. Восстановление двуцепочечных разрывов может быть осуществлена двумя механизмами:

а) негомологичным воссоединением концов ДНК, при котором поврежденные концы цепей соединяются напрямую;

б) гомологичной рекомбинацией, при наличии идентично неповрежденного по нуклеотидной последовательности фрагмента ДНК [1].

Однако репарация ДНК может быть не полностью эффективной, а кроме того, в некоторых случаях репарация повреждений ДНК приводит к ошибкам и, как следствие, к возникновению мутаций.

Ключевую роль в обеспечении стабильности генетического аппарата играет транскрипционный фактор p53, известный также как «страж генома» [2]. Белок p53 маркирует места двухнитевых разрывов и активирует транскрипцию генов, ответственных за механизмы репараций. В свою очередь, для начала восстановле-

ния ДНК белок p53 связывается с фосфорилированной формой гистона H2AX (обозначаемый – γ H2AX). Каждый двуцепочечный разрыв представлен отдельным очагом γ H2AX. Наличие нормальных физиологических механизмов восстановления приводит к успешной репарации и к уменьшению очагов γ H2AX [3, 4].

Накопление двунитевых разрывов, как и других типов повреждений ДНК в большом количестве инициируют программу апоптоза. Однако запрограммированная клеточная гибель является исключительным случаем поддержания гомеостаза (баланса между вновь образующимися и отмирающими клетками), поскольку запуск апоптоза возможен, только если повреждения ДНК в ядре являются необратимыми и системой репарацией они не могут быть исправлены [5].

Таким образом, основной путь репаративной системы ДНК можно предоставить как: повреждение ДНК \rightarrow экспрессия p53 \rightarrow репарация ДНК/апоптоз (при состоянии, угрожающем жизнедеятельности клетки) [6]. Количественное определение разрывов и репараций ДНК осуществляется различными методами: проточная цитометрия, конфокальная микроскопия, непрямо́й иммунофлуоресцентный анализ (НИФ). В представленной работе использовался метод непрямо́й иммунофлуоресценции. В основе НИФ лежит детекция: а) белка H2AX, который образуется при появлении двуцепочечных разрывов ДНК в фосфорилированной форме; б) p53-связывающего белка 1, также известного, как 53BP1, участвующего в передаче сигнала для восстановления двуцепочечного разрыва ДНК.

Цель исследования – сравнительный анализ количества двуцепочечных разрывов и репараций ДНК лимфоцитов периферической крови в группе условно здоровых детей и у пациентов с диагнозом «острый лейкоз» (ОЛ) для разработки метода прогнозирования исхода заболевания и определения эффективности терапии.

Материалы и методы: Материалом для исследования служили лимфоциты периферической крови. Исследовали следующие группы детей:

1 группа (n=38, медиана возраста 9,7 лет) – контрольная (условно здоровые дети);

2 группа (n=100, медиана возраста 8 лет) – пациенты с ОЛ: острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) = 82, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) = 17, ОЛ смешанной линейности = 1.

3 группа – (n=14, медиана возраста 9,7 лет) – дети с рецидивом ОЛ.

Критерии включения: дети в возрасте от 0 до 18 лет с первичным ОЛ и рецидивом ОЛ, проходившие диагностику и лечение в Научном центре педиатрии и детской хирургии (Алматы, Казахстан).

Критерии исключения: лица старше 18 лет; дети с выраженной цитопенией.

Период сбора данных – январь 2022 по март 2023 гг. Длительность стационарного пребывания пациентов с диагнозом ОЛЛ составила 8 месяцев, для больных ОМЛ 4-5 месяцев.

Исследование двуцепочечных разрывов/репараций ДНК проводилось с помощью системы Aklides (MEDIPAN,

Германия), состоящей из флуоресцентного анализатора и программного обеспечения AKLIDES Nuk. Методика количественного определения двуцепочечных разрывов и репараций ДНК лимфоцитов у больных с острым лейкозом впервые выполнена в Казахстане. В работе использовались коммерческие наборы AKLIDES Nuk Human Lymphocyte Complete Combi. Метод основан на связывании специфических антител к белковому компоненту γ H2AX. Второй этап анализа заключался в связывании специфических антител для 53BP1 к первоначально образовавшемуся комплексу. Очаг разрыва и репарации отображался сигналом флуоресценции. Зеленое свечение в канале FITC наблюдалось на очаге разрыва, красное свечение в канале APC на очаге репарации (рисунок 1а). Канал DAPI на основе автофокусировки и контрастного окрашивания использовался для обнаружения ядер клеток (рисунок 1б). Система Aklides отбирала клетки одинаковой морфологии и типичной округлой формы. Расчет двухнитевых разрывов /репараций проводился на 100 лимфоцитов. Конечный результат отображался в виде отчетов (Single Report). Как указывалось выше, цифровая система Aklides полностью стандартизирована и поддерживает анализ объектов только определенных форм и размеров. Однако опухолевые клетки морфологически отличаются от нормальных. В связи с этим для последующих исследований лейкоэмических клеток целесообразно внести изменения в параметры выборки.

Статистический анализ проведен с использованием пакета программ SPSS Statistics, версия 23.0 для Windows.

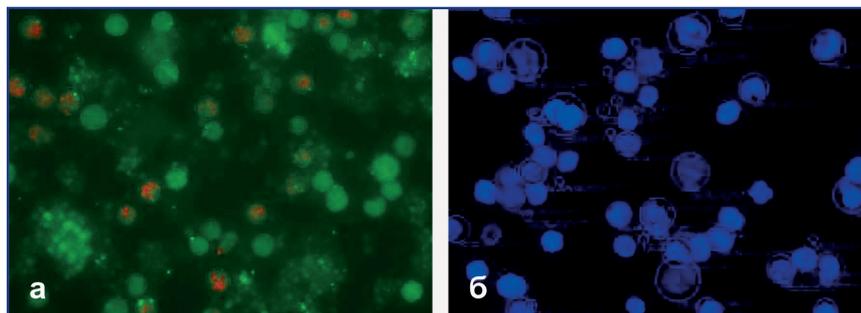


Рисунок 1 – Пример непрямого иммунофлуоресцентного анализа количественного определения фосфорилированного γ H2AX и белка 53BP1 в лимфоцитах:

- а) просмотр изображения в одновременных режимах FITC и APC;
б) автоматическая фокусировка на клетках в канале DAPI

Результаты: В таблице 1 представлены результаты количественного определения двуцепочечных разрывов и репараций ДНК у контрольной группы. Возраст детей контрольной группы соответствовал возрасту исследуемых пациентов.

На основании данных таблицы 1, в группе детей в возрасте от 0 до 5 лет число клеток с разрывами преобладало над числом клеток с репарациями, в то время

как общее количество репараций было выявлено больше. В возрастной группе от 5-10 лет общее количество разрывов и репараций было приблизительно равным. Для третьей группы детей старше 10 лет двуцепочечных разрывов обнаружено больше, чем репараций. Увеличение количества повреждений ДНК с возрастом может быть обусловлено влиянием внешних факторов среды и различными биохимическими процессами организма.

Таблица 1 – Показатели соотношений разрывов/репараций ДНК лимфоцитов (Лф) у пациентов контрольной группы (среднее арифметическое значение $M \pm m$)

Возраст, лет	Клетки с разрывами и репарациями Лф (FITC/APC)	Общее кол-во разрывов и репараций Лф (FITC/APC)	Кол-во разрывов и репараций на 1 клетку
От 0-5 лет	43±5/38±4*	122±6/131±8*	1/1
От 5-10 лет	51±4/35±6 (p≤0,05)	109±10/104±9*	1/1
Старше 10 лет	48±5/34±6*	114±11/96±8*	1/1

Примечание: * - результат недостоверен

В диаграмме 1 представлено распределение количества пациентов в зависимости от иммунологического варианта ОЛ.

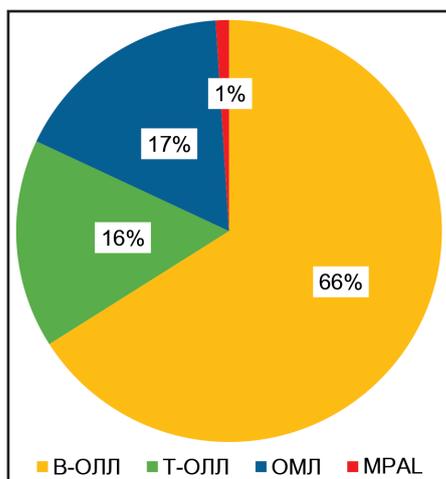


Диаграмма 1 – Количество пациентов по вариантам ОЛ

Распределение вариантов ОЛ выглядит следующим образом: «острый В-лимфобластный лейкоз» (В-ОЛЛ) был установлен 66 пациентам, что составляет 66% от всего числа больных. Среди пациентов с В-ОЛЛ, про-В1 вариант выявлен у 9 детей (14%), В2-38 (58%), В3-16 (24%), В4-3 (4%). Диагноз «острый миелоидный лейкоз» установлен 17 пациентам (17%), среди которых с ОМЛ М1-М2 – 11 (65%), М3 – 3 (18%), М4-М5 – 1 (6%) и М7 – 2 (11%). С острым Т-лимфобластным лейкозом (Т-ОЛЛ) поступило 16 человек (16%), с Т3-кортикальным иммунологическим вариантом 10 детей (62%) и Т-некортикальным 6 (38%). Был выявлен один случай ОЛ смешанной линейности (В+миело), классифицируемый как острый лейкоз смешанного фенотипа (Mixed-phenotype acute leukemia, MPAL).

Распределение пациентов по возрасту и линейной принадлежности первичного ОЛ представлено в таблице 2.

По данным таблицы 2, В-ОЛЛ чаще выявлялся у детей в возрасте от 5-10 лет 45% (N=30). Среди детей старше 10 лет ОМЛ диагностирован у 42% (N=7).

Таблица 2 – Распределение пациентов с ОЛ по возрасту и иммунологическому варианту заболевания

Вариант ОЛ	Количество пациентов, абс., (%)		
	0-5 лет	5-10 лет	Старше 10 лет
Острый лимфобластный лейкоз	19 (29%)	30 (45%)	17 (26%)
Т-острый лимфобластный лейкоз	4 (25%)	7 (44%)	5 (31%)
Острый миелоидный лейкоз	5 (29%)	5 (29%)	7 (42%)
Острый лейкоз смешанного фенотипа	1 (100%)	-	-

По данным таблицы 2, В-ОЛЛ чаще выявлялся у детей в возрасте от 5-10 лет 45% (N=30). Среди детей старше 10 лет ОМЛ диагностирован у 42% (N=7).

Количество разрывов и репараций ДНК лимфоцитов периферической крови среди пациентов с впервые диагностированным ОЛ представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Показатели двуцепочечных разрывов/репараций у пациентов с первичным ОЛ (среднее арифметическое значение $M \pm m$)

Вариант ОЛ	Кол-во клеток с разрывами и репарациями (FITC/APC)	Общее кол-во разрывов и репараций лимфоцитов (FITC/APC)	Кол-во разрывов и репараций на 1 клетку
ОЛЛ В2	41±3/31±4 (p≤0,05)	95±8/109±7*	1/1
ОЛЛ В1	73±5/38±3 (p≤0,01)	186±9/209±8 (p≤0,05)	2/2
ОЛЛ В3	29±4/22±5*	52±5/38±4* (p≤0,05)	1/1
ОЛЛ В4	20±3/17±3*	59±4/14±3 (p≤0,01)	1/1
ОЛЛ Т3-кортикальный	24±4/41±5 (p≤0,05)	53±5/143±9 (p≤0,01)	1/1
ОЛЛ Т-некортикальный	25±2/44±4 (p≤0,01)	55±7/194±11 (p≤0,01)	1/2
ОМЛ М1-М2	34±5/24±4*	62±5/60±7*	1/1
ОМЛ М3	60±5/52±4*	153±6/117±8 (p≤0,01)	1/1
ОМЛ М4-М5	67±6/2±1 (p≤0,001)	165±10/2±1 (p≤0,001)	2/1
ОМЛ М7	34±5/38±3*	76±4/91±6 (p≤0,05)	1/1
MPAL (В+миело)	84±7/12±3 (p≤0,01)	239±11/42±7 (p≤0,001)	2/1

Примечание: * - результат недостоверен

Согласно данным таблицы 3, у пациента с бифенотипическим острым лейкозом репарация была снижена в 5.7 раза. Прогноз при бифенотипическом лейкозе хуже, чем при остром лимфобластном лейкозе или при остром миелоидном лейкозе. Однако больной полихимиотерапию перенес относительно не плохо, на фоне проводимой терапии состояние ребенка стабилизировалось. Для группы пациентов с Т-ОЛЛ среднее количество разрывов как при кортикальном (n=53), так и при не кортикальном (n=55) вариантах оказалось приблизительно равным. В то же время количество репараций у

пациентов с Т3-кортикальным ОЛЛ (n=143) и Т-некортикальным ОЛЛ (n=194) было достоверно больше, чем количество самих разрывов. Среди пациентов с ОМЛ при М1-М2 был выявлен минимум повреждений – 62 разрыва, максимум при М4-М5 – 165 в расчете на 100 лимфоцитов. В последнем стоит отметить, что репарация оказалась, снижена в 82 раза. Для группы пациентов с ОМЛ среднее число репараций при М1-М2 составило 60, при М3 – 117. Среди ОМЛ только при М7 репараций оказалось больше (n=91), чем разрывов (n=76). Прогноз при М7 ОМЛ крайне неблагоприятный.

В группе пациентов с В-линейным ОЛ среднее количество двуцепочечных разрывов для pro-B1 составил максимум -186, минимум для пре-B3 -52. Среднее количество репарационных очагов в клетках в группе пациентов с В-ОЛЛ распределилось следующим образом: при В1 – 209, В2 – 109, В3 – 38. Уровень репараций при В4-ОЛЛ оказался самым низким по сравнению с другими вариантами В-ОЛЛ. При этом клинически зрело-

клеточный В4-ОЛЛ характеризовался высоким пролиферативным индексом, что в свою очередь отражался плохим исходом.

Количество разрывов и репараций ДНК лимфоцитов периферической крови среди пациентов с рецидивом ОЛ представлены в таблице 4. В группе «рецидивы» у троих пациентов был выявлен рецидив ОЛ менее чем через год с начала лечения.

Таблица 4 – Показатели двуцепочечных разрывов/репараций у пациентов с рецидивом ОЛ (среднее арифметическое значение $M \pm m$)

Вариант ОЛ	Кол-во клеток с разрывами и репарациями (FITC/APC)	Общее кол-во разрывов и репараций лимфоцитов (FITC/APC)	Кол-во разрывов и репараций на 1 клетку
Рецидив ОЛЛ В2	36±5/20±5 (p≤0,05)	74±6/60±3 (p≤0,05)	1/1
Рецидив ОЛЛ В4-зрелоклеточный тип	45±7/0 (p≤0,001)	45±4/0 (p≤0,001)	1/0
Рецидив ОМЛ М1-М2	29±4/20±3*	50±5/30±3 (p≤0,01)	1/1

Примечание: * - результат недостоверен

Как видно из таблицы 4, среди пациентов с рецидивом заболевания вне зависимости от варианта ОЛ двухнитевые разрывы преобладали над репарациями. Большинство пациентов, у которых выявлен рецидив заболевания составили больные с В2 common (N=11). Рецидив М1-М2 ОМЛ был выявлен у двоих детей, В4-зрелоклеточный ОЛЛ у одного. Репарация при В4-ОЛЛ полностью отсутствовала, несмотря на проведенную терапию, пациент скончался.

Результаты подсчета количества разрывов и репараций ДНК лимфоцитов периферической крови в ходе лечения представлены в таблице 5. У больных с ОЛЛ в соответствии с протоколом лечения на этапе индукции, первые 7 дней входил прием глюкокортикоида преднизолона, в то время как для ОМЛ курс начинался группой цитостатических препаратов. Следующие точки расчета показателей разрывов/репараций – 15 день и 3 месяц.

У некоторых пациентов начиная с 15-го дня в результате проводимой химиотерапии отмечалась выраженная цитопения. В образцах крови с концентрацией лейкоцитов меньше $2 \times 10^9/\text{л}$ система Akliides не производила подсчет разрывов/репараций в виду большого расстояния между клетками, зафиксированных на лунках носителей. Кроме того, на фоне приема цитостатических препаратов отмечались морфологические изменения клеток, их формы, размера. Этому мог послужить развившийся синдром лизиса опухоли, который в большинстве случаев наблюдался у детей с гиперлейкоцитозом. Мы выдвигаем предположение, что при выделении клеток из периферической крови в определенном градиенте плотности, впоследствии помимо лимфоцитов могли быть проанализированы blasts.

По данным таблицы 5, среди пациентов с В-лимфобластным лейкозом в большинстве случаев отношения показателей разрывов/репараций в ходе лечения не изменились. Двуцепочечные разрывы ДНК преобладали над репарациями, как при впервые установленном ОЛ, так и на 7-й, 15-й день, 3-й месяц лечения. По наблюдениям специалистов [7], В-клеточный ОЛЛ считается более благоприятным вариантом с точки зрения прогноза, чем Т-ОЛЛ. Любопытным фактом является сниженная репарация лимфоцитов у пациентов с В-ОЛЛ, которая сопровождалась положительным ответом на химиотерапию. У пациентов с Т-ОЛЛ на 7-й день профазы изме-

нений не наблюдалось, репараций (N=7) также выявлено больше, чем разрывов (N=4). Однако на 15-й день полихимиотерапии (N=6) и на 3 месяц (N=3) пациентов с разрывами стало больше, чем с репарациями N=3 и N=2 соответственно. Среди пациентов с диагнозом ОМЛ на 7-й день терапии преобладали двуцепочечные разрывы (N=8), в то время как на 15-й день (N=5) и на 3 месяц репарации увеличились (N=4).

Таблица 5 – Динамика соотношений двуцепочечных разрывов/репараций в ходе терапии

День терапии	Количество пациентов (N)		
	Вариант ОЛ	b>r*	r>b*
7 день	В-ОЛЛ	22	15
	Т-ОЛЛ	4	7
	ОМЛ	8	4
15 день	В-ОЛЛ	18	12
	Т-ОЛЛ	6	3
	ОМЛ	4	5
3 месяц	В-ОЛЛ	22	13
	Т-ОЛЛ	3	2
	ОМЛ	2	4

Примечание: b – double-stranded breaks (двуцепочечные разрывы); r – repair (репарация)

Обсуждение: Для многих лейкозов, лимфом и сарком первыми событиями канцерогенеза чаще всего являются транслокации, которые активируют или формируют онкоген [8]. Из-за унаследованных мутаций в генах репарации ДНК в реплицирующихся соматических клетках, нерепарированные повреждения будут увеличиваться [9]. У больной с М4-М5 ОМЛ выявлено 169 разрывов и 2 репарации. По результатам FISH исследования обнаружена реаранжировка гена лейкемии смешанного типа (mixed-lineage leukemia, MLL). Таким образом, полученные результаты подтверждаются данными литературы. Репарация лимфоцитов пациентов с Т-ОЛЛ для вариантов pro-T1, pre-T2 и mature-T4 оказалась выше в 1,3 раза, чем у пациентов с кортикальным Т3-ОЛЛ. По наблюдениям врачей, существенных клинических различий обнаружено не было. Однако у пациентов с Т-некортикальным ОЛЛ вариантом изначально ответ на химиотерапию был хуже, чем у пациентов с Т-кортикальным ОЛЛ. В целом, пациенты с Т-лимфобластным лейкозом отличались меньшим коли-

чеством двуцепочечных разрывов. При этом практически у всех пациентов с данным иммунологическим вариантом ОЛ как на момент поступления, так и на конец 7-го дня профазы количество репарационных очагов было выше в среднем в 3 раза нежели повреждений ДНК. Таким образом, преднизолон не оказал существенной роли в изменении характера соотношений двуцепочечных разрывов и репараций ДНК. Полученные результаты соответствуют клиническим признакам данного варианта ОЛ. На конец 7-го дня профазы в большинстве случаев отмечалось отсутствие регрессии гиперпластического синдрома и сохранение высокого уровня бластов в общем анализе крови (ОАК). В то же время применение цитостатических препаратов привело к увеличению количества двуцепочечных повреждений ДНК и улучшению клинической картины заболевания. Дискутабельным являются результаты репаративной способности лимфоцитов у пациентов с Т-ОЛЛ. Высокие показатели репарации могут быть одной из причин плохого ответа на проводимую химиотерапию. Задача репарации – исправить возникшие повреждения в ДНК, уменьшив вероятность появления мутаций, и тем самым возникновение опухолевого субстрата [10, 11]. Полученные результаты соответствуют данным Trenner A. с соавт., которые рассматривают механизм репарации как один из главных факторов устойчивости к проводимой химиотерапии [12].

На данный момент работ, связанных с изучением двуцепочечных разрывов и репараций ДНК у больных с острыми лейкозами представлено мало. В доступной литературе исследовались двуцепочечные повреждения и репарации ДНК в условиях "in vitro" [3, 13]. В представленной нами работе мониторинг разрывов/репараций у пациентов с диагнозом ОЛ проводился как до, так и после воздействия ряда противоопухолевых препаратов.

Заключение: Уровень повреждений ДНК лимфоцитов у пациентов с В-ОЛЛ оказался выше ожидаемого. Кроме того, на всех этапах терапии больных В-ОЛЛ отношение двуцепочечных разрывов к репарациям сохранилось. Предполагаемые нами изменения у данных пациентов могут наблюдаться на этапе поддерживающей терапии и/или после ее окончания. Мониторинг двуцепочечных разрывов/репараций являлся первоначальным этапом для разработки метода прогнозирования исхода заболевания и определения эффективности терапии. Полученные результаты вызывают непосредственный интерес, и требует дальнейших исследований.

Список использованных источников:

1. Основные пути репарации двойных разрывов ядерной геномной ДНК и взаимодействия между ними / Литвинов С.В. //

Цитология и генетика. – 2014. – Т. 48, № 3. – С. 64-77 [Osnovnye puti reparacii dvoynyx razryvov yadernoj genomnoj DNK i vzaimodejstviya mezhd u nimi / Litvinov S.V. // *Citologiya i genetika.* – 2014. – Т. 48, № 3. – С. 64-77 (in Russ.)] <http://dspace.nbu.gov.ua/bitstream/handle/123456789/126655/10-Litvinov.pdf?sequence=1>

2. Bártova E., Legartová S., Dundr M., Suchánková J. A role of the 53BP1 protein in genome protection: structural and functional characteristics of 53BP1-dependent DNA repair // *Aging (Albany NY).* – 2019. – Vol. 11(8). – P. 2488-2511. <https://doi.org/10.18632/aging.101917>

3. Ермилова Т.И., Тарасова А.В., Шман Т.В. Анализ эффективности повреждения и репарации ДНК по выявлению фосфорилированной формы гистона γH2AX в лейкоэмических клетках пациентов с острыми лейкозами «Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа». – 2016. – №3(2). – С.330-343 [Ermilova T.I., Tarasova A.V., Shman T.V. Analiz éffektivnosti povrezhdeniya i reparacii DNK po vyavleniyu fosforilirovannoj formy gistona γN2AX v lejkemicheskix kletkax pacientov s ostrymi lejkozami «Gematologiya. Transfuziologiya. Vostochnaya Evropa». – 2016. – №3(2). (in Russ.)]. <https://oncology.by/assets/img/doc/sng-4.pdf>

4. Palla V.V., Karaolani G., Katafigiotis I., Anastasiou I., Patapis P., Dimitroulis D., Perrea D. gamma-H2AX: Can it be established as a classical cancer prognostic factor? // *Tumour Biol.* – 2017. – Vol. 39(3). – P. 31. <https://doi.org/10.1177/1010428317695931>

5. Булудова М.В., Полотов В.Э. Апоптоз: молекулярно-клеточные механизмы развития, значение в обеспечении клеточного гомеостаза // *Бюллетень медицинских интернет-конференций.* – 2017. – №6(7). – С. 1043-1045 [Buludova M.V., Polotov V.E. Apoptoz: molekulyarno-kletochnye mexanizmy razvitiya, znachenie v obespechenii kletochnogo gomeostaza // *Byulleten' medicinskix internet-konferencij.* – 2017. – No. 6(7). – S. 1043-1045 (in Russ.)]. <https://cyberleninka.ru/article/n/apoptoz-molekulyarno-kletochnye-mehanizmy-razvitiya-znachenie-v-obespechenii-kletochnogo-gomeostaza>

6. Ray U., Raghavan S.C. Understanding the DNA double-strand break repair and its therapeutic implications // *DNA Repair (Amst).* – 2021. – Vol. 106. – P. 103177. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2021.103177>;

7. Teachey DT, Pui CH. Comparative features and outcomes between paediatric T-cell and B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2019 Mar;20(3):e142-e154. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9233195/>;

8. Elitzur S., Izraeli Sh., Ben-Yehuda D., Gatt M.E. 77 - Lymphoid Leukemias // In: *Clinical Immunology.* – Sixth Edition. – Elsevier. – 2023. – P. 984-999. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-8165-1.00077-0>

9. Bernstein C., Prasad A.R., Nfonsam V., Bernstein H. DNA Damage, DNA Repair and Cancer // In: *New Research Directions in DNA Repair / ed. C. Chen.* <https://doi.org/10.5772/53919>.

10. Alhegaili A.S. Role of DNA Repair Deficiency in Cancer Development // *Pakistan J. Biol. Sci.* – 2023. – Vol. 26. – P. 15-22. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2023.15.22>

11. Broustas C.G., Lieberman HB. DNA damage response genes and the development of cancer metastasis // *Radiat Res.* – 2014. – Vol. 181(2). – P. 111-130. <https://doi.org/10.1667/RR13515.1>

12. Trenner A., Sartori A.A. Harnessing DNA Double-Strand Break Repair for Cancer Treatment // *Front. Oncol.* – 2019. – Vol. 9. – P. 1388. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01388>;

13. Аклеев А.В., Пушкарев С.А. Роль апоптоза и репарации ДНК в формировании адаптивного ответа у лиц, подвергшихся хроническому радиационному воздействию // *Вестник ЮУрГГПУ.* – 2008. – №11 [Akleev A.V., Pushkaryov S.A. Rol' apoptoza i reparacii DNK v formirovanii adaptivnogo otveta u lic, podvergshixsya xronicheskomu radiacionnomu vozdeystviyu // *Vestnik YuUrGGPU.* – 2008. – №11. – С.273-276 (in Russ.)]. <https://cyberleninka.ru/article/n/rol-apoptoza-i-reparatsii-dnk-v-formirovanii-adaptivnogo-otveta-ulits-podvergshihsiya-hronicheskomu-radiatsionnomu-vozdeystviyu>

АНДАТПА

ЖЕДЕЛ ЛЕЙКОЗ КЕЗІНДЕГІ ДНҚ ҚОСТІЗБЕКТІ ҮЗІЛІСТЕРІ МЕН РЕПАРАЦИЯСЫ

М.Г. Булгенова¹, А. Дунаева¹, С.С. Салиева¹, А.А. Ускенбаева¹

¹«Педиатрия және балалар хирургиясы ғылыми орталығы» АҚ, Алматы, Қазақстан Республикасы

Өзектілігі: ДНҚ-ның қос тізбекті үзілістері сияқты зақымдануды қалпына келтіру жүйесіндегі қателер жасушалардың кейінгі ұрпақтарына берілетін мутацияларға әкелуі мүмкін және мұндай мутациялардың кейбіреулері онкогендік потенциалға ие болуы мүмкін. **Зерттеудің мақсаты** – шартты түрде сау балалар тобындағы және "жедел лейкоз" (ЖЛ) диагнозы қойылған пациенттердің перифериялық қан лимфоциттерінің қос тізбекті үзілістері және ДНҚ репарациясының санын салыстырмалы талдау және оны аурудың нәтижесін болжау мен емнің тиімділігін анықтау әдісін әзірлеу үшін қолдану.

Әдістері: тікелей емес иммунофлуоресцентті талдау әдісі флуоресцентті анализатор мен Aklides nuk бағдарламалық қамтамасыз етуден тұратын Aklides (Medipan, Германия) жүйесінде өткізілді. Әдіс арқылы перифериялық қан лимфоциттері зерттелді: а) шартты түрде сау 38 бала (бақылау тобы); б) жедел лейкоз (ЖЛ) диагнозы қойылған 100 науқас; в) аурудың қайталануы бар 14 науқас.

Нәтижелері: T-лимфобластикалық лейкозбен ауыратын науқастарда емнің басында және ауруханаға жатқызудың 7-ші күні 53BP1 репарация ошақтарының саны ДНҚ зақымдану санынан орта есеппен 3 есе жоғары болды. В-бағытты лейкозбен ауыратын науқастар арасында көп жағдайда емдеу кезінде ДНҚ қостізбекті үзілісі/репарациясы көрсеткіштерінің арақатынасы өзгерген жоқ, ДНҚ-ның қостізбекті үзілістері ауру алғаш анықталған сәтте, емдеудің 7-ші, 15-ші күні, 3-ші айында да репарациядан басым болды.

Қорытынды: В-ALL бар емделушілерде лимфоциттердің ДНҚ зақымдану деңгейі күтілгеннен жоғары болды. Сонымен қатар, екі тізбекті үзілістердің жөндеуге қатынасы В-ALL бар емделушілерде терапияның барлық кезеңдерінде өзгеріссіз қалды. Бұл емделушілерде біз ұсынып отырған өзгерістер демеуші терапия сатысында және/немесе оны аяқтағаннан кейін байқалуы мүмкін. Екі қатарлы үзілістердің/репарациялардың мониторингі аурудың нәтижесін болжау және терапияның тиімділігін анықтау әдісін әзірлеудің бастапқы қадамы болды. Алынған нәтижелер тікелей қызығушылық тудырады және қосымша зерттеулерді қажет етеді.

Түйінді сөздер: ДНҚ қостізбекті үзілістері, ДНҚ репарациясы, жедел лейкоз, лимфоциттер, иммунофлуоресценция.

ABSTRACT

DNA DOUBLE-STRANDED BREAKS AND REPAIRS IN ACUTE LEUKEMIA

M. Bulegenova¹, A. Dunayeva¹, S. Saliyeva¹, A. Uskenbayeva¹

¹«Scientific Center of Pediatrics and Pediatric Surgery» JSC, Almaty, the Republic of Kazakhstan

Relevance: Double-strand Relevance: Errors in the damage repair system, such as double-stranded DNA breaks, can lead to mutations that will be passed on to subsequent generations of cells, and some of these mutations may have oncogenic potential.

The study aimed to evaluate the number of double-stranded breaks and DNA repairs of peripheral blood lymphocytes in a group of conditionally healthy children and in patients diagnosed with acute leukemia (AL) to develop a method for predicting the outcome of the disease and determining the effectiveness of therapy.

Methods: peripheral blood lymphocytes were studied: a) 38 conditionally healthy children (control group); b) 100 patients diagnosed with acute leukemia (AL); c) 14 children with relapse of the disease. Double-stranded DNA breaks/repairs were examined using the Aklides system (MEDIPAN, Germany), consisting of a fluorescent analyzer and the AKLIDES Nuk software.

Results: In patients with T-lymphoblastic leukemia, both at admission and the end of Day 7 at the hospital, the number of 53BP1 repair foci was, on average, three times higher than the number of DNA damages. In most cases, the ratio of breaks/repairs indicators during treatment did not change among patients with B-line leukemia. Double-stranded DNA breaks prevailed over repairs, with the newly established disease on the 7th, 15th day, and 3rd month of treatment.

Conclusion: The level of lymphocyte DNA damage in patients with B-ALL was higher than expected. In addition, the ratio of double-strand breaks to repairs remained unchanged at all stages of therapy in patients with B-ALL. The changes we suggest in these patients can be observed during and/or after maintenance therapy. Monitoring double-strand breaks/repairs was the initial step in developing a method of predicting the disease outcome and determining the therapy efficacy. The results obtained are of direct interest and require further research.

Keywords: double-stranded breaks, DNA repair, acute leukemia, lymphocytes, immunofluorescence.

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

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Данное исследование профинансировано в рамках научно-технической программы BR11065390 «Разработка и развитие инновационных технологий ранней диагностики и лечения злокачественных заболеваний с учетом современных подходов геномики» (Программно-целевое финансирование Министерства Здравоохранения Республики Казахстан).

Вклад авторов: вклад в концепцию – Булегенова М.Г.; научный дизайн – Дунаева А., Салиева С.С.; исполнение заявленного научного исследования – Булегенова М.Г.; интерпретация заявленного научного исследования – Булегенова М.Г., Ускенбаева А.А.; создание научной статьи – Булегенова М.Г., Дунаева А., Салиева С.С.

Сведения об авторах:

Булегенова М.Г. – профессор, зав. КДЛ, АО «Научный центр педиатрии и детской хирургии», Алматы, Республика Казахстан, тел.: +77017220183, e-mail: mbulegenova@yandex.kz, ORCID ID: 0000-0002-7195-5926;

Дунаева А. (корреспондирующий автор) – специалист клинико-диагностической лаборатории, АО «Научный центр педиатрии и детской хирургии», Алматы, Республика Казахстан, тел.: +77475938655, e-mail: dunaeva-angelina2001@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-5430-7636;

Салиева С.С. – врач онколог-гематолог детский, АО «Научный центр педиатрии и детской хирургии», Алматы, Республика Казахстан, тел.: +77072890102, e-mail: symbatsaliyeva@gmail.com, ORCID ID: 0000-0003-0262-8515;

Ускенбаева А.А. – врач онколог-гематолог детский, АО «Научный центр педиатрии и детской хирургии», Алматы, Республика Казахстан, тел.: 877017607820, e-mail: auskenbaeva@mail.ru, ORCID ID: 0009-0008-0277-7741.

Адрес для корреспонденции: Дунаева А., АО «Научный центр педиатрии и детской хирургии», ул. Гурьевская 23, г. Алматы 050018, Республика Казахстан.