

Ермилова Т.И., Тарасова А.В., Шман Т.В.

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь

Ermilova T., Tarasova A., Shman T.

Belarusian Research Center of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus

Анализ эффективности повреждения и репарации ДНК по выявлению фосфорилированной формы гистона γ -H2AX в лейкемических клетках пациентов с острыми лейкозами

Analysis of damage and repair of DNA by detection of phosphorylated form of histone γ -H2AX in leukemic cells of patients with acute leukemia

Резюме

В работе исследуется способ оценки повреждения и репарации ДНК лейкемических клеток по выявлению фосфорилированной формы гистона γ -H2AX. Подобраны дозы генотоксических факторов, выбраны временные точки исследования, а также способ детекции γ -H2AX. Оценка вариабельности повреждения ДНК была проведена на образцах лейкемических клеток, полученных от 41 пациента детского возраста с острыми лейкозами. Установлено, что через 3 ч после воздействия этопозида и ионизирующего излучения наблюдается увеличение количества клеток с γ -H2AX, тогда как через 24 ч после воздействия происходит достоверное снижение количества клеток с фосфорилированным γ -H2AX, что свидетельствует об активности системы репарации у пациентов с острым лейкозом.

Ключевые слова: повреждение ДНК, репарация ДНК, γ -H2AX, острый лейкоз.

Abstract

There was studied the method of assessment of DNA damage and repair in leukemia cells with phosphorylated form of histone γ -H2AX. There were selected the doses of genotoxic factors, the time points for investigations, and the method of γ -H2AX detection. Assessment of variability of DNA damage was done in 41 leukemic samples of children with acute leukemia. There was found the significant increase of cells with γ -H2AX after 3 hours of etoposide and ionizing radiation, while after 24 hours the quantity of cells with γ -H2AX significantly decreased, which proves the activity of repair mechanisms in patients with acute leukemia.

Keywords: DNA damage, DNA repair, γ -H2AX, acute leukemia.

■ ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительные достижения в лечении онкологических заболеваний, одной из важнейших причин неэффективности проводимой терапии является химио- и радиорезистентность опухолевых клеток. Множество механизмов, опосредующих резистентность, можно разделить на две группы: фармакокинетические (изменяют дозу препарата) и фармакодинамические (влияют на достижение цитотоксического эффекта) [1]. К первой группе относятся такие механизмы, как выброс препарата из клетки белками семейства ABC, биотрансформация и инактивация химиопрепарата системами глутатиона, цитохрома P450 и другие. Ко второй группе – ингибирование программы апоптоза, изменение мишеней препарата посредством мутаций, метилирования и др. К этой же группе относится и повышенная активность систем распознавания поврежденной ДНК и запуска ее репарации.

Мишенью многих противоопухолевых терапевтических средств является молекула ДНК. Основными повреждениями ДНК являются одноцепочечные разрывы и двуцепочечные разрывы (ДР) ДНК, поперечные сшивки, повреждение оснований. Ингибиторы топоизомеразы II (этопозид, митоксантрон) вызывают двунитевые разрывы, которые репарируются двумя путями – гомологичной рекомбинацией или негомологичным сшиванием концов ДНК. Химиопрепараты группы антрациклинов (доксорубицин, даунорубицин) встраиваются между основаниями ДНК, при этом изменение структуры молекулы ДНК приводит к ингибированию топоизомеразы II и образованию двуцепочечных разрывов [2]. Воздействие антрациклиновых химиопрепаратов также приводит к усилению образования свободных радикалов, которые также повреждают ДНК [3]. Цитотоксическое действие аналогов пуриновых (флударабин, кладрибин) и пиримидиновых (цитарабин) нуклеозидов действует на различные механизмы: подавление синтеза ДНК через ингибирование ДНК-полимераз, встраивание в ДНК, ингибирование репарации ДНК и накопление повреждений [4]. Ионизирующее излучение (ИИ) вызывает комплекс различных повреждений, таких как окисление, повреждение оснований, сшивки, одноцепочечные и двуцепочечные разрывы, в ответ на которые клетка активирует несколько репаративных путей [5]. Выбор стратегической программы репарации и степень ее регуляции зависит во многом от типа клеток, их микроокружения, характера повреждающего фактора и степени повреждения.

Для оценки вклада процессов репарации в формирование лекарственной резистентности опухолевых клеток необходимо использовать методы, которые позволяют количественно оценивать повреждение ДНК. Для таких целей оптимально подходит метод детекции поврежденных ДНК по выявлению фосфорилированной формы гистона H2AX.

Гистон H2AX – вариант гистона H2A, является одним из белков, ответственных за мониторинг целостности генома. В ответ на повреждение ДНК (особенно с образованием ДР) гистон H2AX фосфорилируется по Ser139 [6], такую фосфорилированную форму гистона называют γ -H2AX. Этот гистон фосфорилируется такими киназами, как ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATR (ATM-Rad3-related) или DNA-PK (ДНК-зависимой протеинкиназой). В течение 30 мин после возникновения ДР большое количество молекул H2AX фосфорилируется вокруг повреж-

денного участка, формируя платформу для белковых факторов, задействованных в клеточном ответе на ДР. Так как локусы γ -H2AX образуются в местах ДР, то их можно использовать как биомаркеры повреждения ДНК [7]. Выявление фосфорилированного гистона γ -H2AX возможно с помощью методов проточной цитофлуориметрии или конфокальной микроскопии [8, 9].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка способа оценки эффективности повреждения и репарации ДНК по накоплению фосфорилированной формы гистона γ -H2AX в лейкоэмических клетках; оценка вариабельности индуцированных повреждений ДНК лейкоэмических клеток пациентов с острыми лейкозами.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали 41 образец опухолевых клеток пациентов детского возраста с диагнозами «острый лимфобластный лейкоз» (ОЛЛ, $n=28$), «острый миелоидный лейкоз» (ОМЛ, $n=6$) и «рецидивы острого лейкоза» ($n=7$).

В работе использовали клетки лейкоэмических клеточных линий: миелоидная KG-1, лимфоидные Raji и Nalm-6.

Лейкоэмические клетки выделяли из костного мозга пациентов на градиенте плотности Histopaque-1077, осаждали и отмывали в среде RPMI с 2% эмбриональной сыворотки телят (ЭТС). Полученные клетки ресуспендировали в среде RPMI-1640 в присутствии 15% ЭТС, 2mM L-глутамина и смеси антибиотика/антимикотика.

Клетки клеточных линий культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной ЭТС, 2mM L-глутамина и смеси антибиотика/антимикотика при 37 °C во влажной атмосфере 5% CO₂.

Разрывы ДНК индуцировали, культивируя клетки с эпопозидом (VP, дозы – 10 и 30 мкг/мл) и под действием ионизирующего излучения (ИИ, дозы облучения 5 Gy и 30 Gy) 3 и 24 ч в стандартных условиях. Источником ионизирующего излучения был Cs137 аппарата для облучения криви Gammacell 3000 Elan (MDS Nordion, Канада).

Спустя 3 и 24 ч культивирования нефиксированные клетки, окрашенные антителами к CD45, ресуспендировали в фосфатном буфере PBS с 7-AAD (4,5 мкг/мл), инкубировали в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре. Затем добавляли по 200 мкл PBS и немедленно анализировали на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США).

Выявление двойных разрывов ДНК по образованию фосфорилированной формы гистона γ -H2AX методом проточной цитофлуориметрии

Оценку уровня фосфорилированного гистона проводили спустя 3 и 24 ч инкубации. Для этого после культивирования клетки отмывали в PBS и лизировали. Далее клетки окрашивали антителами к CD45 в течение 15 мин при комнатной температуре. После этого клетки отмывали от антител в PBS и фиксировали с помощью раствора параформальдегида (2%, 10 мин при комнатной температуре) и ледяного 80%-го этанола (не менее 20 ч при температуре –20 °C). После чего клетки

дважды отмывали в PBS, ресуспендировали в блокирующем буфере (3% ЭТС в PBS) и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Далее добавляли антитела против гистона γ -H2AX, меченные AlexaFluor488 (BD Bioscience, США) или AlexaFluor647 (Beckman Coulter, США) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Для выявления фосфорилированной формы ATM фиксированные клетки инкубировали с антифосфо-ATM (Ser1981) mouse IgG2b/к антителами в разведении 1:1000 в течение 2 ч при температуре +4 °C. Затем клетки отмывали в блокирующем буфере и добавляли вторичные антитела Goat Anti-Mouse-IgG2b(γ 2b) AlexaFluor633 (1:1000) и инкубировали 1 ч при температуре +4 °C. После этого клетки отмывали в PBS с 3% ЭТС. Учет результатов проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 [8, 10].

В качестве позитивного контроля флуоресценции фосфорилированного гистона использовали клетки линии K562, культивируемые с эпопозидом (30 мкг/мл) в течение 3 ч в стандартных условиях.

Выявление двойных разрывов ДНК по образованию фосфорилированной формы гистона γ -H2AX методом конфокальной микроскопии

Для определения индуцированных двойных разрывов ДНК с помощью цитоцентрифуги клетки осаждали на стекла, фиксировали ледяным метанолом в течение 5 мин, отмывали в PBS 30 мин и хранили в PBS с 5%-м бычьим сывороточным альбумином. Затем клетки окрашивали антителами против гистона γ -H2AX, меченными AlexaFluor488 (BD Bioscience, США) в разведении 1:100 в течение 1 ч при комнатной температуре. Клетки трижды отмывали, подкрашивали пропидий йодидом (PI), просушивали и помещали в среду для хранения, состоящую из глицерола и PBS. Анализ проводили на конфокальном микроскопе Leica TCS SPE (Германия).

Для математической обработки и статистического анализа данных использовали программы Microsoft Excel и Statistica 6.0.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выполнения поставленной цели работы необходимо было оценить возможности проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии для количественного анализа повреждений ДНК, оценить динамику появления повреждений ДНК после генотоксического воздействия, выбрать дозы химиопрепарата и облучения, а также время культивирования для оценки повреждений ДНК в лейкомиических клетках.

Способы оценки повреждений ДНК по уровню фосфорилированного гистона γ -H2AX методами конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии

Определение повреждений ДНК по экспрессии фосфорилированного гистона γ -H2AX возможно с использованием методов конфокальной микроскопии. На рис. 1 представлен пример оценки повреждения ДНК методом конфокальной микроскопии по образованию γ -H2AX foci (фокусов) в местах двунитевых разрывов ДНК.

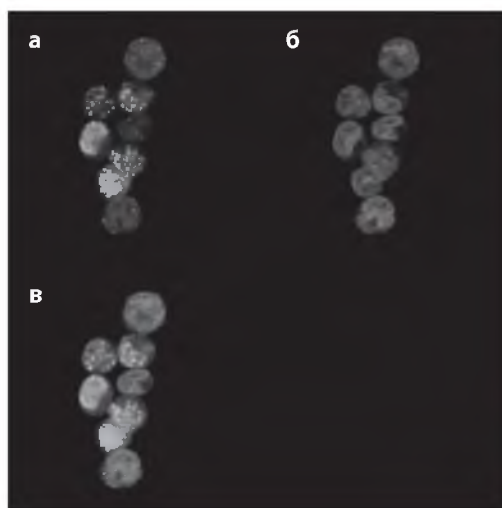


Рис. 1. Пример анализа флуоресценции фосфорилированных гистонов γ -H2AX после воздействия этопозида в клетках Nalm-6 методом конфокальной микроскопии: а – изображение клеток в области флуоресценции γ -H2AX Alexa488, б – флуоресценция PI, в – наложение изображений а и б

Подсчет количества двойных разрывов осуществляли в программе ImageJ (рис. 2).

Преимуществом конфокальной микроскопии является визуализация двойных разрывов, возможность рассчитать количество ДР на одну клетку, проанализировать колокализацию различных молекул. Однако анализ большого количества образцов методами микроскопии затруднителен. Преимуществами определения повреждений ДНК по экспрессии фосфорилированного гистона γ -H2AX с помощью проточной цитофлуориметрии является возможность анализа большого количества клеток, возможность комбинирования с дополнительными иммунофенотипическими маркерами, с анализом клеточного цикла и др., а также меньшая субъективность [13]. На рис. 3 представлен алгоритм анализа количества клеток, экспрессирующих γ -H2AX с дополнительным окрашиванием маркера CD45 для выделения региона бластных клеток.

Для определения количества клеток, экспрессирующих γ -H2AX, на первом этапе выделяли жизнеспособные клетки по показателям FS/SS (прямого и бокового светорассеивания) (рис. 3а, г), затем по экспрессии маркера CD45 выделяли бластные клетки (рис. 3б, д), после чего в них анализировали количество клеток, позитивных по γ -H2AX (рис. 3в, е).

Двунитевые разрывы сопровождаются изменением скрученности спирали ДНК, что служит сигналом к автофосфорилированию АТМ-киназы. Активная рАТМ фосфорилирует множество нуклеоплазматических субстратов и участвует в фосфорилировании гистона H2AX. По уровню фосфорилирования γ -H2AX можно точно оценить количество двунитевых разрывов или общий уровень повреждения ДНК, тогда как по уровню активности рАТМ можно проанализировать и работу системы репарации [10, 11]. Методами проточной цитофлуориметрии также можно одновременно оценить экспрессию рАТМ и γ -H2AX. Пример такого двухфакторного анализа клеток показан на рис. 4.

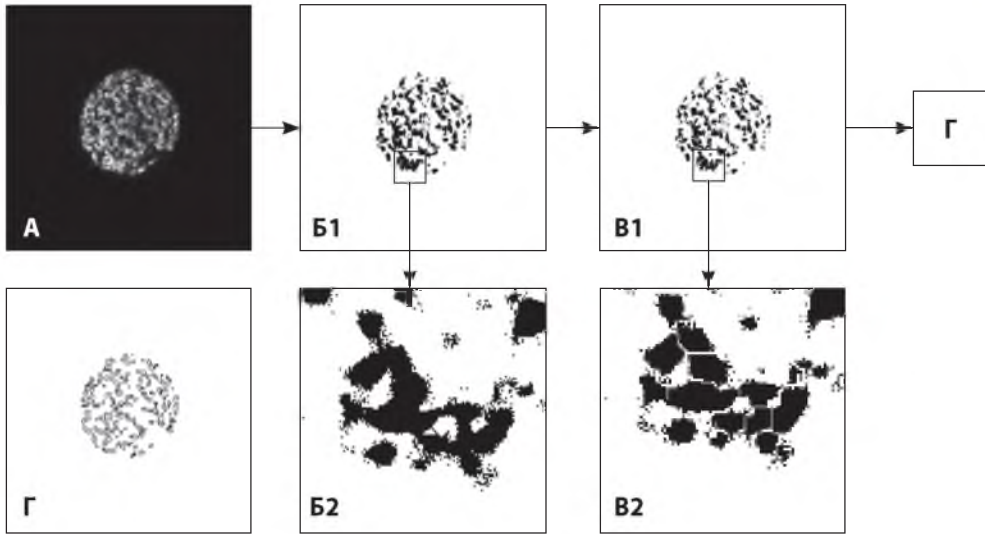


Рис. 2. Автоматический подсчет γ -H2AX фокусов в лимфоците крови с помощью программы ImageJ: А – необработанное изображение с разрешением 1024*1024 пикселей; Б1 – бинарное (черно-белое) изображение с установленным уровнем «объект/фон» (threshold segmentation); Б2 – увеличенный фрагмент бинарного изображения, показывающий частично перекрывающиеся зоны; В1 – бинарное изображение с применением функции «разделения частиц» (watershed segmentation); В2 – увеличенный фрагмент бинарного изображения после «разделения частиц»; Г – подсчет частиц заданного размера (20–500 пикселей)

Как показано на рис. 4, в лейкемических клетках пациента в ответ на действие этопозида, индуцирующего образование ДР, происходит фосфорилирование ATM и H2AX.

Учитывая преимущества каждого метода, для дальнейшего анализа повреждений ДНК нами был выбран метод проточной цитофлуориметрии с использованием антител к фосфорилированному гистону γ -H2AX в комбинации с антителами к CD45.

Определение динамики повреждений ДНК по уровню фосфорилированного гистона γ -H2AX в лейкемических клеточных линиях

Для исследования динамики репаративного ответа лейкемические клеточные линии KG-1, Raji и Nalm-6 инкубировали с этопозидом (10 мкг/мл). Часть клеток отбирали и фиксировали через определенные промежутки времени: 0, 15 и 30 мин, 1, 3 и 24 ч. В фиксированных клетках изучали уровень факторов репарации γ -H2AX и pATM. Результаты представлены на рис. 5.

Уровень γ -H2AX и pATM увеличивался в клетках тестируемых клеточных линий уже через 15 мин воздействия этопозида и достигал максимального значения спустя несколько часов. При этом для клеток была отмечена прямая корреляция между уровнем обоих факторов ($p < 0,05$). Через 24 ч наблюдали падение уровня γ -H2AX и pATM в клетках всех исследованных линий.

Другими исследователями, использовавшими в своей работе миелоидную лейкемическую клеточную линию HL-60, максимальный уро-

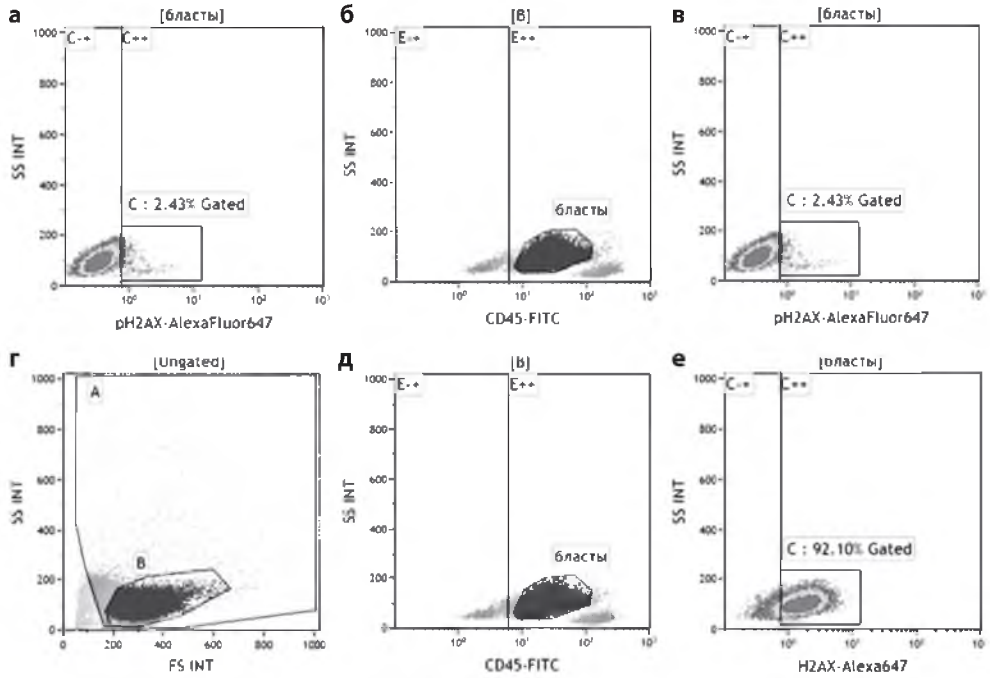


Рис. 3. Пример определения экспрессии фосфорилированного гистона γ -H2AX в клетках пациента с острым лейкозом после воздействия эпопозада: а, б, в – контрольные клетки, г, д, е – клетки после 3 ч культивирования с эпопозидом

вень γ -H2AX после воздействия цисплатины был достигнут через 3 ч (69%) [8], под действием митоксантрона – через 4 ч [12].

Таким образом, для оценки динамики повреждения ДНК далее нами были выбраны временные точки: 0 ч – контрольная точка без воздей-

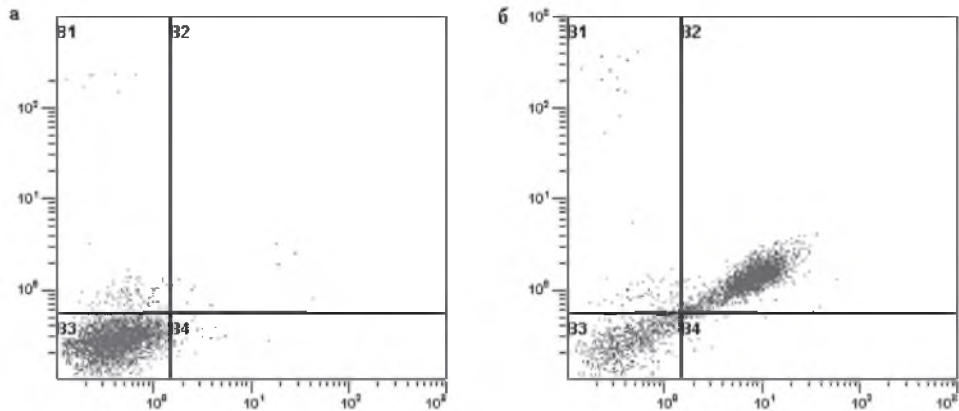


Рис. 4. Пример определения уровня γ -H2AX и pATM в лейкозных клетках пациента с острым лейкозом до (а) и после (б) воздействия эпопозада: по оси X – уровень накопления γ -H2AX, по оси Y – уровень накопления pATM в клетках

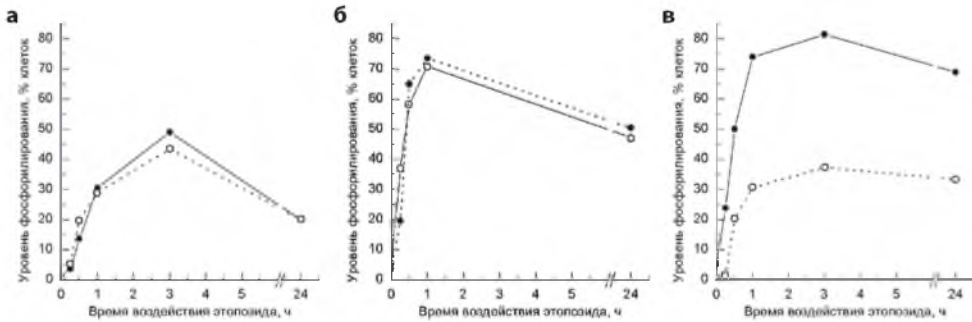


Рис. 5. Изменение количества клеток линий KG-1 (а), Raji (б) и Nalm-6 (в), экспрессирующих факторы репарации γ -H2AX и pATM в ответ на генотоксическое воздействие этопозида. ● – γ -H2AX, ○ – pATM

ствия; 3 ч после генотоксического воздействия – точка, когда наблюдается максимальное количество повреждений ДНК; 24 ч после воздействия – точка, когда наблюдается снижение количества поврежденной ДНК, что необходимо для оценки эффективности работы систем репарации.

Изменение уровней pATM и γ -H2AX в лейкомиических клетках пациентов с острыми лейкозами

Для выбора дозы воздействия химиопрепарата и ИИ исследовали жизнеспособность лейкомиических клеток при использовании двух доз этопозида (10 и 30 мкг/мл) и двух доз облучения (5 и 30 Gy). Полученные результаты представлены на рис. 6.

Согласно представленным данным видно, что через 3 ч после воздействия использование более высоких доз не приводит к значимому снижению жизнеспособности клеток. Однако через 24 ч при использовании высоких доз воздействия количество живых клеток значительно снижается. Так как низкая жизнеспособность клеток не позволяет исследовать эффективность репаративных систем, далее в исследовании нами были использованы дозы для этопозида – 10 мкг/мл, для облучения – 5 Gy.

Для одновременного анализа уровня γ -H2AX и pATM были исследованы лейкомиические клетки 24 пациентов с диагнозом «острый лейкоз».

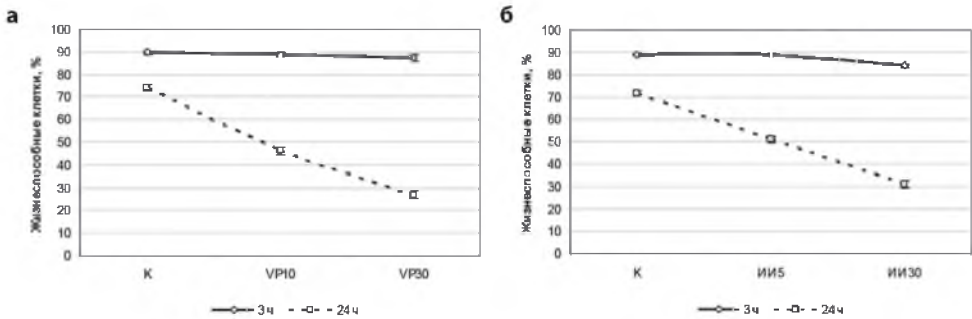


Рис. 6. Жизнеспособность лейкомиических клеток пациентов после воздействия различными а) дозами этопозида (VP, 10 и 30 мкг/мл) и б) ионизирующего излучения (ИИ, 5 и 30 Gy) при культивировании 3 и 24 ч. К – контрольные клетки без воздействия

Для исследования репаративного ответа клетки культивировались без воздействия (контроль) и с этопозидом (10 мкг/мл). Результаты сравнения уровней γ -H2AX и pATM в группе пациентов с острыми лейкозами представлены в табл. 1.

Через 3 ч воздействия этопозидом наблюдали увеличение уровня γ -H2AX в лейкоэмических клетках пациентов в 11,9 раза (по медиане) и увеличение уровня pATM в 13,8 раза по отношению к контрольным клеткам без этопозидом. Через 24 ч было отмечено достоверное снижение уровней обоих компонентов. При этом наблюдалась прямая корреляция (анализ корреляции по Спирману) между уровнем γ -H2AX и pATM в клетках через 3 ч (N=24, $r=0,59$, $p=0,002$) и 24 ч (N=23, $r=0,46$, $p=0,03$). По данным Т. Такаки и соавт., бимерный анализ уровней pATM и γ -H2AX в клетках лейкоэмических клеточных линий после воздействия различных повреждающих ДНК факторов выявил, что большинство γ -H2AX позитивных клеток также экспрессируют и pATM [10, 11].

Так как фосфорилирование ATM возможно при различных клеточных процессах, а фосфорилирование H2AX является прямым следствием повреждения ДНК, а также ввиду полученных нами данных о корреляции между значениями pATM и γ -H2AX далее в исследованиях, как и в случае с клеточными линиями, для анализа повреждения и репарации ДНК нами использовался только уровень фосфорилированного гистона γ -H2AX.

Анализ вариабельности индуцированных повреждений ДНК в различных группах пациентов с острыми лейкозами

Оценка вариабельности повреждений ДНК после воздействия этопозидом была проведена для 41 пациента с острым лейкозом. Полученные результаты для этих пациентов представлены в табл. 2.

Согласно представленным результатам после воздействия этопозидом через 3 ч наблюдали увеличение количества клеток с γ -H2AX для общей

Таблица 1

Сравнение уровней γ -H2AX и pATM после культивирования лейкоэмических клеток с этопозидом в группе пациентов с острым лейкозом

Время	Количество лейкоэмических клеток с фосфорилированным белком, %, медиана (24–75 перцентиль), n=24			
	γ -H2AX		pATM	
	контроль	этопозид	контроль	этопозид
3 ч	3,9 (1,9–6,3)	46,5 (38,4–71,3)*	1,9 (1,3–2,9)	27,1 (14,3–38) *
24 ч	7,4 (5,4–8,9)	33,8 (18,5–55,2)	7,7 (2,0–4,6)	15,8 (6,8–29,0)

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с уровнем через 24 ч.

Таблица 2

Количество лейкоэмических клеток с фосфорилированным γ -H2AX в общей группе пациентов с острыми лейкозами после воздействия этопозидом

Условия	Количество лейкоэмических клеток с фосфорилированным γ -H2AX, %, медиана (24–75 перцентиль), n=41	
	культивирование 3 ч	культивирование 24 ч
Контроль	3,5 (2,1–5,6)	6,6 (3,9–9,0)
Этопозид	45,5 (26,5–68,0)	33,5 (13,6–55,2)*

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с культивированием 3 ч.

группы пациентов по показателю медианы, однако диапазон минимального и максимального значений был широк (от 1 до 90%). Через 24 ч воздействия химиопрепарата наблюдали достоверное снижение количества клеток с фосфорилированным γ -H2AX (тест Вилкоксона, $p=0,049$).

Далее проанализировали динамику изменения количества клеток с поврежденной ДНК в различных группах пациентов. На рис. 7 представлена динамика уровня γ -H2AX после воздействия этопозида в группе пациентов с первичным ОЛЛ.

Согласно представленным данным, как в общей группе пациентов с первичным ОЛЛ, так и в группе пациентов в В-линейном ОЛЛ снижение уровня γ -H2AX через 24 ч культивирования по сравнению с 3 ч было достоверным ($p=0,013$ и $p=0,01$ соответственно). В группе пациентов с рецидивами острых лейкозов не выявлено значительного снижения уровня γ -H2AX при культивировании 24 ч по сравнению с 3 ч. Для 4 из 6 пациентов с первичным ОМЛ отмечено снижение количества лейкоцитарных клеток с поврежденной ДНК через 24 ч по сравнению с 3 ч, что говорит о репарации повреждений ДНК у этих пациентов.

Оценка вариабельности повреждений ДНК после воздействия облучения была проведена для 17 пациентов с острым лейкозом. Полученные результаты для этих пациентов представлены в табл. 3.

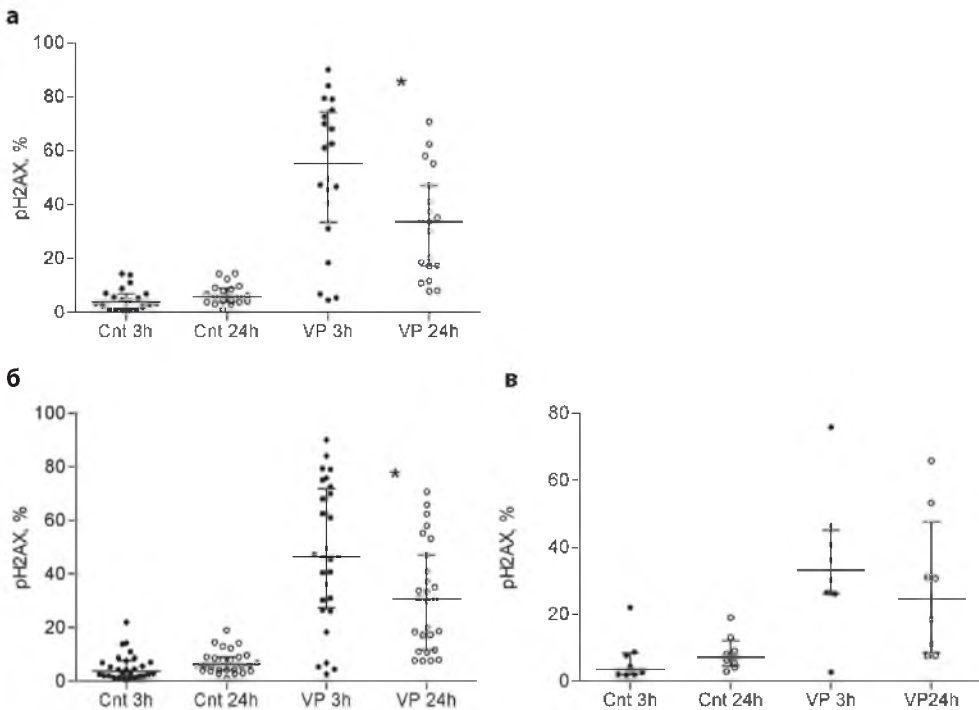


Рис. 7. Количество лейкоцитарных клеток с фосфорилированным γ -H2AX после воздействия этопозида в группе пациентов с первичным ОЛЛ (а), в группе пациентов с В-линейным ОЛЛ (б) и Т-линейным ОЛЛ (в)

Примечание: * – $p<0,05$ по сравнению с уровнем γ -H2AX через 3 ч культивирования.

Таблица 3

Количество лейкомиических клеток с фосфорилированным γ -H2AX в общей группе пациентов с острыми лейкозами после воздействия ионизирующего излучения

Условия	Количество лейкомиических клеток с фосфорилированным γ -H2AX, %, медиана (24–75 перцентиль), n=17	
	культивирование 3 ч	культивирование 24 ч
Контроль	4,5 (2,5–7,1)	4,6 (3,3–7,8)
Облучение 5 Gy	29,5 (11,0–45,8)	8,6 (7,6–19,1)*

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с культивированием 3 ч.

Согласно представленным результатам после воздействия облучения через 3 ч наблюдали увеличение количества клеток с γ -H2AX для общей группы пациентов по показателю медианы (с диапазоном минимального и максимального значений от 2 до 90%), через 24 ч после воздействия наблюдали достоверное снижение количества клеток с фосфорилированным γ -H2AX (тест Вилкоксона, $p = 0,0007$).

Далее проанализировали динамику изменения количества клеток с поврежденной ДНК после ИИ в различных группах пациентов. На рис. 8 представлена динамика уровня γ -H2AX после облучения в группах пациентов с ОЛЛ и ОМЛ.

Согласно представленным данным в общей группе пациентов с первичным ОЛЛ и ОМЛ снижение уровня γ -H2AX через 24 ч культивирования по сравнению с 3 ч было достоверным ($p = 0,0007$ и $p = 0,028$). У двух пациентов с рецидивами ОМЛ наблюдали аналогичные изменения.

Таким образом, при анализе данных, полученных для общей группы пациентов, через 3 ч после воздействия этопозиды и ИИ наблюдали достоверное увеличение количества клеток, экспрессирующих γ -H2AX, тогда как спустя 24 ч количество таких клеток достоверно снижается, что свидетельствует о работе системы репарации. Однако подобные закономерности не были выявлены при воздействии этопозиды для пациентов с первичными Т-линейными лейкозами, пациентов с рецидивами ОЛЛ.

Измерение уровней γ -H2AX в лейкомиических клетках пациентов после генотоксического воздействия может иметь прогностическое значение. Так, Eliot Marston et al. показали, что устойчивость лейкомииче-

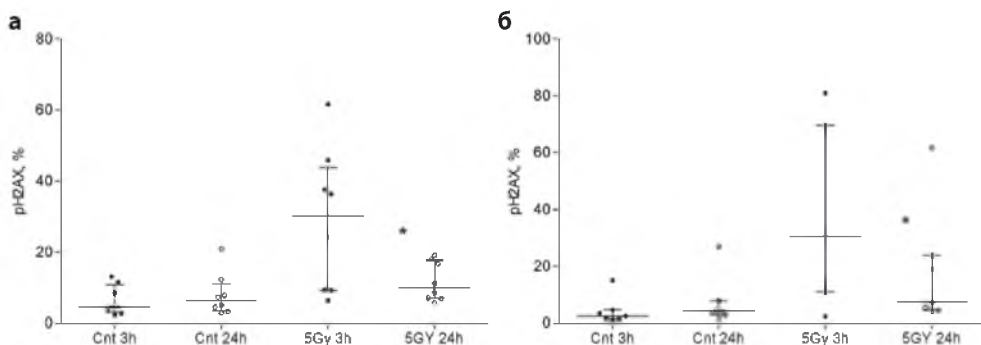


Рис. 8. Количество лейкомиических клеток с фосфорилированным γ -H2AX после облучения в группе пациентов с первичным ОЛЛ (а), в группе пациентов с первичным ОМЛ (б)

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с уровнем γ -H2AX через 3 ч культивирования.

ских клеток к ионизирующему излучению *in vitro* была ассоциирована с выявлением остаточных опухолевых клеток на 28-й день проводимой терапии [14]. Изучение, анализ и в последующем учет молекулярных механизмов развития резистентности опухолевых клеток к повреждающим агентам позволит контролировать ответ на терапию в процессе лечения, корректировать имеющиеся и разрабатывать принципиально новые схемы терапии лейкозов, в том числе на основе индивидуально подобранных доз и протоколов лечения.

■ ВЫВОДЫ

При использовании моделей клеточных линий и лейкоэмических клеток пациентов с острыми лейкозами для дальнейшего тестирования эффективности работы систем повреждения и репарации ДНК нами были проанализированы и подобраны следующие условия. Индукция повреждений ДНК с помощью эпопозида в дозе 10 мгк/мл, ионизирующего излучения в дозе 5 Gy. Для оценки динамики повреждения ДНК были выбраны временные точки: 0 ч – контрольная точка без воздействия; 3 ч после генотоксического воздействия – точка, когда наблюдается максимальное количество повреждения ДНК; 24 ч после генотоксического воздействия – точка, когда наблюдается снижение количества поврежденной ДНК, что необходимо для оценки эффективности работы систем репарации. Для детекции количества поврежденной ДНК нами был выбран метод проточной цитофлуориметрии и использование антител к фосфорилированному гистону γ -H2AX в комбинации с антителами к CD45 для точного выделения бластных клеток.

При исследовании вариабельности повреждения ДНК было показано, что после воздействия эпопозида и ИИ через 3 ч наблюдается увеличение количества клеток с γ -H2AX для общей группы пациентов с широким диапазоном минимального и максимального значений. Через 24 ч после используемых генотоксических воздействий для общей группы пациентов наблюдали достоверное снижение количества клеток с фосфорилированным γ -H2AX, что свидетельствует о работе системы репарации. Данные закономерности верны при использовании эпопозида в группе пациентов с первичным ОЛЛ, в группе с В-линейным ОЛЛ, тогда как в группе пациентов с рецидивами ОЛЛ значительного изменения уровня γ -H2AX при культивировании 24 ч не выявлено.

■ ЛИТЕРАТУРА

1. Mellor H.R., Callaghan R. (2008) Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response. *Pharmacology*, vol. 81, pp. 275–300.
2. Yang F., Kemp C.J., Henikoff S. (2015) Anthracyclines induce double-strand DNA breaks at active gene promoters. *Mutat Res.*, vol. 773, pp. 9–15.
3. Yang F., Teves S.S., Kemp C.J., Henikoff S. (2014) Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta*, vol. 1845, no 1, pp. 84–89.
4. Robak P., Robak T. (2013) Older and new purine nucleoside analogs for patients with acute leukemias. *Cancer Treat Rev.*, vol. 39, no 8, pp. 851–861.
5. Maier P., Hartmann L., Wenz F., Herskind C. (2016) Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int J Mol Sci*, vol. 14, no 17 (1). pii: E102. doi: 10.3390/ijms17010102.

6. Redon C., Pilch D., Rogakou E., Sedelnikova O., Newrock K., Bonner W. (2002) Histone H2AZ variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev.*, vol. 12, no 2, pp. 162–169.
7. Mah L-J., El-Osta A., Karagiannis T.C. (2010) γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*, vol. 24, pp. 679–686.
8. Huang X., Darzynkiewicz Z. (2006) Cytometric assessment of histone H2AX phosphorylation: a reporter of DNA damage. *Methods Mol Biol.*, vol. 314, pp. 73–80.
9. Sedelnikova O. (2008) γ H2AX and cancer. *Nature reviews*, vol. 8, pp. 957–967.
10. Tanaka T., Traganos F. (2007) Induction of ATM activation, histone H2AX phosphorylation and apoptosis by etoposide relation to cell cycle. *Cell Cycle*, vol. 6, no 3, pp. 371–376.
11. Tanaka T., Darzynkiewicz Z. (2007) Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry Part A*, pp. 648–661.
12. Kurose A., Dai W. (2005) Assessment of ATM phosphorylation on Ser-1981 induced by DNA topoisomerase 1 and 2 inhibitors in relation to Ser-139-histone H2AX phosphorylation, cell cycle phase, and apoptosis. *Cytometry Part A*, vol. 68A, pp. 1–9.
13. Redon C.E., Nakamura A.J., Sordet O., Dickey J.S., Gouliava K., Tabb B., Lawrence S., Kinders R.J., Bonner W.M., Sedelnikova O. (2011) γ -H2AX detection in peripheral blood lymphocytes, splenocytes, bone marrow, xenografts, and skin. *Methods Mol Biol.*, vol. 682, pp. 249–70.
14. Marston E., Weston V., Jesson J., Maina E., McConville C., Agathangelou A., Skowronska A., Mapp K., Sameith K., Powell J.E., Lawson S., Kearns P., Falciani F., Taylor M., Stankovic T. (2009) Stratification of pediatric ALL by in vitro cellular responses to DNA double-strand breaks provides insight into the molecular mechanisms underlying clinical response. *Blood*, vol. 113, no 1, pp. 117–126.

Поступила / Received: 08.08.2016

Контакты / Contacts: shman@oncology.by

Корж А.В.

Национальная медицинская академия последиplomного образования имени П. Л. Шупика, Киев, Украина

Korzh A.

P. Shupik National Medical of Post-Graduate Education, Kyiv, Ukraine

Содержание свободных фракций биогенных аминов в плазме крови, полученной различными методами плазмафереза

Content of free fraction of biogenic amines in the blood plasma, obtained by different plasmapheresis methods

Резюме

Исследованы образцы плазмы 34 первичных доноров (22 мужчины и 12 женщин), которые впервые сдавали плазму методом автоматического плазмафереза (контрольная группа наблюдения) и 152 активных донора плазмы крови (110 мужчин и 42 женщины), которые являлись кадровыми донорами с интервалом между донациями не менее 14 сут. Количество плазмодач у активных доноров-мужчин составляло в среднем $18,63 \pm 1,71$ при индивидуальных колебаниях показателя от 2 до 78, у женщин – $14,09 \pm 1,95$ при индивидуальных колебаниях показателя от 2 до 45. Активные доноры плазмы в зависимости от метода получения плазмы были распределены на 2 группы: метод мануального плазмафереза – 1-я группа наблюдения – 40 мужчин и 14 женщин; метод автоматического плазмафереза – 2-я группа наблюдения – 70 мужчин и 28 женщин. Группы обследованных были однородными по возрасту и полу. Гематологические и биохимические показатели определяли у всех обследованных и по заключению специалистов все были допущены к донации плазмы. Содержание свободных фракций биогенных аминов в плазме крови определяли флуориметрическим методом. Анализ полученных результатов показал, что в образцах донорской плазмы, полученной методом мануального плазмафереза, достоверно выше уровень свободного гистамина и свободного серотонина. Обсуждается значение полученных результатов.

Ключевые слова: плазмаферез, методы, доноры плазмы, гистамин, серотонин.

Abstract

The plasma samples of 34 primary donors (22 men and 12 women) for the first time given the plasma by automated plasmapheresis (control surveillance), and 152 active donors of blood plasma (110 men and 42 women) being donors with non-less 14 days interval between donations, have been examined. The active male donors' plasma averaged at 18.63 ± 1.71 with individual index fluctuations from 2 to 78, female donors' – 14.09 ± 1.95 with individual index fluctuations from 2 to 45. According to the method of plasma obtaining, the active plasma donors were divided into two groups: manual plasmapheresis method – I (first) observation group – 40 men and 14 women: