

# Потенциал использования определения двунитевых разрывов ДНК в различных областях медицины

Торгашина А.В., Лиля А.М.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт ревматологии им. В.А. Насоновой», Москва  
Россия, 115522, Москва, Каширское шоссе, 34А

*В статье рассмотрена актуальность определения двунитевых разрывов ДНК (ДРД) при помощи анализа фокусов  $\gamma$ -H2AX в качестве маркера нестабильности ДНК при различных состояниях организма. Освещены вопросы образования ДРД и особенности их выявления в различных тканях. Проанализированы изменения интенсивности образования ДРД при применении методов лучевой диагностики, стрессе, повышенных физических нагрузках, некоторых онкологических и ревматических заболеваниях, а также динамика восстановления ДНК на фоне различных методов терапии.*

**Ключевые слова:** геном; двуцепочечные разрывы ДНК; фокусы  $\gamma$ -H2AX.

**Контакты:** Анна Васильевна Торгашина; [anna.torgashina@gmail.com](mailto:anna.torgashina@gmail.com)

**Для ссылки:** Торгашина АВ, Лиля АМ. Потенциал использования определения двунитевых разрывов ДНК в различных областях медицины. Современная ревматология. 2023;17(3):96–103. DOI: 10.14412/1996-7012-2023-3-96-103

## *The potential use of DNA double-strand breaks detection in various fields of medicine*

*Torgashina A.V., Lila A.M.*

*V.A. Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow  
34A, Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia*

*The article discusses the relevance of determining DNA double-strand breaks (DSBs) using the analysis of  $\gamma$ -H2AX foci as a marker of DNA instability in various conditions. The issues of the formation of DSBs and the peculiarities of their detection in various tissues are highlighted. Changes in the intensity of DSBs formation during the use of radiological diagnostic methods, stress, increased physical exertion, some oncological and rheumatic diseases, as well as the dynamics of DNA repair on the background of various methods of therapy were analyzed.*

**Keywords:** genome; double-strand breaks in DNA; focuses  $\gamma$ -H2AX.

**Contact:** Anna Vasilievna Torgashina; [anna.torgashina@gmail.com](mailto:anna.torgashina@gmail.com)

**For reference:** Torgashina AV, Lila AM. The potential use of DNA double-strand breaks detection in various fields of medicine. *Sovremennaya Revmatologiya=Modern Rheumatology Journal*. 2023;17(3):96–103. DOI: 10.14412/1996-7012-2023-3-96-103

Геном человека подвергается повреждениям тысячи раз ежедневно. Это происходит как в результате обычных ошибок во время репликации ДНК, так и под действием эндогенных или экзогенных токсических факторов, которые блокируют процесс репликации и приводят к геномной нестабильности. Повреждение ДНК запускает многоступенчатый механизм репарации, который распознает дефекты ДНК во время клеточного цикла и восстанавливает ее целостность. Если же повреждение не было восстановлено, возникает мутация или запускается механизм апоптоза. Взаимодействие между механизмом восстановления ДНК и иммунным ответом активно изучается [1].

В последние годы в различных областях медицины внедряется персонализированный подход к лечению, который позволяет учитывать индивидуальную чувствительность пациентов к терапии. Большое внимание уделяется разделению больных на подгруппы на основании определения особых диагностических или прогностических маркеров внутри конкретной нозологии. Заметные успехи были достигнуты в онкологии. Гетерогенность опухолей представляла собой серьезное препятствие для назначения терапии. Сегодня значительный прогресс в лечении онкологических заболеваний

достигнут благодаря разработке индивидуальных молекулярных фармакогенетических профилей [2]. Функциональные тесты, оценивающие уровень индуцированного повреждения ДНК и ее способность к восстановлению, потенциально могут также использоваться в клинической практике. Реакция ДНК на повреждение может быть маркером индивидуальной чувствительности опухолевых клеток к химиотерапии и лучевой терапии. Кроме того, определение поражения ДНК может применяться для мониторинга эффективности терапии и корректировки графика проведения химиотерапии [3].

ДНК каждой клетки постоянно подвергается повреждению. Повреждения возникают как при репликации, так и под влиянием продуктов метаболизма, например активных форм кислорода. Кроме того, множество внешних факторов, таких как ионизирующее и ультрафиолетовое излучение, различные токсины, способны вызывать нарушения в структуре ДНК [4]. Повреждения ДНК накапливаются на протяжении жизни и приводят к изменению хроматина в различных типах клеток, в том числе в тканеспецифичных стволовых клетках. Данный феномен может лежать в основе старения, онкогенеза и развития многих хронических заболеваний [5, 6]. В онкологии в основе действия химиотерапии также лежит

индукция повреждения ДНК опухолевых клеток. Один из самых тяжелых типов повреждения ДНК — двухцепочечные, или двунитевые, разрывы ДНК (ДРД).

Существует множество специфических механизмов восстановления целостности ДНК. Самым ранним ответом на возникновение ДРД является фосфорилирование гистона H2AX (H2AX) в непосредственной близости от места разрыва. Фосфорилирование, которое происходит под действием киназ, распространяется по хромосоме, выделяя поврежденный домен. Это первая ступень восстановления ДНК. Фосфорилирование H2AX и образование  $\gamma$ -H2AX в ответ на повреждение ДНК осуществляется как в покоящихся клетках, так и во время митоза [7]. Клетки с недостаточным количеством  $\gamma$ -H2AX восстанавливаются медленнее и впоследствии имеют грубые хромосомные перестройки, что подчеркивает важную роль  $\gamma$ -H2AX в поддержании стабильности генома [8]. Фосфорилирование H2AX также может быть индуцировано экспериментально клеточным стрессом, ультрафиолетовым излучением, применением радиации, радиоимитических веществ [9]. В ядре клетки  $\gamma$ -H2AX формируют очаги повреждения, которые могут быть визуализированы с помощью различных методик. Число данных фокусов в ядре отражает уровень ДРД, т. е. каждый очаг находится в месте разрыва. После успешного восстановления ДРД молекулы  $\gamma$ -H2AX дефосфорилируются, и очаги  $\gamma$ -H2AX более не выявляются [10].

Кинетика образования и исчезновения очагов  $\gamma$ -H2AX хорошо изучена. В норме формирование фокусов занимает несколько минут после повреждения ДНК, они достигают максимальной выраженности через 30 мин, после чего экспрессия фокусов уменьшается вплоть до их полного исчезновения в течение 24 ч. Период полужизни фокусов  $\gamma$ -H2AX составляет 2–7 ч в зависимости от типа клеток. Этот показатель может быть иным в дефектных клетках пациентов с опухолевыми заболеваниями, а также пациентов, получающих лучевую терапию [9]. Выделяют два типа фокусов  $\gamma$ -H2AX. *Первый тип* — преходящие очаги, которые связаны с быстрым восстановлением разрыва ДНК с последующим быстрым дефосфорилированием. Эти очаги выявляются в интервале от нескольких минут до нескольких часов после повреждения. *Второй тип* — остаточные или персистирующие очаги, которые сохраняются несколько дней или месяцев. Наличие персистирующих  $\gamma$ -H2AX указывает либо на замедление процесса восстановления ДНК, либо на полное отсутствие репарации в связи с клеточным старением, апоптозом [11].

Наличие небольших дефектов восстановления поврежденной ДНК в течение длительного времени способствует накоплению невосстановленных ДРД и персистенции  $\gamma$ -H2AX. Измерение остаточных фокусов может использоваться в дозиметрии для определения клеточной чувствительности к ионизирующему излучению. Остаточные, персистирующие ДРД могут быть предиктором поздней смертности от лучевой терапии [12]. Таким образом, анализ  $\gamma$ -H2AX может применяться в разные моменты времени: для изучения исходного повреждения, кинетики репарации или остаточного повреждения [13].

Еще один важный маркер восстановления ДНК — белок 53BP1, который связывается с  $\gamma$ -H2AX и регулирует восстановление ДНК. Недостаточное рекрутирование репарационных белков к местам повреждения ДНК приводит к утрате или замедлению формирования «репаративного комплекса»

ДНК, что можно зафиксировать либо по отсутствию очагов 53BP1, либо по неспособности завершить процесс «ремонта» своевременно. Следовательно, очаги 53BP1 выступают в качестве биомаркера целостности восстановительного каскада, в то время как  $\gamma$ -H2AX может свидетельствовать о других скомпromетированных процессах репарации. Объединив анализ  $\gamma$ -H2AX и 53BP1 и определив их совместную локализацию, можно оценить восстановительную способность клетки [14].

В литературе имеются данные об экспрессии  $\gamma$ -H2AX различных типов клеток: в толстом кишечнике, молочной железе, печени, почках, фибробластах, эпителиальных клетках слизистой оболочки щеки, мононуклеарах периферической крови, а также во многих первичных и культивируемых опухолевых клетках. Разные типы клеток имеют разные базальные уровни  $\gamma$ -H2AX [9]. Для исследований хорошо подходят лимфоциты периферической крови, имеющие ряд существенных преимуществ перед другими типами клеток. Во-первых, достаточное количество этих клеток можно без труда получить как до, так и после воздействия. Для проведения анализа необходимо только 1–2 мл крови. Во-вторых, лимфоциты периферической крови имеют низкий исходный уровень экспрессии  $\gamma$ -H2AX с минимальной гетерогенностью между клетками. Кроме того, имеется ряд практических преимуществ: относительно короткое время (менее 2 дней), необходимое для выделения, окрашивания и анализа образца [15].

#### Флюоресцентный метод определения повреждений ДНК

Наиболее современный метод оценки ДРД — иммунофлюоресценция с определением фосфорилированного гистона  $\gamma$ -H2AX [16];  $\gamma$ -H2AX и 53BP1 маркируются флюоресцентными антителами, что позволяет обнаружить разрывы ДНК. Флюоресцентный сигнал имеет вид светящейся точки (пикселя). Скопления флюоресцентно меченных антител к  $\gamma$ -H2AX и 53BP1 принято называть фокусами соответствующих белков. Анализ очагов  $\gamma$ -H2AX является признанным методом определения повреждений ДНК. Механизмы репарации ДНК, напротив, могут оцениваться по количеству связывающего белка p53 (53BP1). При использовании таких методов требуется анализ большого числа изображений, который является крайне сложной задачей. Поскольку ручной подсчет параметров флюоресценции занимает неприемлемо много времени, сегодня активно развиваются алгоритмы автоматического анализа флюоресцентных изображений. Количественное определение очагов с помощью цифровой иммунофлюоресценции — очень чувствительный метод, позволяющий оценить как отдельные клетки, так и отдельные очаги. Эти параметры могут быть измерены и полностью отображены автоматически с помощью AKLIDES® Cell Damage [17].

Флюоресцентная микроскопия — наиболее чувствительный метод, способный обнаружить даже крайне малое количество фокусов на ячейку. Поэтому она особенно удобна в тех случаях, когда клетки экспрессируют малое число  $\gamma$ -H2AX. Другим преимуществом флюоресцентной микроскопии является возможность исследования сразу нескольких белков, участвующих в цикле восстановления ДНК, а также возможность изучения пространственного распределения отдельных фокусов экспрессии этих белков. Кроме того, данный метод позволяет вместо относительных значений интенсивности или качественных описаний определять содержание фокусов  $\gamma$ -H2AX в абсолютных числах в каждой клетке. Это

особенно важно, так как количественные значения более удобны для проведения статистических расчетов [18].

В популяционных исследованиях, оценивающих репарацию ДНК, время от генотоксического воздействия до проведения анализа легко контролируется, поскольку индукция повреждения обычно выполняется *in vitro*. В эпидемиологических исследованиях, напротив, стандартизировать время, прошедшее до момента получения проб, довольно сложно [9].

#### ДРД и факторы внешней среды

К сожалению, работ, посвященных оценке токсического воздействия на геном различных факторов внешней среды или вредных привычек, крайне мало. К примеру, увеличение уровня  $\gamma$ -H2AX было обнаружено *in vitro* после использования повреждающих ДНК веществ: тяжелых металлов, полициклических ароматических углеводородов, нефтепродуктов. При изучении влияния на кератиноциты человека фототоксических соединений и ультрафиолетового излучения отмечено появление ДРД даже при воздействии низких их доз [19]. В то же время излучение мобильного телефона, работающего в диапазоне 900 мГц в течение 30 мин, не оказывало существенного воздействия на лимфоциты здоровых доноров [20].

*In vivo* было выявлено существенное повышение числа ДРД в клетках букального эпителия у токсикоманов и курящих подростков по сравнению с подростками того же возраста без вредных привычек. Микроволны от мобильных телефонов UMTS/GSM также влияют на формирование очагов репарации ДНК. Влияние микроволн GSM на очаги репарации было более выраженным, зависело от частоты диапазона и типа сигнала и проявлялось в виде дисбаланса между повреждением и репарацией ДНК. Подавление формирования очагов репарации ДНК было стойким и сохранялось до 3 сут после часового воздействия микроволн мобильных телефонов UMTS/GSM [21].

Мониторинг повреждений ДНК, вызванных свободными радикалами кислорода в организме профессиональных спортсменов, может быть надежным методом контроля индивидуальной тренировочной нагрузки. В одном из исследований пробы крови спортсменов, взятые в состоянии покоя и после завершения тренировочных заездов на 5, 10, 21 и 42 км, исследовались с помощью AKLIDES® Cell Damage. Было обнаружено, что каждый участник индивидуально реагировал на нагрузку, а количество разрывов ДНК сильно возрастало с увеличением нагрузки. Система AKLIDES® Cell Damage позволяет получить ценную информацию о повреждении ДНК клеток, вызванном физическими упражнениями, а также о возможности индивидуального контроля адаптационных способностей организма к постоянно увеличивающимся тренировочным нагрузкам [22].

Предпринимались попытки выяснить механизм влияния хронического стресса на здоровье человека. Связанные со стрессом воздействия на организм решено было определить количественно по уровню экспрессии  $\gamma$ -H2AX. Было выявлено существенное повышение частоты ДРД у пациентов с посттравматическим стрессовым расстройством [23]. Эти данные продемонстрировали возможность количественного определения и оценки субъективного воздействия стресса на здоровье человека с помощью объективных медицинских параметров.

Образование очагов  $\gamma$ -H2AX, индуцированное радиацией, хорошо изучено, в то время как исследований ДРД при старении сравнительно мало. Нарушение процессов репарации при синдроме ускоренного старения ведет к развитию различных заболеваний: болезни Альцгеймера, диабета, рака простаты, прогерии. Повреждения ДНК накапливаются с возрастом и могут способствовать возникновению перечисленных заболеваний или быть их следствием [24].

Пока не опубликовано ни одного профессионального эпидемиологического исследования, в котором используется определение фокусов  $\gamma$ -H2AX для выявления ДРД. Вероятно, это связано как с новизной анализа, так и с отсутствием стандартизированного протокола, который позволяет воспроизводить результаты и проводить межлабораторные сравнения.

#### ДРД в онкологии

Известно, что нарушение механизмов репарации ДРД и последующее накопление мутаций в геноме лежат в основе предрасположенности к развитию опухолевых заболеваний. При определении частоты спонтанных ДРД в опухолевых клетках различных органов, а также в непораженных опухолевым процессом тканях у тех же больных было высказано предположение, что повышение уровня эндогенного  $\gamma$ -H2AX характерно именно для культур опухолевых клеток и предопухолевых состояний. Авторы исследовали 30 биоптатов опухолевых тканей кишечника, яичников, печени, почек и образцы здоровых тканей этих больных. В результате было установлено, что повышение частоты ДРД наблюдается именно в опухолевых клетках. Было предложено рассмотреть определение  $\gamma$ -H2AX в качестве маркера для раннего опухолевого скрининга [25].

При изучении частоты распространения  $\gamma$ -H2AX в ткани рака яичников было обнаружено, что данный маркер может быть полезен как для установления диагноза на ранней стадии, так и для выделения подгруппы больных с высоким риском прогрессирования заболевания. Экспрессия  $\gamma$ -H2AX в опухолевых клетках была существенно выше, чем в здоровых тканях. Кроме того, при резистентности к терапии высокая экспрессия  $\gamma$ -H2AX наблюдалась в 80% случаев, в то время как при хорошем ответе на лечение — в 53% ( $p=0,025$ ). Повышение экспрессии  $\gamma$ -H2AX коррелировало с более коротким периодом безрецидивной ремиссии, но не влияло на общую выживаемость [26]. Подобные результаты были получены и у больных меланомой [27]. Увеличение экспрессии  $\gamma$ -H2AX в тканях опухолей эндометрия коррелировало с классическими прогностическими факторами, такими как стадия и гистологический тип опухоли, а также безрецидивная и общая выживаемость [28]. В другом исследовании существенное увеличение частоты фокусов  $\gamma$ -H2AX являлось независимым прогностическим маркером выживаемости у больных с немелкоклеточным раком легкого и ассоциировалось с более чем двукратным увеличением риска смертельного исхода [29]. Таким образом, экспрессия  $\gamma$ -H2AX может быть полезным диагностическим и прогностическим маркером у больных с различными опухолевыми заболеваниями.

Эффективность многих химиотерапевтических средств основана на разрушении быстро делящихся опухолевых клеток путем провоцирования различных видов повреждения ДНК, из которых ДРД являются наиболее разрушительными.

Определение фокусов  $\gamma$ -H2AX может использоваться для мониторинга восстановления ДНК после лучевого воздействия, для выявления нестабильности генома в опухолевых клетках [30]. Было показано, что число фокусов  $\gamma$ -H2AX в опухолевых клетках даже до применения лучевой терапии существенно выше, чем в нормальных, здоровых клетках. В ряде работ этот показатель исследовали до и после применения различных методов противоопухолевой терапии. Установлено, что уже через 30 мин после лучевой терапии число фокусов поражения ДНК увеличивалось в десятки раз. Далее наблюдалось уменьшение содержания  $\gamma$ -H2AX, не доходившее, однако, до исходного уровня в течение последующих 1–3 сут [31].

Большой проблемой при лечении неопластических заболеваний является меняющаяся со временем реакция больных на лечение. Развитие множественной лекарственной резистентности связывают с функционированием в мембранах клеток особых транспортных каналов/насосов, с помощью которых происходит отток лекарственных препаратов из клетки. Избыточная функциональная активность этих каналов в опухолевых клетках может привести к усилению выведения из них лекарственных средств, что, в свою очередь, снижает терапевтическую эффективность [32]. Наиболее полно охарактеризован канал Р-гликопротеин (Р-gp), участвующий в переносе экзогенных и эндогенных токсических соединений из клетки [33]. Этот транспортер экспрессируется в том числе и на лимфоцитах и играет важную роль в развитии и функционировании иммунных клеток, способствует формированию резистентности к терапии при аутоиммунных заболеваниях, ВИЧ-инфекции, лейкемии [34, 35]. С транспортным каналом Р-gp взаимодействуют многие лекарственные средства, некоторые из них, например циклоспорин А и рапамицин, способны подавлять его активность, приводя к внутриклеточному обогащению лекарственным препаратом [36]. Повышение концентрации лекарства внутри клетки ведет к усилению его повреждающего действия и, как следствие, к повышению уровня ДРД. Было показано, что сами по себе циклоспорин А и рапамицин не влияют на уровень очагов  $\gamma$ -H2AX в обработанных ими клетках. В то же время при обработке клеток только этопозидом число очагов  $\gamma$ -H2AX увеличилось по сравнению с исходным уровнем. Когда клетки обрабатывали как этопозидом, так и циклоспорином А (или рапамицином), снижалась скорость оттока лекарственного средства из клетки и усиливалось его повреждающее действие. В результате наблюдалось дальнейшее увеличение числа и интенсивности очагов  $\gamma$ -H2AX [37].

Влияние на активность транспортера различных препаратов было протестировано в ряде доклинических и клинических испытаний. К сожалению, одобренные Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (Food and Drug Administration, FDA) верапамил и циклоспорин А при добавлении к химиотерапии для преодоления резистентности существенно усиливали ее токсичность и ухудшали переносимость [38]. Ведутся поиски новых методов преодоления лекарственной резистентности.

#### ДРД и методы лучевой диагностики

В последние годы отмечается постоянное увеличение частоты назначения таких современных методов лучевой

диагностики, как компьютерная томография (КТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ). Вопросы безопасности проведения данных диагностических процедур, неблагоприятные реакции, которые могут спровоцировать контрастные вещества, вызывают определенную обеспокоенность. Как сами электромагнитные поля, так и аккумуляция контрастного вещества в тканях могут привести к нестабильности генома. Было проведено несколько исследований, посвященных этому вопросу.

В одних работах было показано увеличение числа очагов повреждения ДНК лимфоцитов человека после МРТ [39–42], в других эти данные не нашли подтверждения [43–45]. До сих пор нет четких доказательств МРТ-индуцированного поражения ДНК, в том числе при использовании контрастного усиления [46].

В одной из работ частота ДРД определялась исходно, через 5 и 30 мин после МРТ у 43 пациентов. В части случаев МРТ выполнялась с введением контрастного вещества, а еще у 10 пациентов определение ДРД проводилось после КТ. В ходе исследования было установлено, что МРТ не влияла на частоту ДРД, в то время как после КТ отмечалось значимое увеличение поражения ДНК [45].

М. Fatahi и соавт. [44] обследовали сотрудников отделения лучевой диагностики, подвергающихся частому (суммарно более сотни часов) воздействию магнитного поля 3–7Т. Средний уровень экспрессии  $\gamma$ -H2AX у них не отличался от такового у здоровых доноров. Дополнительное воздействие *in vitro* магнитным полем 7Т также существенно не повлияло на частоту ДРД.

#### ДРД и наследственные заболевания

Одной из важнейших областей применения определения ДРД в клинической практике является выявление пациентов с наследственными симптомами генетической нестабильности. При данных состояниях дефекты процесса репарации ДНК обуславливают высокий риск развития злокачественных опухолей и гиперчувствительность к генотоксическим факторам, в том числе к лучевой терапии. Атаксия-телеангиоэктазия – генетическое заболевание, которое наследуется по аутосомно-рецессивному типу и характеризуется спонтанной хромосомной нестабильностью, повышенной чувствительностью клеток к радиации. Большинство этих пациентов отличаются сниженной кинетикой восстановления ДНК после облучения клеток *ex vivo*. Пациенты с гетерозиготной мутацией имеют умеренный риск развития опухолевых заболеваний и повышения радиочувствительности, носители гомозиготной мутации страдают от иммунодефицита, нейромоторной дисфункции, характеризуются высоким риском канцерогенеза и фатальной гиперчувствительностью к ионизирующей радиации [47]. С.Е. Rube и соавт. [48] оценивали уровень повреждения ДНК у детей с опухолевыми заболеваниями и в контрольной группе (здоровые дети). У 3 детей сохранялось повышение экспрессии  $\gamma$ -H2AX, а следовательно, замедление репарации ДНК через 5 ч после лучевой терапии. У 2 из них развились тяжелые постлучевые осложнения.

Персистирующие фокусы  $\gamma$ -H2AX являются перспективным биомаркером для прогнозирования радиочувствительности при наследственных заболеваниях. Однако для использования в рутинной лабораторной диагностике этих диагностических тестов необходимы стандартизация и валидация методики.

**Определение ДРД в ревматологии**

Системные аутоиммунные заболевания (АЗ) — гетерогенная группа нозологий, характеризующаяся нарушением иммунного ответа на собственные антигены организма, выработкой широкого спектра аутоантител и поражением различных органов и систем. Нарушения системы репарации повреждений ДНК описаны у больных с различными АЗ: системной красной волчанкой (СКВ), системной склеродермией (ССД), ревматоидным артритом (РА) [49]. Однако исследований, посвященных определению ДРД при ревматических болезнях, крайне мало и проведены они, как правило, на небольших группах больных. В настоящее время неясно, является ли повышенный уровень ДРД при АЗ причиной заболевания, фактором патогенеза или его следствием.

При СКВ наблюдаются снижение толерантности к ядерным антигенам, выработка множества аутоантител, ключевыми из которых считаются антитела к двуспиральной ДНК. Нарушение регуляции процессов апоптоза при СКВ ведет к накоплению разрушенных клеток и еще большему образованию аутоантител.

Первое исследование различных параметров образования и репарации ДРД при СКВ было проведено R.C. Davies и соавт. [50]. Из образцов периферической крови 9 пациентов детского возраста были выделены В-лимфоциты, которые затем трансформировали вирусом Эпштейна—Барр. Такая трансформация позволила нивелировать эффекты иммуносупрессивной терапии, которую получали пациенты. Уровень и кинетика формирования фокусов  $\gamma$ -H2AX определялись исходно, через 15 мин, 5 и 24 ч после облучения дозой 3 Гр. Ни в одной точке не было выявлено различий между контрольной и экспериментальной группой. Через 24 ч частота ДРД вернулась к первоначальной в обеих группах. Причем во всех клеточных образцах после облучения обнаружено формирование фокусов 53BP1 в нормальных пропорциях. Распределение фокусов 53BP1 и  $\gamma$ -H2AX не отличалось от такового в группе контроля. При оценке всех параметров нарушение восстановления ДНК после облучения обнаружено у 3 из 9 пациентов с СКВ [50]. В дальнейшем было бы интересно отдельно оценить течение заболевания у больных с нарушением репарации ДНК.

V.L. Souliotis и P.P. Sfikakis [51] наблюдали 6 пациентов с волчаночным нефритом (ВН) и высоким уровнем антител к ДНК. При ВН уровень поражения ДНК исходно был в 5 раз выше, чем в контроле. Количество фокусов  $\gamma$ -H2AX также было существенно выше у больных СКВ и не зависело от длительности и активности заболевания, гистологического типа нефрита и проводимой терапии. Воздействие *ex vivo* на клетки такими генотоксическими препаратами, как мелфалан и цисплатин, привело к увеличению числа ДРД, более выраженному при СКВ, чем в контроле. Причем для повреждения ДНК у больных СКВ требовались более низкие дозы этих препаратов. Данное наблюдение, по мнению авторов, демонстрирует, что накопление ДРД в мононуклеарных клетках крови у больных ВН было связано с усилением апоптоза и непосредственно с патогенезом СКВ [51].

В исследовании R. Namas и соавт. [52] приняли участие 18 пациентов с СКВ, 8 — с РА и 15 здоровых лиц (группа контроля). ДРД определяли с помощью подсчета фокусов  $\gamma$ -H2AX в различные фазы клеточного цикла, а также после оксидативного стресса, который был индуцирован перекисью водорода. Обнаружено существенное увеличение количества ДРД в CD4+, CD8+ Т-лимфоцитах и моноцитах при СКВ

по сравнению с аналогичным показателем в контроле и у больных РА. Число ДРД не зависело от фазы клеточного цикла и коррелировало с активностью заболевания. Оксидативный стресс индуцировал накопление ДРД только у пациентов с СКВ [52].

Появление значительных изменений ДНК может быть следствием более высокой чувствительности ДНК к повреждению или снижения скорости и эффективности восстановления этих повреждений. Оба варианта не являются взаимоисключающими и могут сочетаться. К примеру, выявлено замедление восстановления ДНК лейкоцитов у больных СКВ после облучения или оксидативного стресса [53]. Вместе с тем известно, что некоторые внутриклеточные процессы при СКВ сами по себе индуцируют ДРД. Сайты репарации ДНК, а также белки, участвующие в репарации, такие как Ku-белок, PARG-1, некоторые киназы и лигазы, могут стать самостоятельными мишенями для аутоантител [54]. Плохая переносимость ультрафиолетовых лучей при СКВ также способствует повышенному образованию ДРД. E. Schmidt и соавт. [55] предположили, что индуцированные инсоляцией апоптоз и некроз кератиноцитов стимулируют образование иммунных комплексов и антител к ДНК. По мнению авторов, ультрафиолетовое излучение при СКВ не только отрицательно влияет на кожу, но и может усугублять поражение внутренних органов, являясь индуктором обострения.

Дефекты репарации ДНК описаны также у больных с другими аутоиммунными заболеваниями. Так, при РА у навивных CD4+ CD45 RA+ Т-лимфоцитов поражение ДНК и степень апоптоза были существенно выше, чем в контроле. После облучения этих клеток наблюдалось ослабление и замедление восстановления ДРД [56].

V.L. Souliotis и соавт. [57] изучали восстановление ДНК у 18 больных РА на фоне различных вариантов терапии. Исходно при РА было выявлено трехкратное увеличение уровня поражения ДНК периферических мононуклеаров (с учетом как двуцепочечных, так и одноцепочечных разрывов). После 12 нед терапии (глюкокортикоиды, метотрексат и ингибиторы фактора некроза опухоли  $\alpha$  в различных сочетаниях) у всех больных уровень эндогенного повреждения ДНК достиг такового в контрольной группе.

G. Galita и соавт. [58] оценивали репаративные способности периферических мононуклеаров у больных РА после воздействия на клетки трет-бутилгидропероксида, блеомицина, метилметансульфоната и ультрафиолетового излучения. Как и в прочих исследованиях, частота ДРД исходно была выше в группе РА. При воздействии *ex vivo* на клетки канцерогенных веществ количество ДРД увеличилось как в основной, так и в контрольной группе. Однако при РА была обнаружена значимо более высокая чувствительность к воздействию.

Повышение частоты ДРД наблюдается также у больных с ССД, независимо от типа заболевания или проводимой терапии. У этих пациентов был обнаружен также полиморфизм генов белков репарации, что ассоциируется со снижением скорости восстановления поврежденной ДНК [59].

Таким образом, как при СКВ, так и при РА в большинстве исследований выявляется накопление эндогенных ДРД, а также наблюдается более высокая чувствительность ДНК к повреждению различными экзогенными генотоксическими факторами. Определение ДРД может быть полезно для понимания патогенеза заболеваний, контроля за эффективностью терапии и определения риска обострения.

**З а к л ю ч е н и е**

Разработка нового биомаркера и его внедрение в рутинную клиническую практику — длительный и очень сложный процесс. Преимущество маркера должно быть доказано в тщательно организованных клинических испытаниях, учитывающих различные гендерные, возрастные аспекты и специфику исследуемых тканей. Таким образом, диагностика ДРД путем определения фокусов  $\gamma$ -H2AX должна быть хорошо стандартизирована и автоматизирована.

Однако стоит помнить о некоторых ограничениях данного метода, которые нужно учитывать при интерпретации результатов. Так, экспрессия  $\gamma$ -H2AX не в полной

мере соответствует реальному наличию ДРД, а лишь регистрирует клеточную метаболическую активность, оптимизирующую восстановление ДНК. Кроме того, анализ фокусов  $\gamma$ -H2AX не позволяет выяснить, восстановлена ли молекула ДНК в своем первоначальном состоянии. Данные факты не умоляют достоинств метода. Определение ДРД на основании анализа фокусов  $\gamma$ -H2AX крайне интересно для предсказания нестабильности генома, восприимчивости к опухолевым заболеваниям, лекарственной неэффективности и, соответственно, для разработки индивидуальных режимов терапии, в том числе ревматических заболеваний.

**Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S**

- Saez GT. DNA Damage and Repair in Degenerative Diseases 2016. *Int J Mol Sci*. 2017 Jan 16;18(1):166. doi: 10.3390/ijms18010166.
- Cirkel GA, Gadelalaa-van Hooijdonk CG, Koudijs MJ, et al. Tumor heterogeneity and personalized cancer medicine: are we being outnumbered? *Future Oncol*. 2014 Feb; 10(3):417-28. doi: 10.2217/fon.13.214.
- Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids*. 2010 Aug 3;2010:920161. doi: 10.4061/2010/920161.
- Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):366-74. doi: 10.1038/35077232.
- Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med*. 2009 Oct 8;361(15):1475-85. doi: 10.1056/NEJMra0804615.
- Schuler N, Rube CE. Accumulation of DNA Damage-Induced Chromatin Alterations in Tissue-Specific Stem Cells: The Driving Force of Aging? *PLoS One*. 2013 May 17;8(5):e63932. doi: 10.1371/journal.pone.0063932. Print 2013.
- Giunta S, Belotserkovskaya R, Jackson SP. DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *J Cell Biol*. 2010 Jul 26;190(2):197-207. doi: 10.1083/jcb.200911156.
- Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, et al. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*. 2002 May 3;296(5569):922-7. doi: 10.1126/science.1069398. Epub 2002 Apr 4.
- Valdiglesias V, Giunta S, Fenech M. gH2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat Res*. 2013 Jul-Sep;753(1):24-40. doi: 10.1016/j.mrrev.2013.02.001. Epub 2013 Feb 13.
- Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, et al. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gH2AX antibody. *Radiat Res*. 2002 Oct;158(4):486-92. doi: 10.1667/0033-7587(2002)158[0486:qdoiid]2.0.co;2.
- Siddiqui MS, Francois M, Fenech MF, et al. Persistent H2AX: A promising molecular marker of DNA damage. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015 Oct-Dec;766:1-19. doi: 10.1016/j.mrrev.2015.07.001. Epub 2015 Jul 21.
- Buchali A, Heiserich L, Bauer P. Baseline H2AX foci, 53BP1 values and late morbidity after definitive radio-chemotherapy in head and neck carcinoma patients. *J Solid Tumors*. 2017;7(2):7-13. doi: 10.5430/jst.v7n2p7.
- Koch U, Höhne K, von Neubeck C, et al. Residual H2AX foci predict local tumour control after radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2013 Sep;108(3):434-9. doi: 10.1016/j.radonc.2013.06.022. Epub 2013 Jul 25.
- Ivashkevich A, Redon CE, Nakamura AJ, et al. Use of the  $\gamma$ -H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Lett*. 2012 Dec 31;327(1-2):123-33. doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.025. Epub 2011 Dec 21.
- Sak A, Grehl S, Erichsen P, et al. gH2AX foci formation in peripheral blood lymphocytes of tumor patients after local radiotherapy to different sites of the body: dependence on the dose-distribution, irradiated site and time from start of treatment. *Int J Radiat Biol*. 2007 Oct;83(10):639-52. doi: 10.1080/09553000701596118.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 1998 Mar 6;273(10):5858-68. doi: 10.1074/jbc.273.10.5858.
- Runge R, Hiemann R, Wendisch M, et al. Fully automated interpretation of ionizing radiation induced H2AX foci by the novel pattern recognition system AKLIDES®. *Int J Radiat Biol*. 2012 May;88(5):439-47. doi: 10.3109/09553002.2012.658468. Epub 2012 Mar 26.
- Reddig A, Rube CE, Rödiger S. DNA damage assessment and potential applications in laboratory diagnostics and precision medicine. *J Lab Precis Med*. 2018 Apr;3(4):31. doi: 10.21037/jlpm.2018.03.06.
- Toyooka T, Ishihama M, Ibuki Y. Phosphorylation of histone H2AX is a powerful tool for detecting chemical photogenotoxicity. *J Invest Dermatol*. 2011 Jun;131(6):1313-21. doi: 10.1038/jid.2011.28. Epub 2011 Mar 3.
- Danese E, Lippi G, Buonocore R. Mobile phone radiofrequency exposure has no effect on DNA double strand breaks (DSB) in human lymphocytes. *Ann Transl Med*. 2017 Jul;5(13):272. doi: 10.21037/atm.2017.04.35.
- Belyaev IY, Markova E, Hillert L, et al. Microwaves from UMTS/GSM mobile phones induce long-lasting inhibition of 53BP1/gamma-H2AX DNA repair foci in human lymphocytes. *Bioelectromagnetics*. 2009 Feb; 30(2):129-41. doi: 10.1002/bem.20445.
- Lippi G, Buonocore R, Tarperi C, et al. DNA injury is acutely enhanced in response to increasing bulks of aerobic physical exercise. *Clin Chim Acta*. 2016 Sep 1;460:146-51. doi: 10.1016/j.cca.2016.06.041. Epub 2016 Jun 30.
- Morath J, Moreno-Villanueva M, Humami G, et al. Effects of Psychotherapy on DNA Strand Break Accumulation Originating from Traumatic Stress. *Psychother Psychosom*. 2014; 83(5):289-97. doi: 10.1159/000362739. Epub 2014 Aug 6.
- Schurman SH, Dunn CA, Greaves R, et al. Age-related disease association of endogenous gamma-H2AX foci in mononuclear cells derived from leukapheresis. *PLoS One*. 2012;7(9):e45728. doi: 10.1371/journal.pone.0045728. Epub 2012 Sep 21.
- Sedelnikova OA, Bonner WM. H2AX in Cancer Cells A Potential Biomarker for Cancer Diagnostics, Prediction and Recurrence. *Cell Cycle*. 2006 Dec;5(24):2909-13. doi: 10.4161/cc.5.24.3569. Epub 2006 Dec 15.
- Mei L, Hu Q, Peng J, et al. Phospho-histone H2AX is a diagnostic and prognostic

- marker for epithelial ovarian cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 May 1;8(5):5597-602. eCollection 2015.
27. Warters RL, Adamson PJ, Pond CD, et al. Melanoma cells express elevated levels of phosphorylated histone H2AX foci. *J Invest Dermatol.* 2005 Apr;124(4):807-17. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23674.x.
28. Brunner AH, Hinterholzer S, Riss P, et al. Expression of  $\gamma$ -H2AX in endometrial carcinomas: an immunohistochemical study with p53. *Gynecol Oncol.* 2011 Apr;121(1):206-11. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.11.037. Epub 2010 Dec 23.
29. Matthaios D, Foukas PG, Kefala M, et al.  $\gamma$ -H2AX expression detected by immunohistochemistry correlates with prognosis in early operable non-small cell lung cancer. *Oncotargets Ther.* 2012;5:309-14. doi: 10.2147/OTT.S36995. Epub 2012 Oct 30.
30. Nagelkerke A, van Kuijk SJ, Martens JW, et al. Poor prognosis of constitutive  $\gamma$ -H2AX expressing triple negative breast cancers is associated with telomere length. *Biomark Med.* 2015;9(4):383-90. doi: 10.2217/bmm.15.2.
31. Siddiqui MS, Francois M. Persistent  $\gamma$ H2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2015 Oct-Dec;766:1-19. doi: 10.1016/j.mrrev.2015.07.001. Epub 2015 Jul 21.
32. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jan;2(1):48-58. doi: 10.1038/nrc706.
33. Shukla S, Ohnuma S, Ambudkar SV. Improving cancer chemotherapy with modulators of ABC drug transporters. *Curr Drug Targets.* 2011 May;12(5):621-30. doi: 10.2174/138945011795378540.
34. Lee CG, Gottesman MM, Cardarelli CO, et al. HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter. *Biochemistry.* 1998 Mar 17;37(11):3594-601. doi: 10.1021/bi972709x.
35. Van de Ven R, Oerlemans R, van der Heijden JW, et al. ABC drug transporters and immunity: novel therapeutic targets in autoimmunity and cancer. *J Leukoc Biol.* 2009 Nov;86(5):1075-87. doi: 10.1189/jlb.0309147. Epub 2009 Sep 10.
36. Aouali N, Eddabra L, Macadre J. Immunosuppressors and reversion of multidrug-resistance. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005 Oct;56(1):61-70. doi: 10.1016/j.critrevonc.2004.12.010.
37. Reddig A, Lorenz S, Hiemann R, et al. Assessment of modulated cytostatic drug resistance by automated  $\gamma$ H2AX analysis. *Cytometry A.* 2015 Aug;87(8):724-32. doi: 10.1002/cyto.a.22667. Epub 2015 Apr 2.
38. Xia CQ, Smith PG. Drug efflux transporters and multidrug resistance in acute leukemia: therapeutic impact and novel approaches to mediation. *Mol Pharmacol.* 2012 Dec;82(6):1008-21. doi: 10.1124/mol.112.079129. Epub 2012 Jul 23.
39. Simi S, Ballardin M, Casella M, et al. Is the genotoxic effect of magnetic resonance negligible? Low persistence of micronucleus frequency in lymphocytes of individuals after cardiac scan. *Mutat Res.* 2008 Oct 14;645(1-2):39-43. doi: 10.1016/j.mrfmm.2008.08.011. Epub 2008 Aug 30.
40. Lee JW, Kim MS, Kim YJ, et al. Genotoxic effects of 3 T magnetic resonance imaging in cultured human lymphocytes. *Bioelectromagnetics.* 2011 Oct;32(7):535-42. doi: 10.1002/bem.20664. Epub 2011 Mar 15.
41. Fiechter M, Stehli J, Fuchs TA, et al. Impact of cardiac magnetic resonance imaging on human lymphocyte DNA integrity. *Eur Heart J.* 2013 Aug;34(30):2340-5. doi: 10.1093/eurheartj/eh184. Epub 2013 Jun 21.
42. Lancellotti P, Nchimi A, Delierneux C, et al. Biological effects of cardiac magnetic resonance on human blood cells. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2015 Sep;8(9):e003697. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.115.003697.
43. Reddig A, Fatahi M, Friebe B, et al. Analysis of DNA double-strand breaks and cytotoxicity after 7 tesla magnetic resonance imaging of isolated human lymphocytes. *PLoS One.* 2015 Jul 15;10(7):e0132702. doi: 10.1371/journal.pone.0132702. eCollection 2015.
44. Fatahi M, Reddig A, Vijayalaxmi, et al. DNA double-strand breaks and micronuclei in human blood lymphocytes after repeated whole body exposures to 7T magnetic resonance imaging. *Neuroimage.* 2016 Jun;133:288-93. doi: 10.1016/j.neuroimage.2016.03.023. Epub 2016 Mar 16.
45. Reddig A, Fatahi M, Roggenbuck D, et al. Impact of in vivo highfield-strength and ultrahigh-field-strength MR imaging on DNA double-strand-break formation in human lymphocytes. *Radiology.* 2017 Mar;282(3):782-9. doi: 10.1148/radiol.2016160794. Epub 2016 Sep 30.
46. Friebe B, Godenschweiger F, Fatahi M. The potential toxic impact of different gadolinium-based contrast agents combined with 7-T MRI on isolated human lymphocytes. *Eur Radiol Exp.* 2018 Nov 28;2(1):40. doi: 10.1186/s41747-018-0069-y.
47. Pollard JM, Gatti RA. Clinical radiation sensitivity with DNA repair disorders: an overview. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009 Aug 1;74(5):1323-31. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.02.057.
48. Rube CE, Fricke A, Schneider R, et al. DNA repair alterations in children with pediatric malignancies: novel opportunities to identify patients at risk for high-grade toxicities. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010 Oct 1;78(2):359-69. doi: 10.1016/j.ijrobp.2009.08.052. Epub 2010 Feb 12.
49. Souliotis VL, Vlachogiannis NI, Pappa M, et al. DNA Damage Response and Oxidative Stress in Systemic Autoimmunity. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 20;21(1):55. doi: 10.3390/ijms21010055.
50. Davies RC, Pettijohn K, Fike F, et al. Defective DNA Double-Strand Break Repair in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012 Feb;64(2):568-78. doi: 10.1002/art.33334.
51. Souliotis VL, Sfrikakis PP. Increased DNA double-strand breaks and enhanced apoptosis in patients with lupus nephritis. *Lupus.* 2015 Jul;24(8):804-15. doi: 10.1177/0961203314565413. Epub 2014 Dec 26.
52. Namas R, Renauer P, Ogenovskii M, et al. Histone H2AX phosphorylation as a measure of DNA double-strand breaks and a marker of environmental stress and disease activity in lupus. *Lupus Sci Med.* 2016 Apr 29;3(1):e000148. doi: 10.1136/lupus-2016-000148. eCollection 2016.
53. Bassi C, Xavier DJ, Palomino G, et al. Efficiency of the DNA repair and polymorphisms of the XRCC1, XRCC3 and XRCC4 DNA repair genes in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2008 Nov;17(11):988-95. doi: 10.1177/0961203308093461.
54. Fell VL, Schild-Poulter C. The Ku heterodimer: Function in DNA repair and beyond. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2015 Jan-Mar;763:15-29. doi: 10.1016/j.mrrev.2014.06.002. Epub 2014 Jul 4.
55. Schmidt E, Tony HP, Brocker EB, Kneitz C. Sun-induced lifethreatening lupus nephritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Jun;1108:35-40. doi: 10.1196/annals.1422.004.
56. Shao L, Fujii H, Colmegna I, et al. Deficiency of the DNA repair enzyme ATM in rheumatoid arthritis. *J Exp Med.* 2009 Jun 8;206(6):1435-49. doi: 10.1084/jem.20082251. Epub 2009 May 18.
57. Souliotis VL, Vlachogiannis NI, Pappa M. DNA damage accumulation, defective chromatin organization and deficient DNA repair capacity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Immunol.* 2019 Jun;203:28-36. doi: 10.1016/j.clim.2019.03.009. Epub 2019 Mar 28.
58. Galita G, Brzezinska O, Gulbas I, et al. Increased Sensitivity of PBMCs Isolated from Patients with Rheumatoid Arthritis to DNA Damaging Agents Is Connected with Inefficient DNA Repair. *J Clin Med.* 2020 Apr 1;9(4):988. doi: 10.3390/jcm9040988.
59. Palomino GM, Bassi CL, Wastowski IJ, et al. Patients with systemic sclerosis present increased DNA damage differentially associated with DNA repair gene polymorphisms. *J Rheumatol.* 2014 Mar;41(3):458-65. doi: 10.3899/jrheum.130376. Epub 2014 Feb 1.

Поступила/отрецензирована/принята к печати

Received/Reviewed/Accepted

01.04.2023/25.05.2023/27.05.2023

#### **Заявление о конфликте интересов/Conflict of Interest Statement**

Исследование выполнено в рамках фундаментальной темы № 1021051402790-6 «Изучение иммунопатологии, диагностики и терапии на ранних стадиях системных ревматических заболеваний».

Исследование не имело спонсорской поддержки. Конфликт интересов отсутствует. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.

The investigation has been conducted within fundamental scientific topic №1021051402790-6 "Study of immunopathology, diagnosis and therapy in the early stages of systemic rheumatic diseases."

The investigation has not been sponsored. There are no conflicts of interest. The authors are solely responsible for submitting the final version of the manuscript for publication. All the authors have participated in developing the concept of the article and in writing the manuscript. The final version of the manuscript has been approved by all the authors.

Торгашина А.В. <https://orcid.org/0000-0001-8099-2107>

Лиля А.М. <https://orcid.org/0000-0002-6068-3080>