

## ОСОБЕННОСТИ ПОВРЕЖДЕНИЯ И РЕПАРАЦИИ ДНК В ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ У ДЕТЕЙ

Шман Т. В., Ермилова Т. И.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», г. Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** В работе представлены результаты исследований повреждения и репарации ДНК в лейкемических стволовых клетках с фенотипом CD45<sup>low</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> при острых лейкозах у детей по сравнению с нормальными гемопоэтическими стволовыми клетками (далее — ГСК). Показан меньший уровень повреждений ДНК в субпопуляции CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> по сравнению с субпопуляцией CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> при острых лейкозах и в донорском костном мозге.

**Ключевые слова:** острый лейкоз, лейкемические стволовые клетки, репарация ДНК.

**Введение.** Несмотря на достижения в лечении онкологических заболеваний, одной из важнейших причин неэффективности терапии является химио- и радиорезистентность опухолевых клеток. Множество механизмов, опосредующих резистентность, можно разделить на две группы: фармакокинетические (изменяют дозу препарата) и фармакодинамические (влияют на выполнение цитотоксического эффекта) [1]. К 1-й группе относятся такие механизмы, как выброс препарата из клетки белками семейства ABC, биотрансформация и инактивация химиопрепарата системами глутатиона, цитохрома P450 и другие. Ко 2-й 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. Опухолевые стволовые клетки обладают рядом свойств, присущих стволовым клеткам в норме (самовозобновление, нахождение в покое состоянии, высокая активность ABC-транспортеров, систем детоксикации ксенобиотиков и репарации ДНК), которые обуславливают резистентность к современным режимам химиотерапии, что способствует развитию рецидива [2].

В середине 90-х гг. XX в. на примере острого миелоидного лейкоза (далее — ОМЛ) были получены первые данные о существовании особой популяции клеток с иммунофенотипом CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, которая способна инициировать лейкоз в иммунодефицитных мышах [3]. Клетки с такими свойствами называют лейкоз-иницирующими или лейкемическими стволовыми клетками (далее — ЛСК).

К настоящему времени показано, что количество бластных клеток с фенотипом CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> имеет прогностическое значение при ОМЛ. Выявлено, что высокий процент лейкемических клеток с таким фенотипом при ОМЛ у взрослых и детей достоверно ассоциируется с резистентностью к химиотерапии, высоким уровнем минимальной остаточной болезни, большей частотой рецидивов и худшей выживаемостью пациентов [4]. Несмотря на то, что данные о фенотипе ЛСК фракции при остром лимфобластном лейкозе (далее — ОЛЛ) противоречивы, также показано, что высокое содержание CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> клеток предсказывает высокий уровень минимальной остаточной болезни в группе педиатрических пациентов с ОЛЛ [5]. Подобные данные, демонстрирующие неблагоприятное значение большого количества ЛСК, подтверждают их особые свойства, способствующие резистентности к терапии. Наиболее изучены механизмы репарации ДНК и вклад их в радио- и химиорезистентность опухолевых стволовых клеток при солидных опухолях, поэтому исследование особенностей репарации лейкемических стволовых клеток при острых лейкозах (далее — ОЛ) является актуальным.

Для оценки вклада репарации в формирование химиорезистентности опухолевых клеток используют методы, позволяющие количественно оценивать повреждение ДНК. Для таких целей нами была предложена схема оценки повреждения и репарации ДНК при ОЛ на основании выявления фосфорилированной формы гистона H2AX [6], являющегося вариантом гистона H2A и одним из белков, ответственных за мониторинг целостности генома. В ответ на повреждение ДНК гистон H2AX фосфорилируется по Ser139, такую фосфорилированную форму гистона называют  $\gamma$ -H2AX. Поскольку локусы  $\gamma$ -H2AX образуются в местах двойных разрывов, то их используют как биомаркеры повреждения ДНК [7].

**Цель работы** — сравнение эффективности репарации ДНК в нормальных гемопоэтических и лейкемических стволовых клетках *in vitro*.

**Материалы и методы.** Исследовали 18 образцов опухолевых клеток пациентов детского возраста с диагнозами ОЛЛ (n = 9), ОМЛ (n = 1), рецидивы ОЛЛ (n = 4) и ОМЛ (n = 4).

В группу сравнения были включены образцы костного мозга (далее — КМ) доноров аллогенной трансплантации ГСК (n = 6), а также костный мозг пациентов с неподтвержденным диагнозом (диагностическая группа) ОЛ (n = 8).

Лейкемические клетки пациентов с лейкозами и гемопоэтические предшественники КМ доноров выделяли центрифугированием (30 мин при 400 g) на градиенте плотности Histopaque-1077 (Sigma, США). Слой мононуклеарных клеток собирали, отмывали в среде RPMI1640 (Sigma, США) с добавле-

нием 2 % эмбриональной сыворотки телят (далее — ЭТС). Полученные клетки ресуспендировали в среде RPMI1640 в присутствии 10 % ЭТС, 2 mM L-глутамина и 1 % смеси антибиотиков. Для индукции разрывов ДНК лейкемические и мононуклеарные клетки доноров культивировали с этопозидом (10 мкг/мл) 3 и 24 ч в стандартных условиях.

Выявление двойных разрывов (далее — ДР) ДНК по образованию фосфорилированной формы гистона  $\gamma$ -H2AX проводили методом проточной цитофлуориметрии [6]. Оценку уровня фосфорилированного гистона проводили спустя 3 и 24 ч инкубации. Для этого после культивирования с этопозидом клетки отмывали в фосфатном буфере (далее — PBS) и окрашивали антителами в комбинации CD38 PE/D34 PE-Cy-5/CD45 PE-Cy-7 в течение 20 мин при комнатной температуре. После этого клетки отмывали от антител в PBS и фиксировали с помощью 1 %-го раствора параформальдегида (10 мин при +4 °C) и ледяного 80 %-го этанола (не менее 20 ч при температуре -20 °C). Затем клетки дважды отмывали в PBS, ресуспендировали в блокирующем буфере (1 % ЭТС в PBS) и инкубировали в течении 15 мин при комнатной температуре. Далее добавляли антитела против гистона  $\gamma$ -H2AX, меченные AlexaFluor488 (BD Bioscience, США) и инкубировали 30 мин при +4 °C. После этого клетки отмывали в PBS с 3 %-м ЭТС. Учет результатов проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter).

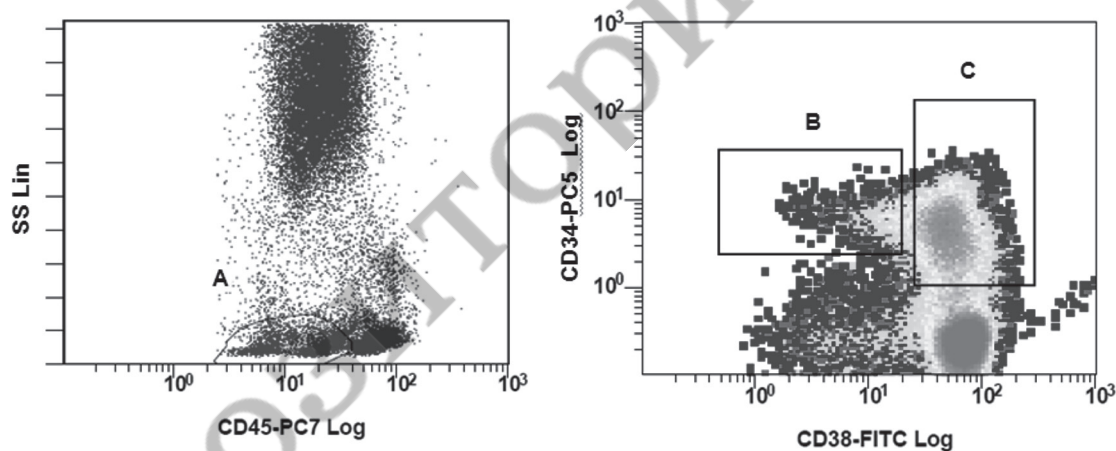
Для учета контрольного (без воздействия) уровня  $\gamma$ -H2AX использовали формулу:

$$((\text{опыт} - \text{контроль}) / (100 - \text{контроль})) \times 100 \%$$

Индекс репарации (далее — ИР) рассчитывали как соотношение уровня  $\gamma$ -H2AX через 24 ч к уровню  $\gamma$ -H2AX через 3 ч инкубирования с этопозидом.

Для математической обработки и статистического анализа данных использовали программы MS Excel, Statistica 6.0, GraphPad Prism. Для расчетов достоверности различий использовали критерий Манна-Уитни, для парных сравнений — критерий Уилкоксона, для сравнения частот —  $\chi^2$ -тест.

**Результаты и их обсуждение.** Гемопоэтические стволовые и лейкемические стволовые клетки описывают иммунофенотипом CD45<sup>low</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>. На рисунке 1 представлен алгоритм выделения субпопуляций стволовых клеток в образце здорового донорского костного мозга.



Регион А — клетки с низким боковым светорассеиванием и сниженной экспрессией CD45 (CD45<sup>low</sup>);  
В — клетки с фенотипом CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>; С — с фенотипом CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>

**Рисунок 1. — Пример анализа количества ГСК в донорском КМ**

Среди CD34<sup>+</sup> стволовых клеток выделяют наименее дифференцированную субпопуляцию стволовых клеток CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> (рисунок 1, регион В) и субпопуляцию более дифференцированных клеток с фенотипом CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (рисунок 1, регион С). При сравнении количества клеток в этих субпопуляциях среди клеток предшественников (рисунок 1, регион А) в КМ группы доноров и пациентов достоверных отличий в количестве клеток с фенотипом CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> выявлено не было: в нормальном КМ их количество составило 2,5 (0,9–8,2) %, тогда как при ОЛ — 4,1 (2,2–11,5) %. Однако в донорском КМ достоверно снижено количество CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> клеток — 14,1 (8,3–26,0) %, тогда как при ОЛ — 82,4 (63,2–92,1) %.

Далее мы сравнили уровни повреждения ДНК через 3 и 24 ч воздействия этопозидом в субпопуляциях CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> и CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> в опухолевых клетках пациентов с ОЛ и клетках КМ доноров (рисунок 2).

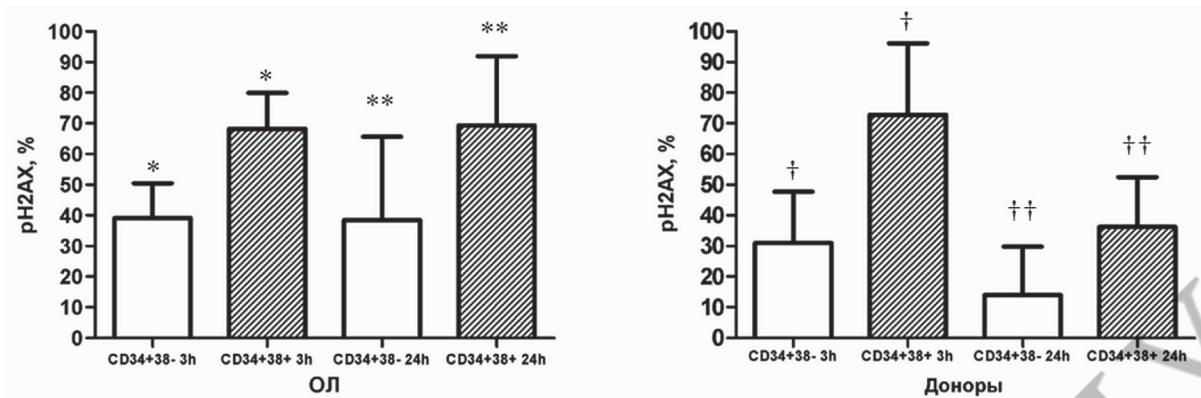


Рисунок 2. — Количество ДР ДНК в клетках с фенотипом CD34+CD38- и CD34+CD38+ через 3 и 24 ч воздействия этопозиды в КМ пациентов с ОЛ (\* —  $p = 0,004$ ; \*\* —  $p = 0,1$ ) и КМ доноров († —  $p = 0,016$ ; †† —  $p = 0,09$ )

Согласно представленным на рисунке данным, уровень повреждения ДНК через 3 ч воздействия этопозиды достоверно снижен в наименее дифференцированной субпопуляции клеток CD34+CD38- по сравнению с субпопуляцией CD34+CD38+ как в лейкемических клетках пациентов, так и в клетках донорского костного мозга. Через 24 ч различия в количестве двойных разрывов между исследуемыми субпопуляциями сохраняются в группе пациентов и доноров, хотя и менее выражены.

При сравнении эффективности репарации ДНК в анализируемых субпопуляциях выявили отличия между группами пациентов и доноров. На рисунке 3 представлено сравнение количества клеток с поврежденной ДНК через 3 и 24 ч воздействия в субпопуляции CD34+CD38-.

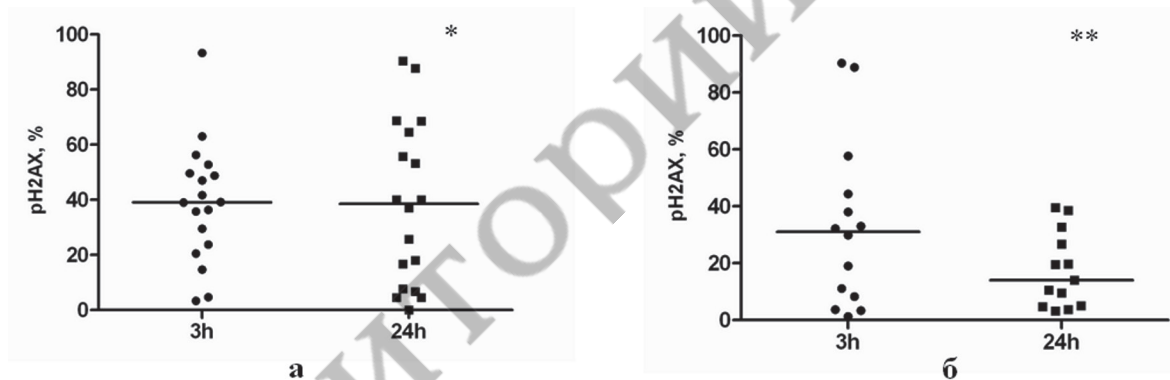


Рисунок 3. — Количество двойных разрывов ДНК в клетках с фенотипом CD34+CD38- через 3 и 24 ч воздействия этопозиды: а — в КМ пациентов с ОЛ (\* —  $p = 0,98$ ); б — в КМ доноров (\*\* —  $p = 0,03$ )

Через 3 ч количество ДР в клетках с фенотипом CD34+CD38- в образцах клеток пациентов составило 39,1 (23,8–49,6) %, клеток донора — 31,1 (8,3–44,4) % ( $p = 0,25$ ), что свидетельствует о сходном уровне повреждения ДНК в этой субпопуляции клеток у пациентов и доноров. Однако через 24 ч количество ДР в клетках пациентов составило 38,4 (7,7–64,6) %, тогда как в клетках доноров наблюдали более низкий уровень повреждения ДНК — 22,9 (13,1–34,4) %. Количество ДР в клетках пациентов с ОЛ через 24 ч практически не изменялось, т. е. репарация не происходит ( $p = 0,98$ ), в случае с нормальным КМ наблюдали достоверное снижение количества ДР, т. е. повреждения ДНК репарируются ( $p = 0,03$ ). Для оценки эффективности репарации также можно использовать индекс репарации, рассчитанный как соотношение количества ДР через 24 ч к уровню ДР через 3 ч. Индекс равен 1, если количество ДР не изменилось, менее 1 — если количество ДР уменьшилось (происходит репарация), индекс более 1 — происходит увеличение ДР. Среди клеток субпопуляции CD34+ CD38- в группе пациентов с ОЛ в 9 из 18 случаев (50,0 %) наблюдали увеличение ИР, тогда как в образцах нормального КМ — только в 5 из 14 (35,7 %).

На рисунке 4 представлены показатели репарации ДНК для субпопуляции CD34+CD38+ после воздействия этопозиды в группе пациентов с ОЛ и группы доноров КМ.

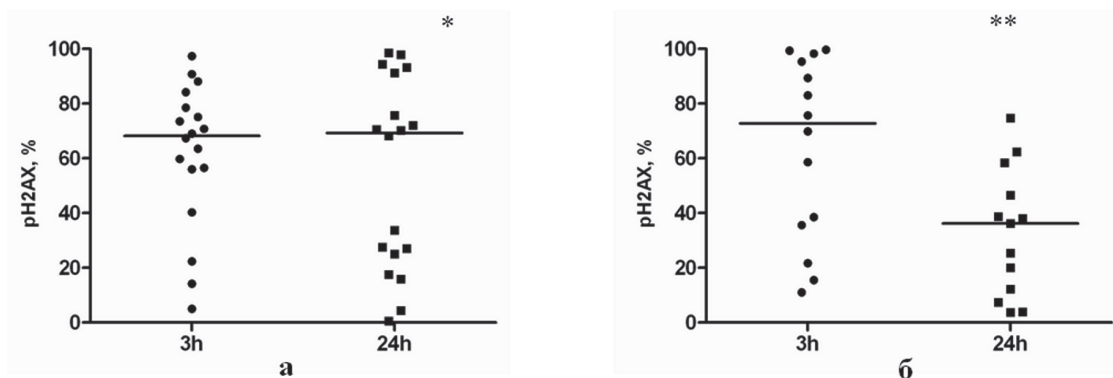


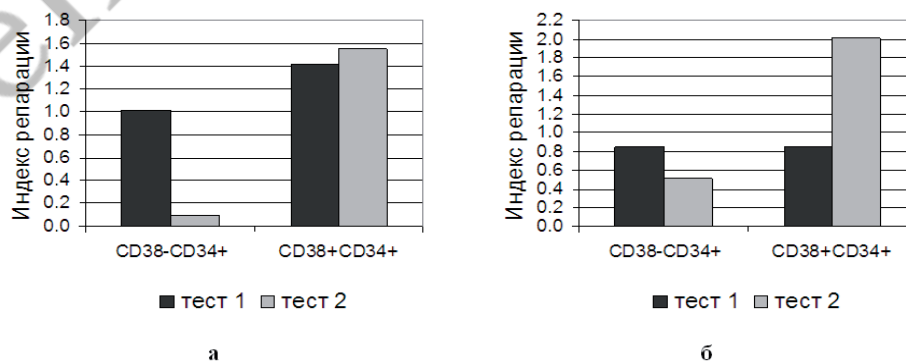
Рисунок 4. — Количество двойных разрывов ДНК в клетках с фенотипом CD34+CD38+ через 3 и 24 ч воздействия этопозида: а — в КМ пациентов с ОЛ (\* —  $p = 0,37$ ); б — в КМ доноров (\*\* —  $p = 0,006$ )

Аналогично данным, полученным для субпопуляции CD34+CD38-, уровень повреждения ДНК через 3 ч воздействия этопозида в группе пациентов и доноров не отличался. Через 3 ч количество ДР в клетках с фенотипом CD34+CD38+ в образцах клеток пациентов составило 68,2 (56,0–78,5) %, клеток донора — 72,8 (35,6–95,4) % ( $p = 0,59$ ). Однако через 24 ч количество ДР в клетках пациентов составило 69,3 (25,1–91,3) %, тогда как в клетках доноров наблюдали сниженный уровень ДР — 36,2 (12,1–46,5) % по сравнению с клетками пациентов. Количество ДР в клетках пациентов с ОЛ через 24 ч практически не изменялось ( $p = 0,98$ ), тогда как в случае с нормальным КМ наблюдали репарацию ДНК, что соответствовало достоверному снижению количества ДР ( $p = 0,006$ ). При сравнении ИР среди клеток субпопуляции CD34+CD38+ в группе пациентов с ОЛ в 14 из 18 случаев (77,8 %) наблюдали увеличение ИР, тогда как в образцах нормального КМ — только в 3 из 14 (21,4 %) ( $p = 0,001$ ). Таким образом, в большинстве случаев ОЛ наблюдали увеличение ИР, что свидетельствует о накоплении ДР и, видимо, дальнейшей гибели клеток, тогда как в случае с нормальным КМ в большинстве случаев происходила репарация ДНК.

Далее мы исследовали эффективность повреждения и репарации ДНК в группах пациентов с первичными ОЛ и его рецидивами. В группе пациентов с рецидивами ОЛ наблюдали сниженное количество повреждений ДНК под воздействием этопозида в исследуемых субпопуляциях опухолевых клеток во все временные точки исследования. Среди субпопуляции CD34+CD38- различия в количестве ДР через 24 ч между группами с первичными и рецидивами ОЛ были достоверны. В группе пациентов с первичными ОЛ незначительная репарация ДНК отмечается только в общей популяции бластных клеток, тогда как в группе пациентов с рецидивами ОЛ репарация ДНК выявлена во всех исследуемых субпопуляциях.

Два пациента с ОМЛ были исследованы дважды (рисунок 5). Первый пациент (№ 1) с рецидивом ОМЛ в состоянии химиорезистентности. Повторное исследование (спустя 1 мес.) было проведено после курса химиотерапии, на которую пациент не ответил. При повторном исследовании было отмечено снижение показателей химиочувствительности лейкомиических клеток в МТТ-тесте *in vitro*, значительное снижение ИР в субпопуляции CD34+CD38-.

Второй пациент (№ 2) первично исследовался при диагностике ОМЛ и второй раз в рецидиве, который развился после аллогенной трансплантации ГСК. При первичном и повторном исследованиях (спустя 7 мес.) наблюдали активность систем репарации в субпопуляции CD34+CD38-.



а — пациент № 1; б — пациент № 2

Рисунок 5. — Изменения показателя индекса репарации в различных субпопуляциях лейкомиических клеток у пациентов с ОМЛ в динамике

Таким образом, у двух пациентов в динамике наблюдали снижение ИР (т. е. усиление процессов репарации) в субпопуляции CD34+CD38-, но не CD34+CD38+, где наблюдается увеличение количества ДР.

**Заключение.** В субпопуляции наименее дифференцированных CD34+CD38- клеток по сравнению с субпопуляцией CD34+CD38+ наблюдали достоверно сниженный уровень индукции двойных разрывов ДНК как в случае с острыми лейкозами, так и в случае нормального костного мозга.

В донорском костном мозге после повреждения ДНК в большинстве анализируемых случаев наблюдали индукцию процессов репарации во всех исследуемых субпопуляциях гемопоэтических клеток. В случае с ОЛ индукция репарации в субпопуляции CD34+CD38- наблюдалась в 50 % случаев, в CD34+CD38+ — в 22 %.

В группе пациентов с рецидивами ОЛ по сравнению с первичными лейкозами отмечали снижение интенсивности повреждения ДНК после воздействия этопозида во всех субпопуляциях опухолевых клеток во все временные точки исследования.

У пациентов, наблюдавшихся в динамике, прогрессия заболевания сопровождалась усилением процессов репарации ДНК в субпопуляции клеток с фенотипом CD34+CD38-, но не CD34+CD38+.

#### **Литература**

1. Mellor, H. R. Resistance to chemotherapy in cancer : a complex and integrated cellular response / H. R. Mellor, R. Callaghan // *Pharmacology*. — 2008. — Vol. 81, № 14. — P. 275–300.
2. Wang, J. C. Cancer stem cells: lessons from leukemia / J. C. Wang, J. E. Dick // *Trends Cell Biol.* — 2005. — Vol. 15, № 9. — P. 494–501.
3. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice / T. Lapidot [et al.] // *Nature*. — 1994. — Vol. 367. — P. 645–648.
4. Schuurhuis Leukemic stem cells: identification and clinical application / D. Hanekamp, J. Cloos, G.J. Schuurhuis // *Int. J. Hematol.* — DOI 10.1007/s12185-017-2221-2225.
5. Shman, T.V. Frequencies of immature CD34+CD38- and CD34+CD38-CD19+ blasts correlate with minimal residual disease level in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia / T. V. Shman, L. V. Movchan, O. V. Aleinikova // *Leuk. Lymphoma*. — 2013. — Vol. 54, № 11. — P. 2560–2562.
6. Ермилова, Т. И. Анализ эффективности повреждения и репарации ДНК по выявлению фосфорилированной формы гистона  $\gamma$ -H2AX в лейкемических клетках пациентов с острыми лейкозами / Т. И. Ермилова, А. В. Тарасова, Т. В. Шман // *Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа*. — 2016. — № 3. — С. 330–342.
7. Mah, L.-J.  $\gamma$ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair / L.-J. Mah, A. El-Osta, T. C. Karagiannis // *Leukemia*. — 2010. — Vol. 24. — P. 679–686.

### **FEATURES OF DNA INJURY AND REPAIR IN LEUKEMIC STEM CELLS FOR PEDIATRIC ACUTE LEUKEMIA**

*Shman T. V., Ermilova T. I.*

*State Institution “Belarussian Research Center for Pediatric Oncology, Hematology and Immunology”  
Minsk, Republic of Belarus*

In this study it was investigated DNA damage and DNA repair in leukemia stem cells with CD45<sup>low</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> immunophenotype in childhood acute leukemia in comparison with hematopoietic stem cells of bone marrow donors. Significantly decreased DNA damage was found in CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> subpopulation than in CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> cells as leukemia samples as well donor bone marrows.

**Keywords:** acute leukemia, leukemia stem cells, DNA repair.