

Для цитирования: *Цырлина Е.В., Порошина Т.Е., Оганесян А.П., Проценко С.А., Берштейн Л.М.* Повреждение ДНК мононуклеарных клеток периферической крови, выявленное методом «комет», как возможный показатель чувствительности меланомы к иммунотерапии ниволумабом. Сибирский онкологический журнал. 2021; 20(2): 37–45. – doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-2-37-45

For citation: *Tsyrlina E.V., Poroshina T.E., Oganesyanyan A.P., Protsenko S.A., Berstein L.M.* Peripheral blood mononuclear DNA damage identified by the «Comet» method, as a possible indicator of sensitivity of melanoma to immunotherapy with nivolumab. Siberian Journal of Oncology. 2021; 20(2): 37–45. – doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-2-37-45

ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, ВЫЯВЛЕННОЕ МЕТОДОМ «КОМЕТ», КАК ВОЗМОЖНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МЕЛАНОМЫ К ИММУНОТЕРАПИИ НИВОЛУМАБОМ

**Е.В. Цырлина, Т.Е. Порошина, А.П. Оганесян, С.А. Проценко,
Л.М. Берштейн**

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Петрова», г. Санкт-Петербург, Россия
Россия, 197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68.
E-mail: evg.tsyrlina@gmail.com

Аннотация

Цель исследования – оценить возможность применения степени повреждения ДНК в мононуклеарных клетках крови пациентов с метастатической меланомой в качестве критерия оценки эффективности проводимой терапии. **Материал и методы.** На 10 пациентах с прогрессирующим метастатическим типом меланомы методом «комет» исследована степень повреждения ДНК в мононуклеарных клетках крови до начала и через 3–4 мес терапии Ниволумабом. **Результаты.** Показано, что до начала лечения у пациентов в сопоставлении с группой сравнения без онкопатологии отмечается более высокий уровень повреждения ДНК в мононуклеарных клетках крови. Этот уровень существенно понижается в случае достижения стабилизации или полного регресса опухолевого процесса, но изменяется менее значительно или увеличивается при признаках прогрессирования опухоли на фоне терапии. **Заключение.** Не исключено, что исходный уровень и динамика изменения повреждения ДНК в мононуклеарных клетках крови у пациентов с меланомой может служить критерием в определении чувствительности опухоли к иммунотерапии при использовании не только Ниволумаба, но и других препаратов этого ряда.

Ключевые слова: меланома, повреждение ДНК, мононуклеарные клетки, метод «комет», Ниволумаб.

PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR DNA DAMAGE IDENTIFIED BY THE «COMET» METHOD, AS A POSSIBLE INDICATOR OF SENSITIVITY OF MELANOMA TO IMMUNOTHERAPY WITH NIVOLUMAB

E.V. Tsyrlina, T.E. Poroshina, A.P. Oganesyanyan, S.A. Protsenko, L.M. Berstein

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, St. Petersburg, Russia
68, Leningradskaya Street, Pesochny, 197758, St. Petersburg, Russia.
E-mail: evg.tsyrlina@gmail.com

Abstract

Purpose of the study: to assess whether the determination of the grade of DNA damage in the blood lymphocytes of patients with metastatic melanoma can be a criterion for assessing the effectiveness of therapy. **Material and Methods.** The grade of DNA damage in blood mononuclear cells was studied using the comet assay in 10 patients with progressive metastatic melanoma before therapy with Nivolumab and 3–4 months after Nivolumab therapy. **Results.** It was revealed that prior to treatment the level of DNA damage in blood mononuclears was higher in patients with melanoma than in controls (healthy subjects). This level significantly decreased when stable disease or complete regression were reached, while it changed less significantly or increased in cases with disease progression. **Conclusion.** The initial level and changes in lymphocyte DNA damage in patients with melanoma can serve as a criterion for assessing tumor response to immunotherapy with Nivolumab.

Key words: melanoma, DNA damage, mononuclears, «comet» method, Nivolumab.

Введение

Развитие опухоли вызывает целый ряд изменений в регуляторных системах организма, что иногда приводит к появлению признаков, которые могут быть использованы как критерии в оценке агрессивности опухолевого процесса, сопротивления его прогрессированию и, что немаловажно, эффективности проводимого лечения. В качестве одного из таких критериев предположительно может рассматриваться степень повреждения ДНК как в опухолевых клетках, так и в мононуклеарных клетках крови. Как известно, повреждения ДНК возникают под действием различных физических, химических и биологических факторов [1]. С другой стороны, накапливаются данные о том, что выявляемая степень повреждения ДНК может косвенно характеризовать как выраженность риска возникновения опухоли [2], так и то состояние клеток и тканей организма, которое развивается при применении специфической противоопухолевой терапии [3, 4]. Наконец, повреждения ДНК являются важным инициирующим событием в канцерогенезе. В качестве примера можно сослаться на работу S. Mourret et al. [5], в которой на основании того факта, что в меланоцитах повреждения ДНК под влиянием оксидативного стресса и ультрафиолетового облучения возникают с большей выраженностью, чем при тех же условиях в кератоцитах, высказывается мысль, что именно эти события могут лежать в основе развития меланомы под влиянием солнечного излучения.

Само присутствие в организме опухоли также может влиять на степень повреждения ДНК. Причем процессы повреждения и репарации ДНК обнаруживаются не только на уровне соматических клеток, но и в циркулирующих в крови мононуклеарных клетках. Так, повреждение ДНК, выявленное методом Comet в культуре лейкоцитов, полученных от пациентов с меланомой, было более выраженным, чем в мононуклеарных клетках здоровых людей [6]. Возрастание уровня повреждения ДНК в лимфоцитах крови описано у первичных больных с опухолями головы и шеи [7], раком легкого [8], а при воздействии на тестируемые клетки

ультрафиолетом – при раке толстой кишки и меланоме [9]. Показано также, что степень повреждения ДНК коррелирует со стадией опухолевого процесса и прогнозом течения заболевания при раке мочевого пузыря [10] и с глубиной инвазии рака тела матки [11]. В качестве примера влияния опухоли на состояние ДНК в мононуклеарных клетках крови можно отметить и тот факт, что чем ниже были исходные показатели повреждения ДНК, тем более благоприятным оказывалось течение опухолевого процесса. Так, у больных герминогенными опухолями при низких показателях повреждения ДНК лимфоцитов имели место достоверно лучший прогноз, а также большая средняя продолжительность жизни и безрецидивный период [12].

Кроме того, существует зависимость между степенью повреждения ДНК и ответом опухоли на проводимую химиотерапию. В отношении пациентов с меланомой показано, что больные, у которых на начальном этапе и через 30 дней после введения противоопухолевых препаратов (ингарон, ломустин, дакарбазин и цисплатин) была отмечена высокая степень вторичной деградации двухцепочечной-ДНК (ds-ДНК) лимфоцитов, имели частично положительный ответ (по выражению авторов) на проводимую терапию [13], что подтверждает возможность использования подобных подходов с целью оценки чувствительности к назначаемому лечению.

Определить степень повреждения ДНК в циркулирующих за пределами опухоли клетках возможно с помощью уже упоминавшегося метода «комет» [14, 15]. Он позволяет оценить результат воздействия терапии на новообразование не только по тому, как применяемые препараты действуют непосредственно на опухолевые клетки, но и на основании того, какие изменения отмечаются при этом в нормальных клетках и тканях, допуская, что подобные изменения могут соответствовать событиям, происходящим на уровне опухолевого процесса [16].

Можно предполагать, что уменьшение размеров новообразования на фоне терапии способно сопровождаться снижением показателей системного

повреждения ДНК, что в итоге может быть использовано в качестве критерия чувствительности данной опухоли к проводимому лечению. Не исключено, соответственно, что этот параметр может оказаться полезным в оценке как повреждающих, так и репарационных сигналов и изменений, возникающих в организме под влиянием противоопухолевой терапии [6].

Среди факторов, связанных с опухолью, которые сопутствуют повреждению ДНК, может быть названа мембранная гамма-глутамил трансфераза (ГГТ), активация которой за счет продукции реактивных соединений кислорода связана, с одной стороны, с опухолевой прогрессией и развитием резистентности к противоопухолевой терапии, а, с другой – способствует геномной нестабильности. В качестве примера, высокий уровень ГГТ активности в клетках меланомы коррелирует с возрастанием в них повреждений ДНК [17].

Меланома относится к числу агрессивно протекающих злокачественных опухолей с низкой чувствительностью к применяемым методам лечения. После появления метастазов традиционная химиотерапия только в 15–23 % случаев приводит к развитию непродолжительной стабилизации [18]. Более эффективным в лечении меланомы оказалось применение таргетной иммунотерапии, в частности препарата Ниволумаб (Nivolumab, Опдиво®), который блокирует взаимодействие между рецептором программируемой смерти (PD-1) и его лигандами (PD-L1 и PD-L2) [19] и, как оказалось, способен продлевать общую выживаемость и безрецидивный период пациентов с метастатической формой меланомы [20].

Повышению эффективности терапии больных меланомой могут служить как обновление спектра терапевтических подходов, так и продолжение поиска критериев, отражающих индивидуальную чувствительность опухоли к повреждающим воздействиям. Считается, что такие клинические данные, как величина опухолевого узла, глубина инвазии, наличие изъязвления, не всегда коррелируют с результатом лечения. Важными параметрами в определении эффективности таргетной терапии являются молекулярно-генетические особенности опухоли. В отношении меланомы к числу таких параметров можно отнести наличие мутаций генов BRAF и NRAS. В частности, обсуждается их роль в прогрессировании опухоли и чувствительности к терапии [21, 22]. Показано, что присутствие в опухоли BRAF-мутации коррелирует с эффективностью терапии меланомы верурафенибом [23, 24], что в совокупности с приведенными выше сведениями указывает на желательность привлечения с той же целью дополнительных лабораторных тестов.

Целью исследования явились изучение степени повреждения ДНК в мононуклеарных клетках крови пациентов с метастатической меланомой до

и на фоне лечения Ниволумабом и сопоставление полученных данных с ответом на проводимую иммунотерапию. Следует отметить, что ответ на лечение Ниволумабом, по данным объединенного анализа, проведенного J. Larkin et al. [25], составил 34,6 % (95 % CI, 28,3–41,3) у пациентов с отсутствием мутации BRAF и 29,7 % (95 % CI, 19,7–41,5) при ее наличии, не выявив заметных различий между сравниваемыми группами. Как следствие, с учетом сказанного ранее, заслуживающим внимания представлялось сопоставление чувствительности меланомы к Ниволумабу с показателем степени повреждения ДНК, оцененной методом «комет». Исследование комет принадлежит к числу оптимальных тестов для выявления повреждений ДНК [1], причем Comet assay позволяет выявлять повреждения и разрывы ДНК, в том числе и в клетках меланомы [26].

Материал и методы

В работу были включены 10 больных меланомой и 32 здоровых человека сравнимого возраста. Все пациенты имели опухоли T1c-2-3a-4bN0-2-3M0-1c с метастазами в регионарных лимфатических узлах, легких и головном мозге (табл. 1). Пациенты получали лечение в отделении химиотерапии и инновационных методов лечения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» препаратом Ниволумаб (Опдиво[®]) в дозе 3 мг/кг веса, который вводился внутривенно капельно в течение 60 мин один раз в 2 нед. Препарат был предоставлен фармкомпанией в рамках расширенного доступа. Пациенты и здоровые лица, включенные в исследование, подписывали информированное согласие, исследование было одобрено комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова».

У всех лиц, включенных в исследование, определяли параметры, характеризующие ДНК комет в мононуклеарных клетках периферической крови. У пациентов это исследование проводили дважды: перед началом терапии Ниволумабом и через 3–4 мес от начала его применения перед очередным введением препарата. Для получения фракции мононуклеарных клеток кровь, взятую в пробирки с ЭДТА, наслаивали на градиент плотности фиколла/верографина (1,077 г/мл), затем пробирки центрифугировали 30 мин при скорости 1200 об/мин; после центрифугирования клетки отмывали три раза физраствором с 0,001 М фосфатным буфером. Для исследования повреждения ДНК использовали протокол метода, описанный V.J. McKelvey-Martin et al. [27]. Метод основан на лизисе клеток в щелочной среде с последующим электрофорезом в постоянном электрическом поле и окрашиванием препаратов флуоресцентным красителем (в нашем исследовании – DAPI). Под микроскопом клетки представлены в виде электрофоретического следа фрагментов ДНК, получившего название «кометы» по своему внешнему виду. Длина следа

фрагментов и доля ДНК в хвосте «кометы» связаны со степенью повреждения ДНК клетки. Форма и размеры клеток оценивались визуально в процессе микроскопии и затем обсчитывались по программе CASPS (Comet Score, TriTek Corp., USA). Исследовалось по 100 клеток, в которых определялось среднее значение показателя длины головы (хвоста) кометы. В индивидуальных клетках определялись следующие показатели: длина всей клетки «кометы» (данные не представлены), диаметр или длина головы «кометы» (данные не представлены), длина хвоста «кометы», % ДНК в хвосте, момент хвоста «кометы». Отметим, что момент хвоста «кометы» рассматривается как один из наиболее

чувствительных параметров, характеризующих повреждение ДНК [1, 28]. Также вычислялся процент клеток с повреждениями (% «комет»), причем «кометой», по нашим предварительным расчетам, считается клетка, в хвосте которой содержится $\geq 4,5$ % ДНК. Данные по динамике изменения степени повреждения ДНК в мононуклеарных клетках крови сопоставляли с клиническим эффектом терапии Ниволумабом, оцененным по системе RECIST 1.1, irRC.

Статистический анализ производился с помощью пакета программ Statistica 12. При оценке показателей с помощью описательной статистики было выявлено отклонение от нормального рас-

Таблица 1/Table 1

Характеристика пациентов с меланомой, получавших терапию Ниволумабом, и здоровых лиц (группы сравнения)

Characteristics of melanoma patients treated with Nivolumab and healthy subjects (comparison groups)

Пациент, № (пол)/ Patient, № (sex)	Возраст, годы/ Age, years	Стадия опухоли/ Tumor stage	Предшествующая терапия/ Previous therapy
1 (м/м)	60	TxN3M1?	Дакарбазин/Dakarbazine; Паклитаксел/Paclitaxel; Карбоплатин/Carboplatin
2 (ж/ф)	38	T3aN3M1c	Хирургия/Surgery Ипилимумаб/Ipilimumab; T-VEC
3 (м/м)	47	T3aN0M0	Хирургия/Surgery
4 (м/м)	58	T3aN3M1c	Интерферон/Interferon; Дакарбазин/Dakarbazine; Ипилимумаб/Ipilimumab
5 (м/м)	57	T1cN0M0	Лучевая терапия/Radiation therapy
6 (м/м)	68	TxNxM1c	Дакарбазин, мелатонин/ Dacarbazine, melatonin
7 (м/м)	37	T2N0M0	Дакарбазин/Dakarbazine; Темозоламид/Temozolomide
8 (ж/ф)	68	T1xN2bM0	Хирургия/Surgery Дакарбазин/Dakarbazine; Ипилимумаб/Ipilimumab
9 (м/м)	68	T4bN3M0	Хирургия/Surgery Дакарбазин/Dakarbazine
10 (ж/ф)	68	T4bN0M0	Хирургия/Surgery Навельбин/Navelbin
Пациенты/ Patients (n=10)	56,9 ± 3,4		
Группа сравнения/ Comparison groups (n=32)	57,2 ± 1,3		

Таблица 2/Table 2

Показатели повреждения ДНК, выявленные методом исследования «комет» в мононуклеарных клетках периферической крови, у здоровых лиц и у пациентов с меланомой (медиана и квартили)
Parameters of DNA damage revealed by the method of studying «comets» in mononuclear cells of peripheral blood of healthy individuals and in patients with melanoma (median and quartels)

Группы/ Groups	Длина хвоста кометы (пиксели)/ Comet tail length (pixels)	Момент хвоста кометы (усл.ед)/ Comet tail moment (conventional units)	% комет/ % of comets
Больные меланомой/ Patients with melanoma	9,18 (4,8, 42,4)	1,29 (0,13, 12,0)	22,0 (8,0, 42,0)
Контроль/Controls	5,493 (1,3, 13,1)	1,72 (0,4, 5,1)	9,0 (2,5, 15,0)
p	0,1139		0,0135

пределения. В связи с этим данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. В дополнение был произведен анализ с использованием критериев Манна – Уитни и Вилкоксона.

Результаты

Все пациенты, которые были включены в данное исследование, имели вариант меланомы с признаками распространения процесса (табл. 1). До начала терапии Ниволумабом у пациентов с меланомой отмечено большее количество мононуклеарных клеток крови, образующих кометы, при сопоставлении с показателями, полученными в группе сравнения (здоровыми людьми). Как можно видеть, более высоким, чем в «группе сравнения» (табл. 2), у пациентов с меланомой был только процент комет ($p < 0,02$), в то время как длина хвоста «кометы», % ДНК и момент хвоста были сравнимы.

Кроме того, обнаружилось, что возраст у больных со стабилизацией и регрессом процесса на фоне лечения Ниволумабом был несколько ниже, чем в группе, где терапия Ниволумабом не дала эффекта – $52,0 \pm 9,30$ года и $61,8 \pm 13,86$ года

соответственно ($p < 0,23$). Однако он не достигал статистической достоверности как между этими подгруппами, так и по сравнению с группой контроля и в дальнейшем не учитывался.

По нашим наблюдениям, терапия Ниволумабом у 5 из 10 пациентов привела к развитию в 2 случаях полного регресса, в 3 – к стабилизации опухолевого процесса, у 5 других больных была неэффективна. Независимо от стадии опухолевого процесса у пациентов, которые отреагировали на проведенное лечение позитивно, отмечено снижение более 50 % практически всех анализируемых параметров, характеризующих повреждение ДНК (в 17 измерениях из 20). Стоит отметить, что только один показатель, а именно длина хвоста кометы, у пациентки 4 не изменился, но это значение исходно было низким (табл. 3). Повышение показателей повреждения ДНК в этой группе не отмечено ни у одного пациента. Более того, обращают на себя внимание низкие исходные данные длины и момента хвоста кометы у больных с более благоприятным течением заболевания. Такой тенденции не наблюдалось, если на фоне терапии Ниволумабом продолжалось прогрессирование опухолевого про-

Таблица 3/Table 3

Показатели повреждения ДНК, выявленные методом исследования «комет» в мононуклеарных клетках периферической крови, у пациентов с меланомой на фоне терапии ниволумабом (индивидуальные данные, медианы и квартили)

Parameters of DNA damage revealed by the study of «comets» in mononuclear cells of peripheral blood in patients with melanoma during therapy with nivolumab (individual data, medians and quartels)

Пациент/Patient №	Длина головы кометы (пиксели*)/ Comet head length (pixels *)			Длина хвоста кометы (пиксели)/ Comet tail length (pixels)			Момент хвоста (усл. ед.)/ Tail moment (conventional units)			% комет/ % of cemets			Эффект терапии/ Therapy response
	I	II	%	I	II	%	I	II	%	I	II	%	
1	85,52	81,23	-5	6,21	4,09	-34	0,135	0,037	-72,6	16	1,5	-90	Ст/SD
2	81,81	69,15	-15	8,25	1,19	-85,6	0,3	0,045	-85	17	2	-88	ПР/CR
3	76,07	68,02	-10,6	4,81	0,85	-82	0,009	0,008	-11	3	1	-66	ПР/CR
4	86,95	65,32	-24,8	1,14	1,14	0	0,38	0,028	-92	8	3	-62	Ст/SD
5	109,94	53,78	-51	78,04	4,93	-93,7	41,97	0,082	-99	63	4	-94	Ст/SD
Me	85,52	68,02		6,21	1,19		0,30	0,037		16,0		2,0	
(Iq, hq)	(81,8; 86,9)	(65,32; 69,1)		(4,81; 8,25)	(1,14; 4,09)		(0,13; 0,38)	(0,03; 0,04)		(8,0; 17,0)		(1,5; 3,0)	
6	97,08	111,75	+15	42,41	71,25	+68	12,06	37,61	+200	36	5	-86	П/П
7	75,18	97,13	+29	21,22	12,30	-42	9,839	5,15	-47,6	42	46	+104	П/П
8	81,64	73,39	-10	10,12	4,07	-59,8	2,195	3,87	+76	27	13	-52	П/П
9	104,86	84,91	-19	57,87	13,33	-77	19,277	0,48	-97	78	28	-64	П/П
10	74,84			1,039			0,085			5			П/П
Me	81,64	91,02		21,22	12,8		9,84	4,51		36,0		20,5	
(Iq, hq)	(75,18; 97,08)	(79,1; 104,4)		(19,12; 42,4)	(8,18; 42,3)		(2,2; 12,0)	(2,17; 21,4)		(27,0; 42)		(9,0; 37,0)	

Примечание: ПР – полная регрессия; Ст – стабилизация, П – прогрессирование, * Пиксель – наименьший логический элемент двухмерного цифрового изображения, I – до начала терапии ниволумабом, II – через 34 мес от начала терапии ниволумабом, * – % изменения показателя на фоне терапии.

Note: CR – complete regression, SD – stable disease, P – progression, * Pixel – the smallest logical element of a two-dimensional digital image, I – before the start of nivolumab therapy, II – 3–4 months after the start of nivolumab therapy, * – % change in the indicator during therapy.

цесса. В этой группе на высоком уровне оставались практически все параметры (длина хвоста кометы, % ДНК, % комет и момент хвоста). Из 16 показателей, характеризующих метод комет, у пациентов с прогрессирующим процессом на фоне лечения снизились на 50 % только 5, а в 4 случаях они даже выросли (табл. 3). Причем отмеченное снижение было менее выраженным, чем в первой группе, в которой лечение было эффективным.

При сравнении показателей, характеризующих степень повреждения ДНК у пациентов, ответивших (группа 1) и не ответивших (группа 2) на лечение, при использовании U-теста Манна – Уитни, выявлено, что до начала терапии достоверных различий между группами отмечено не было. В то же время, несмотря на немногочисленность группы, на фоне терапии в группе 1 стали достоверно ниже % ДНК ($p < 0,02$), момент хвоста ($p < 0,02$) и процента комет ($p < 0,02$), а длина хвоста кометы имела тенденцию к снижению ($p < 0,06$). Исследование динамики изменения показателя внутри каждой из групп с использованием критерия Вилкоксона показало, что в 1 группе достоверно снизились показатели % ДНК ($p < 0,05$), момента хвоста ($p < 0,05$) и процент комет ($p < 0,05$) и отмечалась тенденция к снижению длины хвоста ($p < 0,06$).

Обсуждение

Выявленные повреждения ДНК у пациентов с меланомой до начала лечения свидетельствуют о влиянии как собственно опухолевого процесса в качестве фактора, вызывающего повреждение ДНК, так и предшествующего лечения, которое после хирургического этапа включало химиотерапию и/или иммунотерапию (но не ниволумаб). В известных нам работах других авторов, которые оценивали уровень повреждения ДНК в лимфоцитах до начала лечения, отмечались сходные изменения, возникающие под влиянием опухоли. Так, в работе F. Shimabukuro et al. [6] показано, что повреждение ДНК лимфоцитов, выявленное методом «комет» у пациентов с ранними стадиями меланомы, составило $59,3 \pm 63,5$ усл. ед., а у людей без опухоли – $35,3 \pm 18,6$ усл. ед. Выше уже приводились ссылки на связь между злокачественным процессом и степенью повреждения ДНК лимфоцитов у пациентов с опухолями головы и шеи, раком легкого, раком толстой кишки. В дополнение при сопоставлении степени повреждения ДНК у больных раком молочной железы и здоровых лиц показано, что у пациентов с опухолью был достоверно выше такой показатель повреждения ДНК, как момент хвоста, – $10,78 \pm 3,63$ усл. ед. против $6,86 \pm 2,76$ усл. ед. в группе сравнения [29]. Содержание ДНК в «хвосте» и момент хвоста «кометы», как это уже упоминалось, считаются наиболее чувствительными параметрами, характеризующими степень повреждения ДНК [30].

Важным наблюдением стало снижение параметров повреждения ДНК после проведения терапии Ниволумабом у пациентов, которые отреагировали на эту терапию ремиссией или стабилизацией опухолевого процесса. Не исключено, что это может быть связано с регрессом опухоли, но нельзя исключать и воздействие Ниволумаба на процессы репарации ДНК. В литературе значение метода «ДНК-комет» как критерия при оценке эффективности лечения описано главным образом при использовании химиотерапевтических препаратов. В частности, приводятся данные, что он может быть показателем токсического действия химиотерапии, что давало возможность определить целесообразность применения той или иной схемы лечения у конкретного пациента [31, 32]. Причем это показано не только на культуре опухолевых клеток, в частности клеток меланомы [4], но и по увеличению степени повреждения ДНК в лейкоцитах периферической крови у пациентов с опухолями молочной железы [33]. В части исследований увеличение числа «ДНК-комет» под влиянием химиотерапии связывали с её эффективностью [1]. Так, в работе E. Uriol et al. [34] рост числа ДНК-комет после 5 курсов химиотерапии CMF (циклофосфамид, метотрексат, фторурацил) или CEF (циклофосфамид, эпирубицин, фторурацил) коррелировал с показателем чувствительности к проводимому лечению и прогнозом течения рака молочной железы.

В каждом конкретном случае важен срок, когда оценивается степень повреждения ДНК, в частности, непосредственно через несколько часов после начала лечения или через какое-то время после завершения курса химиотерапии. Большая часть исследований *in vivo* и *in vitro* проводилась через короткие сроки после введения препаратов, и в них мог отражаться непосредственный (а не отложенный) генотоксический эффект воздействия химиотерапии.

В данном исследовании связь с возрастом напрямую не отмечена, возможно, из-за малого числа наблюдений, но известна роль возраста в увеличении риска появления меланомы [35], а также его роль в более агрессивном течении и худшем прогнозе меланомы у пациентов старше 70 лет по сравнению с другими возрастными группами [36]. Кроме того, с возрастом увеличивается склонность к повреждению ДНК, что находит подтверждение в литературе как по экспериментальным данным [29, 37], так и по наблюдениям на людях, включая больных раком молочной железы [14]. Следует тем не менее отметить, что в настоящей работе в группе сравнения (у здоровых людей) этого феномена зависимости результатов от возраста обнаружено не было (табл. 2).

Выводы

1. У пациентов с распространенной меланомой до назначения Ниволумаба по сравнению с группой

без онкологической патологии отмечено достоверное ($p < 0,02$) увеличение числа мононуклеарных клеток крови, образующих кометы.

2. Степень повреждения ДНК у пациентов, которые отреагировали на лечение Ниволумабом стабилизацией или полным регрессом опухоли, в 4 случаях из 5 была исходно невысокой и снизилась дополнительно на фоне иммунотерапии в отличие от больных, у которых терапия оказалась неэффективной.

3. Исходный уровень и динамика изменения повреждения ДНК лимфоцитов у пациентов с меланомой требует дальнейшего изучения с целью оценки этого показателя как критерия в определении чувствительности опухоли к иммунотерапии при использовании не только Ниволумаба, но и других препаратов этого ряда.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Araldi R.P., de Melo T.C., Mendes T.B., de Sá Junior P.L., Nozima B.H., Ito E.T., de Carvalho R.F., de Souza E.B., de Cassia Stocco R. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomed Pharmacother.* 2015 May; 72: 74–82. doi: 10.1016/j.biopha.2015.04.004.
2. Collins A.R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res.* 2009; 681(1): 24–32. doi: 10.1016/j.mrrev.2007.10.002.
3. Arienti C., Zoli W., Pignatta S., Carloni S., Paganelli G., Ulivi P., Romeo A., Menghi E., Sarnelli A., Medri L., Polico R., Silvestrini R., Tesei A. Efficacy of different sequences of radio- and chemotherapy in experimental models of human melanoma. *J Cell Physiol.* 2014; 10: 1548–1556.
4. Streffer C. Strong association between cancer and genomic instability. *Radiat Environ Biophys.* 2010 May; 49(2): 125–31. doi: 10.1007/s00411-009-0258-4.
5. Mouret S., Forestier A., Douki T. The specificity of UVA-induced DNA damage in human melanocytes. *Photochem Photobiol Sci.* 2012 Jan; 11(1): 155–62. doi: 10.1039/c1pp05185g.
6. Shimabukuro F., Neto C.F., Sanches J.A.Jr., Gattás G.J. DNA damage and repair in leukocytes of melanoma patients exposed in vitro to cisplatin. *Melanoma Res.* 2011; 21(2): 99–105. doi: 10.1097/CMR.0b013e3283426839.
7. Palyvoda O., Potaliska J., Wygoda A., Rzeszowska-Wolny J. DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and micronucleus tests. *Acta Biochim Pol.* 2003; 50(1): 181–90.
8. Lou J., He J., Zheng W., Jin L., Chen Z., Chen S., Lin Y., Xu S. Investigating the genetic instability in the peripheral lymphocytes of 36 untreated lung cancer patients with comet assay and micronucleus assay. *Mutat Res.* 2007; 617(1–2): 104–10. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2007.01.004.
9. Najafzadeh M., Baumgartner A., Gopalan R., Davies J.B., Wright A., Reynolds P.D., Anderson D. In vitro sensitivities to UVA of lymphocytes from patients with colon and melanoma cancers and precancerous states in the micronucleus and the Comet assays. *Mutagenesis.* 2012 May; 27(3): 351–7. doi: 10.1093/mutage/ger087.
10. Allione A., Pardini B., Viberti C., Oderda M., Allasia M., Gontero P., Vineis P., Sacerdote C., Matullo G. The prognostic value of basal DNA damage level in peripheral blood lymphocytes of patients affected by bladder cancer. *Urol Oncol.* 2018; 36(5): 241.e15–241.e23. doi: 10.1016/j.urolonc.2018.01.006.
11. Buchynska L.G., Brieva O.V. Sensitivity to 4-hydroxyestradiol and DNA repair efficiency in peripheral blood lymphocytes of endometrial cancer patients. *Exp Oncol.* 2018 Mar; 40(1): 68–72.
12. Sestakova Z., Kalavska K., Hurbanova L., Jurkovicova D., Gursky J., Chovanec M., Svetlovska D., Miskovska V., Obertova J., Palacka P., Rejlekova K., Sycova-Mila Z., Cingelova S., Spanik S., Mardiak J., Chovanec M., Mego M. The prognostic value of DNA damage level in peripheral blood lymphocytes of chemotherapy-naïve patients with germ cell cancer. *Oncotarget.* 2016; 7: 16: 75996–76005.
13. Тронов В.А., Артамонов Д.Н., Абрамов М.Е., Горбачева Л.Б., Личиницер М.Р. Связь эффективности репарации ДНК, уровня экспрессии белков MLH1, MSH2 и FASR в лимфоцитах больных диссеминированной меланомой кожи с клиническим ответом на химиотерапию. *Вопросы онкологии.* 2011; 57; 2: 165–172. [Tronov V.A.

Заключение

Суммируя сказанное, можно прийти к заключению, что высокий уровень повреждения ДНК у обследованных пациентов до назначения Ниволумаба может быть связан с влиянием опухоли, так как все пациенты имели регионарные, а часть – отдаленные метастазы. С другой стороны, уменьшение «ДНК-комет» у больных меланомой, получавших иммунотерапию Ниволумабом, может свидетельствовать о хорошем терапевтическом действии этого препарата, возможно, включающем в себя и определенное ослабление воздействия прогенотоксического пресса или же более эффективную репарацию повреждений ДНК. Подобное обобщение заслуживает проверки на различных, в том числе и более длительных, этапах терапии заболевания, а также при использовании иных препаратов, аналогичных Ниволумабу, и их комбинаций.

Artamonov D.N., Abramov M.E., Gorbacheva L.B., Lichinitser M.R. Effectiveness of DNA repair and expression of MLH1, MSH2 and FASR in lymphocytes of patients with chemotherapy-responsive, disseminated cutaneous melanoma. *Problems in Oncology.* 2011; 57; 2: 165–172. (in Russian)].

14. Yesil Devecioglu T., Aydogan F., Omurtag G.Z., Bese N.S., Sardas S. Investigation of genotoxicity risk and DNA repair capacity in breast cancer patients using anastrozole. *North Clin Istanbul.* 2018 Jan 22; 5(1): 6–13. doi: 10.14744/nci.2017.55822.

15. Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Aug 30; 123(1): 291–8. doi: 10.1016/0006-291x(84)-0411-x.

16. Harding S.M., Benci J.L., Irianto J., Discher D.E., Minn A.J., Greenberg R.A. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature.* 2017; 548(7668): 466–470. doi: 10.1038/nature23470.

17. Corti A., Duarte T.L., Giommarrelli C., De Tata V., Paolicchi A., Jones G.D., Pompella A. Membrane gamma-glutamyl transferase activity promotes iron-dependent oxidative DNA damage in melanoma cells. *Mutat Res.* 2009 Oct 2; 669(1–2): 112–21. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.05.010.

18. Azijli K., Stelloo E., Peters G.J., Van Den Eertwegh A.J. New developments in the treatment of metastatic melanoma: immune checkpoint inhibitors and targeted therapies. *Anticancer Res.* 2014 Apr; 34(4): 1493–505.

19. Koppolu V., Rekha Vasigala V.K. Checkpoint immunotherapy by nivolumab for treatment of metastatic melanoma. *J Cancer Res Ther.* 2018 Oct-Dec; 14(6): 1167–1175. doi: 10.4103/jcrt.1290_16.

20. Hodi F.S., Chiarion-Sileni V., Gonzalez R., Grob J.J., Rutkowski P., Cowey C.L., Lao C.D., Schadendorf D., Wagstaff J., Dummer R., Ferrucci P.F., Smylie M., Hill A., Hogg D., Marquez-Rodas L., Jiang J., Rizzo J., Larkin J., Wolchok J.D. Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018 Nov; 19(11): 1480–1492. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30700-9.

21. Hept M.V., Siepmann T., Engel J., Schubert-Fritschle G., Eckel R., Mirlach L., Kirchner T., Jung A., Gesierich A., Ruzicka T., Flaig M.J., Berking C. Prognostic significance of BRAF and NRAS mutations in melanoma: a German study from routine care. *BMC Cancer.* 2017; 17(1): 536. doi: 10.1186/s12885-017-3529-5.

22. Thomas N.E., Edmiston S.N., Alexander A., Groben P.A., Parrish E., Kricker A., Armstrong B.K., Anton-Culver H., Gruber S.B., From L., Busam K.J., Hao H., Orlow I., Kanetsky P.A., Luo L., Reiner A.S., Paine S., Frank J.S., Bramson J.I., Marrett L.D., Gallagher R.P., Zanetti R., Rosso S., Dwyer T., Cust A.E., Ollila D.W., Begg C.B., Berwick M., Conway K. GEM Study Group. Association Between NRAS and BRAF Mutational Status and Melanoma-Specific Survival Among Patients With Higher-Risk Primary Melanoma. *JAMA Oncol.* 2015; 1; 3: 359–368.

23. Ravn M.C., Matalka M.S. Vemurafenib in patients with BRAF V600E mutation-positive advanced melanoma. *Clin Ther.* 2012 Jul; 34(7): 1474–86. doi: 10.1016/j.clinthera.2012.06.009.

24. Saroufim M., Habib R.H., Gerges R., Saab J., Loya A., Amr S.S., Sheikh S., Satti M., Oberkanins C., Khalifeh I. Comparing BRAF mutation status in matched primary and metastatic cutaneous melanomas: implica-

tions on optimized targeted therapy. *Exp Mol Pathol*. 2014 Dec; 97(3): 315–20. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.09.008.

25. Larkin J., Lao C.D., Urba W.J., McDermott D.F., Horak C., Jiang J., Wolchok J.D. Efficacy and Safety of Nivolumab in Patients With BRAF V600 Mutant and BRAF Wild-Type Advanced Melanoma: A Pooled Analysis of 4 Clinical Trials. *JAMA Oncol*. 2015; 1(4): 433–40. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.1184.

26. Cheewinhamrongrod V., Kageyama H., Palaga T., Takabe T., Waditee-Sirisattha R. DNA damage protecting and free radical scavenging properties of mycosporine-2-glycine from the Dead Sea cyanobacterium in A375 human melanoma cell lines. *J Photochem Photobiol B*. 2016 Nov; 164: 289–295. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.09.037.

27. McKelvey-Martin V.J., Green M.H., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Méo M.P., Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res*. 1993; 288(1): 47–63. doi: 10.1016/0027-5107(93)90207-v.

28. Olive P.L., Banáth J.P., Durand R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the «comet» assay. *Radiat Res*. 1990 Apr; 122(1): 86–94.

29. Smith T.R., Miller M.S., Lohman K.K., Case L.D., Hu J.J. DNA damage and breast cancer risk. *Carcinogenesis*. 2003 May; 24(5): 8839. doi: 10.1093/carcin/bgg037.

30. Azqueta A., Collins A.R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol*. 2013 Jun; 87(6): 949–68. doi: 10.1007/s00204-013-1070-0.

31. Shaposhnikov S., Frengen E., Collins A.R. Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization—a review. *Mutagenesis*. 2009 Sep; 24(5): 383–9. doi: 10.1093/mutage/gep021.

32. McKenna D.J., McKeown S.R., McKelvey-Martin V.J. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis*. 2008 May; 23(3): 183–90. doi: 10.1093/mutage/gem054.

33. Kopjar N., Garaj-Vrhovac V., Milas I. Assessment of chemotherapy-induced DNA damage in peripheral blood leukocytes of cancer patients using the alkaline comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2002; 22(1): 13–30. doi: 10.1002/tem.1035.

34. Uriol E., Sierra M., Comendador M.A., Fra J., Martínez-Cambor P., Lacave A.J., Sierra L.M. Long-term biomonitoring of breast cancer patients under adjuvant chemotherapy: the comet assay as a possible predictive factor. *Mutagenesis*. 2013 Jan; 28(1): 39–48. doi: 10.1093/mutage/ges050.

35. Ribero S., Stucci L.S., Marra E., Marconcini R., Spagnolo F., Orgiano L., Picasso V., Queirolo P., Palmieri G., Quaglino P., Bataille V. Effect of Age on Melanoma Risk, Prognosis and Treatment Response. *Acta Derm Venereol*. 2018 Jul 11; 98(7): 624–629. doi: 10.2340/00015555-2944.

36. Balch C.M., Soong S.J., Gershenwald J.E., Thompson J.F., Coit D.G., Atkins M.B., Ding S., Cochran A.J., Eggertmont A.M., Flaherty K.T., Gimotty P.A., Johnson T.M., Kirkwood J.M., Leong S.P., McMasters K.M., Mihm M.C.Jr., Morton D.L., Ross M.I., Sondak V.K. Age as a prognostic factor in patients with localized melanoma and regional metastases. *Ann Surg Oncol*. 2013 Nov; 20(12): 3961–8. doi: 10.1245/s10434-013-3100-9.

37. Heuser V.D., de Andrade V.M., Peres A., Gomes de Macedo Braga L.M., Bogo Chies J.A. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell Biol Int*. 2008 Oct; 32(10): 1223–9. doi: 10.1016/j.cellbi.2008.07.005.

Поступила/Received 18.05.2020
Принята в печать/Accepted 18.09.2020

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Цырлина Евгения Владимировна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, Россия). E-mail: evg.tsyrlina@gmail.com. SPIN-код: 8007-8528. Researcher ID (WOS): H-3238-2016. Author ID (Scopus): 75258238. ORCID: 0000-0002-0882-6697.

Порошина Татьяна Евгеньевна, кандидат биологических наук, биолог, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, Россия). SPIN-код: 8939-3404. Author ID (Scopus): 6603943288. ORCID: 0000-0001-5558-5366.

Оганесян Ани Погосовна, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, Россия).

Проценко Светлана Анатольевна, доктор медицинских наук, заведующая отделением химиотерапии и инновационных технологий, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава (г. Санкт-Петербург, Россия). Researcher ID (WOS): O-8421-2015. Author ID (Scopus): 6701618390. ORCID: 0000-0001-6822-9467.

Берштейн Лев Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (г. Санкт-Петербург, Россия). SPIN-код: 2265-6757. Researcher ID (WOS): O-5714-2015. Author ID (Scopus): 7006060881. ORCID: 0000-0002-5112-3372.

ВКЛАД АВТОРОВ

Цырлина Евгения Владимировна: обработка и анализ полученных данных, составление черновика рукописи.

Порошина Татьяна Евгеньевна: выполнение метода «комет», анализ результатов лабораторных исследований.

Оганесян Ани Погосовна: ведение пациентов, анализ результатов проведенного лечения.

Проценко Светлана Анатольевна: критический пересмотр рукописи с внесением ценного интеллектуального содержания.

Берштейн Лев Михайлович: разработка концепции, критический пересмотр рукописи с внесением ценного интеллектуального содержания.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности

Авторы выражают благодарность за помощь в математическом анализе полученных данных кандидату медицинских наук, старшему научному сотруднику ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России Д.А. Васильеву.

ABOUT THE AUTHORS

Evgenia V. Tsyrlina, MD, PhD, Leading Researcher, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology (St-Petersburg, Russia). E-mail: evg.tsyrlina@gmail.com. Researcher ID (WOS): H-3238-2016. Author ID (Scopus): 75258238. ORCID: 0000-0002-0882-6697.

Tatiana E. Poroshina, PhD, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology (St-Petersburg, Russia). Author ID (Scopus): 6603943288. ORCID: 0000-0001-5558-5366.

Ani P. Oganessian, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology (St-Petersburg, Russia).

Svetlana A. Protsenko, MD, DSc, Head of Chemotherapy and Innovative Technologies, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology (St-Petersburg, Russia). Researcher ID (WOS): O-8421-2015. Author ID (Scopus): 6701618390. ORCID: 0000-0001-6822-9467.

Lev M. Bershtein, MD, DSc, Professor, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology (St-Petersburg, Russia). Researcher ID (WOS): O-5714-2015. Author ID (Scopus): 7006060881. ORCID: 0000-0002-5112-3372.

AUTHOR CONTRIBUTION

Evgenia V. Tsyrlina: data processing and analysis, drafting of the manuscript.

Tatiana E. Poroshina: performing of the «comets» method, data analysis.

Ani P. Oganessian: management of patients, analysis of the results of the treatment.

Svetlana A. Protsenko: critical revision of the manuscript for important intellectual content.

Lev M. Bershtein: study conception, critical revision of the manuscript for important intellectual content.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgment

The authors would like to express their gratitude to D.A. Vasiliev, MD, PhD, Senior Researcher of N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, St-Petersburg, for the help in the mathematical data analysis.