

Для цитирования: Цырлина Е.В., Порошина Т.Е., Васильев Д.А., Зиновьев Г.В., Гафтон Г.И., Берштейн Л.М. Повреждение ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с меланомой. Сибирский онкологический журнал. 2022; 21(3): 33–41. – doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-3-33-41

For citation: Tsyrlina E.V., Poroshina T.E., Vasiliev D.A., Zinoviev G.V., Gafton G.I., Berstein L.M. DNA damage in peripheral blood mononuclear cells in patients with melanoma. Siberian Journal of Oncology. 2022; 21(3): 33–41. – doi: 10.21294/1814-4861-2022-21-3-33-41

ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С МЕЛАНОМОЙ

Е.В. Цырлина, Т.Е. Порошина, Д.А. Васильев, Г.В. Зиновьев, Г.И. Гафтон, Л.М. Берштейн

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

Аннотация

Введение. Заболеваемость злокачественной меланомой и ее уровень смертности в последние десятилетия неуклонно растут, что делает актуальным разработку дополнительных маркеров диагностики этой патологии. **Цель исследования** – оценить, сопровождается ли развитие меланомы до проведения какого-либо лечения изменениями на уровне организма и, в частности, повреждением ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов. **Материал и методы.** У 93 пациентов, поступивших в ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н.Н.Петрова» для оперативного лечения меланомы кожи, и 118 здоровых лиц в качестве группы сравнения методом «комет» была исследована степень повреждения ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови. В группу пациентов было включено 26 мужчин и 67 женщин с опухолями T1c-2a-b-3a-b-4a-bN0-1, M0-1 стадии. В процессе анализа все больные были разделены в зависимости от сроков обследования на две группы: 1-я группа – 45 пациентов (13 мужчин и 32 женщины), обследованных до каких-либо лечебных вмешательств; 2-я группа – 48 пациентов (13 мужчин и 35 женщин), предварительно получивших нерадикальное лечение в виде биопсии меланомы. **Результаты.** Показано, что степень повреждения ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови, выявленная методом «комет», у пациентов с меланомой достоверно выше, чем в группе сравнения. Причем это повышение было близким по величине как у пациентов с первичной опухолью до начала каких-либо лечебных воздействий, так и у тех, кому предварительно была сделана попытка нерадикального удаления новообразования. Выявлена определенная зависимость степени повреждения ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови от морфологической характеристики опухоли: так, при расчете корреляций по Спирмену все показатели, определяющие повреждение ДНК, хотя и слабо, но положительно коррелировали с толщиной меланомы по индексу Бреслоу, а процент ДНК в комете и момент хвоста кометы коррелировали и со стадией заболевания. **Заключение.** Развитие меланомы кожи сопровождается повышением степени повреждения ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови. Степень повреждения ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови отражает изменения, происходящие в организме пациента под влиянием опухолевого процесса, что, возможно, позволит использовать этот показатель как дополнительный критерий диагностики и агрессивности меланомы.

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

DNA DAMAGE IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN PATIENTS WITH MELANOMA

E.V. Tsyrlina, T.E. Poroshina, D.A. Vasiliev, G.V. Zinoviev, G.I. Gafton,
L.M. Berstein

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

Abstract

Introduction. The incidence and mortality of malignant melanoma have increased steadily over the last decades; therefore, the development of novel diagnostic markers for malignant melanoma is of great importance. **The purpose of the study** was to assess whether the development of melanoma before any treatment is accompanied by the body changes and, in particular, DNA damage in the mononuclear cells of the peripheral blood of patients. **Material and Methods.** In 93 patients (26 men and 67 women) admitted to the N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology for surgical treatment of stage T1c-2a-b-3a-b-4a-bN0-1 cutaneous malignant melanoma, and in 118 healthy people as a comparison group, the level of damage to DNA in peripheral blood mononuclear cells was studied using the “comet” method. All patients were divided into two groups: group 1 included 45 patients (13 men and 32 women) who were examined before a decision on treatment was made and group 2 consisted of 48 patients (13 men and 35 women) who previously underwent excision biopsy for melanoma. **Results.** The level of DNA damage in peripheral blood mononuclear cells, assessed by the comet assay, was found to be significantly higher in patients with melanoma than in the comparison group. Moreover, the increase in the level of DNA damage was similar both in patients with a primary tumor before starting any treatment and in those who previously underwent excision biopsy for melanoma. The relationship between the level of DNA damage in peripheral blood mononuclear cells and the morphological characteristics of the tumor cells was revealed. The Spearman correlation analysis showed that all parameters that determined DNA damage positively correlated with the thickness of melanoma according to the Breslow’s depth, and the percentage of DNA in the comet and the comet tail moment correlated with the stage of the disease. **Conclusion.** The development of cutaneous melanoma is accompanied by an increase in the level of DNA damage in peripheral blood mononuclear cells. The level of DNA damage in peripheral blood mononuclear cells reflects the changes that occur in the patient’s body under the influence of the tumor process, which may allow using this indicator as an additional criterion for the diagnosis and aggressiveness of melanoma.

Key words: melanoma, DNA damage, mononuclear cells, comet method.

Введение

Учитывая, что заболеваемость злокачественной меланомой и ее уровень смертности в последние десятилетия неуклонно растут [1], актуальными являются разработка дополнительных критериев оценки изменений, происходящих в организме больного, которые в последующем можно было бы связать с агрессивностью опухолевого процесса и эффективностью лечения. Среди параметров, связанных с развитием злокачественных опухолей и заслуживающих внимания, есть основания выделить такой показатель, как степень повреждения ДНК [2, 3]. Повреждение ДНК, возникающее в клетках организма, приводит к развитию геномной нестабильности и является во многих случаях первым шагом в процессах канцерогенеза, развития основных неинфекционных заболеваний, ускоренного старения и смерти [4–6]. Ведущая роль в развитии генотоксического эффекта принадлежит накапливающимся в клетках активным формам кислорода и азота, которые вызывают повреждение ДНК и эпигеномные изменения, приво-

дящие в совокупности к возникновению мутаций и геномной нестабильности [7, 8]. В результате в злокачественных опухолях накапливается большое количество клеток с поврежденной ДНК [9], которые могут служить «маркером» течения, прогноза и чувствительности злокачественных новообразований к терапии [10].

Одним из распространенных методов оценки степени повреждения ДНК в клетке является метод «комет», который позволяет оценить повреждение ДНК даже в единичных клетках [11–13]. Теория, лежащая в основе этого метода, заключается в том, что обработка щелочью поврежденной ДНК вызывает разрывы ее цепей. Если ДНК в клетке сохраняет свою структуру, она сильно свернута и при растворении ядерной мембраны не перемещается, как правило, через такую подложку, как агароза. Поврежденная фрагментированная ДНК может легче мигрировать, перемещаясь к положительно заряженному аноду, образуя структуру, напоминающую хвост кометы [14]. Из-за частого сочетания повышенного уровня повреждения ДНК

и снижения способности к ее репарации опухолевые клетки накапливают от сотен до тысяч геномных aberrаций [15, 16], что может быть использовано в качестве маркера злокачественной опухоли [17, 18]. Исследование повреждения ДНК методом «комет» в клетках рака молочной железы показало, что самая высокая степень повреждения выявлена в наиболее агрессивном, трижды негативном раке, а самая низкая – в люминальном типе опухоли, который характеризуется благоприятным течением и высокой чувствительностью к лечению [19]. В клетках рака шейки матки уровень повреждения ДНК, оцененный по проценту «комет», был значимо выше, чем в контроле, и, что важно, он коррелировал с прогрессированием опухолевого процесса [20].

Важным при этом является тот факт, что такие параметры, как высокий уровень окислительного и репликативного стресса, потеря или подавление контрольных точек клеточного цикла, вызванных повреждением ДНК, способствуют созданию среды, богатой источниками повреждения ДНК [21, 22], и это повреждение возникает не только в опухоли, но и в других клетках организма и, в частности, в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК). Показано, что повреждение ДНК в МКПК у пациентов с немелкоклеточным раком легких, определенное по величине «хвоста кометы», выше, чем у здоровых людей [23]. Аналогичные данные получены в отношении пациентов с опухолью мочевого пузыря, причем авторы предположили, что определение «комет» может представлять собой в данном случае прогностический маркер, указывающий на возможность плохой выживаемости [24, 25]

Связь степени повреждения ДНК, оцененной методом «комет», выявлена не только с заболеваемостью злокачественными опухолями и агрессивностью их течения, но и с общей смертностью. В работе S. Bonassi et al. у 2 403 здоровых индивидумов в период между 1996 и 2016 гг. определены такие параметры «комет» МКПК, как длина хвоста кометы, момент хвоста и % ДНК в хвосте кометы. К концу исследования зафиксирована гибель 308 человек из группы обследованных. Наиболее частой причиной смерти были злокачественные опухоли (n=108) и сердечно-сосудистая патология (n=77). По полученным данным, в группе людей, впоследствии умерших, и у тех, у кого были выявлены злокачественные опухоли, уже исходные средние значения параметров «комет» оказались выше. Причем если основные показатели повреждения ДНК имели только тенденцию к повышению, то уровень ДНК в хвосте кометы был статистически достоверно выше как у умерших (18,0 против 9,0 %, $p < 0,001$), так и у заболевших раком (17,7 против 12,4 %, $p < 0,019$). При использовании статистического анализа Kaplan–Meier показано, что риск смерти выше для обследованных, отнесенных к среднему и верхнему тертилю повреждения

ДНК [26]. Изменения в структуре ДНК, которые возникают в МКПК, могут как отражать общий генотоксический фон организма, так и быть следствием влияния собственно опухоли. Известно, что опухоль может оказывать повреждающее действие на различные системы организма. Вероятно, чем более агрессивным является этот процесс, тем более выраженным может быть это повреждение.

Одним из примеров возможного влияния опухоли на организм является кахексия, которая рассматривается как мультифакторный синдром, включающий изменения в различных метаболических системах и тканях. Влияние опухоли на организм осуществляется за счет таких вырабатываемых опухолью соединений, как воспалительные цитокины (фактор некроза опухоли- α и интерлейкин-6), белки острой фазы и маркеры дегенерации скелетных мышц [27]. Необходимо также упомянуть роль гормонов в этом процессе [28] и, в частности, повышение уровня глюкогона и глюкостероидов [29].

Повреждение ДНК в тканях организма при развитии злокачественной опухоли может происходить и при участии микроРНК (миРНК). миРНК, класс малых регуляторных РНК, снижают способность к репарации ДНК и повышают ее чувствительность к повреждающим агентам [30, 31]. В частности, такие миРНК (miRs), как miR-18b и miR-21, имеют отношение к развитию и прогрессии злокачественной меланомы [32]. Можно предполагать, что в этом процессе определенная роль принадлежит и экзосомам, которые являются продуктами различных типов клеток организма, включая и опухолевые, и обнаруживаются во всех жидких фазах – в крови, слюне, моче и молоке [33]. Экзосомы участвуют в передаче информации от клетки к клетке как между нормальными клетками, так и опухолевыми и оказывают влияние на пролиферацию клеток, иммунный ответ, на ангиогенез, развитие метастазов и чувствительность опухоли к лекарственной терапии [34, 35].

В предшествующем исследовании, проведенном в лаборатории [36], было показано, что повреждение ДНК МКПК, выявленное методом «комет» у пациентов с метастатической меланомой кожи, может рассматриваться как признак агрессивности опухолевого процесса и его чувствительности к иммунотерапии ниволумабом. С целью поиска дополнительных критериев оценки прогноза течения первичной меланомы кожи в настоящем исследовании проведено сопоставление степени повреждения ДНК в мононуклеарах периферической крови с клиническими и морфологическими параметрами опухоли.

Цель исследования – оценить, сопровождается ли развитие меланомы до проведения какого-либо лечения изменениями на уровне организма и, в частности, повреждением ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов.

Материал и методы

В исследование включены 93 пациента, поступившие в ФГБУ «НМИЦ онкологии им Н.Н. Петрова» Минздрава России для оперативного лечения меланомы кожи, и 118 здоровых лиц в качестве группы сравнения (табл. 1). Все пациенты и обследованные в группе сравнения подписывали информированное согласие на определение у них степени повреждения ДНК в МНПК методом «комет». Исследование было одобрено комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Учитывая, что у части больных до проведения оперативного лечения в НИИ онкологии была произведена биопсия меланомы, все пациенты были разделены на две группы: 1-я группа включала первичных пациентов, обследованных до каких-либо лечебных воздействий, ко 2-й группе отнесены больные, которым предварительно была произведена биопсия новообразования. В последующем у 45 пациентов получены данные о ремиссии, у 48 больных такие сведения отсутствовали. В качестве группы сравнения обследовано 118 человек, которые были разделены по возрасту – до 35 лет и после 37 лет.

У всех лиц, включенных в исследование, определяли содержание ДНК-комет в мононуклеарных клетках периферической крови. 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 физиологическим раствором

с 0,001М фосфатным буфером. Для исследования повреждения ДНК использовали протокол метода, описанный V.J. McKelvey-Martin et al. [37]. Этот метод основан на лизисе клеток в щелочной среде с последующим электрофорезом в слое агарозы в постоянном электрическом поле и окрашиванием препаратов флуоресцентным красителем (в нашем исследовании – DAPI). Согласно этому методу, мононуклеарные клетки разрушаются в щелочной среде и поврежденная ядерная ДНК под влиянием электрического тока выходит из клетки, создавая электрофоретический след фрагментов ДНК в виде «кометы». Хвост «кометы» содержит поврежденную ДНК. Длина следа фрагментов (хвоста кометы) и доля ДНК в хвосте связаны со степенью повреждения ДНК клетки. Форма и размеры клеток оценивались визуально в процессе микроскопии и затем измерялись по программе CASPS (Comet Score, TriTek Corp. USA). «Кометой», на основании наших предварительных расчетов, считается клетка, в хвосте которой содержится >4,5 % ДНК. В индивидуальных клетках определялись следующие показатели: длина хвоста «кометы», % ДНК в хвосте, момент хвоста «кометы» (произведение длины хвоста «кометы» на долю ДНК в нем) и процент «комет». Описанный метод доступен в исполнении, чувствителен к оценке и в связи с этим может быть широко адаптирован к исследованию различных патологических процессов [38, 39].

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 и здоровых людей (группа сравнения), включенных в исследование Characteristics of patients and healthy people (comparison group)

Группа/Group	Пол/ Sex	Число обследованных/ Number of examined	Возраст/ Age	Стадия опухоли/ Tumor stage	Длительность ремиссии, мес/ Remission duration, months
1	Муж/Men	13	64,0 (50,0; 72,0)	T1c-2a-b-3a-b-4a-bN0-1,M0-1	10,5 (8,0; 12,0) n=20
	Жен/ Women	32	59,5 (46,0; 68,0)		
2	Муж/Men	13	60,0 (49,0; 67,0)	Tx-1a-2a-b-3a-b-4a-bN0-1,M0-1	12,0 (8,0; 12,0) n=25
	Жен/ Women	35	53,0 (45,0; 64,0)		
Контроль молодой/ The control of the young group	Муж/Men	13	26,0 (25,0; 28,0)		
	Женщ/ Women	34	25,0 (23,0; 30,0)		
Контроль пожилой/ The control of the elderly group	Муж/Men	22	56,0 (45,0; 74,0)		
	Жен/ Women	49	59,0 (48,0; 64,0)		

Примечание: группа 1 – пациенты до начала лечения; группа 2 – пациенты, прооперированные предварительно нерадикально.

Note: group 1 – patients before starting treatment; group 2 – patients who previously underwent excision biopsy.

пределения. В связи с этим данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха, а достоверность различий определяли непараметрическими методами: Манна–Уитни и Спирмена.

Результаты

Показано, что больные с первичной меланомой до оперативного лечения и те, кто был предварительно прооперирован нерадикально, по сравнению с группой контроля имели более высокий уровень повреждения ДНК, определенный методом комет в МКПК (табл. 2). При обсчете данных по Манну–Уитни различие всех параметров, характеризующих повреждение ДНК: длина хвоста кометы, момент хвоста, процент ДНК в хвосте и процента комет – было статистически достоверным как для первичных пациентов до начала лечения, так и для тех, кто до обращения в Институт онкологии был прооперирован нерадикально (табл. 2). При этом эти две группы больных по обследованным параметрам не различались между собой.

Также проведен анализ степени повреждения ДНК в МКПК в зависимости от локализации опухоли, при котором значимых различий не выявлено. Единственное наблюдение, которое можно было отметить, это тенденция к связи между локализацией опухоли и процентом комет, который при расположении меланомы на туловище составил 22,0 (16,00; 27,00), при локализации на нижней конечности – 19,0 (8,00; 28,00), а на верхней

конечности – 11,5 (5,00; 28,00). Представленное наблюдение согласуется с данными литературы, в которых показано, что локализация первичной меланомы на туловище характеризуется худшим прогнозом [40].

Важно отметить, что выявлена определенная зависимость степени повреждения ДНК в МКПК от морфологической характеристики опухоли. Так, при расчете корреляций по Спирмену все показатели, определяющие повреждение ДНК, хотя и слабо, но положительно коррелировали с толщиной меланомы по индексу Бреслоу, а процент ДНК в комете и момент хвоста кометы коррелировали и со стадией заболевания (табл. 3).

Накопление повреждений ДНК и возникновение возрастных заболеваний связывают с процессом старения [41]. В данном исследовании связь между возрастом и степенью повреждения ДНК в МКПК была проанализирована у здоровых людей. В «молодой» и «пожилой» группах были сопоставлены % ДНК и % комет. В молодом возрасте % ДНК в комете составил 2,9 (0,01; 11,80) и % комет – 7,4 (0,01; 26,01). У лиц пожилого возраста % ДНК был равен 3,2 (0,01; 20,10), % комет – 10,0 (0,00; 51,00). На основании этих результатов можно говорить о том, что с возрастом увеличивается количество клеток, в которых имеет место повреждение ДНК. Однако связь с возрастом не была достоверной.

Таким образом, можно считать, что развитие опухолевого процесса оказывает более выра-

Таблица 2/Table 2

Параметры, характеризующие степень повреждения ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с меланомой в зависимости от сроков обследования и в группе сравнения (контроль)

Parameters characterizing the level of DNA damage in peripheral blood mononuclear cells in patients with melanoma and in the comparison group (control)

Параметры/Parameters	Группа 1/ Group 1 (n=45)	Группа 2/ Group 2 (n=48)	Контроль/ Control (n=71)	U (p)
Возраст (лет)/ Age (years)*	61,0 (48,0; 68,0)	52,5 (45,0; 65,0)	59,0 (48,0; 68,0)	a) 891,0* b) 1535,0* c) 1452,0*
Длина хвоста (пиксели)/ Tail length (pixels)*	13,4 (7,32; 21,36)	13,0 (7,53; 21,75)	6,1 (1,27; 12,69)	a) 1001,0* b) 937,0** c) 916,5**
% ДНК/ % DNA*	7,0 (2,33; 9,89)	6,5 (3,49; 10,50)	2,4 (0,40; 4,81)	a) 1045,0* b) 776,0** c) 741,0**
Момент хвоста (усл. ед.)/ Tail moment (arb. units)*	5,5 (1,64; 7,90)	4,6 (2,18; 8,28)	2,1 (0,17; 4,87)	a) 1056,0* b) 915,5** c) 924,5**
% Комет/ % of Comets*	21,0 (8,00; 28,00)	22,5 (11,50; 29,00)	9,0 (2,00; 15,00)	a) 948,5* b) 800,5** c) 694,0**

Примечание: группа 1 – пациенты до начала лечения; группа 2 – пациенты прооперированные предварительно нерадикально; * – p>0,1; ** – p<0,0001; а) – сравнение группа 1/группа 2; б) – сравнение группа 1/контроль; в) – сравнение группа 2/контроль; U – критерий Манна–Уитни.

Note: group 1 – patients before starting treatment; group – 2 patients who previously underwent excision biopsy; * – p>0.1; ** – p<0.0001; а) – comparison group 1/group 2; б) – comparison group 1/control; в) comparison group 2/control; U – Mann–Whitney test.

Таблица 3/Table 3

Коэффициент корреляции по Спирмену, характеризующий сопоставление данных повреждения ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови и морфологических параметров меланомы
Spearman correlation coefficient characterizing the comparison of DNA damage data in peripheral blood mononuclear cells and morphological parameters of melanoma

Показатели комет/ Comet indicators	Коэффициент корреляции по Спирмену, U/Spearman correlation coefficient, U			
	Уровень инвазии меланомы по Кларку/ Clarke's level of melanoma invasion	Толщина опухоли по Бреслоу/ Tumor thickness according to Breslow	Диаметр опухоли/ Tumor diameter	Стадия/ Stage
Длина хвоста (пиксели)/ Tail length (pixels)	0,04	0,35 *	0,13	0,16
% ДНК/ % DNA	0,05	0,38 *	0,12	0,21*
Момент хвоста (усл.ед.)/ Tail moment (arb. units)	0,06	0,38*	0,13	0,21*
% Комет/ % of Comets	-0,02	0,30*	0,15	0,15

Примечание: * – $p < 0,05$.

Note: * – $p < 0,05$.

Таблица 4/Table 4

Связь степени повреждения ДНК и длительности ремиссии
The relationship between the level of DNA damage and the duration of remission

Параметры/Parameters	Длительность ремиссии/Remission duration		P
	≤10 мес/≤10 month 8,0 (5,00; 9,00)	>10 мес/>10 month 12,00 (12,00; 15,00)	
Число наблюдений/Number of observations	22	23	
Возраст (годы)/Age (years)	57,6 (46,0–66,0)	71,5 (65,0–74,0)	0,9
Длина хвоста/Tail length	12,9 (7,39–23,20)	10,4 (7,57–20,23)	0,7
% ДНК/ % DNA	7,4 (3,56–12,28)	5,7 (3,20–10,04)	0,7
Момент хвоста (усл. Ед)/Tail moment (arb. units)	5,4 (2,40–11,47)	4,2 (2,34–8,19)	0,6
% Комет/ % of Comets	22,5 (9,00–29,00)	18,0 (11,00–29,00)	0,9

женное повреждающее действие на ДНК в различных клетках организма, включая МКПК, чем гормонально-метаболические нарушения, возникающие в процессе старения и не сопровождающиеся развитием злокачественной опухоли.

Проведено сопоставление параметров, характеризующих повреждение ДНК, и длительности ремиссии. У пациентов, оперированных повторно и имевших длительность ремиссии меньше 10 мес, все показатели, характеризующие повреждение ДНК, были несколько выше, чем у тех, кто имел ремиссию больше 10 мес, но различия не достигали достоверного уровня (табл 4). Следует отметить, что эти группы различались по возрасту. Медиана возраста пациентов с ремиссией менее 10 мес составила 57,6 (46,00; 66,00) года, при ремиссии больше 10 мес – 71,5 (65,00; 74,00) года (табл. 4).

Обсуждение

Основной результат, полученный в исследовании, показал, что метод «комет» позволяет выявить степень повреждения ДНК в клетках пациентов со злокачественной опухолью, в данном случае меланомой. Это подтверждают данные исследований, выполненных при других новообразованиях,

показавшие, что благодаря чувствительности и экономической эффективности метод «комет» может служить маркером генотоксичности, оксидативного стресса и других метаболических сдвигов, связанных с развитием опухоли и ее изменением под влиянием лечения [2, 13]. Несомненным резервом является в этой области способность ДНК к репарации, что обоснованно связывают с будущими перспективами индивидуальной профилактики или лечения опухолевого процесса [42].

Описана связь степени повреждения ДНК с эффективностью проводимого лечения меланомы. Степень повреждения ДНК и как следствие этого количество мутаций в опухоли коррелировали с ответом на блокаду иммунных точек у пациентов с метастатической меланомой, получавших CTLA-4-блокирующие антитела ипилimumаб или тремелимуаб [43]. В исследовании, выполненном в нашей лаборатории, установлено, что чувствительность меланомы к ниволумабу, препарату, который блокирует рецептор программируемой смерти (PD-1), была выше, если степень повреждения ДНК в МКПК была выражена меньше [36].

Учитывая, что эффективность таргетных препаратов сильно варьирует, в т.ч. и у больных с

меланомой, важен поиск дополнительных клинических критериев, позволяющих прогнозировать эффективность терапии. В то же время стоит учитывать, что при использовании теста комет для оценки эффективности противоопухолевой терапии величина степени повреждения ДНК МКПК может являться отражением как изменений, происходящих в опухоли под влиянием проводимого лечения, так и быть результатом собственно токсического действия лекарственных препаратов на мононуклеарные клетки периферической крови.

Изменения в ДНК в МКПК у пациентов со злокачественной опухолью являются либо следствием общих генотоксических воздействий, происходящих в организме онкологического пациента, либо,

что представляется также вероятным, влиянием опухоли. Подтверждением последней точки зрения может служить выявленная в данном исследовании положительная корреляция степени повреждения ДНК и глубины инвазии меланомы по Бреслоу.

Заключение

Развитие меланомы кожи сопровождается повышением степени повреждения ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови. Все параметры, характеризующие степень повреждения ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови, положительно коррелируют с глубиной инвазии меланомы по Бреслоу.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Leiter U., Keim U., Garbe C. Epidemiology of Skin Cancer: Update 2019. *Adv Exp Med Biol.* 2020; 1268: 123–39. doi: 10.1007/978-3-030-46227-7_6.
2. Pilié P.G., Tang C., Mills G.B., Yap T.A. State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019; 16(2): 81–104. doi: 10.1038/s41571-018-0114-z.
3. Kuchařová M., Hronek M., Rybáková K., Zadák Z., Štětina R., Josková V., Patková A. Comet assay and its use for evaluating oxidative DNA damage in some pathological states. *Physiol Res.* 2019; 68(1): 1–15. doi: 10.33549/physiolres.933901.
4. Burrell R.A., McClelland S.E., Endesfelder D., Groth P., Weller M.C., Shaikh N., Domingo E., Kanu N., Dewhurst S.M., Gronroos E., Chew S.K., Rowan A.J., Schenk A., Sheffer M., Howell M., Kschischo M., Behrens A., Helleday T., Bartek J., Tomlinson I.P., Swanton C. Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature.* 2013; 494(7438): 492–6.
5. Wilhelm T., Olziarsky A.M., Harry D., De Sousa F., Vassal H., Eskat A., Meraldi P. Mild replication stress causes chromosome mis-segregation via premature centriole disengagement. *Nat Commun.* 2019; 10(1): 3585. doi: 10.1038/s41467-019-11584-0.
6. Lugović L., Situm M., Kos L. Malignant melanoma—future prospects. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2005; 13(1): 36–43.
7. Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009; 27(2): 120–39. doi: 10.1080/10590500902885684.
8. Khosla L., Gong S., Weiss J.P., Birder L.A. Oxidative Stress Biomarkers in Age-Related Lower Urinary Tract Disorders: A Systematic Review. *Int Neurourol J.* 2022; 26(1): 3–19. doi: 10.5213/inj.2142188.094.
9. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5): 646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
10. Pearl L.H., Schierz A.C., Ward S.E., Al-Lazikani B., Pearl F.M. Therapeutic opportunities within the DNA damage response. *Nat Rev Cancer.* 2015; 15(3): 166–80. doi: 10.1038/nrc3891.
11. Milić M., Frustaci A., Del Bufalo A., Sánchez-Alarcón J., Valencia-Quintana R., Russo P., Bonassi S. DNA damage in non-communicable diseases: A clinical and epidemiological perspective. *Mutat Res.* 2015; 776: 118–27. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.11.009.
12. Møller P., Stopper H., Collins A.R. Measurement of DNA damage with the comet assay in high-prevalence diseases: current status and future directions. *Mutagenesis.* 2020; 35(1): 5–18. doi: 10.1093/mutage/gez2018.
13. Azqueta A., Ladeira C., Giovannelli L., Boutet-Robinet E., Bonassi S., Neri M., Gajski G., Duthie S., Del Bo' C., Riso P., Koppen G., Basaran N., Collins A., Møller P. Application of the comet assay in human biomonitoring: An hCOMET perspective. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2020; 783. doi: 10.1016/j.mrrev.2019.108288.
14. Sýkora P., Witt K.L., Revanna P., Smith-Roe S.L., Dismukes J., Lloyd D.G., Engelward B.P., Sobol R.W. Next generation high throughput DNA damage detection platform for genotoxic compound screening. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 2771. doi: 10.1038/s41598-018-20995-w.
15. Lawrence M.S., Stojanov P., Mermel C.H., Robinson J.T., Garraway L.A., Goltub T.R., Meyerson M., Gabriel S.B., Lander E.S., Getz G. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature.* 2014; 505(7484): 495–501.
16. Mouw K.W., Goldberg M.S., Konstantinopoulos P.A., D'Andrea A.D. DNA Damage and Repair Biomarkers of Immunotherapy Response. *Cancer Discov.* 2017; 7(7): 675–93. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-0226.
17. Perkhofers L., Gout J., Roger E., Kude de Almeida F., Baptista Simões C., Wiesmüller L., Seufferlein T., Kleger A. DNA damage repair as a target in pancreatic cancer: state-of-the-art and future perspectives. *Gut.* 2021; 70(3): 606–17. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319984.
18. Duijff P.H.G., Nanayakkara D., Nones K., Srihari S., Kalimutho M., Khanna K.K. Mechanisms of Genomic Instability in Breast Cancer. *Trends Mol Med.* 2019; 25(7): 595–611. doi: 10.1016/j.molmed.2019.04.004.
19. Galardi F., Oakman C., Truglia M.C., Cappadona S., Biggeri A., Grisotto L., Giovannelli L., Bessi S., Giannini A., Biganzoli L., Santarpia L., Di Leo A. Inter- and intra-tumoral heterogeneity in DNA damage evaluated by comet assay in early breast cancer patients. *Breast.* 2012; 21(3): 336–42. doi: 10.1016/j.breast.2012.02.007.
20. Cortés-Gutiérrez E.I., Hernández-Garza F., García-Pérez J.O., Dávila-Rodríguez M.I., Aguado-Barrera M.E., Cerda-Flores R.M. Evaluation of DNA single and double strand breaks in women with cervical neoplasia based on alkaline and neutral comet assay techniques. *J Biomed Biotechnol.* 2012. doi: 10.1155/2012/385245.
21. Burrell R.A., McClelland S.E., Endesfelder D., Groth P., Weller M.C., Shaikh N., Domingo E., Kanu N., Dewhurst S.M., Gronroos E., Chew S.K., Rowan A.J., Schenk A., Sheffer M., Howell M., Kschischo M., Behrens A., Helleday T., Bartek J., Tomlinson I.P., Swanton C. Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature.* 2013; 494(7438): 492–6.
22. Wilhelm T., Said M., Naim V. DNA Replication Stress and Chromosomal Instability: Dangerous Liaisons. *Genes (Basel).* 2020; 11(6): 642. doi: 10.3390/genes11060642.
23. Fikrova P., Stetina R., Hrcniarik M., Hrcniarikova D., Hronek M., Zadák Z. DNA crosslinks, DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes of non-small cell lung cancer patients treated with platinum derivatives. *Oncol Rep.* 2014; 31(1): 391–6. doi: 10.3892/or.2013.2805.
24. 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). doi: 10.1016/j.urolonc.2018.01.006.
25. Sestakova Z., Kalavska K., Smolkova B., Miskovska V., Rejlekova K., Sycova-Mila Z., Palacka P., Obertova J., Holickova A., Hurbanova L., Jurkovicova D., Roska J., Goffa E., Svetlovska D., Chovanec M., Mardiak J., Mego M., Chovanec M. DNA damage measured in blood cells predicts overall and progression-free survival in germ cell tumour patients. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2020. doi: 10.1016/j.mrgentox.2020.503200.
26. Bonassi S., Ceppi M., Møller P., Azqueta A., Milić M., Neri M., Brunborg G., Godschalk R., Koppen G., Langie S.A.S., Teixeira J.P., Bruzzone M., Da Silva J., Benedetti D., Cavallo D., Ursini C.L., Giovannelli L., Moretti S., Riso P., Del Bo' C., Russo P., Dobrzyńska M., Goroshinskaya I.A., Surikova E.I., Staruchova M., Barančokova M., Volkovova K., Kažimirova A., Smolkova B., Laffon B., Valdiglesias V., Pastor S., Marcos R., Hernández A., Gajski G., Spremo-Potparević B., Živković L., Boutet-Robinet E., Perdry H., Lebailly P., Perez C.L., Basaran N., Nemeth Z., Safar A., Dusinska M., Collins A.; hCOMET project. DNA damage in circulating leukocytes measured with the comet assay may predict the risk of death. *Sci Rep.* 2021; 11(1): 16793. doi: 10.1038/s41598-021-95976-7.
27. Loumaye A., Thissen J.P. Biomarkers of cancer cachexia. *Clin Biochem.* 2017; 50(18): 1281–8. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.07.011.
28. Chesnokova V., Melmed S. Peptide Hormone Regulation of DNA Damage Responses. *Endocr Rev.* 2020; 41(4): 519–37. doi: 10.1210/edrv/bnaa009.

29. Argilés J.M., Busquets S., Stemmler B., López-Soriano F.J. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14(11): 754–62. doi: 10.1038/nrc3829.
30. Wan G., Mathur R., Hu X., Zhang X., Lu X. miRNA response to DNA damage. *Trends Biochem Sci*. 2011; 36(9): 478–84. doi: 10.1016/j.tibs.2011.06.002.
31. Visser H., Thomas A.D. MicroRNAs, damage levels, and DNA damage response control. *Trends Genet*. 2021; 37(11): 963–5. doi: 10.1016/j.tig.2021.06.018.
32. Yang C., Xia Z., Zhu L., Li Y., Zheng Z., Liang J., Wu L. MicroRNA-139-5p modulates the growth and metastasis of malignant melanoma cells via the PI3K/AKT signaling pathway by binding to IGF1R. *Cell Cycle*. 2019; 18(24): 3513–24. doi: 10.1080/15384101.2019.1690881.
33. Chung I.M., Rajakumar G., Venkidasamy B., Subramanian U., Thiruvengadam M. Exosomes: Current use and future applications. *Clin Chim Acta*. 2020; 500: 226–32. doi: 10.1016/j.cca.2019.10.022.
34. Gowda R., Robertson B.M., Iyer S., Barry J., Dinavahi S.S., Robertson G.P. The role of exosomes in metastasis and progression of melanoma. *Cancer Treat Rev*. 2020; 85. doi: 10.1016/j.ctrv.2020.101975.
35. Khan A.Q., Akhtar S., Prabhu K.S., Zarif L., Khan R., Alam M., Buddenkotte J., Ahmad A., Steinhoff M., Uddin S. Exosomes: Emerging Diagnostic and Therapeutic Targets in Cutaneous Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(23): 9264. doi: 10.3390/ijms21239264.
36. 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. [Tsyrlina E.V., Poroshina T.E., Oganesyana A.P., Protsenko S.A., Bershtein 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. (in Russian)]. doi: 10.21294/1814-4861-2021-20-2-37-45.
37. McKelvey-Martin V.J., Green M.H., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Mèo 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.
38. Milic M., Frustaci A., Del Bufalo A., Sánchez-Alarcón J., Valencia-Quintana R., Russo P., Bonassi S. DNA damage in non-communicable diseases: A clinical and epidemiological perspective. *Mutat Res*. 2015; 776: 118–27. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.11.009.
39. Møller P. Measurement of oxidatively damaged DNA in mammalian cells using the comet assay: Reflections on validity, reliability and variability. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2022; 873. doi: 10.1016/j.mrgentox.2021.503423.
40. Voinea S., Blidaru A., Panaitescu E., Sandru A. Impact of gender and primary tumor location on outcome of patients with cutaneous melanoma. *J Med Life*. 2016; 9(4): 444–8.
41. Shimizu I., Yoshida Y., Suda M., Minamino T. DNA damage response and metabolic disease. *Cell Metab*. 2014; 20(6): 967–77. doi: 10.1016/j.cmet.2014.10.008.
42. Vodička P., Vodenkova S., Opattova A., Vodičkova L. DNA damage and repair measured by comet assay in cancer patients. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2019; 843: 95–110. doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.05.009.
43. Snyder A., Makarov V., Merghoub T., Yuan J., Zaretsky J.M., Desrichard A., Walsh L.A., Postow M.A., Wong P., Ho T.S., Hollmann T.J., Bruggeman C., Kannan K., Li Y., Elipenahli C., Liu C., Harbison C.T., Wang L., Ribas A., Wolchok J.D., Chan T.A. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*. 2014; 371(23): 2189–99. doi: 10.1056/NEJMoa1406498.

Поступила/Received 03.03.2022

Одобрена после рецензирования/Revised 27.05.2022

Принята к публикации/Accepted 10.06.2022

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Цырлина Евгения Владимировна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия). E-mail: evg.tsyrlina@gmail.com. SPIN-код: 8007-8528. Author ID (Scopus): 7005258238. ORCID: 0000-0002-0882-6697.

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

Васильев Дмитрий Алексеевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия). SPIN-код: 2250-4475. Researcher ID (WOS): G-4698-2019. Author ID (Scopus): 6602117724. ORCID: 0000-0002-4215-2948.

Зиновьев Григорий Владимирович, кандидат медицинских наук, заведующий хирургическим отделением опухолей костей, мягких тканей и кожи, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия). SPIN-код: 3883-1380. Author ID (Scopus): 57215858104. ORCID: 0000-0003-1639-2443.

Гафтон Георгий Иванович, доктор медицинских наук, заведующий научным отделением, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия). SPIN-код: 6795-2956. Researcher ID (WOS): O-7616-2015. ORCID: 0000-0003-3172-2201.

Берштейн Лев Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (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 драфта рукописи.

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

Васильев Дмитрий Алексеевич: обработка и анализ полученных данных.

Зиновьев Григорий Владимирович: ведение пациентов, обсуждение полученных результатов.

Гафтон Георгий Иванович: обсуждение полученных результатов, редактирование рукописи.

Берштейн Лев Михайлович: существенный вклад в разработку концепции, редактирование последовательных вариантов рукописи и окончательное утверждение ее направленной в редакцию версии.

Финансирование

Это исследование не потребовало дополнительного финансирования.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ABOUT THE AUTHORS

Evgenia V. Tsyrlina, MD, PhD, Leading Researcher, N.N. Petrov National Medical Oncology Research Center of the Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia). E-mail: evg.tsyrlina@gmail.com. Author ID (Scopus): 7005258238. ORCID: 0000-0002-0882-6697.

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

Dmitry A. Vasiliev, MD, PhD, Senior Researcher, N.N. Petrov National Medical Oncology Research Center of the Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia). Researcher ID (WOS): G-4698-2019. Author ID (Scopus): 6602117724. ORCID: 0000-0002-4215-2948.

Grigory V. Zinoviev, MD, PhD, Head of Surgical Department of Bone, Soft Tissue and Skin Tumors, N.N. Petrov National Medical Oncology Research Center of the Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia). Author ID (Scopus): 57215858104. ORCID: 0000-0003-1639-2443.

Georgy I. Gafton, MD, DSc, Head of Scientific Department, N.N. Petrov National Medical Oncology Research Center of the Ministry of Health of Russia (St. Petersburg, Russia). Researcher ID (WOS): O-7616-2015. ORCID: 0000-0003-3172-2201.

Lev M. Bershtein, MD, DSc, Professor, N.N. Petrov National Medical Oncology Research Center of the Ministry of Health of Russia (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.

Tatyana E. Poroshina: implementation of the “comet” method, analysis of the results of laboratory studies.

Dmitry A. Vasiliev: data processing and analysis.

Grigory V. Zinoviev: management of patients, discussion of the results.

Georgy I. Gafton: discussion of the obtained results, editing of the manuscript.

Lev M. Bershtein: significant contribution to the development of the concept, editing of successive versions of the manuscript and the final approval of its version.

Funding

This study required no funding.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.