

## ОЦЕНКА УРОВНЯ ПОВРЕЖДЕННОСТИ ДНК ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ПРОЦЕССЕ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

Горошинская И.А.<sup>1</sup>, Франциянц Е.М.<sup>1</sup>, Владимирова Л.Ю.<sup>1</sup>, Сирота Н.П.<sup>2</sup>, Сурикова Е.И.<sup>1</sup>, Тарнопольская О.В.<sup>1</sup>, Тихановская Н.М.<sup>1</sup>, Кузнецова Е.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, e-mail: iagor17@mail.ru;

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН, Пущино

Методом ДНК-комет исследовали базальный уровень поврежденности ДНК лейкоцитов свежей цельной капиллярной крови у 17 больных раком молочной железы (РМЖ), T2-4N1-2M0, в процессе неoadьювантной химиотерапии с использованием циклофосфида, доксорубина, 5-фторурацила. Также определяли долю ДНК в хвосте комет (%ТДНК) у 13 здоровых женщин без онкопатологии. В группе здоровых женщин уровень %ТДНК составил  $2,8 \pm 0,2$  %. У больных РМЖ до начала лечения средний по группе уровень %ТДНК составил  $2,6 \pm 0,3$  %, при этом группа была достаточно разнородна по данному показателю. Воздействие окислительного стресса на лейкоциты (позитивный контроль с  $H_2O_2$ ) приводило к сходным изменениям у здоровых женщин и у больных до лечения: уровень % ТДНК возрастал в среднем в 4–6 раз. На разных сроках после введения химиопрепаратов в течение 3 курсов неoadьювантной химиотерапии выявлены индивидуальные особенности ответа лейкоцитов. К концу первых суток после введения химиопрепаратов на 1 курсе только у одной больной выявлено значительное увеличение уровня % ТДНК. Перед 2 курсом уровень % ТДНК у 4 больных оказался повышенным, а у 7 – оставался на уровне значений до начала лечения. Поскольку % ТДНК является интегральным показателем целостности генома клетки, его варибельность – результат взаимодействия многих факторов и может отражать изменения в чувствительности лейкоцитов к цитотоксическому воздействию химиопрепаратов. Результаты показали, что существуют различия в ответе лейкоцитов при использовании метода ДНК-комет для оценки поврежденности ДНК, возможно, связанные со спецификой используемых химиопрепаратов. Полученные данные обуславливают интерес к дальнейшим исследованиям индивидуальной динамики поврежденности ДНК неопухолевых (нетаргетных) клеток, особенно в первые часы после введения химиопрепаратов.

Ключевые слова: рак молочной железы, химиотерапия, доксорубин, повреждение ДНК, метод ДНК-комет, лейкоциты цельной крови.

## EVALUATION OF DNA DAMAGE IN BLOOD LEUKOCYTES IN BREAST CANCER PATIENTS DURING NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY

Goroshinskaya I.A.<sup>1</sup>, Francijanc E.M.<sup>1</sup>, Vladimirova L.Yu.<sup>1</sup>, Sirota N.P.<sup>2</sup>, Surikova E.I.<sup>1</sup>, Tarnopolskaya O.V.<sup>1</sup>, Tikhanovskaya N.M.<sup>1</sup>, Kuznetsova E.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: iagor17@mail.ru

<sup>2</sup> Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino

Basal levels of DNA damage in leukocytes in fresh capillary whole blood were studied with the comet assay in 17 patients with breast cancer (T2-4N1-2M0) during neoadjuvant chemotherapy with cyclophosphamide, doxorubicin and 5-fluorouracil. DNA percentage in the comet tail (%Tail DNA) was detected in 13 healthy women. %Tail DNA in healthy women was  $2.8 \pm 0.2$  %. %Tail DNA varied greatly in patients before the treatment with its mean level of  $2.6 \pm 0.3$  %. Leukocyte exposure to oxidative stress (positive control with  $H_2O_2$ ) resulted in similar changes in healthy women and in patients before treatment: %TDNA increased on average by 4-6 times. Individual characteristics of leukocyte response were registered in different periods after administration of chemotherapy drugs during 3 courses of neoadjuvant chemotherapy. Only 1 patient showed significant increase of %Tail DNA level by the end of the first day of course 1 of chemotherapy. Before the second course, %Tail DNA in 4 patients was increased and in 7 patients it was similar to the level before treatment. Since %Tail DNA is an integral indicator of the cell genome integrity, its variability is the result of an interaction of many factors and can reflect changes in the leukocyte sensitivity to cytotoxic effects of chemotherapy drugs. The results showed that there are some differences in leukocyte response when using the method of DNA comets to assess DNA damage. They are probably associated with the specificity of the chemotherapy drugs. The obtained data determine the interest in further studies of individual dynamics of DNA damage in non-tumor (non-target) cells, especially during the first hours after chemotherapy drug administration.

Keywords: breast cancer, chemotherapy, doxorubicin, DNA damage, comet assay, whole blood leukocytes.

В структуре онкологической заболеваемости женщин рак молочной железы занимает ведущее место во многих регионах мира, в том числе и в Ростовской области [1]. В настоящее время в схемах предоперационной химиотерапии больных РМЖ наиболее часто используется включение антрациклиновых антибиотиков, одинаково блокирующих синтез ДНК и РНК и вызывающих гибель клеток. По современным представлениям существует несколько механизмов действия химиопрепаратов этого класса: 1 – интеркаляция молекулы препарата между основаниями ДНК с образованием прочного комплекса между ДНК и препаратом; 2 – связывание и ингибирование топоизомеразы II, принимающей участие в процессах организации хроматина в ходе репликации ДНК, транскрипции генов, в результате чего нарушаются синтез ДНК, ее транскрипция; 3 – помимо этого показано, что в процессе внутриклеточного метаболизма препаратов, в частности доксорубина, при участии различных оксидоредуктаз (NAD(P)H-дегидрогеназ, ксантинооксидазы, NO-синтазы) инициируется образование свободных радикалов кислорода [10]. Образование свободных радикалов сопровождается окислительным повреждением ДНК, о чем свидетельствуют, например, данные работы Doroshow J.H. и соавт. [9], в которой показана индукция модификации оснований ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови при введении доксорубина. Модификация оснований ДНК приводит к образованию щелочлабильных сайтов, которые можно выявить методом ДНК-комет в щелочной версии.

Данный метод нашел применение в биомониторинговых исследованиях как критерий генотоксического действия различных внешних физических и химических факторов [5]. Кроме того, метод ДНК-комет (Comet assay) пытаются использовать в онкологии для оценки химио- и радиочувствительности опухолевых (таргетных) и неопухолевых (нетаргетных) клеток при различных методах лечения. Например, в работах Blaziak J. и соавт. [8], Сироты Н.П. и соавт. [4] показан повышенный средний уровень % ТДНК у больных РМЖ в процессе химиотерапии по схеме, включающей циклофосфамид, метотрексат, 5-фторурацил (СМФ), в сравнении со здоровыми женщинами. Результаты работ [4] и [8] существенно различаются значением базального уровня повреждения ДНК у здоровых лиц одного возрастного периода. Так, в работе [8] % ТДНК составил  $0,4 \pm 0,1$  %, а в работе [4] –  $2,9 \pm 0,5$  %. Эти различия могут быть обусловлены неидентичностью экспериментальных условий проведения щелочной процедуры Comet assay.

**Целью** нашей работы явилась оценка индивидуальной динамики уровня поврежденности ДНК лейкоцитов свежей цельной крови у больных РМЖ при неoadъювантной химиотерапии с использованием доксорубина.

## Материал и методы исследования

В исследовании приняли участие 17 больных раком молочной железы (T2-4N1-2M0) с гистотипом инфильтрирующая протоковая карцинома (1 женщина – люминальный А, 3 – люминальный В HER2 негативный, 9 – люминальный В HER2 позитивный, 3 – Erb-B2 сверхэкспрессирующий, 1 – трижды негативный подтипы РМЖ), в возрасте от 38 до 65 лет, получивших химиотерапевтическое лечение в ФГБУ «РНИОИ» Минздрава РФ с апреля по июль 2015 года. Неоадьювантную химиотерапию (НАХТ) проводили по схеме: 1) циклофосфамид (Бакстер Онкология ГмбХ, Германия) 500 мг/м<sup>2</sup>, внутривенно, капельно, 2) доксорубин (ОАО «Фармстандарт», Россия; ООО «ЛЭНС-Фарм», Россия) 50 мг/м<sup>2</sup>, внутривенно, капельно, 3) 5-фторурацил (Эбеве Фарма ГмбХ Нфг. КГ, Австрия) 500 мг/м<sup>2</sup>, внутривенно, капельно. 2-й и 3 курсы химиотерапии проводили через 21 день после инфузии на предыдущем курсе. Забор крови у больных производили утром натощак перед 1 курсом, перед началом 2 курса и перед началом 3 курса НАХТ, а также через 1–4 суток после введения химиопрепаратов на каждом курсе. По различным организационно-техническим причинам не у всех больных удалось произвести забор крови на одинаковых этапах химиотерапии. Контрольную группу составили 13 женщин без онкопатологии, в возрасте от 31 до 65 лет, обследованных в этот же период времени. Дизайн исследования был одобрен этическим комитетом ФГБУ «РНИОИ». Обязательным условием включения в исследование было добровольное информированное согласие больных и женщин из контрольной группы. Использовали свежую цельную капиллярную кровь (антикоагулянт К<sub>2</sub>EDTA 1,0 мг). Все пробы крови не подвергались замораживанию и размораживанию.

Для оценки степени поврежденности ДНК использовали метод щелочного геле-электрофореза изолированных клеток (метод ДНК-комет) согласно рекомендациям [3], протокол описан в работе [6]. Цельную кровь в соотношении 1:20 смешивали с 1 % легкоплавкой агарозой. Лизис проводили в течение 1 часа при 4°C в буфере, содержащем 2,5М NaCl, 100мМ Na<sub>2</sub>EDTA, 10мМ трис-(гидроксиметил)-аминометан, 10 % диметилсульфоксид, 1 % тритон X-100 (pH=10). Этап денатурации проводили в течение 20 мин. при 4 °С в щелочном буфере, содержащем 300мМ NaOH, 1мМ Na<sub>2</sub>EDTA (pH>13). В том же буфере проводили электрофорез (4 °С, 20 мин, 300 мА, 20 В, источник тока Эльф-4 (ДНК-технология), камера BIO-RAD Sub-Cell model 96). Препараты фиксировали в 70° этаноле и окрашивали в растворе этидиум бромид (2 мкг/мл). В качестве позитивного контроля использовали препараты, которые перед этапом лизиса инкубировали в растворе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 мкМ/л) 10 мин. при 4°C.

Микроскопирование препаратов осуществляли на люминесцентном микроскопе Axio Imager M2, Zeiss. Съемку производили цветной цифровой камерой AxioCam HRc, Zeiss при

длине волны возбуждения 520 нм, волны эмиссии – 640 нм, для каждой пробы соблюдали одинаковые разрешение и экспозицию. Определение интенсивности свечения этидиум бромид, связанного с нуклеоидами, и подсчет параметров ДНК-комет проводили с помощью программного обеспечения AxioVision, rel.4.8. На каждом микропреparate анализировали не менее 200 комет, определяя % ТДНК.

Численные данные анализировали с помощью приложений Exsel и Statistica 6.0. Статистическую значимость различий оценивали непараметрическим U-критерием (Манна – Уитни) и параметрическим – Т-тест Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования показали, что в контрольной группе (у здоровых женщин) %ТДНК составлял в среднем  $2,8 \pm 0,2$  %, индивидуальные различия были в пределах от 1,6 до 4,0 % ТДНК (таблица 1). В позитивном контроле (после воздействия  $H_2O_2$ ) уровень повреждения ДНК увеличивался в среднем в 5 раз (от 2,6 до 8,6 раз) вне зависимости от количества лейкоцитов в крови.

В группе больных РМЖ до лечения средний уровень % ТДНК не отличался от значения в контрольной группе и составлял  $2,6 \pm 0,31$  % ТДНК (таблица 2). При этом у 11 человек исходный уровень % ТДНК был ниже среднего значения по контрольной группе ( $1,8 \pm 0,06$  %), а у 6 человек исходный уровень % ТДНК был выше среднего значения по контрольной группе ( $4,0 \pm 0,45$  %) ( $p < 0,001$ ). Только у 2-х человек (№ 14 и 17) исходный уровень % ТДНК превышал максимальный в контрольной группе. У больных РМЖ % ТДНК в позитивном контроле (после воздействия  $H_2O_2$ ) увеличивался в среднем также в 5 раз, однако индивидуальный разброс был шире – от 1,8 до 18,2 раз. При этом у больных с уровнем повреждения ниже среднего по контрольной группе % ТДНК в позитивном контроле увеличивался в среднем в 6,2 раза, у больных с уровнем повреждения выше среднего по контрольной группе % ТДНК увеличивался в среднем лишь в 3,2 раза.

Таблица 1

Уровень поврежденности ДНК лейкоцитов и общее количество лейкоцитов крови здоровых женщин

№ п/п	Базальный уровень, %ТДНК $\pm$ SE	Позитивный контроль, %ТДНК $\pm$ SE	Общее количество лейкоцитов в крови $\times 10^9$ кл/л
1	$3,8 \pm 0,7$	$16,2 \pm 1,3$	5,2
2	$2,7 \pm 0,5$	$13,8 \pm 1,5$	6,1
3	$3,4 \pm 0,5$	$13,4 \pm 1,3$	5,5
4	$2,5 \pm 0,4$	$13,0 \pm 1,4$	6,0
5	$2,1 \pm 0,3$	$16,8 \pm 1,7$	5,8

6	2,4±0,4	20,2±1,7	5,0
7	2,8±0,6	15,2±1,3	6,5
8	3,2±0,5	9,8±1,2	6,1
9	3,2±0,7	8,2±1,1	5,1
10	1,9±0,2	8,8±0,9	7,9
11	1,6±0,2	7,4±0,9	6,0
12	4,0±0,6	4,2±0,5	6,2
13	3,2±0,5	27,5±1,9	6,1
Mean ± SE	2,8±0,2	13,4±1,7	6,0±0,2

Примечание: Mean – среднее значение, SE – стандартная ошибка.

При оценке динамики уровня % ТДНК в течение 4 суток после введения химиопрепаратов на 1 курсе химиотерапии только у 1 больной было выявлено значимое его увеличение (больная № 14). У остальных больных колебания уровня % ТДНК не были статистически значимы. В позитивном контроле через 1–2 суток после введения химиопрепаратов отмечалось менее выраженное (по сравнению с фоновым контролем) увеличение % ТДНК в ответ на воздействие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, т.е. ослабление реакции на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – нарастала устойчивость лейкоцитов к окислению ДНК, через 3 суток отмечалось постепенное восстановление исходной реакции клеток, т.е. увеличение чувствительности к повреждению H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Надо отметить, что у всех больных через 1 сутки после введения химиопрепаратов существенно выросло общее количество лейкоцитов в среднем с  $5,5 \times 10^9$  кл./л (разброс от 4,0 до  $7,1 \times 10^9$  кл./л) до  $8,0 \times 10^9$  кл./л,  $p=0,005$  (разброс от 5,2 до  $11,3 \times 10^9$  кл./л), что указывает на выход дополнительного количества лейкоцитов из кровяных депо (костного мозга и селезенки) в ответ на цитотоксическое действие химиопрепаратов на клетки крови. В результате происходит обновление популяции лейкоцитов. В последующие сутки этот показатель снижался, приближаясь к значениям до начала лечения.

Перед 2 курсом НАХТ, т.е. через три недели после введения химиопрепаратов на 1 курсе, у 4 женщин (28 % больных) уровень % ТДНК в лейкоцитах был значимо повышен по сравнению с их исходно низким уровнем (перед 1 курсом) – в 3–5 раз ( $p<0,05$ ), у 1 больной (№ 14) уровень % ТДНК снизился в 3,5 раза ( $p<0,001$ ), а у 5 больных (№ 9, 10, 11, 15, 17) с исходно более высоким (перед 1 курсом) уровнем % ТДНК произошло снижение этого показателя на 24–54 %, хотя и статистически не значимое. Через 3 суток после введения химиопрепаратов на 2 курсе НАХТ уровень % ТДНК снизился, вернувшись к соответствующим фоновым значениям до 1 курса НАХТ. Динамика реакции лейкоцитов на воздействие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в позитивном контроле была аналогична изменениям на 1 курсе. Далее нам удалось проследить только 3 больных с высоким уровнем % ТДНК перед 2 курсом НАХТ. На 3 курсе химиотерапии % ТДНК у них оказался значительно сниженным в среднем в 2,2 раза по сравнению с фоном перед 2 курсом, оставаясь, однако, выше исходных значений.

Таблица 2

Уровень поврежденности ДНК (% ТДНК  $\pm$  SE) лейкоцитов крови больных РМЖ в процессе неoadьювантной химиотерапии

№ п/п пациента, стадирование по TNM	1 курс химиотерапии					2 курс химиотерапии			3 курс химиотерапии	
	до начала курса	Через 1 сутки	Через 2 суток	Через 3 суток	Через 4 суток	до начала курса	Через 1 сутки	Через 3 суток	до начала курса	Через 3 суток
1- сT3N1M0	1,8 $\pm$ 0,53	1,8 $\pm$ 0,42	1,6 $\pm$ 0,33	1,6 $\pm$ 0,35						
2- сT2N1M0	1,6 $\pm$ 0,38	1,5 $\pm$ 0,31	1,6 $\pm$ 0,43	1,6 $\pm$ 0,34		<b>8,1<math>\pm</math>1,12*</b>	2,5 $\pm$ 0,55	1,9 $\pm$ 0,50	3,6 $\pm$ 1,22	2,5 $\pm$ 0,81
3- сT2N1M0 и сT4N2M0	1,5 $\pm$ 0,36	1,8 $\pm$ 0,51	1,8 $\pm$ 0,31	1,5 $\pm$ 0,31	2,1 $\pm$ 0,52	<b>5,4<math>\pm</math>1,01*</b>	2,5 $\pm$ 0,45	1,7 $\pm$ 0,63	2,9 $\pm$ 1,0	3,2 $\pm$ 1,25
4- сT2N1M1	2,0 $\pm$ 0,34	1,4 $\pm$ 0,32			1,3 $\pm$ 0,33	<b>6,0<math>\pm</math>1,21*</b>	1,5 $\pm$ 0,60	2,2 $\pm$ 0,75	2,0 $\pm$ 0,75	3,4 $\pm$ 1,24
5- сT2N1M0	1,9 $\pm$ 0,32	1,9 $\pm$ 0,40	2,0 $\pm$ 0,30		2,1 $\pm$ 0,21	2,6 $\pm$ 0,62		2,3 $\pm$ 0,92		
6- сT4N1M0	1,7 $\pm$ 0,27	2,0 $\pm$ 0,38	2,2 $\pm$ 0,60							
7- сT2N1M0	1,9 $\pm$ 0,36		3,5 $\pm$ 0,52	3,9 $\pm$ 0,34				<b>4,4<math>\pm</math>0,93*</b>		
8- сT2N1M0	2,1 $\pm$ 0,39		2,4 $\pm$ 0,23	2,4 $\pm$ 0,30		1,6 $\pm$ 0,55		2,6 $\pm$ 0,85		
9- сT4NxM0	3,2 $\pm$ 0,35	3,0 $\pm$ 0,27			2,0 $\pm$ 0,31	2,0 $\pm$ 0,41		2,7 $\pm$ 0,92		
10- сT2NxM0	3,3 $\pm$ 0,51	4,1 $\pm$ 0,55			2,0 $\pm$ 0,52	2,2 $\pm$ 0,73		3,3 $\pm$ 1,10		
11- сT4N1-2M0	3,4 $\pm$ 0,44			2,3 $\pm$ 0,32		2,2 $\pm$ 0,61		2,6 $\pm$ 1,0		
12- сT3N1M0	1,7 $\pm$ 0,27				1,6 $\pm$ 0,37	1,8 $\pm$ 0,52				
13- сT4Nx-1M0	1,7 $\pm$ 0,32	1,8 $\pm$ 0,63			1,9 $\pm$ 0,43	<b>5,9<math>\pm</math>0,85*</b>				
14- сT4N1M0	5,2 $\pm$ 0,53	<b>9,9<math>\pm</math>0,61*</b>			<b>17,4<math>\pm</math>0,60*</b>	<b>1,5<math>\pm</math>0,33*</b>				
15- сT2N1M0	3,4 $\pm$ 0,51				2,8 $\pm$ 0,25	2,6 $\pm$ 0,45				
16- сT2N2M0	2,0 $\pm$ 0,42		2,2 $\pm$ 0,24	2,4 $\pm$ 0,31		1,9 $\pm$ 0,36				
17- сT2N1M0	5,7 $\pm$ 0,91					2,6 $\pm$ 0,51				
Mean $\pm$ SE (n)	2,6 $\pm$ 0,31 (17)	2,9 $\pm$ 0,82 (10)	2,2 $\pm$ 0,22 (8)	2,2 $\pm$ 0,32 (7)	3,7 $\pm$ 1,72 (9)	3,3 $\pm$ 0,56 (14)	2,2 $\pm$ 0,35 (3)	2,6 $\pm$ 0,27 (9)	2,8 $\pm$ 0,46 (3)	3,0 $\pm$ 0,29 (3)
Позитивный контроль	14,0 $\pm$ 0,8	8,8 $\pm$ 0,4	5,7 $\pm$ 0,3	7,6 $\pm$ 0,1	12,9 $\pm$ 0,8	14,5 $\pm$ 0,6	9,2 $\pm$ 0,2	12,6 $\pm$ 0,3	8,3 $\pm$ 0,2	10,0 $\pm$ 0,2
Mean 1 $\pm$ SE(n)	<b>1,8<math>\pm</math>0,06</b> (11)	1,7 $\pm$ 0,08 (7)			2,0 $\pm$ 0,15 (8)	2,1 $\pm$ 0,13 (10)		2,3 $\pm$ 0,14 (7)		
Mean 2 $\pm$ SE(n)	<b>4,0<math>\pm</math>0,45**</b> (6)	5,7 $\pm$ 2,14 (3)			17,4 $\pm$ 0,6 (1)	6,4 $\pm$ 0,6 (4)		3,8 $\pm$ 0,55 (2)		

Примечание: \* – статистически значимое отклонение от показателя до начала 1 курса химиотерапии ( $p < 0,05$ ), \*\* – статистически значимые различия между подгруппами 1 и 2 ( $p < 0,001$ ). Mean – среднее значение, SE – стандартная ошибка.

По результатам проведенного исследования нельзя однозначно сказать, что больные РМЖ в целом существенно отличаются от здоровых женщин (без выявленной онкопатологии) по уровню поврежденности ДНК лейкоцитов крови. Однако больные РМЖ представляют собой достаточно разнородную группу – у 65 % больных интегральный показатель поврежденности был существенно ниже, а у 35 % – выше среднего по группе здоровых женщин. Это может быть связано с индивидуальными различиями в интенсивности окислительных процессов, протекающих в крови, и состоянии антиоксидантных систем защиты, как плазменных, так и внутриклеточных. Кроме того, %ТДНК как интегральный показатель поврежденности ДНК зависит не только от интенсивности процессов повреждения ДНК, но также и от активности репаративных процессов, протекающих в клетке. Существуют индивидуальные различия в активности систем репарации, определяемые полиморфизмом генов ферментов репарации.

Полученные данные по динамике поврежденности ДНК лейкоцитов в течение 2 курсов НАХТ с использованием в схеме доксорубина выявили разнородность ответа лейкоцитов больных РМЖ на разных сроках после введения химиопрепаратов. К концу первых суток после инфузии только у одной больной из 10 обследованных на данном этапе было выявлено значительное увеличение поврежденности ДНК. При этом у данной больной с сопутствующим хроническим пиелонефритом был отмечен повышенный исходный уровень поврежденности ДНК, что может свидетельствовать об исходно нарушенном балансе интенсивности окислительных и репаративных процессов. У остальных больных изменения были слабо выражены или отсутствовали. Одной из причин такого явления может быть процесс репопуляции лейкоцитов (выброс более молодых и, возможно, более устойчивых клеток), о чем свидетельствует увеличение количества лейкоцитов у больных через 1 сутки после инфузии химиопрепаратов. Похожая картина наблюдается и на 2 курсе НАХТ.

В данном исследовании нам не удалось выявить четких взаимосвязей между изменением показателя % ТДНК в лейкоцитах и такими клиническими характеристиками, как распространенность опухолевого процесса (классификация по TNM) или биологическим подтипом РМЖ. Однако стоит обратить внимание на существование некоторых клинических особенностей у больных со значимым увеличением % ТДНК перед 2 курсом НАХТ: у больной № 2 (с самым высоким % ТДНК перед 2 курсом) у единственной в группе был обнаружен трижды негативный подтип РМЖ (часто ассоциирующийся с мутацией BRCA1 и характеризующийся агрессивным течением), больная № 3 единственная в группе имела синхронный РМЖ (люминальный В HER2 позитивный подтип), больная № 4 (опухоль люминального В HER2 негативного подтипа) – единственный в группе случай отдаленного метастазирования (в мягкие ткани грудины), у больной №13 выявлена крупная опухоль с

мультицентрической формой роста (люминальный В HER2 позитивный подтип), кроме того, состояние больной было осложнено значительно выраженной сердечно-сосудистой патологией.

В литературе имеются сведения об увеличении уровня поврежденности ДНК лейкоцитов больных РМЖ в процессе химиотерапии. Например, Blaziak J. и соавт. [8] изучали выделенные из крови лимфоциты у больных РМЖ до и после химиотерапии по схеме, включающей циклофосфамид, метотрексат, 5-фторурацил (СМФ). Показано, что больные РМЖ и до лечения и на 8–12 день после инфузии характеризуются более высоким уровнем эндогенного повреждения ДНК, чем здоровые женщины, примерно в 7–10 раз. В исследовании Сироты Н.П. и соавт. [4] изучали уровень повреждения ДНК лейкоцитов цельной капиллярной крови у больных РМЖ в процессе лечения также по схеме СМФ, однако отсутствуют данные по уровню повреждения ДНК до начала лечения, к тому же обследованы всего две пациентки на разных курсах химиотерапии. Необходимо обратить внимание на то, что используемый в данной схеме метотрексат подавляет не только синтез ДНК, но и ее репарацию.

В работе Верно С.Р. и соавт. [7] методом ДНК-комет был продемонстрирован значительный генотоксический эффект доксорубина на лейкоциты крови в экспериментах на мышах. Однако использование 4-аминоантипирин (4-Aminoantipyrine, метаболита анальгетического препарата дипирон) в комбинации с химиопрепаратами циклофосфамид, доксорубин и цисплатин уменьшало проявления их генотоксического эффекта.

Нельзя не учитывать и возможный вклад образовавшихся аддуктов химиопрепаратов (например, доксорубина, циклофосфамида) с ДНК, которые могут препятствовать расхождению молекул ДНК в процессе электрофореза, как было показано в работе Греховой А.К. и соавт. [2] для цисплатина и морфозола. В пользу этого предположения говорит также ослабление реакции на  $H_2O_2$  на 1–2 сутки после введения химиопрепаратов. Возможно также, что к концу первых суток после введения химиопрепаратов процесс репарации повреждений ДНК соответствующими системами уже завершен, поэтому необходима оценка поврежденности ДНК на более ранних сроках после введения химиопрепаратов (например, через 1–3 часа). В связи с этим мы выборочно у двух больных исследовали % ТДНК через 1,5 часа после введения доксорубина на 1 курсе НАХТ (таблица 3).

Таблица 3

Уровень поврежденности ДНК лейкоцитов крови перед НАХТ и на разных сроках после введения доксорубина

№№ больной	Фон перед 1 курсом НАХТ	Через 1,5 часа после введения	Через 1 сутки	Через 4 суток	Перед 2 курсом НАХТ
------------	-------------------------	-------------------------------	---------------	---------------	---------------------

13	% ТДНК± SE	1,7±0,5	2,5±0,7	1,8±0,5	1,9±0,6	<b>5,9±0,8*</b>
	Позитивный контроль % ТДНК ± SE	14,3±1,8	11,9±1,5	<b>8,3±1,4*</b>	<b>9,2±1,3*</b>	11,3±1,2
14	% ТДНК± SE	5,2±0,5	<b>12,7±0,5*</b>	<b>9,9±0,5*</b>	<b>17,4±0,5*</b>	<b>1,5±0,5*</b>
	Позитивный контроль % ТДНК ± SE	31,8±2,0	<b>38,2±1,8*</b>	<b>21,6±1,6*</b>	<b>41,1±2,3*</b>	37,4±2,1

Примечание: \* – статистически значимое отклонение от показателя до начала 1 курса химиотерапии ( $p < 0,05$ ). SE – стандартная ошибка.

У больной № 13 значимое изменение показателя было выявлено только перед 2 курсом НАХТ – % ТДНК вырос в 3,5 раза по сравнению с фоновым значением. У больной №14 уже через 1,5 часа после введения доксорубина % ТДНК был повышен в 2,4 раза по сравнению с фоном до лечения, через 1 сутки после введения трех препаратов % ТДНК оставался повышенным, а через 4 суток оказался выше фонового уровня в 3,3 раза. Однако через 21 сутки (т.е. перед 2 курсом) произошло значительное снижение % ТДНК – в 3,5 раза ниже фонового значения. Изменение уровня % ТДНК в позитивном контроле выявило постепенное ослабление реакции клеток на  $H_2O_2$ : у больной № 13 на всех сроках наблюдения, у больной № 14 реакция клеток на  $H_2O_2$  также снижалась до 4 суток после введения доксорубина, но затем она восстанавливалась и к началу 2 курса НАХТ стала в 4 раза более сильной, чем исходно.

Полученные результаты показали различную динамику показателя % ТДНК лейкоцитов у разных больных. Такая картина может складываться в результате взаимодействия многих факторов – особенностей связывания доксорубина в крови с эритроцитами, плазматическими факторами, с особенностями работы мембранных механизмов транспорта, различиями в работе внутриклеточных метаболических систем, различиями в активности систем репарации ДНК, а также в результате возможного влияния других препаратов, вводимых онкологическим больным в процессе их лечения.

### **Заключение**

Полученные нами результаты показали более низкий ответ лейкоцитов периферической крови обследованных больных РМЖ по сравнению с данными литературы, полученными при химиотерапии с использованием метотрексата и при исследовании действия доксорубина на животных [4,7,8]. Динамика поврежденности ДНК лейкоцитов в процессе неoadьювантной химиотерапии с использованием в схеме доксорубина показала, что существует индивидуальная вариабельность показателя % ТДНК, которая может отражать изменения в чувствительности лейкоцитов к цитотоксическому воздействию

химиопрепаратов, обусловленные активностью транспортных механизмов, состоянием внутриклеточных систем метаболизма, активностью механизмов защиты ДНК (состояние хроматина, репаративные системы). Результаты исследования позволяют предполагать, что различия в ответе лейкоцитов при использовании метода ДНК-комет для оценки поврежденности ДНК могут быть связаны со спецификой используемых в онкологии химиопрепаратов. Необходимы дальнейшие исследования динамики поврежденности ДНК неопухолевых (нетаргетных) клеток, особенно в первые часы после введения химиопрепаратов.

### Список литературы

1. Архипова О.Е., Черногубова Е.А., Тарасов В.А., Лихтанская Н.В., Кит О.И., Еремеева А.А., Матишов Д.Г. Уровень онкологических заболеваний как индикатор медико-экологической безопасности территорий (на примере Ростовской области) // Вестн. ЮНЦ РАН. – 2013. – Т.9, № 3. – С.7-17.
2. Грехова А.К., Горбачева Л.Б., Иванова Н.А., Ефименко И.А., Осипов А.Н. Сравнительные исследования генотоксичности нового ацидокомплекса палладия и цисплатина в лимфоцитах крови человека *in vitro* // Биомед. химия. – 2013. – Т.59, № 1. – С.107-114.
3. Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*. Методические рекомендации. – МР 4.2 0014 -10 // Товаровед продовольств. товаров. – 2011. – № 1. – С.64-70.
4. Сирота Н.П., Кузнецова Е.А., Гуляева Н.А., Попкова М.А., Захарова И.Г., Кочменева Л.Н., Брусков В.И., Газиев А.И. Индивидуальные различия ответа на радиационное воздействие, выявляемые в клетках крови пациентов в ходе химиотерапии // Радиационная биология. Радиационная экология. – 2005. – Т.45, № 6. – С.645-652.
5. Сорочинская У.Б., Михайленко В.М. Применение метода ДНК-комет для оценки повреждений ДНК, вызванных различными агентами окружающей среды // Онкология. – 2008. – Т.10, № 3. – С.303-309.
6. Тарнопольская О.В., Сурикова Е.И., Горошинская И.А., Тихановская Н.М. Способы оценки повреждения ДНК в лейкоцитах крови у пациенток раком молочной железы методом ДНК-комет // Клинический экспериментальный морфологический журнал. – 2016. – № 2. – С.60-65.
7. Berno C.R., Rós Bde T., da Silveira I.O., Coelho H.R., Antonioli A.C., Beatriz A., de Lima D.P., Monreal A.C., Sousa F.G., da Silva Gomes R., Oliveira R.J. 4-Aminoantipyrine reduces toxic and genotoxic effects of doxorubicin, cisplatin, and cyclophosphamide in male mice // *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* – 2016. – Vol.805. – P.19-24. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2016.05.009.

8. Blaziak J., Arabski M., Krupa R., Wozniak K., Rykala J., Kolacinska A., Morawiec Z., Drzewoski J., Zadrozny M. Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer // *Mutat. Res.* – 2004. – Vol. 554. – P.139-148.
9. Doroshow J.H., Synold T.W., Somlo G., Akman S.A., Gajewski E. Oxidative DNA base modifications in peripheral blood mononuclear cells of patients treated with high-dose infusion doxorubicin // *Blood.* – 2001. – Vol. 97, № 9. – P.2839–2845.
10. Tacar O., Sriamornsak P., Dass C.R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 65, № 2. – P.157-170.  
DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.