



*Е.В. Цырлина, Т.Е. Порошина, Д.А. Васильев, Е.А. Еналдиева,
 П.В. Криворотко, Л.М. Берштейн*

Повреждение ДНК в мононуклеарах периферической крови у пациентов со злокачественными опухолями молочной железы

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

E.V. Tsyrlina, T.E. Poroshina, D.A. Vasiliev, D.A. Enaldieva, P.V. Krivorotko, L.M. Bershtein

DNA Damage in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients with Breast Cancer

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, St. Petersburg, the Russian Federation

Введение. Сложная биология рака молочной железы (РМЖ) диктует необходимость поиска биомаркеров, которые могут дифференцировать индолентный рост от агрессивного и более точно предсказывать ответ на лечение.

Цель. Оценить степень генотоксического повреждения ДНК в мононуклеарах периферической крови (МНПК) у первичных пациентов с РМЖ, и сопоставить этот показатель с клиническими параметрами.

Материалы и методы. У 64 пациентов с первичным РМЖ T1-2N0-1M0 до начала лечения и 83 женщин без онкологической патологии в качестве группы сравнения методом «комет» определена степень повреждения ДНК в МНПК.

Результаты. Показано, что у пациентов с РМЖ имело место статистически достоверное повышение степени повреждения ДНК в МНПК. Так медиана процента лимфоцитов с «кометой» у пациентов РМЖ составила 26,0 (17,50; 34,50), а в группе сравнения у женщин того же возраста — 9,0 (3,00; 16,00), при $p < 0,0001$. Генотоксические проявления были более выражены у пациентов с благоприятными клиническими признаками опухолевого процесса. Выявлена тенденция к повышению процента комет при РЭ+РП+ новообразованиях, у которых медиана процента комет составила 28,0 (19,0; 36,0), а в группе РЭ-РП- этот показатель равнялся 20,5 (16,0; 28,0).

Заключение. Степень повреждения ДНК в МНПК при РМЖ следует рассматривать как влияние общих генотоксических сдвигов, приведших к развитию опухолевого процесса, а не как результат влияния собственно новообразования молочной железы.

Ключевые слова: рак молочной железы; повреждение ДНК в мононуклеарах периферической крови; метод «комет»

Для цитирования: Цырлина Е.В., Порошина Т.Е., Васильев Д.А., Еналдиева Е.А., Криворотко П.В., Берштейн Л.М. Повреждение ДНК в мононуклеарах периферической крови у пациентов со злокачественными опухолями молочной железы. Вопросы онкологии. 2023;69(4):692–698. doi: 10.37469/0507-3758-2023-69-4-692-698

Introduction. The complex biology of breast cancer (BC) requires the search for biomarkers that can differentiate indolent growth from aggressive growth and more accurately predict response to treatment.

Aim. To evaluate the degree of genotoxic DNA damage in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in primary BC patients and to compare this indicator with clinical parameters.

Materials and methods. The degree of DNA damage in PBMCs was determined in 64 patients with primary T1-2N0-1M0 BC before treatment and 83 cancer-free patients as a comparison group using the COMET method.

Results. BC patients had a statistically significant increase in the degree of DNA damage in PBMCs. The median percentage of lymphocytes with COMET in BC patients was 26.0 (17.50; 34.50), and in the comparison group of the same age 9.0 (3.00; 16.00), $p < 0.0001$. Genotoxic manifestations were more pronounced in patients with favorable clinical signs of tumor process. There was a tendency to increase the percentage of comets in RE+RP+ neoplasms, in which the median percentage of comets was 28.0 (19.0; 36.0), while in the RE-RP- group it equaled to 20.5 (16.0; 28.0).

Conclusion. The degree of DNA damage in PBMCs in BC should be considered as an effect of general genotoxic shifts that led to the development of the tumor process, rather than a result of the influence of the breast neoplasm itself.

Keywords: breast cancer; DNA damage in peripheral blood mononuclear cells; comet method

For citation: Tsyrlina EV, Poroshina TE, Vasiliev DA, Enaldieva DA, Krivorotko PV, Bershtein LM. DNA damage in peripheral blood mononuclear cells in patients with breast cancer. *Voprosy Onkologii*. 2023;69(4):692–698. (In Russ.). doi: 10.37469/0507-3758-2023-69-4-692-698

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) — одна из самых частых опухолей женщин, является сложным гетерогенным заболеванием, характе-

ризующимся многими морфологическими, клиническими и молекулярными особенностями, а также различным течением, чувствительностью к терапии и прогнозом [1]. Разработан ряд гистоморфологических критериев, которые позво-

ляют с большей или меньшей достоверностью планировать терапию РМЖ. К такого рода критериям относятся: локализация опухоли (дуктальная или лобулярная), наличие инвазии в окружающие структуры, присутствие в опухолевых клетках рецепторов стероидных гормонов [2], рецептора эпидермального фактора роста (HER2-позитивный или HER2-негативный), а также маркера пролиферативной активности Ki 67 [3].

Однако сложная биология РМЖ диктует необходимость поиска биомаркеров, которые могут дифференцировать индолентный рост от агрессивного, и более точно предсказывать ответ на лечение. Значительные изменения диагностика РМЖ претерпевает благодаря геномным и транскриптомным технологиям, которые делают возможным проводить анализ экспрессии генов и статуса мутаций, что позволяет более точно классифицировать опухоли в отношении диагностики и прогноза [4, 5]. Однако эти методы на сегодняшний день доступны ограничено.

В то же время показано, что важным параметром, отражающим развитие и течение злокачественных опухолей, является генотоксическое повреждение ДНК [6], которое фиксируется как в клетках опухоли [7], так и в мононуклеарах периферической крови (МНПК) пациентов [8].

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 [9, 10]. В качестве хорошо воспроизводимого и выгодного экономически метода, позволяющего оценить степень повреждения ДНК, используется метод «комет». Согласно этому методу, клетки, в которых проводится оценка состояния ДНК, подвергаются лизису и последующему электрофорезу в слое агарозы. В результате ядерная ДНК под влиянием электрического тока выходит из клетки и создает структуру, похожую на «комету». Хвост «кометы» содержит поврежденную ДНК. После налаживания лабораторной процедуры, метод доступен в исполнении, чувствителен к оценке и в связи с этим может быть широко адаптирован к исследованию различных патологических процессов [11, 12].

С помощью этого метода было показано, что повреждение ДНК обнаруживается при различных злокачественных опухолях [13]. Также в литературе имеется ряд работ, в которых исследована степень повреждения ДНК непосредственно в клетках РМЖ и в мононуклеарах периферической крови пациентов с опухолями молочной железы. Исследование «кометным» методом повреждений ДНК непосредственно в клетках опу-

холи, полученных в процессе оперативного вмешательства, в силу гетерогенности результатов не позволило связать характеристики «комет» с определенным подтипом РМЖ [14]. Хотя в той же работе авторы пишут, что значительные различия были выявлены между биологическими подгруппами. Самая высокая средняя степень повреждения ДНК наблюдалась в трижды негативном раке молочной железы (ТНРМЖ), а самая низкая — в подгруппе люминального А рака, который характеризуется благоприятным течением и высокой чувствительностью к проводимому лечению. Разница не была статистически значимой, однако возможно это определяется небольшим числом пациентов и неравным размером выборки между подгруппами [14]. В частности, с агрессивностью опухолевого процесса статистически достоверно коррелировал и уровень повреждения ДНК, оцененный по проценту «комет», у пациентов с раком шейки матки [15]. Что касается данных в отношении РМЖ, то выявленная гетерогенность в степени повреждения ДНК в опухолевых клетках может быть причиной и того, что некоторые опухоли люминального А подтипа текут агрессивно, а некоторые ТНРМЖ отличаются благоприятным течением.

Повреждение и нарушение репарации ДНК, происходящее в процессе канцерогенеза и роста опухоли, обнаруживается не только в опухолевых клетках, но сопровождается аналогичными изменениями на уровне МНПК [16]. Доступность мононуклеаров, возможность производить повторные исследования на фоне терапии привело к широкому использованию этих клеток в «кометном» методе при различных онкологических патологиях. Важно отметить, что изменения в структуре ДНК не только обнаруживались практически при всех видах новообразований [13], но и могли зависеть от клинических особенностей опухолевого процесса. В качестве одного из примеров могут быть приведены результаты исследований, выполненных у пациентов с герминогенными опухолями, в которых было показано, что степень повреждения ДНК в МНПК коррелирует со стадией опухолевого процесса и прогнозом течения заболевания [17], а также с развитием гематологической токсичности при проведении у этих пациентов химиотерапии [18]. Одновременные изменения ДНК в опухолевых клетках MCF-7 и в МНПК наблюдались под влиянием тамоксифена [19].

В отношении пациентов с РМЖ показано, что до начала химиотерапии у них наблюдалось статистически значимое, по сравнению со здоровыми донорами крови, увеличение таких показателей, характеризующих степень повреждения ДНК, как длина хвоста «кометы», а также

выявлена статистически недостоверная связь параметров «комет» со стадией заболевания. Уровень базального повреждения ДНК был выше у больных РМЖ, чем в контроле, и разница была более выражена, если пациентки были обследованы после химиотерапии [20, 21].

Использование МНПК позволяет проводить исследования у пациентов на фоне лечения и, в частности, на фоне химиотерапии. Метод выявления повреждения ДНК в МНПК является чувствительным методом, способным обнаруживать повышенную миграцию ДНК в клетках крови пациентов уже через час после завершения первого цикла химиотерапии [22].

Динамика изменения параметров «комет» может быть различной. Повреждения ДНК, в МНПК, которое определяется, с одной стороны, как признак наличия опухоли, а с другой, как следствие непосредственного токсического действия химиотерапии, развивается не в 100 % случаев. Сам факт выявления таких нарушений в структуре ДНК свидетельствует, возможно, о наличии определенного эндогенного фона, приводящего к повреждению ДНК, в т. ч. и в МНПК. Снижение числа комет после химиотерапии может свидетельствовать об элиминации мононуклеаров с разрушенной ДНК и свидетельствовать о чувствительности опухолевого процесса к проводимому лечению.

Исходные уровни повреждения ДНК могут быть связаны, в т. ч. с генотипом GSTM1, кодирующим фермент глутатион-S-трансферазу, который участвует в антиоксидантной защите организма, в результате чего происходит обезвреживание продуктов перекисного окисления липидов и пероксидов ДНК [23]. Важным наблюдением является тот факт, что помимо исходного генотоксического эффекта генотип GSTM1 определяет повреждение ДНК в МНПК, возникающее под влиянием химиотерапевтических препаратов. Эта связь продемонстрирована в работе E. Uriol и соавт. [24], которые, используя метод «комет», показали, что существует зависимость степени повреждения ДНК с полиморфизмам GSTM1. Это выражалось в таких показателях как количество комет, образовавшихся в МНПК после химиотерапии, а также в величине «момента хвоста комет». В этой же работе показано, что исходные уровни повреждения ДНК связаны с экспрессией гормональных рецепторов. В работе представлены также данные, показывающие, что эти же параметры «комет» — момента хвоста «кометы» в сочетании со стадией болезни могут предсказывать рецидив рака через пять лет [24]. Это наблюдение представляет большой интерес, однако прежде чем кометный анализ можно будет использовать в качестве инструмента для онкологов, эта взаи-

мосвязь должна быть подтверждена у большего числа пациентов, а также должны быть решены проблемы стандартизации и интерпретации данных.

Представляется целесообразным оценить степень повреждения ДНК в МНПК у первичных больных РМЖ и сопоставить полученные результаты с клиническими параметрами.

Материалы и методы

В работу были включены 64 пациентки с РМЖ T1-2N0-1M0, поступивших в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России для оперативного лечения, и 83 здоровых женщины в качестве группы сравнения. Все пациенты и обследованные в группе сравнения подписывали информированное согласие на проведение исследования у них степени повреждения ДНК методом «комет». Исследование было одобрено комитетом по этике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Пациенты и женщины в группе сравнения были разделены на две группы соответственно возрасту. В результате 24 пациентки с РМЖ имели медиану возраста 40,0 (интерквартильный размах (ИР) 36,0; 42,0), что соответствовало репродуктивному периоду жизни женщины, и 40 находились в менопаузе с медианой возраста 64,0 (ИР 58,0; 70,0). Соответственно в группе сравнения 34 человека составили молодую группу с медианой возраста 25,0 (ИР 23,0; 30,0) и 49 старшую с медианой возраста — 59,0 (ИР 48,0; 64,0).

У всех лиц, включенных в исследование, определяли содержание ДНК-комет в мононуклеарах периферической крови. Для получения фракции мононуклеаров кровь, взятую в пробирки с ЭДТА, наслаивали на градиент плотности фикола/верографина (1,077 г/мл), затем пробирки центрифугировали 30 мин при скорости 1200 об/мин; после центрифугирования клетки отмывали три раза физиологическим раствором с 0,001M фосфатным буфером. Для исследования повреждения ДНК использовали протокол метода, описанный V.J. McKelvey-Martin и соавт. и адаптированный в лаборатории эндокринологии Института онкологии им. Н.Н. Петрова [25]. Метод основан на лизисе клеток в щелочной среде с последующим электрофорезом в постоянном электрическом поле и окрашиванием препаратов флуоресцентным красителем (в нашем исследовании — DAPI (4', 6-диамидино-2-фенилиндол, дигидрохлорид) — синий флуоресцентный краситель ДНК. При оценке под микроскопом клетки представлены в виде электрофоретического следа фрагментов ДНК — «кометы». 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 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 «кометы», длина хвоста «кометы», % ДНК в хвосте, момент хвоста «кометы» (произведение длины хвоста «кометы» на долю ДНК в нём) и процент «комет».

Статистический анализ производился с помощью пакета программ Statistica 12. При оценке показателей с помощью описательной статистики было выявлено отклонение от нормального распределения. В связи с этим данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Помимо этого, производили анализ по Манн-Уитни и Спирмену.

Таблица 1. Степень повреждения ДНК в мононуклеарах периферической крови у больных раком молочной железы и в группе сравнения

Показатель	РМЖ вся группа (n 64)	РМЖ < 45 лет (n 24)	РМЖ > 50 лет (n 40)	Группа сравнения < 40 лет (n 34)	Группа сравнения > 45 лет (n 49)
Возраст (лет)*	57,5 (42,00; 68,00)	40,0 (36,00; 42,00)	64,0 (58,00; 70,00)	25,0 (23,00; 30,00)	59,0 (48,00; 64,00)
Длина хвоста(пиксели)*	20,3 (12,42; 31,25)	23,7 (11,34; 35,08)	19,2 (13,63; 29,68)	5,3 (2,90; 9,88)	7,2 (2,06; 12,69)
% ДНК в хвосте *	10,6 (6,86; 15,54)	12,6 (6,03; 18,23)	9,9 (7,40; 13,99)	1,7 (0,67; 4,24)	2,6 (0,68; 4,73)
Момент хвоста (усл.ед)*	9,2 (5,48; 16,81)	12,6 (4,41; 20,46)	8,7 (5,83; 14,63)	1,3 (0,23;4,08)	2,2 (0,43; 3,83)
% Комет*	26,0 (17,50; 34,50)	27,5 (16,00; 40,00)	24,0 (18,50; 34,50)	6,0 (4,00; 10,00)	9,0 (3,00; 16,00)

Примечание:* Me (lq; hq)

Таблица 2. Сопоставление параметров повреждения ДНК у пациентов с РМЖ и в группе сравнения по Манн-Уитни

Параметры	РМЖ (n = 64)	Группа сравнения (n = 45)	U / p
Возраст (лет)*	57,5 (42,00; 68,00)	59,0 (48,00; 64,00)	1318,5
Длина хвоста (пиксели)*	20,3 (12,42; 31,25)	7,2 (2,06; 12,69)	432,5**
% ДНК *	10,6 (6,86; 15,54)	2,6 (0,68; 4,73)	247,5**
Момент хвоста (усл. ед)*	9,2 (5,48; 16,81)	2,2 (0,43; 3,83)	327,0**
% Комет *	26,0 (17,50; 34,50)	9,0 (3,00; 16,00)	389,0**

Примечание: * Me (lq; hq) ** p < 0,0001

Таблица 3. Сопоставление процента комет в мононуклеарах периферической крови и момента хвоста кометы с показателем Ki67

Ki 67	Число больных	% Комет *	Момент хвоста кометы *
< 10	18	30,5 (20,0; 41,0)	11,93 (5,82; 16,82)
10-20	13	32,0 (19,0; 37,0)	13,08 (7,6;1-20,89)
21-30	7	27,0 (15,0; 32,0)	15,19 (2,03; 16,86)
31-40	6	19,0 (16,0; 24,0)	5,79 (4,01; 7,64)
41-50	17	21,0 (14,0; 28,0)	7,88 (4,60; 15,04)
> 50	14	18,5 (14,0; 28,0)	9,59 (4,60; 15,04)

Примечание: * Me (lq; hq)

Результаты

В работе представлены результаты обследования пациентов, имевших наиболее часто встречающийся инвазивный протоковый рак тип NST (No Special Type или инвазивный рак без признаков специфичности), который встречается в 75–80 % случаев РМЖ [26]. Выявлено (табл. 1), что у пациентов с опухолью молочной железы по сравнению с контролем имело место значительное повреждение ДНК в мононуклеарах периферической крови. Это выразилось в более высоком проценте образовавшихся «комет», а также в увеличении таких параметров, характеризующих генотоксический эффект, как содержание в комете ДНК, в моменте и величине хвоста кометы.

Пациенты и здоровые лица были распределены по возрасту, для оценки влияния последнего на данные показатели (табл. 2). Следует отметить, что если в группе сравнения отмечена

тенденция к увеличению с возрастом степени повреждения ДНК, что отражает кумуляцию генотоксических воздействий по мере старения организма, то у пациентов с опухолями выраженность повреждения ДНК в молодой группе была выше. Трудно сказать, является ли это наблюдение результатом влияния опухоли или отражает особенности организма и происходящие в нем процессы канцерогенеза. Различия между группами по всем параметрам, кроме возраста, высоко статистически достоверны (табл. 2). Учитывая, что группа молодого контроля существенно отличалась по возрасту, статистический анализ был произведен только между пациентами РМЖ и женщинами группы сравнения старшего возраста, между которыми, как видно из табл. 2, отсутствуют статистические различия по этому параметру.

Проанализирована связь степени повреждения ДНК с такими клиническими параметрами как уровень рецепторов, размер опухолевого

узла и величина маркера пролиферативной активности опухолевой клетки Ki67. В отношении корреляций степени повреждения ДНК в МНПК и рецепторного статуса опухоли статистически достоверных данных не получено. Выявлена тенденция к повышению процента комет при РЭ+, РП+ новообразованиях. Так при рецептор положительных опухолях медиана процента комет составила 28,0 (19,0; 36,0), а в группе РЭ-РП- этот показатель равнялся 20,5 (16,0; 28,0). Мы не учитывали связь с рецепторами к ЭФР (эпидермального фактора роста, HER 2), т. к. число пациентов с опухолями HER2+ было малочисленным. Также не было получено достоверных различий между степенью повреждения ДНК в МНПК и размером опухолевого узла. У пациентов с опухолями меньшего размера (< 1,1 см) процент комет составил 39,0 % (22,0; 55,0), а при величине первичного узла > 3,0 см — 29,0 % (22,0; 34,5), но разница была статистически не достоверной. Статистически достоверной была связь с маркером пролиферативной активности Ki67. Согласно этому наблюдению, степень повреждения ДНК в МНПК была выше при более низком показателе Ki67 (табл. 3). Коэффициент корреляции по Спирмену между процентом «комет» и величины Ki67 составил 0,06, $p < 0,05$.

Таким образом, показано, что у пациентов с опухолями молочной железы до начала лечения имело место статистически достоверное повышение степени повреждения ДНК в МНПК. Причем, учитывая тот факт, что большая часть обследованных пациентов имела опухоли T1-2N0-1M0, лечение которых после проведенного обследования было начато с оперативного вмешательства, можно предполагать, что выявленные генотоксические проявления зависели от процессов, происходящих на уровне организма. К такому выводу заставляет прийти тот факт, что повреждения ДНК были более выражены у пациентов с благоприятными клиническими признаками опухолевого процесса.

Обсуждение

В литературе в отношении связи степени повреждения ДНК и клинического статуса опухоли получены неоднозначные результаты. В работах, выполненных на опухолевых клетках, с одной стороны, не выявлено зависимости степени повреждения ДНК и клиники опухолевого процесса [14], а с другой, показано что повреждение ДНК коррелировало с более агрессивным течением заболевания [27]. При определении степени повреждения ДНК в МНПК показано, что имеет место статистически значимое увеличение длины хвоста «кометы» при более агрессивной

клиники РМЖ, в то же время связь параметров «комет» со стадией заболевания была не достоверна [19, 20, 21]. Важное значение также имеют работы, в которых оценивалась динамика повреждения ДНК в процессе лечения пациентов РМЖ. В данном случае оценивался непосредственный генотоксический эффект самой химиотерапии и последующая динамика параметров комет, отражающие репарацию ДНК. В частности показано, что увеличение степени повреждения ДНК уже после первого цикла химиотерапии коррелировало с эффективностью терапии РМЖ циклофосфамидом, метотрексатом и 5-фторурацилом [22]. Напротив, как ранее было показано [28] в нашем предыдущем исследовании эффективность лечения меланомы ниволумабом сопровождалась уменьшением степени повреждения ДНК в МНПК.

Твердо установленным является факт статистически достоверного повышения повреждения ДНК в МНПК у пациентов РМЖ и другими злокачественными опухолями [29]. Считается, что этот параметр можно рассматривать не только как результат влияния опухоли на организм, но и как показатель генотоксического воздействия, а следовательно, как маркер риска развития рака, включая РМЖ [20]. Интерес в этом отношении представляет работа S. Bonassi и соавт. [30], в которой степень повреждения ДНК в МНПК исследована у здоровых лиц в период между 1996 и 2016 гг. В результате было показано, что повреждения ДНК были достоверно выше, для умерших в последствии и для заболевших раком.

Повреждение ДНК, измеренное с помощью «кометного» анализа, является маркером генотоксического фона в организме и коррелирует с риском развития злокачественных опухолей. Благодаря относительной простоте и хорошей воспроизводимости, метод комет стал эталонным в исследованиях *in vitro* и *in vivo*, включая клинические испытания для выявления различных типов повреждений, таких как единичные и двухцепочечные разрывы ДНК. Он также позволяет получить информацию об окислительном повреждении ДНК или оценить устойчивость ДНК к окислительному стрессу. Все эти изменения ДНК вызывают значительный интерес, поскольку они лежат в основе механизмов, связанных с основными хроническими неинфекционными заболеваниями, такими как атеросклероз, рак и сахарный диабет [13, 31, 32]. Важным достоинством данного метода является тот факт, что в качестве объекта исследования могут использоваться мононуклеары периферической крови, изменения в которых отражают процессы, происходящие на уровне соматических и опухолевых клеток.

Выводы

1. У пациентов с опухолью молочной железы выявлено статистически достоверное ($p < 0,0001$) по сравнению со здоровыми женщинами повреждение ДНК в мононуклеарах периферической крови.

2. У пациентов РМЖ имел место более высокий процент образовавшихся «комет», а также увеличение параметров, характеризующих генотоксический эффект, таких как содержание в «комете» ДНК, момент и величина хвоста «кометы».

3. Повреждение ДНК в МНПК в данном исследовании имело тенденцию к более выраженному проявлению у пациентов с рецептор-позитивными и меньшими по размеру опухолями, а также статистически достоверно ($p < 0,05$) отрицательно коррелировало с индексом пролиферации Ki67.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии в статье конфликта интересов.

Финансирование

Государственная организация.

Участие авторов

Цырлина Е.В. — обработка и анализ полученных данных, составление драфта рукописи;

Васильев Д.А. — сбор материала, обработка и анализ полученных данных, редактирование рукописи;

Порошина Т.Е. — выполнение метода «комет», анализ результатов лабораторных исследований;

Едалгиева Д.А. — ведение пациентов, анализ результатов проведенного лечения;

Криворотько П.В. — руководство ведением пациентов, анализ полученных результатов, редактирование рукописи;

Берштейн Л.М. — существенный вклад в разработку концепции, редактирование последовательных вариантов рукописи и окончательное утверждение ее направленной в редакцию версии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Waks AG, Winer EP. breast cancer treatment. JAMA;2019;321(3):288-300. doi:10.1001/jama.2018.19323.
2. Curtit E, Mansi L, Maisonnette-Escot Y, et al. Prognostic and predictive indicators in early-stage breast cancer and the role of genomic profiling: Focus on the Oncotype DX Breast Recurrence Score Assay. Eur J Surg Oncol. 2017;43(5):921-930. doi:10.1016/j.ejso.2016.11.016.
3. Jenkins S, Kachur ME, Rechache KM. Rare Breast Cancer Subtypes. Curr Oncol Rep. 2021;23(5):54. doi:10.1007/s11912-021-01048-4.

4. De Abreu FB, Schwartz GN, Wells WA, et al. Personalized therapy for breast cancer. Clin Genet. 2014;86(1):62-7. doi:10.1111/cge.12381.
5. Lian W, Liu C, Gu B, et al. The early prediction of pathological response to neoadjuvant chemotherapy and prognosis: comparison of PET Response Criteria in Solid Tumors and European Organization for Research and Treatment of Cancer criteria in breast cancer. Nucl Med Commun. 2020;41(3):280-287. doi:10.1097/MNM.0000000000001145.
6. Burrell RA, McClelland SE, Endesfelder D, et al. Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. Nature. 2013;494(7438):492-6. doi:10.1038/nature11935.
7. Liao CL, Peng SF, Chen JC, et al. Allyl Isothiocyanate Induces DNA Damage and Impairs DNA Repair in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. Anticancer Res. 2021;41(9):4343-4351. doi:10.21873/anticancer.15239.
8. Fikrová P, Stětina R, Hronek M, et al. Application of the comet assay method in clinical studies. Wien Klin Wochenschr. 2011;123(23-24):693-9. doi:10.1007/s00508-011-0066-0.
9. 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):120-139. doi:10.1080/10590500902885684.
10. Sykora P, Witt KL, Revanna P, et al. 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.
11. Milic M, Frustaci A, Del Bufalo A, et al. DNA damage in non-communicable diseases: A clinical and epidemiological perspective. Mutat. Res. 2015;776:118-127. doi:10.1016/j.mrfmmm.2014.11.009.
12. Azqueta A, Ladeira C, Giovannelli L, et al. Application of the comet assay in human biomonitoring: An hCOMET perspective Mutat Res Rev. Mutat Res. 2020;783:108288. doi:10.1016/j.mrrev.2019.108288.
13. Møller P, Stopper H, Collins AR, et al. 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/gez018.
14. Galardi F, Oakman C, Truglia MC, et al. 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.
15. Cortes-Gutierrez EI, Hernandez-Garza F, Garcia-Perez JO, et al. 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;2012:1-7. doi:10.1155/2012/385245.
16. Shimabukuro F, Neto CF, Sanches JA, et al. 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.
17. Chovanec M, Svetlovska D, Miskovska V, et al. 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. doi:10.18632/oncotarget.12515.
18. Hapakova N, Sestakova Z, Holickova A, et al. High endogenous DNA damage levels predict hematological toxicity in testicular germ cell tumor patients treated with first-line

- chemotherapy. *Clin Genitourin Cancer*. 2019;17(5):e1020-e1025. doi:10.1016/j.clgc.2019.06.004.
19. Wozniak K, Kolacinska A, Blasinska-Morawiec M, et al. The DNA-damaging potential of tamoxifen in breast cancer and normal cells. *Arch Toxicol*. 2007;81(7):519-27. doi:10.1007/s00204-007-0188-3.
 20. Blasiak J, Arabski M, Krupa R, et al. Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutat Res*. 2004;554(1-2):139-48. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.04.001.
 21. Synowiec E, Stefanska J, Morawiec Z, et al. Association between DNA damage, DNA repair genes variability and clinical characteristics in breast cancer patients. *Mutat Res*. 2008;648(1-2):65-72. doi:10.1016/j.mrfmmm.2008.09.014.
 22. Kopjar N, Milas I, Garaj-Vrhovac V, et al. Alkaline comet assay study with breast cancer patients: evaluation of baseline and chemotherapy-induced DNA damage in non-target cells. *Clin Exp Med*. 2006;6(4):177-90. doi:10.1007/s10238-006-0113-8.
 23. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:51-88. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.
 24. Uriol E, Sierra M, Comendador MA. Long-term biomonitoring of breast cancer patients under adjuvant chemotherapy: the comet assay as a possible predictive factor. *Mutagenesis*. 2013;28(1):39-48. doi: 10.1093/mutage/ges050.
 25. McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, et al. 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.
 26. Ciriello G, Gatz ML, Beck AH, et al. Comprehensive Molecular Portraits of Invasive Lobular Breast Cancer. *Cell*. 2015;163(2):506-19. doi:10.1016/j.cell.2015.09.033.
 27. Santos RA, Teixeira AC, Mayorano MB, et al. Basal levels of DNA damage detected by micronuclei and comet assays in untreated breast cancer patients and healthy women. *Clin Exp Med*. 2010;10(2):87-92. doi:10.1007/s10238-009-0079-4.
 28. Цырлина Е.В., Порошина Т.Е., Оганесян А.П., и др. 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 EV, Poroshina TE, Oganesyana AP, et al. 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 Russ.)]. doi:10.21294/1814-4861-2021-20-2-37-45.
 29. Цырлина Е.В., Порошина Т.Е., Васильев Д.А. и др. Повреждение ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с меланомой. // *Сибирский онкологический журнал*. 2022;3:33-41 [Tsyrlina EV, Poroshina TE, Vasiliev DA, et al. DNA damage in peripheral blood mononuclear cells in patients with melanoma. *Siberian journal of oncology*. 2022;21(3):33-41 (In Russ.)] doi:10.21294/1814-4861-2022-21-3-33-41.
 30. Bonassi S, Ceppi M, Møller P, et al. DNA damage in circulating leukocytes measured with the comet assay may predict the risk of death. *Sci Rep*. 2021;11:16793. doi:10.1038/s41598-021-95976-7.
 31. Marino M, Gigliotti L, Møller P, et al. Impact of 12-month cryopreservation on endogenous DNA damage in whole blood and isolated mononuclear cells evaluated by the comet assay. *Sci Rep*. 2021;11(1):363. doi:10.1038/s41598-020-79670-8.
 32. Берштейн Л.М. Гормональный канцерогенез. СПб. Наука, 2000, 199 с. ISBN 5-02-026132-7. [Berstein LM. Hormonal carcinogenesis. St. Petersburg: Nauka. 2000;199. ISBN 5-02-026132-7 (In Russ.)].

Поступила в редакцию 17.03.2023
 Прошла рецензирование 13.04.2023
 Принята в печать 20.04.2023

Сведения об авторах

*Цырлина Евгения Владимировна, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0882-6697>, SPIN-код: 8 007-8528, evg.tsyrlina@gmail.com.

Порошина Татьяна Евгеньевна, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5558-5366>, SPIN-код (РИНЦ): 8939-3404.

Васильев Дмитрий Алексеевич, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4215-2948>, SPIN-код (РИНЦ): 2250-4475.

Еналдиева Диана Артуровна, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2773-3111>, SPIN-код: 2372-3022.

Криворотко Петр Владимирович, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4898-9159>, SPIN-код (РИНЦ): 2448-7506.

Берштейн Лев Михайлович, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5112-3372>, SPIN-код (РИНЦ): 2265-6757.

*Tsyrlina Evgenia Vladimirovna, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0882-6697>, SPIN-code: 8 007-8528, e-mail: evg.tsyrlina@gmail.com.

Poroshina Tatyana Evgenievna, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5558-5366>, SPIN-code (RSCI): 8939-3404.

Vasiliev Dmitry Alekseevich, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4215-2948>, SPIN-code (RSCI): 2250-4475.

Enaldieva Diana Arturovna, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2773-3111>, SPIN-code: 2372-3022.

Krivorotko Piotr Vladimirovitch, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4898-9159>, SPIN-code (RSCI): 2448-7506.

Bershtein Lev Mikhailovich, ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5112-3372>, SPIN-code (RSCI): 2265-6757.