

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕПАРАЦИИ ДНК ЛИМФОЦИТОВ, ИХ ГИБЕЛЬ,  
А ТАКЖЕ ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ MLH1, MSH2, FasR  
КАК ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА КЛИНИЧЕСКОГО ОТВЕТА  
НА ХИМИОТЕРАПИЮ БОЛЬНЫХ ДИССЕМИНИРОВАННОЙ МЕЛНОМОЙ**

© В. А. Тронов,<sup>1,\*</sup> Д. Н. Артамонов,<sup>2</sup> М. Е. Абрамов,<sup>3</sup> Л. Б. Горбачева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН,

<sup>2</sup> Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН

<sup>3</sup> Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва;

\* электронный адрес: vtronov@yandex.ru

Меланома — высокоагрессивное заболевание, вызываемое трансформированными меланоцитами. Эффективность цитотоксической химиотерапии меланомы не превышает 20 %. Один из путей рационализации химиотерапии — поиск маркеров, позволяющих прогнозировать индивидуальную чувствительность больных к химиотерапии. В работе оценивали 6 клеточных показателей лимфоцитов крови больных меланомой (эффективность механизмов репарации BER и MMR, экспрессию белков MLH1, MSH2 и рецептора FasR, а также гибель лимфоцитов) как prognostических маркеров химиотерапии меланомы. Показано, что химиотерапия индуцировала АП-сайты и однонитевые разрывы ДНК в лимфоцитах, репарация которых коррелировала с эффективностью BER. Однако однонитевые разрывы ДНК после химиотерапии полностью репарировались и не коррелировали с клиническим ответом больных, что говорит о незначительном вкладе этих повреждений в цитотоксический эффект химиотерапии. Двухнитевые разрывы ДНК наблюдались позже аддуктов метилирования и продуцировались функционирующей системой MMR, что подтверждается линейной корреляцией этих показателей у разных больных. Количество двухнитевых разрывов прямо коррелировало с эффективностью химиотерапии. Однако уровень экспрессии белков MMR MLH1 и MSH2 не коррелировал с клиническим ответом больных на химиотерапию. Позитивная корреляция наблюдается между гибелю лимфоцитов после химиотерапии и клиническим ответом больных, что указывает на возможный вклад механизма NER (экскизии нуклеотидов) в формирование двухнитевых разрывов и в цитотоксический эффект химиотерапии.

**Ключевые слова:** меланома, лимфоциты, химиотерапия, клеточные маркеры, разрывы ДНК, репарация ДНК.

Меланома — высокоагрессивное неопластическое заболевание, в основе которого лежат трансформированные меланоциты. На ранних стадиях развития меланома поддается хирургическому лечению. На более поздних стадиях применяется цитотоксическая химиотерапия (<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/melanoma/>). Монофункциональные алкилирующие агенты (дакарбазин и темозоломид) и нитрозомочевины (кармустин и ломустин) входят в состав стандартного протокола лечения (Middleton et al., 2000; Gogas et al., 2007). В основе их цитотоксического эффекта лежит формирование безразрывных дефектов ДНК алкилированных (метилированных) оснований. Более 80 % образовавшихся аддуктов составляют метилированные по N7 гуанин (N7meG) и по N3 аденин (N3meA) (Beranek, 1990). N7meG и N3meA цитотоксичны, так как блокируют репликацию. Поэтому в клетке эволюционно возник дорепликативный механизм их удаления из генома — эксцизионная репарация оснований (base excision repair, BER) (Hegde et al., 2008). Механизм включает в себя N-гликозилазу, удаляющую модифицированное основание. Оставшийся АП-сайт (апуриновый/апиримидиновый сайт) распознается АП-эндонуклеазой (APE1),

инициирующей процесс удаления АП-сайта вместе с прилегающими к нему 1—6 нуклеотидами. Образовавшаяся брешь заполняется ДНК-полимеразой бета, использующей интактную цепь ДНК в качестве матрицы. ДНК-лигаза завершает процесс восстановления целостности ДНК. Таким образом, механизм BER противостоит цитотоксическому эффекту 80 % ДНК-аддуктов химиотерапии. Репаративный процессинг возникших аддуктов оснований протекает через формирование временных однонитевых разрывов ДНК, которые в данном случае могут быть маркерами дорепликативного механизма BER.

Вторым по численности аддуктом химиотерапии является метилированный по О6 гуанин (Obmethylguanine), составляющий 7—15 % от всех модифицированных в ходе химиотерапии оснований (Beranek, 1990; Jenkins et al., 2005). Две особенности определяют его вклад в цитотоксический эффект химиотерапии. Первая заключается в отсутствии в клетке распознающей его гликозилазы. Поэтому Obmethylguanine не подвергается дорепликативному механизму BER. Вместе с тем Obmethylguanine подвержен реакции прямого деметилирования при участии метилгуанин-трансферазы (MGMT) (Hansen et al., 2007), что снижает эффективность

химиотерапии. Активность MGMT в клетках может быть подавлена включением в протокол ингибиторов (Friedman et al., 2002; Kreklau et al., 2003; Watson et al., 2009) либо в ходе длительной химиотерапии метилирующими агентами в высокой концентрации (Toft et al., 2000). Вторая особенность ОбмeG состоит в его сходстве с аденином, вследствие чего он не препятствует репликации, но провоцирует ошибочную вставку полимеразой тимина в качестве комплементарного основания в дочернюю цепь. Тем не менее пары ОбмeG—Т и ОбмeG—С некорректны и являются субстратом для пострепликативного механизма коррекционной репарации (*mismatch repair*, MMR). MMR-процессинг этих пар начинается с узнавания белковыми комплексами с участием MSH2 и MLH1 искажения конформации спирали в области некорректной пары, а завершается формированием двухнитевого разрыва ДНК, который запускает апоптоз в клетке, содержащей ОбмeG (Тронов и др., 2002). Первоначально постулированный, этот механизм цитотоксичности метилирующих агентов в последнее время продемонстрирован на культивируемых клетках и стимулированных лимфоцитах человека (Ochs, Kaina, 2000; Roos et al., 2004; Тронов и др., 2006). В этих исследованиях было показано, что вторичные двухнитевые разрывы ДНК, возникающие в клетках спустя 1–2 цикла репликации после обработки метилирующими агентами, могут быть показателями активности MMR в них (Тронов и др., 2008). Таким образом, можно заключить, что условиями, благоприятствующими максимальной эффективности химиотерапии, были бы подавление активности BER и активная MMR в опухолевых клетках.

Цель нашей работы состояла в экспериментальной проверке этого утверждения путем сопоставления клеточных показателей активности BER, MMR, уровня экспрессии белков MLH1, MSH2, FasR и доли погибших клеток с клиническим ответом больных на стандартную цитотоксическую химиотерапию, включающую в себя ломустин, дакарбазин, цисплатин и интерферон гамма. Все клеточные показатели измеряли в лимфоцитах крови пациентов до и после 1 цикла химиотерапии и оценивали как прогностические показатели химиотерапии больных диссеминированной меланомой.

## Материал и методика

**Характеристика больных и процедура химиотерапии.** В работе использовали лимфоциты больных диссеминированной меланомой кожи, проходивших курс лечения в отделении химиотерапии и комбинированных методов лечения злокачественных опухолей НИИ клинической онкологии ГУ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. Протокол лечения (LDCI, lomustine, dacarbazine, cisplatin, ingaron) включал в себя ежесуточное введение ингарона ( $5 \cdot 10^5$  МЕ в течение 5 сут), ломустина ( $80 \text{ мг}/\text{м}^2$  перорально в 1-е сут), дакарбазина ( $250 \text{ мг}/\text{м}^2$  внутривенно в 1–3-и сут) и цисплатина ( $80 \text{ мг}/\text{м}^2$  внутривенно на 3-и сут). Введение ингарона ( $5 \cdot 10^5$  МЕ 3 раза в 1 нед) продолжалось еще 3 нед. Следующий курс начинали на 6-й нед с ежесуточного введения ингарона. Были исследованы 12 больных (8 женщин и 4 мужчин) диссеминированной меланомой кожи, имеющих гистологическое подтверждение диагноза. У 3 больных была достигнута частичная ( $\geq 50\%$ ) регрессия опухоли (ЧР), у 2 отмечена стабилизация болезни (СЗ), у остальных наблюдали прогрессию заболевания (ПЗ).

**Выделение лимфоцитов и оценка доли погибших клеток.** У больных брали кровь из вены до начала, спустя 8 сут после начала первого цикла химиотерапии и после завершения первого терапевтического цикла (30 сут). Лимфоциты выделяли из венозной гепаринизированной крови больных сразу после получения образцов. Кровь насылали на разделяющую смесь фикколл—верографин ( $\rho = 1.078 \text{ г}/\text{см}^3$ ) и центрифугировали при комнатной температуре ( $800 \text{ g}$ , 30 мин). Выделенные лимфоциты суспендировали в среде RPMI—1640, содержащей 3 мг/мл L-глутамина, 20 % эмбриональной сыворотки быка, антибиотики и 10 мкг/мл фитогемагглютина (ФГА). Часть лимфоцитов исследовали сразу после их выделения, часть культивировали в течение 48 ч при  $37^\circ\text{C}$ . Погибшие клетки определяли по выплавлению нуклеоида из спонтанно пермеабилизованных клеток. Для этого клетки суспендировали в растворе низкоплавкой агарозы при  $37^\circ\text{C}$ , суспензию наносили на предметное стекло (30 мкл) и накрывали покровным стеклом. После застывания геля покровное стекло удаляли и слайд помещали в метанол при комнатной температуре. Дегидратированный слайд высушивали на воздухе, окрашивали красителем Sybr-Green и микроскопировали в режиме флуоресценции. Определяли долю пермеабилизованных клеток, имеющих характерное гало из петель нуклеоида, окаймляющего клетку.

**Определение повреждения ДНК методом комет.** Использовали два варианта метода — нейтральный для оценки поврежденности двухнитевой ДНК (dsДНК-кометы) и щелочной для определения одннитевых разрывов ДНК (ssДНК-кометы). В первом случае 100 мкл суспензии, содержащей  $(0.5\text{--}1.0) \cdot 10^6$  клеток в PBS, смешивали с 200 мкл 1%-ного раствора легкоплавкой агарозы IV типа (Sigma, США). Смесь (30 мкл) наносили на предметное стекло, накрывали покровным стеклом ( $18 \times 18 \text{ мм}$ ). После застывания геля стекло удаляли и слайд погружали в лизирующий раствор, содержащий 2.5 М NaCl, 30 мМ EDTA, 10 мМ Tris-HCl, 1 % лаурил-сарказината и 0.03 мг/мл протеиназы K, pH 8.0. Спустя 12–16 ч лизиса при  $37^\circ\text{C}$  слайды погружали в раствор, содержащий 2.5 М NaCl, 0.1 М EDTA, 10 мМ Tris-HCl, 1 % Тритон X-100, 1 % DMSO, pH 10, и помещали на 1 ч или более в холодильник. Далее слайды помещали в горизонтальную камеру для электрофореза, заполненную TAE-буфером (pH 8.3), и выдерживали в течение 40 мин при  $4^\circ\text{C}$ . Электрофорез проводили при 0.56 В/см в течение 40 мин. После электрофореза слайды погружали в охлажденный раствор 0.3 М NaOH и 1 мМ EDTA на 15 мин, трижды ополаскивали 0.4 М Tris-HCl, pH 7.4, и 1 раз — в PBS. Слайды дегидратировали метанолом и высушивали на воздухе. После высыхания и окрашивания Sybr-Green слайды микроскопировали во флуоресцентном режиме. Для определения одннитевых разрывов слайды после инкубации в лизирующем буфере при pH 10 помещали в электрофоретическую камеру, заполненную охлажденным раствором 0.3 М NaOH и 1 мМ EDTA, pH > 13. После инкубации в течение 40 мин при  $4^\circ\text{C}$  проводили электрофорез при 0.75 В/см в течение 22 мин. После электрофореза слайды ополаскивали раствором 0.4 М Tris-HCl и проводили те же операции, что и для нейтральных комет. В процессе микроскопии накапливали изображения комет в памяти компьютера и обрабатывали их по программе CASP (Konca et al., 2003). Показателем поврежденности ДНК служил параметр момент хвоста комет mt (Olive tail moment).

Оценка эффективности механизмов репарации BER и MMR. Для оценки эффективности механизма эксцизии оснований (BER) измеряли способность лимфоцитов больных до химиотерапии элиминировать АП-сайты, индуцированные в них тестирующим воздействием метилнитрозомочевиной (МНМ). Для этого в суспензии лимфоцитов в культуральной среде добавляли МНМ до концентрации 50 мкМ. В параллельную пробу вместе с МНМ добавляли метоксиамин (МА, 10 мкМ), блокирующий репарацию. Суспензии инкубировали 20 ч при 37 °C и измеряли однонитевые разрывы в ДНК, используя щелочной вариант метода комет. Показателем эффективности BER было отношение mt комет лимфоцитов после добавления МНМ и МА к mt комет лимфоцитов после добавления только МНМ ( $mt_{MNM+MA}/mt_{MNM}$ ).

Эффективность MMR оценивали по количеству вторичных двухнитевых разрывов ДНК, формирующихся спустя 24–48 ч после тест-воздействия МНМ на стимулированные лимфоциты (Тронов и др., 2008). Метод включал в себя стимуляцию лимфоцитов (48 ч) в среде, содержащей BrUdR (100 мкМ); обработку клеток МНМ (50 мкМ) с одновременным подавлением метилгуанин-трансферазы с помощью О6-бензилгуанина (О6bzG, 100 мкМ). Спустя 24–48 ч после добавления агентов определяли количество двухнитевых разрывов, используя нейтральный вариант метода ДНК-комет. Для визуализации делящихся клеток на влажные слайды после нейтрализации раствором 0.4 М Tris-HCl (рН 7.4) наносили раствор анти-BrUdR антитела в PBS (30 мкл, 20 мкг/мл), накрывали покровным стеклом и инкубировали 1 ч в темноте при комнатной температуре. После инкубации стекло удаляли и слайд трижды отмывали холодным PBS. Последнюю отмытку проводили PBS, содержащим 2 % бычьей сыворотки. После удаления излишков влаги с поверхности слайда наносили 30 мкл PBS, содержащего вторичные антитела, меченные FITC (10 мкг/мл), накрывали покровным стеклом и инкубировали 1 ч в темноте. После удаления покровного стекла слайды отмывали в PBS, дегидратировали в метаноле, высушивали, окрашивали йодистым пропидием (1 мкг/мл) и микроскопировали в режиме флуоресценции с набором фильтров для FITC. Кометы, формируемые делящимися клетками, содержали BrUdR и FITC и флуоресцировали в зеленой области. Покоящиеся клетки были окрашены оранжевым цветом. Эффективность MMR характеризовалась отношением моментов хвостов комет, формируемых клетками после тест-обработки, и необработанными ( $mt_{MNM+O6bzG}/mt_{O6bzG}$ )

Иммуноцитохимическое определение экспрессии белков. Лимфоциты иммобилизовали в низкоплавкой агарозе в виде тонкого слайда на поверхности предметного стекла. Клетки фиксировали, инкубируя слайды 20 мин в 3%-ном формальдегиде в PBS в холодильнике. Затем пермеабилизовали в 0.2%-ном Тритоне X-100 в PBS (20 мин в холодильнике). Слайды, предназначенные для определения уровня FasR, процедуре пермеабилизации не подвергали. После каждой процедуры слайды трижды отмывали в PBS, последнюю отмытку от первичного антитела проводили в PBS, содержащем 2 % эмбриональной сыворотки. Обработку слайдов антителами проводили так же, как описано выше. Контролем служили слайды с иммобилизованными клетками, которые подвергали такой же обработке, но без первичных антител. В конце слайды дегидратировали в метаноле, высушивали и хранили в темноте. FITC-флуоресцирующие

клетки фотографировали, полученные изображения анализировали на компьютере. Регистрировали флуоресценцию не менее 150 клеток в каждом слайде и определяли долю FITC-позитивных клеток. Показателем уровня экспрессии каждого белка служило произведение среднего значения флуоресценции одной клетки на долю FITC-позитивных клеток в каждом слайде.

## Результаты

Повреждение и репарация ДНК в лимфоцитах в ответ на химиотерапию. В результате одного цикла LDCl-химиотерапии в лимфоцитах пациентов накапливаются повреждения — однонитевые (ss) разрывы ДНК (рис. 1). Возникшие ss-разрывы ДНК с большей или меньшей скоростью репарируются (рис. 2). Это позволило оценить в лимфоцитах больного фактическую эффективность репарации повреждений ssДНК, индуцированных одним циклом LDCl-терапии, и эффективность механизма BER. Их связь друг с другом для 7 пациентов, представленная на рис. 3 а, с высокой достоверностью ( $R^2 = 0.89$ ,  $P < 0.001$ ) описывается линейной зависимостью. Это говорит о том, что в удалении повреждений ssДНК, возникших в результате химиотерапии, принимает участие механизм BER.

Несмотря на серьезное повреждение ssДНК, химиотерапия не вызывает формирования двухнитевых (ds) разрывов ДНК (рис. 1). Напротив, классический индуктор разрывов ДНК — гамма-излучение, хотя и в разной степени, но увеличивает электрофоретическую подвижность ssДНК и dsДНК (рис. 1). Вместе с тем после химиотерапии отмечается изменение ds-нуклеоидов: хотя они и сохраняют симметрию, но становятся менее компактными и менее яркими, напоминающими одуванчики. Такое же различие между ss- и dsДНК-кометами наблюдается и после воздействия на лимфоциты МНМ *in vitro* (рис. 1). Эти наблюдения указывают на то, что превалирующим типом

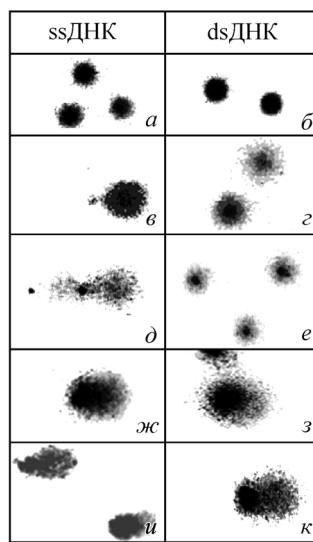


Рис. 1. Микрофотографии ssДНК-комет (рН > 13) и dsДНК-комет (рН 8) из лимфоцитов больных меланомой.

а, б — интактные клетки; в, г — клетки, обработанные метилнитрозомочевиной (МНМ, 250 мкМ); д, е — лимфоциты сразу после 1-го цикла химиотерапии; ж, з — через 48 ч после цикла химиотерапии (ХТ); и, к — после гамма-облучения в дозе 14 Гр.

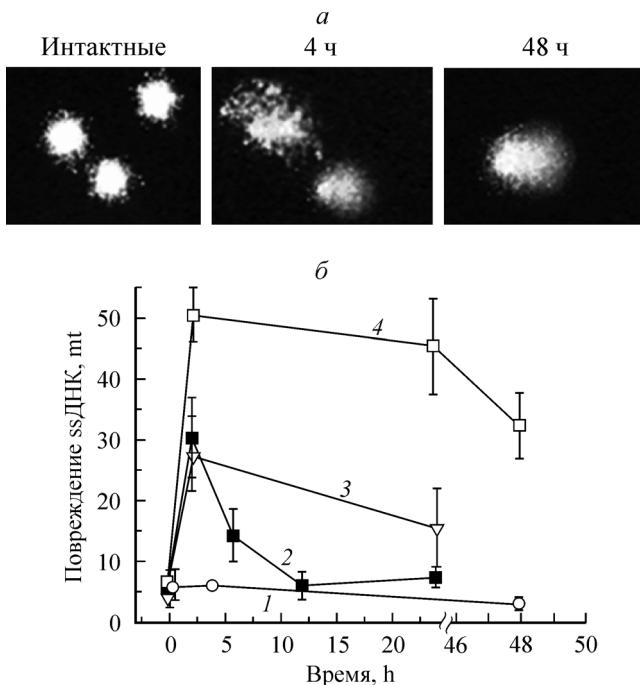


Рис. 2. Микрофотографии ssДНК-комет из лимфоцитов больных до, спустя 4 и 48 ч после химиотерапии (ХТ) (а), а также динамика поврежденности ssДНК в процессе инкубации лимфоцитов in vitro (б).

б: 1 — интактные лимфоциты, 2 — после гамма-облучения in vitro в дозе 14 Гр, 3 — после обработки МНМ (50 мкМ in vitro), 4 — лимфоциты, выделенные из крови больного после 1 цикла ХТ.

повреждений ДНК после химиотерапии являются АП-сайты. АП-сайты трансформируются в ss-разрывы в щелочных условиях (в ssДНК-кометах). При нейтральном pH сохраняется целостность фосфодиэфирной цепи ДНК. Таким образом, в результате лизиса клеток в нейтральном буфере формируются разрыхленные, симметричные ds-нуклеоиды, ДНК в которых не мигрирует в электрическом поле (рис. 1). Тем не менее, как показано на рис. 1, спустя 48 ч после цикла химиотерапии в лимфоцитах на фоне репарации ssДНК формируются ds-разрывы ДНК, о чем свидетельствуют миграция dsДНК и формирование хвоста ssДНК-комет. Эту вторичную деградацию dsДНК в лимфоцитах пациентов, подвергнутых химиотерапии, сопоставили с эффективностью механизма MMR в них. Результат такого сопоставления для 10 исследованных больных представлен на рис. 3, б. Прослеживается линейная корреляция между эффективностью MMR и степенью деградации dsДНК в лимфоцитах больных, подвергнутых одному циклу химиотерапии. Этот факт отражает с высокой вероятностью ( $R^2 = 0.88, P < 0.0001$ ) вовлеченность механизма MMR в процесс вторичной деградации dsДНК в лимфоцитах пациентов после цикла LDCl-химиотерапии.

Повреждение ssДНК и механизм BER не коррелируют с клиническим ответом на LDCl-терапию. Полученные нами результаты (рис. 3, а; 4, д) обнаруживают значительную межиндивидуальную вариабельность эффективности BER и степени повреждения ssДНК в лимфоцитах больных в результате химиотерапии. Однако несмотря на это, спустя 1 мес после первого цикла у больных наблюдали полное восстановление целостности ДНК. Принимая во внимание такое един-

нообразие ответа лимфоцитов, следует ожидать, что повреждения на уровне ssДНК (АП-сайты, однонитевые разрывы) и ассоциированный с ними механизм BER вряд ли могут быть хорошим прогностическим маркером LDCl-химиотерапии. Подтверждение этого получено нами на 5 пациентах. Рис. 4, е показывает зависимость поврежденности ssДНК от клинического ответа больных на химиотерапию. Рисунок демонстрирует отсутствие значимой разницы в степени поврежденности ssДНК (эффективности BER) в лимфоцитах пациентов с различными клиническими ответами на LDCl-терапию.

Вторичная деградация dsДНК, уровень экспрессии белков и клинический ответ на химиотерапию. В отличие от повреждений ssДНК ds-деградация инициируется спустя 24 ч и более после первого цикла терапии (рис. 1) и нарастает во времени: спустя 1 мес число ds-разрывов в ДНК возрастает более чем в 3 раза по сравнению с начальным (рис. 5). Корреляция этого ответа лимфоцитов с клиническим ответом пациентов на LDCl-химиотерапию представлена на рис. 6, а. Как видно, зависимость не монотонна: у пациентов в состояниях прогрессии и стабилизации заболевания обнаружен одинаковый генотоксический ответ лимфоцитов на химиотерапию (практически отсутствие такового). У больных с частично положительным клиническим ответом обнаружена высокая степень вторичной ds-деграда-

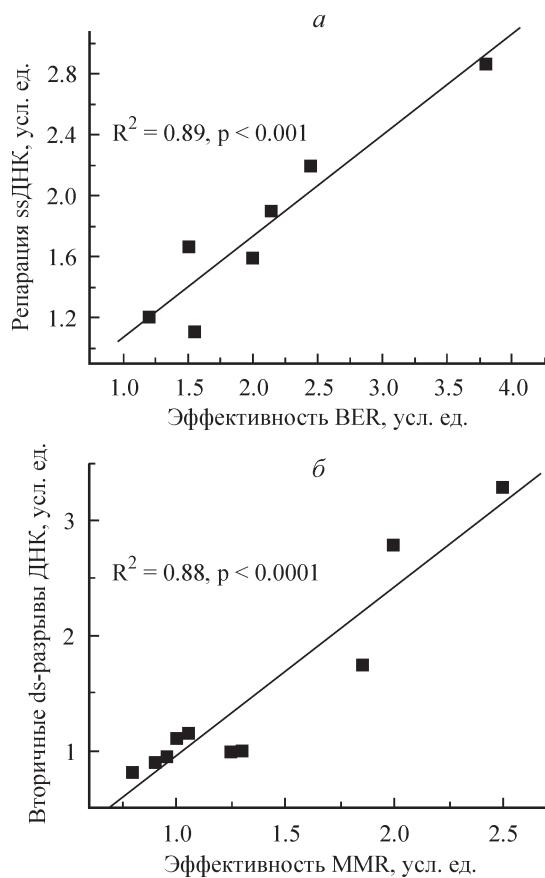


Рис. 3. Зависимость ss- и ds-разрывов ДНК от эффективности систем репарации.

а — корреляция скорости удаления ss-разрывов ДНК в лимфоцитах за 48 ч после 1 цикла химиотерапии, с активностью механизма BER в лимфоцитах 7 пациентов; б — линейная корреляция между накоплением ds-разрывов ДНК спустя 48 ч после 1 цикла ХТ и эффективностью механизма MMR в лимфоцитах 10 больных меланомой.

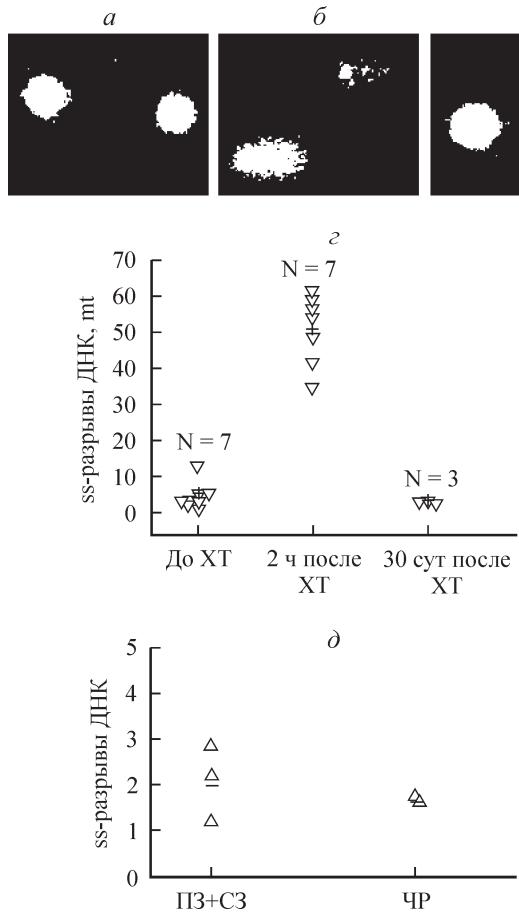


Рис. 4. Влияние химиотерапии (ХТ) на поврежденность ДНК в лимфоцитах больных.

а—в — микрофотографии ДНК-комет из лимфоцитов больных до, спустя 2 ч и 30 сут после 1 цикла ХТ соответственно; г — поврежденность ssDNA, выраженная в значениях момента комет (mt) до ХТ, 2 ч и 30 сут после ХТ; д — связь между клиническим ответом 5 больных меланомой и ss-разрывами ДНК, вызванными ХТ, в лимфоцитах этих же больных; ПЗ — прогресс заболевания, С3 — стабилизация заболевания, ЧР — частичная ремиссия.

ции генома лимфоцитов в ответ на химиотерапию ( $P < 0.0001$ ).

Мы не обнаружили различий в экспрессии белков системы MMR (рис. 6, б) и проапоптотического рецепторного белка FasR (рис. 6, в) среди больных с различным ответом на химиотерапию. Вместе с тем в ответ на химиотерапию увеличивалась доля погибших и погибающих лимфоцитов в крови больных с положительным ответом на химиотерапию (рис. 6, г).

## Обсуждение

Мы намеревались оценить эффективность двух важных механизмов репарации ДНК после химиотерапии (BER и MMR) в связи с клиническим ответом больных меланомой. Часто из-за невозможности получения образцов ткани опухоли лимфоциты крови больных представляются удобным и репрезентативным объектом исследований с целью прогноза развития заболевания и клинического ответа на химиотерапию (Nadin et al., 2006; Sobol et al., 2006). Используемые в LDCI-протоколе лечения меланомы генотоксические агенты (ломустин, дакарбазин и

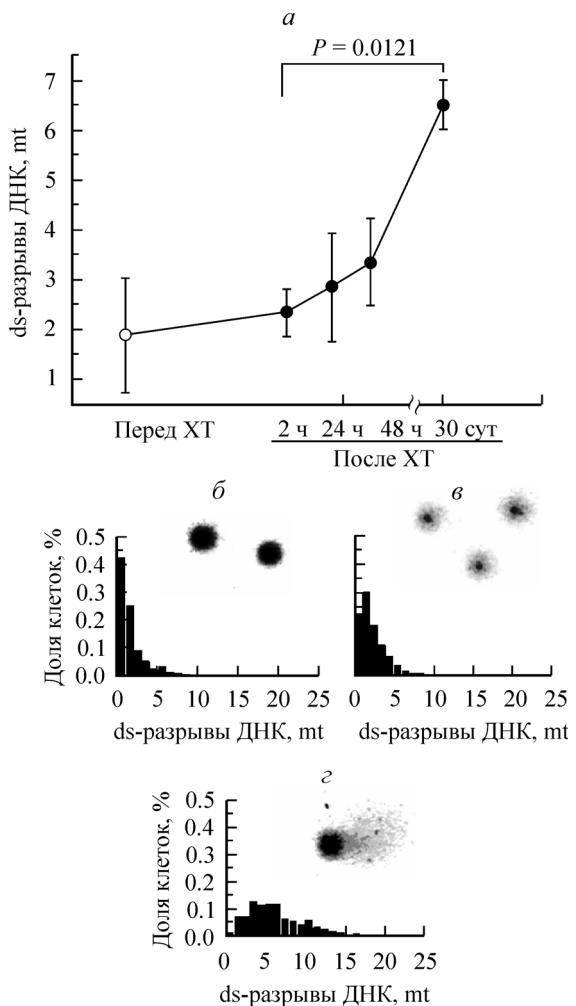


Рис. 5. Вторичная деградация dsДНК в лимфоцитах больных меланомой после химиотерапии (а).

Микрофотографии типичных комет и соответствующие им гистограммы распределений клеток по степени повреждений сразу (б), спустя 2 ч (в) и 30 сут (г) после химиотерапии.

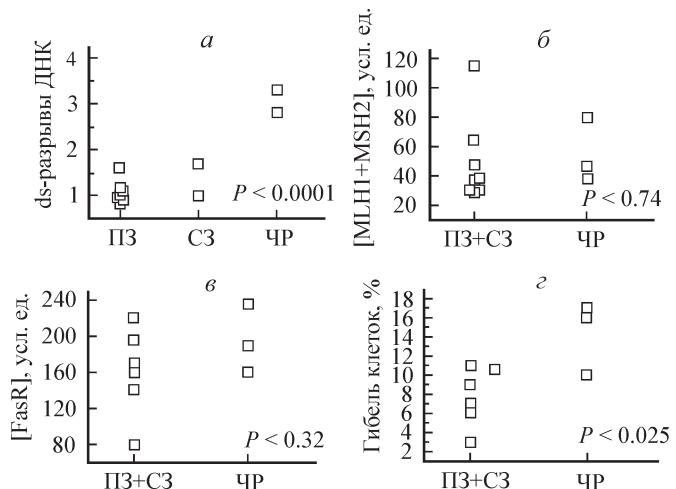


Рис. 6. Корреляция между клиническими ответами больных на химиотерапию и индуцированными ds-разрывами ДНК (а), уровнем экспрессии белков MLH1 и MSH2 (б), рецептора FasR (в) и долей погибших лимфоцитов (г).

ПЗ — прогресс заболевания, С3 — стабилизация заболевания, ЧР — частичная ремиссия.

циплатин) вызывали серьезное повреждение ДНК (ss-разрывы) в лимфоцитах, которое в большей части представлено алкилированными основаниями и связанными с ними АП-сайтами. Более 80 % из них составляют N7meG и N3meA (под действием дакарбазина). АП-сайты формируются как интермедиаты механизма BER (Hegde et al., 2008). Но основным источником АП-сайтов является неферментативный гидролиз N-гликозидной связи в нуклеотидах, содержащих метилированное основание. Показано, что спонтанному гидролизу с образованием АП-сайтов в физиологических условиях подвергаются N7meG и N3meA (Beranek, 1990). Как видно, АП-сайты представляются ss-разрывами ДНК в щелочных условиях (ssДНК-кометы). С другой стороны, ss-разрывы и их удаление сопутствуют функционированию механизма BER, что подтверждается линейной корреляцией доли удаляемых из лимфоцитов ss-разрывов и функциональной активностью BER (рис. 3, a). Коль скоро это так, то следует ожидать наличие корреляции ss-разрывов ДНК с цитотоксичностью АП-сайтов. Вопрос о цитотоксичности АП-сайтов решается неоднозначно. Некоторые авторы считают их нецитотоксичными (Wood, 1996). Однако усиление цитотоксичности метилирующих агентов под действием метоксиамина, ингибитора репарации АП-сайтов (Liu et al., 2002), говорит о цитотоксичности АП-сайтов. Недавние предклинические и клинические данные подтверждают роль APE1 как вероятной мишени противораковой терапии (Al-Attar et al., 2010). Наши результаты демонстрируют полную репарацию ssДНК и отсутствие корреляции между начальным повреждением (ss-разрывами и ассоциированными с ними АП-сайтами) и клиническим ответом больных. Это говорит о незначительном вкладе этих повреждений в цитотоксический эффект химиотерапии.

После химиотерапии помимо ss-разрывов возникают ds-разрывы. Поскольку они формируются после первичных аддуктов метилирования и даже на фоне репарации ssДНК (рис. 1), они называются вторичными. Сравнительные исследования на различных линиях клеток меланомы (Naumann et al., 2009), на клетках глиомы (Roos et al., 2007) и клетках, производных линии СНО (Ochs, Kaina, 2000), позволили идентифицировать 2 пути, транслирующих сигнал от возникшего после метилирования ds-разрыва к апоптозу. Первый включает в себя участие P53 дикого типа (wtP53): ds-разрыв → wtP53 → FasR → каспаза 8 → каспаза 3 → апоптоз. В клетках, содержащих мутантный P53, предполагается митохондриальный сигналинг, в результате которого происходит деградация антиапоптотического белка Bcl-2: ds-разрыв → деградация Bcl-2 → уменьшение соотношения Bcl-2 и проапоптотического белка Bax → каспаза 9 → апоптоз.

Ранее на линиях клеток, различающихся по эффективности MMR, мы показали, что накопление ds-разрывов ДНК после действия МНМ наблюдалось только в клетках с эффективной MMR (Тронов и др., 2006). В настоящей работе мы не обнаружили достоверной корреляции экспрессии двух ключевых белков системы MMR (MLH1 и MSH2) с эффективностью MMR (данные не приводятся) и с клиническим ответом (рис. 6, a). Этот результат соответствует недавнему наблюдению отсутствия корреляции между уровнями экспрессии компонентов гетеродимера MutSa (MSH2 и MSH6) и индукцией апоптоза темозоломидом (TMZ) в линиях меланомных клеток (Naumann et al., 2009). Однако наблюдалась достоверная корреляция

между частотой TMZ-индивидуированного апоптоза и количеством вторичных ds-разрывов ДНК. Отсутствие разницы в уровнях экспрессии MLH1 и MSH2 в лимфоцитах онкологических больных и здоровых доноров отмечалось и ранее (Nadin et al., 2006). У 50 % больных меланомой наблюдали снижение экспрессии MLH1 и MSH2 в метастазах, однако клинический ответ этих больных на терапию дакарбазином не отличался от ответа больных с высоким уровнем экспрессии этих белков (Ma et al., 2002). Наблюданное нами отсутствие корреляции между экспрессией MLH1 и MSH2 и количеством ds-разрывов может объясняться тем, что накопление ds-разрывов в ходе LDCI-терапии происходит не только в результате активации механизма MMR, но и в результате репарации по механизму NER (эксквизиции нуклеотидов) внутри-, межпеченочных и ДНК-белковых сшивок, возникающих под действием цисплатина и хлорэтилирующего агента ломустина. Увеличение доли погибших лимфоцитов у больных с положительным ответом на химиотерапию (рис. 6, a) говорит о том, что этот ответ ассоциирован с апоптозом в клетках. Скорее всего, апоптоз инициируется ds-разрывами преимущественно по Fas-независимому пути. Разрывы формируются благодаря активации системы пострепликативной MMR, но без заметного увеличения экспрессии ключевых белков MLH1 и MSH2.

Таким образом, позитивная корреляция между уровнем ds-разрывов ДНК в лимфоцитах и эффективностью химиотерапии меланомы демонстрирует возможность использования этого параметра как прогностического маркера в клинической практике.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00210).

## Список литературы

- Тронов В. А., Константинов Е. М., Крамаренко И. И. 2002. Роль эксквизионных механизмов репарации ДНК в индукции апоптоза. Биохимия. 67 (7) : 882—889.
- Тронов В. А., Крамаренко И. И., Смирнова Т. Д., Терехов С. М. 2006. Сравнение гено- и цитотоксического эффектов метилнитрозомочевины на линиях клеток профицитных и дефицитных по коррекционной репарации ДНК (MMR). Цитология. 48 (1) : 19—27.
- Тронов В. А., Логинова М. Ю., Крамаренко И. И. 2008. Метилнитрозомочевина challenge-мутаген в оценке активности коррекционной репарации ДНК (MMR): связь с некоторыми видами рака. Генетика. 44 (5) : 686—692.
- Al-Attar A., Gossage L., Fareed K. R., Shehata M., Mohammed M., Zaitoun A. M., Soomro I., Lobo D. N., Abbotts R., Chan S., Madhusudan S. 2010. Human apurinic/apurimidinic endonuclease (APE1) is a prognostic factor in ovarian, gastro-oesophageal and pancreatico-biliary cancers. Br. J. Cancer. 102 : 704—709.
- Beranek D. T. 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. Mutat. Res. 231 : 11—30.
- Friedman H. S., Keir S., Pegg A. E., Houghton P. J., Colvin O. M., Moschel R. C., Bigner D. D., Dolan M. E. 2002. O6-benzylguanine-mediated enhancement of chemotherapy. Mol. Cancer Ther. 1 : 943—948.
- Gogas H. J., Kirkwood J. M., Sondak W. K. 2007. Chemotherapy for metastatic melanoma. Cancer. 109 : 455—464.
- Hansen R. J., Nagasubramanian R., Delaney S. M., Samson L. D., Dolan M. E. 2007. Role of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in protecting from alkylating agent-induced toxicity and mutations in mice. Carcinogenesis. 28 : 1111—1116.

- Hegde M. L., Karza T. K., Mitra S. 2008. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res.* 18 : 27—47.
- Jenkins G. J. S., Doak S. H., Johnson G. E., Quick E., Waters E. M., Parry J. M. 2005. Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents? *Mutagenesis.* 20 : 389—398.
- Konca K., Lankoff A., Banasik A. et al. 2003. Across-platform public domain PC image-analysis program for comet assay. *Mutat. Res.* 534 : 15—20.
- Krekau E. L., Pollok R. T., Bailey B. J., Liu N., Hartwell J. R., Williams D. A., Erickson L. C. 2003. Hematopoietic expression of O6-methylguanine DNA methyltransferase-P140K allows intensive treatment of human glioma xenografts with combination O6-benzylguanine and 1,3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Mol. Cancer Ther.* 2 : 1321—1329.
- Liu L., Nakatsuru Y., Gerson S. L. 2002. Base excision repair as a therapeutic target in colon cancer. *Clin. Cancer Res.* 8 : 2985—2991.
- Ma S., Egyhcozi S., Ringborg U., Hansson J. 2002. Immunohistochemical analysis of DNA mismatch repair protein and O6-methylguanine-DNA methyltransferase in melanoma metastases in relation to clinical response to DTIC-based chemotherapy. *Oncol. Rep.* 9 : 1015—1019.
- Middleton M. R., Lee S. M., Arance A., Wood M., Thatcher N., Margison G. P. 2000. O6-methylguanine formation, repair protein depletion and clinical outcome with a 4 hr schedule of temozolomide in the treatment of advanced melanoma: results of a phase II study. *Int. J. Cancer.* 88 : 469—473.
- Nadin S. B., Vargas-Roig L. M., Drago G., Ibarra J., Ciocca D. R. 2006. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and cancer patients: a pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. *Cancer Lett.* 239 : 84—97.
- Naumann S. C., Roos W. P., Jost E., Belohlavek C., Lennerz V., Schmidt C. W., Christmann M., Kaina B. 2009. Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: response related to MGMT, MMR, DSBs, and p53. *Br. J. Cancer.* 100 : 322—333.
- Ochs K., Kaina B. 2000. Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res.* 60 : 5815—5824.
- Roos W. P., Batista L. F. Z., Naumann S. C., Wick W., Weller M., Menck C. F. M., Kaina B. 2007. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine. *Oncogene.* 26 : 186—197.
- Roos W., Baumgartner M., Kaina B. 2004. Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene.* 23 : 359—367.
- Sobol R. W., Tawbi H., Jukic D. M., Mule K., Mascari R., Kirkwood J. M. 2006. Mismatch repair (MMR) and base excision repair (BER) protein expression correlates with clinical response to dacarbazine (DTIC)/temozolomide (TMZ) therapy of patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 24 : 8015—8016.
- Toft N. J., Sansom O. J., Brookes R. A., Arends M. J., Wood M., Margison G. P., Winton D. J., Clarke A. R. 2000. In vivo administration of O6-benzylguanine does not influence apoptosis or mutation frequency following DNA damage in the murine intestine, but does inhibit P450-dependent activation of dacarbazine. *Carcinogenesis.* 21 : 593—598.
- Watson A. J., Middleton M. R., McGown G., Thorncroft M., Ranson M., Hersey P., McArthur G., Davis I. D., Thomson D., Beith J., Haydon A., Kefford R., Lorigan P., Mortimer P., Sabharwal A., Hayward O., Margison G. P. 2009. O6-methylguanine-DNA methyltransferase depletion and DNA damage in patients with melanoma treated with temozolomide alone or with lomeguatrib. *Br. J. Cancer.* 100 : 1250—1256.
- Wood R. D. 1996. DNA repair in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 65 : 135—167.

Поступила 12 V 2010

CELLULAR MARKERS BASED ON DNA DAMAGE AND REPAIR (BER, MMR),  
EXPRESSION OF MLH1, MSH2, FasR, AND CELL DEATH OF LYMPHOCYTES  
AS PREDICTIVE PARAMETERS FOR CLINICAL RESPONSE  
TO CHEMOTHERAPY OF MELANOMA

V. A. Tronov,<sup>1</sup> D. N. Artamonov,<sup>2</sup> M. E. Abramov,<sup>3</sup> L. B. Gorbacheva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> N. N. Semenov Institute of Chemical Physics RAS,

<sup>2</sup> N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS

and <sup>3</sup> N. N. Blochin Cancer Research Center RAMS, Moscow RAS

Melanoma is a highly aggressive neoplastic disease attributed to transformed melanocytes. The efficacy of regimens of cytotoxic chemotherapy for advanced stage patients does not exceed 20 %. Search for lymphocyte markers of patients' sensitivity to chemotherapy provides a rational basis for development of cytotoxic chemotherapy. Using blood lymphocytes we evaluated efficacy of BER and MMR, expression of MLH1, MSH2 and FasR, and cell death in melanoma patients relative to clinical response to chemotherapy. We found that LDCI-chemotherapy (lomustine, dacarbazine, cisplatin and interferon gamma), induced AP sites and DNA ss-breaks which repaired through BER pathway. However, neither initial DNA damage nor the rate of their repair correlated with clinical response. This result prompts us to think that this type of damage is not crucial in cytotoxic effect of LDCI-regimen of chemotherapy. DNA ds-breaks appeared downstream ss-breaks were attributed to repair of O6-methylguanine by MMR mechanism in PHA-stimulated lymphocytes. The number of ds-breaks appeared by 48 correlated with positive clinical response of patients to chemotherapy. The same link was observed between clinical response and the number of dead lymphocytes. However, there was no correlation between clinical response and expression of MLH1 + MSH2 and FasR. These results imply possible contribution of cross-link repair through NER pathway to formation of DNA ds-breaks as well as to cytotoxicity of LDCI-therapy. The observed link between high level of secondary ds-breaks and positive response to chemotherapy indicates the potential of these instruments to serve as prognostic end point in clinical trials.

**Key words:** melanoma, lymphocytes, chemotherapy, cell markers, DNA strand breaks, DNA repair.