

Всероссийская конференция «Биомедицинская химия: наука и практика»

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### РАЗНОНАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ 8-OHdG В СЛЮНЕ ПРИ ЭКСПРЕССИИ HER2 ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Е.И. Дьяченко<sup>1,2\*</sup>, Е.В. Пахалкова<sup>2</sup>, Е.А. Сарф<sup>1</sup>, Л.В. Бельская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Омский государственный педагогический университет,  
644099, Омск, наб. им. Тухачевского, 14; \*e-mail: Olseya-120@mail.ru

<sup>2</sup>Городской Клинический Перинатальный Центр, 644007, Омск

Оценено изменение концентрации 8-OHdG в слюне среди пациентов с раком молочной железы (РМЖ) в зависимости от молекулярно-биологических подтипов. Уменьшение концентрации 8-OHdG в слюне в группе пациентов с HER2-положительной экспрессией тесно коррелирует со снижением дифференцировки клеток и высоким уровнем Ki-67, что отражает агрессивный характер опухолевого заболевания и плохие прогнозы по выживаемости. Высокая концентрация 8-OHdG в слюне может выступать в роли биологического маркера HER2-положительной группы с плохим прогнозом РМЖ, который может быть использован в качестве дополнительного метода диагностики, мониторинга состояния пациентов и ответа на терапию.

**Ключевые слова:** слюна; 8-гидроксидезоксигуанозин (8-OHdG); рак молочной железы; HER2

**DOI:** 10.18097/BMCRM00236

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее широко используемых маркеров окислительного повреждения ДНК при диагностике онкологических заболеваний является 8-гидрокси-2-дезоксигуанозин (8-OHdG). Известно, что при раке молочной железы (РМЖ) повышается уровень активных форм кислорода (АФК). Азотистое основание гуанин, входящее в состав нуклеотидов ДНК, является наиболее уязвимым к окислительному повреждению в ДНК. Образование 8-OHdG происходит во время окислительного стресса и воздействия АФК на 2'-деоксигуанозин. В норме 8-OHdG удаляется ферментом человеческой 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой 1 (hOGG1) и должен поступать в свободном виде во внеклеточные жидкости [1]. В недавнем исследовании была показана корреляционная зависимость между низким уровнем 8-OHdG в сыворотке крови и плохим прогнозом больных РМЖ [2]. Изменение концентрации продуктов при АФК-индуцированном повреждении ДНК, к которым относится 8-OHdG, отражает состояние системы антиоксидантной защиты организма, является информативным показателем при анализе текущего состояния пациента, прогнозировании и мониторинге ответа на терапевтическое вмешательство.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании случай-контроль приняли участие добровольцы, которые были разделены на 2 группы: основную (РМЖ, n=110, возраст 59±6 лет) и контрольную группу (условно здоровые, n=30, возраст 45±9 лет). Включение в группы происходило параллельно. В качестве критериев включения

были приняты: женский пол, возраст 30–80 лет, отсутствие какого-либо лечения на момент проведения исследования, в том числе хирургического, химиотерапевтического или лучевого, отсутствие признаков активной инфекции (включая гнойные процессы), проведение санации полости рта. Критерии исключения: отсутствие гистологической верификации диагноза.

Образцы слюны собирали однократно на этапе госпитализации строго до начала лечения. Сбор образцов проводили в стерильные полипропиленовые центрифужные пробирки с завинчивающейся крышкой в объёме 2 мл. Образцы слюны собирали путём сплевывания без дополнительной стимуляции в интервале 8–10 часов утра (время максимальной секреции слюны) натощак после предварительного полоскания полости рта водой. Непосредственно после сбора образцы центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин, отбирали 1 мл верхнего слоя, переносили в пробирки типа Эппендорф и хранили при температуре -80°C до проведения анализа.

Во всех образцах определяли содержание 8-OHdG методом конкурентного иммуноферментного анализа (CEA660Ge, "Cloud-Clone Corp.", США) на анализаторе Thermo Fisher Multiskan FC ("Waltham", США). Объём аликвоты составил 200 мкл. Анализ и расчёт концентрации 8-OHdG (пг/мл) проводили в соответствии с инструкцией производителя.

Статистический анализ полученных данных проводили при помощи программы Statistica 10.0 непараметрическим методом с использованием в зависимых группах критерия Вилкоксона, в независимых группах — U-критерия Манна-Уитни. Описание выборки производили с помощью



медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го процентилей [LQ; UQ]. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ . Значения  $0.05 < p < 0.1$  рассматривали как статистическую тенденцию.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В слюне добровольцев контрольной группы концентрация 8-OHdG составила 188.3 [89.07; 309.1] пг/мл. При РМЖ содержание 8-OHdG повышается до 235.5 [156.3; 636.2] пг/мл, но это повышение находится на уровне статистической тенденции ( $p = 0.0926$ ). Однако нами показано, что концентрация 8-OHdG существенно зависит от молекулярно-биологического подтипа РМЖ (табл. 1). Так, концентрация 8-OHdG в слюне статистически значимо увеличивалась при нелюминальном РМЖ по сравнению с контрольной группой ( $p = 0.0167$ ).

Далее мы проанализировали распределение концентрации 8-OHdG в слюне в зависимости от наличия/отсутствия экспрессии HER2 (human epidermal growth factor receptor 2; рецептор эпидермального фактора роста, тип 2). Установлено, что при наличии экспрессии рецепторов HER2 концентрация 8-OHdG в слюне значимо выше (393.3 [222.2; 790.8] пг/мл), чем при отсутствии (196.4 [135.7; 337.2] пг/мл) ( $p = 0.0127$ ). Различия с контрольной группой статистически значимы только для подгруппы HER2-положительного РМЖ ( $p = 0.0139$ ).

Концентрация 8-OHdG зависит от стадии заболевания, степени дифференцировки клеток и индекса пролиферативной активности Ki-67 при наличии/отсутствии экспрессии HER2 (табл. 2).

При HER2(+) РМЖ концентрация 8-OHdG в слюне растёт с увеличением стадии, но уменьшается при низкой дифференцировке и высокой пролиферативной активности. Различия с контрольной группой статистически значимы во всех случаях, кроме подгруппы с низкой пролиферативной активностью, что может быть связано с её малым размером и большим разбросом данных. При этом содержание 8-OHdG в слюне независимо от подгруппы остаётся выше, чем в контрольной группе (табл. 2). Для HER2(-) РМЖ наоборот наблюдается уменьшение концентрации 8-OHdG в слюне на распространённых стадиях РМЖ и при высокой и средней дифференцировке опухоли, а также при высокой пролиферативной активности. При этом концентрация 8-OHdG в слюне в этих подгруппах снижается до значений ниже контрольной группы (табл. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В одном из недавних исследований на примере РМЖ было показано уменьшение содержания 8-OHdG в сыворотке и моче на поздних стадиях заболевания, при лимфоваскулоинвазии, поражении лимфатических узлов, отрицательном статусе по HER2 и высоком индексе пролиферативной активности [2]. Согласно данным, полученным в ходе нашего исследования, было показано уменьшение концентрации 8-OHdG в слюне при HER2(-) статусе пациентов на распространённых стадиях заболевания и высоком уровне Ki-67. В отличие от других исследований, мы наблюдали снижение концентрации 8-OHdG в слюне в подгруппах с высоким индексом пролиферативной активности как при HER2(+), так и при HER2(-) статусе. Также мы обнаружили

**Таблица 1.** Концентрация 8-OHdG в слюне при разных молекулярно-биологических подтипах РМЖ

Показатель	ТНРМЖ, n=22	Нелюминальный, n=22	Люминальный А, n=22	Люминальный В(-), n=22	Люминальный В(+), n=22
Возраст, лет	65.2 [41.6; 70.2]	57.6 [51.3; 68.5]	65.3 [51.7; 69.9]	64.5 [47.6; 66.6]	61.0 [48.2; 67.4]
8-OHdG, пг/мл	250.4 [116.9; 636.2]	477.7 [222.2; 1454.6]	196.4 [106.0; 562.3]	174.9 [154.6; 265.4]	277.2 [196.4; 746.2]

**Таблица 2.** Распределение концентрации 8-OHdG в зависимости от стадии заболевания (St), уровня дифференцировки клеток (G) и индекса пролиферативной активности Ki-67

	HER2(+), n=44		p-value	HER2(-), n=44		ТНРМЖ, n=22	
Стадия							
St 1-2	n=25	286.7 [222.2; 746.2]	0.0498	n=20	200.2 [162.6; 562.3]	n=10	193.0 [140.4; 429.2]
St 3-4	n=19	559.2 [236.8; 1008.7]	0.0164	n=24	164.7 [122.2; 237.9]	n=12	266.4 [111.9; 1136.6]
Степень дифференцировки							
GI+II	n=16	477.7 [156.3; 746.2]	0.0217	n=20	168.8 [130.4; 321.7]	n=1	222.1
GIII	n=25	302.4 [223.8; 1454.5]	0.0224	n=24	194.3 [154.6; 1012.0]	n=21	258.4 [163.8; 444.6]
Индекс пролиферативной активности							
Ki-67 low	n=7	691.4 [156.3; 1226.6]	—	n=16	208.1 [133.0; 431.7]	n=5	346.5 [222.2; 470.8]
Ki-67 high	n=37	393.3 [223.0; 768.5]	0.0138	n=28	162.6 [140.7; 266.4]	n=17	250.4 [116.0; 424.6]

увеличение содержания 8-OHdG в слюне по мере снижения уровня дифференцировки клеток при HER2(-) статусе РМЖ, что не согласуется с предыдущими исследованиями.

Стоит отметить, что уровень концентрации 8-OHdG будет уменьшаться или увеличиваться в зависимости от вида рака. Так он увеличивался при раке лёгких, базальноклеточной карциноме, раке мочевого пузыря, остром лимфобластном лейкозе, колоректальном раке, дисплазии шейки матки высокой степени, печёночно-клеточном раке, раке простаты, желудочно-кишечных метаплазиях и аденокарциноме желудка [2–8].

Уменьшение концентрации 8-OHdG в слюне, по-видимому, связано с одновременной дисфункцией или истощением фермента hOGG1 и активацией антиоксидантной защиты раковых клеток, за счёт повышенной активности антиоксидантных путей, регуляторных факторов и изменения метаболизма аминокислот, проявляющих антиоксидантные свойства (Asp, Gln, Gly, Pro, Tyr) [9–12]. В результате, АФК нейтрализуются, предотвращается окислительное повреждение 2'-деоксигуанозина и как следствие образуется 8-OHdG. В пользу утверждения о снижении циркуляции 8-OHdG за счёт снижения концентрации АФК, обусловленной активацией антиоксидантной системы при РМЖ, говорят данные, полученные в исследовании аминокислотного состава слюны среди пациентов с различными молекулярно-биологическими подтипами РМЖ [12]. Было показано, что уровень свободных аминокислот, обладающих антиоксидантными свойствами, значительно выше среди пациентов с РМЖ по сравнению с контрольной группой. При этом в группе HER2(+) концентрация Asp, Gln, Gly, Pro и Tyr выше, чем в группе HER2(-). Эти данные дополняют результаты, полученные в ходе нашего исследования, так как объясняют снижение концентрации 8-OHdG в группе HER2(+) при низкой дифференцировке и высокой пролиферативной активности раковых клеток за счёт повышения концентрации свободных аминокислот с антиоксидантными свойствами, которые нейтрализуют высокое содержание АФК.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

У всех пациентов перед проведением испытания было взято добровольное согласие на участие и обработку персональных данных. Исследования одобрены на заседании комитета по этике БУЗ Омской области “Клинический онкологический диспансер” от 21 июля 2016 г., протокол № 15.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда, проект 23-15-00188.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

## ЛИТЕРАТУРА

- Hirano, T. (2008) Repair system of 7,8-dihydro-8-oxoguanine as a defense line against carcinogenesis. *J. Radiat. Res.*, **49**(4), 329–440. DOI: 10.1269/jrr.08049
- Sova, H., Jukkola-Vuorinen, A., Puistola, U., Kauppila, S., Karihtala, P. (2010) 8-Hydroxydeoxyguanosine: A new potential independent prognostic factor in breast cancer. *Br. J. Cancer*, **102**(6), 1018–1023. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605565
- Vulimiri, S.V., Wu, X., Baer-Dubowska, W., de Andrade, M., Detry, M., Spitz, M.R., DiGiovanni, J. (2000) Analysis of aromatic DNA adducts and 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in lymphocyte DNA from a case-control study of lung cancer involving minority populations. *Mol. Carcinog.*, **27**(1), 34–46. DOI: 10.1002/(sici)1098-2744(200001)27:1<34::aid-mc6>3.3.co;2-7
- Nishigori, C., Arima, Y., Matsumura, Y., Matsui, M., Miyachi, Y. (2005) Impaired removal of 8-hydroxydeoxyguanosine induced by UVB radiation in naevoid basal cell carcinoma syndrome cells. *Br. J. Dermatol.*, **153**(Suppl 2), 52–56. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2005.06970.x
- Kaczmarek, P., Biaszczyk, J., Fijaikowski, P., Sierakowska-Fijaiek, A., Niemirowicz, J., Kasprzak, A., Baj, Z. (2005) Analiza stezenia 8-hydroksy-2'-deoxyguanozyny w moczu chorych na powierzchownego raka pecherza moczowego leczonych zawiesina pratka BCG [Assessment of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentrations in bladder cancer patients treated with intravesical BCG instillation]. *Polski Merkuriusz Lekarski*, **19**(112), 526–528.
- Romano, G., Sgambato, A., Mancini, R., Capelli, G., Giovagnoli, M.R., Flamini, G., Boninsegna, A., Vecchione, A., Cittadini, A. (2000) 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine in cervical cells: Correlation with grade of dysplasia and human papillomavirus infection. *Carcinogenesis*, **21**, 1143–1147.
- Miyake, H., Hara, I., Kamidono, S., Eto, H. (2004) Oxidative DNA damage in patients with prostate cancer and its response to treatment. *J. Urol.*, **171**(4), 1533–1536. DOI: 10.1097/01.ju.0000116617.32728.ca
- Farinati, F., Cardin, R., Bortolami, M., Nitti, D., Basso, D., de Bernard, M., Cassaro, M., Sergio, A., Rugge, M. (2008) Oxidative DNA damage in gastric cancer: CagA status and OGG1 gene polymorphism. *Int. J. Cancer.*, **123**(1), 51–55. DOI: 10.1002/ijc.23473
- Schafer, Z.T., Grassian, A.R., Song, L., Jiang, Z., Gerhart-Hines, Z., Irie, H.Y., Gao, S., Puigserver, P., Brugge, J.S. (2009) Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature*, **461**(7260), 109–113. DOI: 10.1038/nature08268
- Chen, W., Sun, Z., Wang, X.-J., Jiang, T., Huang, Z., Fang, D., Zhang, D.D. (2009) Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol. Cell.*, **34**(6), 663–673. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.04.029
- Tai, D.J., Jin, W.S., Wu, C.S., Si, H.W., Cao, X.D., Guo, A.J., Chang, J.C. (2012) Changes in intracellular redox status influence multidrug resistance in gastric adenocarcinoma cells. *Exp. Ther. Med.*, **4**(2), 291–296. DOI: 10.3892/etm.2012.591
- Bel'skaya, L.V., Sarf, E.A., Solomatin, D.V. (2024) Free salivary amino acid profile in breast cancer: Clinicopathological and molecular biological Features. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **46**(6), 5614–5631. DOI: 10.3390/cimb46060336

Поступила: 01. 07. 2024.  
После доработки 23. 07. 2024.  
Принята к публикации: 29. 07. 2024.

## MULTI-DIRECTIONAL CHANGES IN 8-OHdG CONCENTRATION IN SALIVA DURING HER2 EXPRESSION IN BREAST CANCER

*E.I. Dyachenko<sup>1,2\*</sup>, E.V. Pahalkova<sup>2</sup>, E.A. Sarf<sup>1</sup>, L.V. Bel'skaya<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Omsk State Pedagogical University,  
14 Tukhachevsky emb., Omsk, 644099 Russia; \*e-mail: Olseya-120@mail.ru  
<sup>2</sup>Clinical diagnostic laboratory, City Clinical Perinatal Center, Omsk, 644007 Russia

The purpose of this work was to evaluate changes in the structure of 8-OHdG in saliva in patients with breast cancer depending on molecular biological subtypes. The findings show that decreased salivary 8-OHdG concentrations in the HER2-positive group rapidly correlated with decreased cell differentiation and high Ki-67 levels, reflecting the aggressive nature of the tumor disease and poor survival prognosis. Thus, the presence of high levels of 8-OHdG in the oral cavity may lead to the development of the role of a biological marker of the HER2-positive group with a poor prognosis of breast cancer and can be used as an additional method of diagnosis, patient condition and response to therapy.

**Key words:** saliva; 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG); breast cancer; HER2

### FUNDING

The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation, project 23-15-00188.

Received: 01.07.2024; revised: 23.07.2024; accepted: 29.07.2024.