

Список литературы

1. Апанасевич А.В. Клиника и методы лечения. Функциональная и инструментальная диагностика. Новые лекарственные формы / А.В. Апанасевич, М.М. Кириллов, Т.Ю. Назаренко // Вестник новых медицинских технологий. - 2006. - №1. - С. 38-40.
2. Бычков М. Б. Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком легкого [электронный ресурс] / М. Б. Бычков, В. А. Горбунова. - Электрон. текстовые данные Ассоциации онкологов России. – Москва: [б.и.], 2015. - Режим доступа: <http://oncology-association.ru/docs/recomend/may2015/19vz-rek.pdf>
3. Иванова З.А. Туберкулез легких и хронические болезни органов дыхания / З.А. Иванова, В.А.Кошечкин, И.Ю. Якушева // Вестник РУДН, серия Медицина. - 2004. - №2 (26). - С. 114-115.
4. Оксенойт Г.К. Состояние здоровья населения / Г.К. Оксенойт, С.Ю. Никитина, Л.И. Агеева и др. // Здравоохранение в России 2017. - М.: Росстат., 2017. - С. 29-31.
5. World Health Organization Classification of Tumours : WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart / Edited by W. D. Travis, E. Brambilla, Allen P. Burke [et. al.]. – Lyon : IARC Press, 2015. – P. 412.

УДК: 618.19-006.6:575

**Быстрова Е.В., Крохалев В.Я.
ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ И АМПЛИФИКАЦИИ ГЕНА
TOR2A В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Институт медицинских клеточных технологий
Екатеринбург, Российская Федерация

**Bystrova E.V., Krokhalev V.Ya.
FEATURES OF EXPRESSION AND AMPLIFICATION OF THE TOR2A
GENE IN BREAST CARCINOMA CELLS**

Institute of Medical Cellular Technologies
Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: evbystrova23@gmail.com

Аннотация. В статье рассмотрено ретроспективное исследование 104 случаев РМЖ. В каждом случае рассчитывали уровень экспрессии и амплификации Tor2a. Нормальный уровень экспрессии Tor2a был в 11,5% случаев РМЖ и характерен только нормальному статусу гена Tor2a. Во всех случаях РМЖ с амплификацией гена Tor2a мы получили гиперэкспрессию фермента Tor2a. При сравнении уровня экспрессии Tor2a в подтипах РМЖ получили достоверное различие только между подтипами HR+/Her2- и HR-/

Her2+ ($p=0,039$). При определении характера зависимости амплификации Top2a с экспрессией Top2a мы установили, что синтез белка Top2a зависит от количества копий гена Top2a на хромосоме.

Annotation. The study is retrospective. Considered 104 cases of breast cancer. In each case, the level of expression and amplification of Top2a was calculated. The normal expression level of Top2a was in 11.5% of cases of breast cancer and is characteristic only of the normal status of the Top2a gene. In all cases of breast cancer with amplification of the Top2a gene, we received overexpression of the Top2a enzyme. When comparing the expression level of Top2a in breast cancer subtypes, a significant difference was only found between the HR + / Her2- and HR- / Her2 + subtypes ($p = 0.039$). In determining the nature of the dependence of Top2a amplification with Top2a expression, we found that the synthesis of Top2a protein depends on the number of copies of the Top2a gene on the chromosome.

Ключевые слова: иммуногистохимия, РМЖ, Top2a, амплификация, гиперэкспрессия

Keywords: immunohistochemistry, breast cancer, Top2a, amplification, overexpression

Введение. В опухолевых клетках уровень Top2a имеет повышенную экспрессию (в отличие от экспрессии в здоровых клетках), что дает материальную основу для разработки ингибиторов топоизомеразы. В отсутствие Top2a ДНК не может нормально реплицироваться, поскольку в ходе репликации образуются положительные сверхвитки и катенаны. Таким образом, ингибиторы топоизомераз (антрациклины) используются как противоопухолевые средства, подавляющие пролиферацию злокачественных клеток [1].

Антрациклины одобрены FDA для лечения РМЖ с 1975. Механизм цитотоксического действия антрациклиновых антибиотиков связан, главным образом, с ингибированием синтеза нуклеиновых кислот путем интеркаляции между парами азотистых оснований, нарушением вторичной спирализации ДНК за счет взаимодействия с ферментом Top2a, а также связыванием с липидами клеточных мембран, сопровождающимся изменением транспорта ионов и клеточных функций. Такой механизм обуславливает высокую антимиотическую активность при низкой избирательности действия.

В период отсутствия альтернатив вклад антрациклинов в лечении РМЖ был неоспорим. Это было подтверждено в многочисленных метаанализах. Однако более детальный анализ последних исследований [4,5] показал, что назначение антрациклин-содержащей ХТ целесообразно только при определенных неблагоприятных подтипах РМЖ (Her2 - позитивный подтип, наличие метастатических лимфоузлов). При относительно "благоприятных"

вариантах РМЖ, когда вероятность 7-ми и 10-летней выживаемости высока предпочтительнее применять альтернативные схемы ХТ.

Идентификация молекулярного фенотипа карцином молочной железы является важным прогностическим фактором заболевания и позволяет персонифицировать лечение больных [3]. Поэтому определение экспрессии и статуса Top2a может быть полезным для выявления подгруппы пациенток с РМЖ способных получить максимальную пользу от антрациклинов.

Цель исследования - выявление наличия взаимосвязи уровня экспрессии Top2a со статусом гена Top2a и определение основных закономерностей экспрессии Top2a в зависимости от подтипа РМЖ.

Материалы и методы исследования. Данное исследование является ретроспективным. Все исследования проводились в патологоанатомическом отделении ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий» (г. Екатеринбург). Предметом исследования являлся операционный материал 104 пациенток с диагнозом инвазивный рак молочной железы, не получавших неoadъювантную химио- и лучевую терапию. Материал отобранных образцов исследовался гистологическим, иммуногистохимическим, молекулярно-генетическим и статистическим методами. Методом иммуногистохимического окрашивания определяли уровень экспрессии рецепторов Estrogen, Progesteron, Her2, Ki67 и Top2a. Статус гена HER2 и гена Top2a определяли методом FISH. Оценка уровня экспрессии рецепторов и статуса генов проводилась врачом патоморфологом.

Статистические исследования выполнены с использованием набора программ описательной статистики и матриц корреляций в программном пакете «Statistica10.0». Применяли непараметрические методы статистического анализа данных.

Результаты исследования и их обсуждение.

На основании имеющихся данных об экспрессии рецепторов Er, Pr и Her2 и рекомендаций 14-ой международной конференции по РМЖ все образцы были отнесены к различным молекулярным подтипам:

HR+ / Her2 - (гормон-рецептор-позитивный-Her2 негативный) – 25% (абс. 26),
HR+ / Her2+ (гормон-рецептор-позитивный-Her2 позитивный) – 21% (абс. 22),
HR- / Her2 + (гормон-рецептор-негативный-Her2 позитивный) – 29% (абс. 30),
HR- / Her2 - (ТН, трижды негативный) – 25% (абс. 26).

Her2-положительные опухоли составили 50%, что не укладывается в рамки других исследований 11-30% [2]. Это объясняется тем, что мы старались набрать в каждую группу примерно одинаковое количество случаев.

Для каждого из молекулярного подтипа мы посчитали среднее значение экспрессии Top2a и сравнили их между собой (табл.1). Для оценки

достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента. По результатам установлено достоверное различие в уровне экспрессии Top2a только между подтипами HR-/Her2+ и HR+/Her2- ($p=0,039$).

По данным литературы уровень экспрессии Top2a в тканях неизменной молочной железы находится в интервале 0-3%. В нашем исследовании нормальный уровень экспрессии встретился в 12 случаях РМЖ, что составило 11,5%. При этом половина случаев относится к ТН подтипу, четыре случая к HR-/Her2+ и два случая к HR+/Her2+.

Таблица 1

Уровень экспрессии и амплификации Top2a в различных молекулярных подтипах РМЖ (n=104)

Характеристика РМЖ		Экспрессия Top2a		Амплификация Top2a
Подтип	Кол-во	ср. знач ± ст. откл.	мода /медиана	Кол-во
HR+ / Her2 -	26	12,34 ±12	5/10	-
HR+ / Her2+	22	20,43 ± 17,2	10/15	6
HR- / Her2 +	30	21,42 ±16,27	30/20	4
ТН	26	26,11 ±23,65	5/20	-

Статус Top2a определяли методом FISH на всех препаратах параллельно с ИГХ-анализом. Амплификация гена TOP2A выявлена в 10 случаях и распределилась по подтипам следующим образом: HR+/Her2+ 6 случая, HR-/Her2+ 4 случая (табл. 1). В Her2-негативных опухолях амплификация не было. Таким образом, амплификация Top2a составила 19% среди Her2-положительных опухолей что укладывается в рамки других исследований. По данным литературы амплификация Top2a встречается в Her2-положительных РМЖ - в 8-37% случаев [2].

После проведения гибридизации *in situ* все случаи в зависимости от статуса Top2a были разделены на две группы: с амплификацией «1» и без амплификации «0». В каждой группе определили уровень экспрессии Top2a, ER, PR, Her2, Ki67, PCNA (табл. 2).

Проведена сравнительная оценка уровня экспрессии каждого белка в двух группах и определена взаимосвязь между статусом гена TOP2A и его экспрессией. В группе "0" Top2a экспрессировался на нормальном уровне в 12 случаях, что составило 13% среди неамплифицированных по гену Top2a случаев РМЖ. В группе "1" во всех случаях была гиперэкспрессия Top2a.

Таблица 2

Результаты ИГХ, FISH/ SISH исследований

Группа	Top2a	ER	PR	Her2	Ki67	PCNA
1, n=10	39,44±13,8	3,5±2,8	2,7±2,2	2,9±0,3	52±19,9	2,25±0,4
0, n=94	18,85 ±16,9	2,9±3,1	1,88±2,8	1,5±1,4	36,9±26,3	2,04±0,5

Для определения характера зависимости амплификации Top2a с экспрессией Top2a (переменная) мы провели следующие расчеты. Проверка по критерию Шапиро-Уилка показала, что для переменной Top2a условие нормальности не выполняется. Поэтому для установления различия групп 0 и 1 был использован непараметрический критерий Манна-Уитни, который не требует указанного условия. Результат: установлено статистически значимое (достоверное) различие между группами (0 и 1) на уровне 0,0005. Таким образом, синтез белка Top2a зависит от количества копий гена Top2a на хромосоме

Выводы:

1. Уровень экспрессии Top2a, характерный для неизменной ткани молочной железы (0-3%), встречается в 11,5% случаев РМЖ и выявлен только в случаях с нормальным статусом гена Top2a. Во всех случаях с амплификацией Top2a мы получили гиперэкспрессию Top2a.

2. При сравнении уровня экспрессии Top2a в подтипах РМЖ получили достоверное различие только между подтипами HR+/Her2- и HR-/ Her2+ (p=0,039).

3. Амплификация гена Top2a выявлена только в Her2-позитивных опухолях РМЖ.

4. Уровень экспрессии Top2a зависит от количества копий гена Top2a на хромосоме (p=0,0005).

Список литературы:

1. Быстрова Е.В. Взаимосвязь экспрессии Top2a и Her2 в клетках карциномы молочной железы (тезисы). Материалы IV Всероссийской конференции по молекулярной онкологии 17–19 декабря 2018 г., Москва. / Е.В. Быстрова, А.А. Бриллиант, С.В. Сазонов, С.М. Демидов // Успехи молекулярной онкологии.- 2018.- Т.5.- №4.- С.124

2. Завалишина Л.Э. Особенности амплификации генов на длинном плече 17-й хромосомы в различных молекулярно-генетических подтипах рака молочной железы / Л.Э. Завалишина, Н.В. Данилова, А.Э. Мационис, И.А. Павленко // Архив патологии. - 2014.- Т. 76.- № 2.- С. 8-12

3. Лаптиев С. А. Молекулярно-генетический «портрет» рака молочной железы. / С. А. Лаптиев, М. А. Корженевская, Е. Н. Имянитов // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. - 2017.- Т. 24.- № 2.- С. 12–22

4. Blum J, Flynn P, Yothers G, et al. 2016 ASCO Annual Meeting. - 2016.- Abstract number 1000.