

*Быстрова Е.В., Новикова Е.А.,  
Сазонов С.В., Леонтьев С.Л.*

**ВЗАИМОСВЯЗЬ АМПЛИФИКАЦИИ  
И ЭКСПРЕССИИ ГЕНА  
ТОПОИЗОМЕРАЗА 2 АЛЬФА  
В МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПОДТИПАХ  
РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Институт медицинских клеточных технологий,  
Екатеринбург, Российская Федерация;  
Уральский государственный медицинский университет,  
Екатеринбург, Российская Федерация

**Резюме.** Фермент Топоизомераза 2 альфа (Top2a) aberrантно экспрессируется во множестве солидных опухолей и играет важную роль в возникновении и развитии опухолевого процесса. В определенной степени уровень экспрессии Top2a отражает уровень пролиферации опухолей. По имеющимся исследованиям не выявлена статистически значимая ассоциация экспрессии Top2a со статусом гена, клиническими параметрами, такими как возраст, пол или опухолевая стадия. По данным литературы при раке молочной железы (PMЖ) aberrации гена Top2a (амплификация/делеция) встречаются до 50% в HER2-положительных опухолях, и в 2,7–8,8% HER2-отрицательных опухолях. Цель: выявить наличие взаимосвязи статуса Top2a с уровнем экспрессии белка и провести сравнительный анализ различных методов гибридизации FISH и SISH с целью определения Top2a-статуса инвазивного долевого PMЖ. Материалы и методы. Мы исследовали операционный материал пациенток с диагнозом инвазивный дольковый рак молочной железы, не получавших неоадьювантную химио- и лучевую терапию. Методом иммуногистохимического окрашивания мы выявили экспрессию ER, PR, Ki-67, HER2 и Top2a. Статус гена HER2 определяли с помощью FISH, статус гена Top2a — параллельно двумя методами FISH и SISH. Результаты. В каждом из подтипов PMЖ мы определяли средний уровень Top2a и сравнивали этот показатель со средним уровнем в выборке (n=691). ER+/HER2- (Ki-67<20%) подтипе среднее значение Top2a было достоверно ниже среднего общего значения. В ER+/HER2- (Ki-67>20%) и ER+/HER2+ подтипах до-

статистически достоверных отличий не обнаружено. Уровень экспрессии Top2a в подтипах ER-/HER2+ и TN достоверно выше на 4,26 и 10,7% соответственно. При проведении методов ISH для оценки статуса гена Top2a в нашем исследовании мы получили полное соответствие результатов FISH и SISH. Амплификация гена Top2a выявлена в 15%. Среднее значение уровня экспрессии Top2a в группе с амплификацией Top2a равно  $41,88 \pm 14,62$ , в группе без амплификации Top2a  $23,59 \pm 18,7$ . В нашем исследовании мы получили статистически значимое различие между уровнем экспрессии Top2a в двух сравниваемых группах. При проведении регрессионного анализа данных мы получили уровень корреляционной связи между экспрессией и статусом гена Top2a равным 0,34, что указывает на наличие средней силы зависимости. Выводы. По результатам анализа получили, что экспрессия Top2a в гормонорецептор-негативных опухолях достоверно выше среднего уровня, а амплификация гена Top2a чаще встречается HER2-позитивных опухолях в независимости от уровня гормональных рецепторов.

**Ключевые слова:** Top2a, рак молочной железы, иммуногистохимия, *in situ* гибридизация

### **Актуальность**

Амплификация гена — это увеличение числа копий ограниченной области хромосомного плеча. Основной причиной амплификации гена под постоянным действием отбора является его повышенная экспрессия, обусловленная увеличением числа копий гена [1, 2]. С другой стороны, изменение количества копий ДНК является только одним из способов изменения экспрессии гена, а экспрессия других онкогенов гораздо менее тесно связана с числом копий ДНК или амплификацией. Другие механизмы регулирования экспрессии могут быть посттранскрипционными, посттрансляционными или включать изменение экспрессии генов на других уровнях. Таким образом, наличие амплификаций гена не всегда приводит к его сверхэкспрессии, но может служить индикатором геномной нестабильности опухолевого процесса, что представляет собой показатель плохого прогноза пациента.

Top2a — ядерный фермент с молекулярной массой 170 кДа. Фермент связываясь с ДНК, образует временный разрыв обеих нитей ДНК что приводит к модификации третичной структуры двойной спирали. Фермент больше экспрессируется в быстро пролиферирующих клетках, а экспрессия ограничена S, G<sub>2</sub>, M-фазами клеточно-

го цикла. По данным литературы Top2a в здоровых тканях экспрессируется на уровне 1–3%, при доброкачественной метаплазии 2–30% и при РМЖ 0–90% [3, 4].

Фермент Top2a аберрантно экспрессируется во множестве солидных опухолей и играет важную роль в возникновении и развитии опухолевого процесса. В определенной степени уровень экспрессии Top2a отражает уровень пролиферации опухолей. Высокая экспрессия Top2a в опухолевой ткани предсказывает неблагоприятный прогноз у некоторых опухолевых пациентов, а также способствует развитию метастазов в лимфатических узлах и отдаленных метастазов при злокачественных опухолях. По имеющимся исследованиям не выявлена статистически значимая ассоциация экспрессии Top2a со статусом гена, клиническими параметрами, такими как возраст, пол или опухолевая стадия [5].

Top2a является молекулярной мишенью для некоторых важных противоопухолевых препаратов, включая антрациклины, которые являются ключевыми химиотерапевтическими агентами в лечении рака молочной железы. Эти препараты создают расщепляемый комплекс, включающий лекарственное средство, фермент и цепь ДНК. Предполагается, что расщепляемый комплекс повреждает ДНК и может индуцировать апоптоз в пролиферирующих опухолевых клетках [6, 7]. Из большинства *in vitro* анализов было показано, что низкие уровни экспрессии Top2a в раковых клетках связаны с лекарственной устойчивостью, тогда как высокие уровни указывают на чувствительность [8]. Однако в ряде исследований не было обнаружено корреляции между уровнем экспрессии Top2a и чувствительностью к лекарственным средствам в клеточных линиях рака молочной железы [9].

Исключая потенциальную роль Top2a в качестве мишени для противоопухолевых препаратов, ряд исследований проанализировало ее как потенциальный прогностический маркер при РМЖ. Имеются данные, что Top2a является потенциальными молекулярным биомаркером злокачественности в гистологически нормальных тканях молочной железы [10].

Ген Top2a человека картирован на длинном плече 17 хромосомы 17q21.2. По данным литературы при РМЖ аберрации Top2a (амплификация/делеция) встречаются до 50% в HER2-положительных опухолях и в 2,7–8,8 % HER2-отрицательных опухолях [11, 12]. Учитывая, что ген Top2a расположен на незначительном удалении от гена HER2, то такая закономерность может указывать, что амплифика-

ция HER2 может быть первичным генетическим событием, связанным с хромосомой 17q в канцерогенезе молочной железы, а изменения Top2a являются вторичными событиями.

Цель: выявить наличие взаимосвязи статуса Top2a с уровнем экспрессии белка и провести сравнительный анализ различных методов гибридизации FISH и SISH с целью определения Top2a-статуса инвазивного долевого РМЖ.

### **Материалы и методы исследования**

Предметом исследования являлся операционный материал пациенток с диагнозом инвазивный дольковый рак молочной железы, не получавших неоадьювантную химио- и лучевую терапию. Материал направлялся для проведения исследования из ГБУЗ СО «Свердловский областной онкологический диспансер». Материал отобранных образцов исследовался гистологическим, иммуногистохимическим, молекулярно-генетическим и статистическим методами. Исследованы 691 случай инвазивного долькового рака молочной железы. Определение экспрессии ER, PR, Ki-67 и Top2a, осуществлялись в автостейнере «Dako» (Дания). Определение экспрессии HER2 на клетках опухоли осуществлялось в автостейнере «Ventana» (США). Оценку реакции осуществляли на световом микроскопе «Zeiss Imager M» (Германия).

Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) применяли для определения статуса гена HER2 и Top2a с использованием наборов HER2 FISH pharm Dx Kit (Dako, Дания) и TOP2a FISH pharm Dx Kit (Dako, Дания). Результаты оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Imager M1 при увеличении 1000. Количественный анализ статуса гена HER2 проводили согласно обновленным рекомендациям ASCO/CAP, 2013 г. В случае оценки статуса Top2a оценивали соотношение красных (Top2a) и зеленых меток (Chr 17) в 60 ядрах опухолевых клеток. Статус гена определяли «без амплификации» при  $0,8 \leq \text{Top2a} / \text{Chr17} \leq 2$ , «с амплификацией» при  $\text{Top2a} / \text{Chr17} > 2$ , либо с делецией при  $\text{Top2a} / \text{Chr17} < 0,8$ .

Усиленная серебром гибридизацию *in situ* SISH проведена в автостейнере Ventana (США) по стандартной методике с использованием наборов Top2a SISH (Ventana). Оценку реакции осуществляли на световом микроскопе «Zeiss Imager M» (Германия). Статус Top2a оценивали соотношение черных (Top2a) и красных меток (Chr 17) в 60 ядрах опухолевых клеток. Статус гена определяли «без амплифи-

кации»  $0,8 \leq \text{Top2a} / \text{Chr17} \leq 2$ , с «с амплификацией»  $\text{Top2a} / \text{Chr17} > 2$ , либо с делецией при  $\text{Top2a} / \text{Chr17} < 0,8$ .

По результатам исследования формировались базы данных с использованием программы Microsoft Office Excel 2010. Статистические исследования выполнены с использованием набора программ описательной статистики и матриц корреляций в программном пакете «Statistica 10.0». Категориальные данные были проанализированы с использованием параметрических и непараметрических методов. Между изучаемыми показателями рассчитывался коэффициент корреляции.

### Результаты и обсуждение

На основании имеющихся данных об экспрессии рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR) и HER2/neu и рекомендаций 14-ой международной конференции по РМЖ (St. Gallen, 2015) все образцы были отнесены к различным молекулярным подтипам РМЖ (таблица 1): гормон-рецептор-позитивный-HER2 негативный (ER+/HER2-) — 55%, гормон-рецептор-позитивный-HER2-позитивный (ER+/HER2+) — 9%, гормон-рецептор-негативный-HER2-позитивный (ER-/HER2+) — 13%, тройной негативный подтип (ТН) — 23%.

Таблица 1

Частота встречаемости молекулярных подтипов в выборке (n=691)  
/)

Характеристика РМЖ		Экспрессия Top2a	
Подтип РМЖ	Значение абс. /отн, %	Среднее значение, %	
ER+ / HER2-	Ki 67<20%	196 / 28	6,74±0,5 T <sub>эмп</sub> = 8,2 p<0,05
	Ki 67≥20%	186 / 27	19,27±1,0 T <sub>эмп</sub> = 1,6 p<0,05
ER+ / HER2+		61 / 9	19,46±2,1 T <sub>эмп</sub> = 1 p<0,05
ER- / HER2+		86 / 13	21,35±1,8 T <sub>эмп</sub> = 2,2 p<0,05
Тройной негативный (ТН)		162 / 23	27,79±1,8 T <sub>эмп</sub> = 6,7 p<0,05
Итого		691 / 100	17,09±0,6 T <sub>кр</sub> = 1,96

Для оценки достоверности различия среднего уровня экспрессии Top2a в опухолях, относящихся к различным молекулярным подтипам РМЖ по сравнению со средним общим значением экспрессии Top2a (17,09%±0,6) использовался Т-критерий Стьюдента. Все полученные результаты собраны в табл. 1. В ER+ / HER2- (Ki-67<20%)

подтипе среднее значение Top2a было достоверно ниже среднего общего значения. В ER+/HER2- ( $Ki-67 \geq 20\%$ ) и ER+/HER2+ подтипах достоверных отличий не обнаружено. Уровень экспрессии Top2a в подтипах ER-/HER2+ и ТН достоверно выше на 4,26% и 10,7% соответственно.

Высокий уровень экспрессии Top2a в подтипе ER-/HER2+ вероятно связан с активацией MAP-киназ, участвующих в процессах транскрипции и пролиферации. Более высокий уровень Top2a в ТН подтипе РМЖ может быть дополнительно обусловлен мутациями гена BRCA1, который при нормальном функционировании индуцирует процессы убиквитинилирования Top2a.

Амплификацию гена (статус) Top2a определили в 54 случаях РМЖ. FISH и SISH выполняли на всех препаратах параллельно с ИГХ-анализом. В нашем исследовании мы получили полное соответствие результатов FISH и SISH, хотя в литературе встречаются данные о незначительном расхождении результатов этих методов [13]. Нужно отметить, что процесс при SISH (от порезки парафиновых блоков до анализа статуса гена) занимает меньше времени, является полностью автоматизированным и, что не менее важно, дает возможность архивировать препараты с проведенным SISH-анализом.

После проведения гибридизации *in situ* все случаи в зависимости от статуса Top2a разделены на две группы: с амплификацией «ISH+» и без амплификации «ISH-». В каждой группе определили распределение по молекулярно-генетическим подтипам РМЖ, уровень экспрессии Top2a. Проведена сравнительная оценка уровня экспрессии белка в двух группах и определена взаимосвязь между статусом гена Top2a и его экспрессией. Результаты ISH-исследований в сравнении с результатами ИГХ-анализа представлены в табл. 2.

Таблица 2  
Результаты ИГХ, FISH/ SISH исследований

Статус Top2a / Results of IHC, FISH / SISH Re- search	Экспрессия Top2a				
	Среднее значение ± стандартное отклонение	ДИ	Медиана	Мода	Мин/ макс
ISH+, n=8	41,88±14,62	[29,7; 54,1]	40	30	25/60
ISH-, n=46	23,59±18,7	[18; 29]	20	10	5/70

Амплификация гена Top2a выявлена в 15% и распределилась по подтипам следующим образом: 1 случай (2%) в ТН РМЖ и 7 случаев (13%) HER2-положительных опухолях ER+/HER2+ — 3 случая, ER-/HER2+ — 4 случая). По данным литературы амплификация Top2a встречается в HER2/neu-положительных РМЖ — в 8–37% случаев [13]; aberrации Top2a (амплификация/делеция) HER2/neu-отрицательных опухолей встречается в 2,7–8,8% [14, 15]. В целом, по полученным данным можем говорить о нормальном распределении уровня экспрессии и статуса Top2a в исследуемой группе.

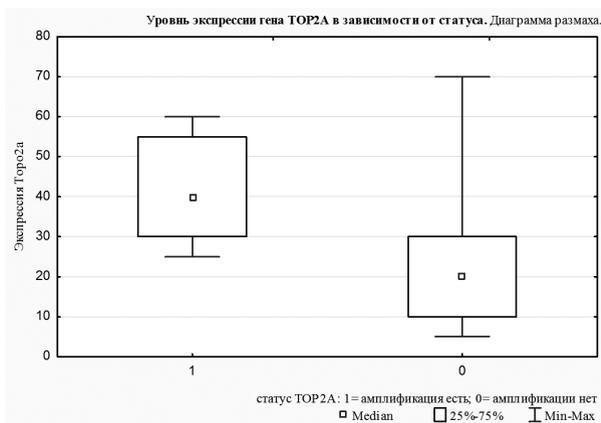


Рисунок 3. Уровень экспрессии гена Top2a в зависимости от статуса

Для проверки гипотезы на нормальное распределение данных (экспрессия Top2a) применяли непараметрические методы. Поскольку выборка имеет объем  $n > 30$  ( $n=54$ ), то в этой ситуации использовали критерий Хи-квадрат Пирсона. Полученное значение критерия  $\chi^2=25$  выше табличного (20,517 при  $p<0,001$ ), что указывает на нормальное распределение. Для проверки характера распределения на нормальность данных в каждой из групп («ISH+»,  $n=8$ ; «ISH-»,  $n=46$ ) использовали критерий Шапиро-Уилка для малых выборок, поскольку этот критерий применим при  $8<n<50$ . На основании полученных данных оказалось, что эмпирические распределения переменных не отличаются от нормального.

С целью выявления зависимости между статусом гена Top2a и его экспрессией мы провели регрессионный анализ данных. Для количественного описания линейной зависимости между исследуемыми по-

казателями рассчитывали коэффициент корреляции. Уровень корреляционной связи между экспрессией гена Top2a и его статусом равен 0,34, что указывает на наличие средней силы зависимости. В нашем исследовании мы получили статистически значимое различие между уровнем экспрессии Top2a в двух сравниваемых группах, подтвержденное U-критерием Манна—Уитни для независимых выборок,  $p < 0,05$  ( $U=67$ ,  $Z=2,83$ ,  $p=0,005$ ), рисунок 3. Однако в литературе встречаются данные, что экспрессия фермента Top2a в большей степени указывает на количество пролиферирующих клеток и не зависит от амплификации гена в данной ткани [12].

### Выводы

1. Уровень экспрессии Top2a достоверно выше среднего общего уровня в гормон-рецептор-негативных подтипах РМЖ и достоверно ниже в ER+/HER- (Ki-67<20%) подтипе РМЖ.
2. Амплификация гена Top2a чаще встречается в HER2-позитивных опухолях РМЖ.
3. Экспрессия Top2a в клетках РМЖ имеет корреляционную связь средней силы в зависимости от статуса гена.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Albertson D.G. Gene amplification in cancer. *Trends. Genet.* 2006; 22 (8): 447–455. doi: 10.1016/j.tig.2006.06.007
2. Gajduskova P., Snijders A.M., Kwek S., et al. Genome position and gene amplification. *Genome Biology.* 2007; 8(6): 120. doi:10.1186/gb-2007-8-6-r120.
3. Nasir A., Chen D.T., Gruidl M., et al. Novel Molecular Markers of Malignancy in Histologically Normal and Benign Breast. *Pathology Research International.* 2011; 2011: 489064. doi:10.4061/2011/489064.
4. Varga Z., Moelans C.B., Zuerrer-Hardi U., et al. Topoisomerase 2A gene amplification in breast cancer. Critical evaluation of different FISH probes. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012; 133(3): 929-35. doi: 10.1007/s10549-011-1873-8.
5. Hou G.X., Liu P., Yang J., Wen S. Mining expression and prognosis of topoisomerase isoforms in non-small-cell lung cancer by using Oncomine and Kaplan–Meier plotter. Franco R, ed. *PLoS ONE.* 2017; 12 (3): 0174515. doi:10.1371/journal.pone.0174515.
6. Ястребов А.П., Гребнев Д.Ю., Маклакова И.Ю. Стволовые клетки, их свойства, источники получения и роль в регенеративной меди-

цине. Екатеринбург, 2016.

7. Kauraniemi P., Barlund M., Monni O., Kallioniemi A. New amplified and highly expressed genes discovered in the ERBB2 amplicon in breast cancer by cDNA microarrays. *Cancer Res.* 2001; 61: 8235–8240.

8. Murthy S.K., Magliocco A.M., Demetrick D.J. Copy number analysis of c-erb-B2 (HER-2/neu) and topoisomerase II $\alpha$  genes in breast carcinoma by quantitative real-time polymerase chain reaction using hybridization probes and fluorescence in situ hybridization. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2005; 129: 39–46.

9. Depowski P.L., Rosenthal S.I., Brien T.P., Stylos S., Johnson R.L., Ross J.S. Topoisomerase II $\alpha$  expression in breast cancer: correlation with outcome variables. *Modern. Pathology.* 2000; 13: 542–47. doi:10.1038/modpathol.3880094.

10. Бриллиант А.А., Сазонов С.В. Изменение рецепторного статуса в группах пролиферативной активности карцином молочной железы. *Вестник Уральской медицинской академической науки* 2013, 1 (43): 61-63.

11. Арутюнян Е.В., Бриллиант А.А., Новикова Е.А., Сазонов С.В. Некоторые закономерности экспрессии иммуногистохимических маркеров на клетках карциномы молочной железы. *Уральский медицинский журнал* 2014, 2(116). 5-8.

12. Usha L., Tabesh B., Morrison L.E., et al. Topoisomerase II alpha gene copy loss has adverse prognostic significance in ERBB2-amplified breast cancer: a retrospective study of paraffin-embedded tumor specimens and medical charts. *Journal of Hematology and Oncology.* 2008;1:12. doi:10.1186/1756-8722-1-12.

13. Завалишина Л.Э., А.А.Рязанцева, Ю.Ю.Андреева, Г.А.Франк. HER2-тестирование методами иммуногистохимии, флуоресцентной (FISH) и хромогенной (SISH) in situ гибридизации при раке желудка и пищеводно-желудочного перехода. *Современная онкология.* 2012; 1: 27-31

14. Hicks D.G., Yoder B.J., Pettay J., et al. The incidence of topoisomerase II-alpha genomic alterations in adenocarcinoma of the breast and their relationship to human epidermal growth factor receptor-2 gene amplification: a fluorescence in situ hybridization study. *Hum. Pathol.* 2005; 36: 348–56. doi: 10.1016/j.humpath.2005.01.016.

15. Bouchalova K., Cizkova M., Cwiertka K., et al. Triple negative breast cancer current status and prospective targeted treatment based on HER1 (EGFR), TOP2A and C-MYC gene assessment. *Biomed Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech Repub.* 2009, 153(1):13–18