

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«УРАЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

НОВИКОВА

Евгения Александровна

**ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА ТОПОИЗОМЕРАЗА– II АЛЬФА В КЛЕТКАХ  
КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,  
профессор С.В. Сазонов

Оренбург - 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ: Аутоуальность исследования.....	4
ГЛАВА 1: ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
Введение .....	11
1.1. Фермент ДНК-топоизомераза- II альфа и его роль в клетке.....	13
1.1.2. Значение экспрессии фермента ДНК топоизомераза II-альфа в клетках карциномы молочной железы.....	19
1.2. Взаимосвязь между амплификацией и экспрессией фермента топоизомераза- II $\alpha$ и рецептора Her2/neu (C-erbB2) в клетках карциномы молочной железы.....	24
1.3. Взаимосвязь пролиферативных процессов в опухолевой ткани и уровня экспрессии белка топоизомераза- II $\alpha$ .....	28
1.4. Взаимосвязь экспрессии топоизомеразы-II $\alpha$ от особенностей статуса рецепторов гормонов в опухолевых клетках .....	30
ГЛАВА 2: МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	34
2.1. Гистологический метод.....	35
2.2. Иммуногистохимические исследования .....	35
2.3. Метод флуоресцентной гибридизации <i>in situ</i> .....	47
2.4. Характеристика исследуемой группы пациенток .....	49
2.5. Статистические методы .....	50
ГЛАВА 3: ОЦЕНКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ФЕРМЕНТА ТОПОИЗОМЕРАЗА-II $\alpha$ В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С РАЗНЫМ РЕЦЕПТОРНЫМ СТАТУСОМ .....	52
3.1. Характеристика экспрессии фермента топоизомераза- II $\alpha$ в норме.....	52
3.2. Результаты изучения экспрессии фермента топоизомераза- II $\alpha$ в клетках инвазивного неспецифического типа рака молочной железы.....	53

3.2.1. Анализ иммуногистохимического окрашивания фермента топоизомераза- $\text{II}\alpha$ в клетках инвазивного неспецифического типа рака молочной железы.....	53
3.3. Анализ уровня экспрессии белка Top-II $\alpha$ в группах опухолей с разным статусом рецепторов к гормонам.....	60
3.3.1. Анализ уровня экспрессии белка Top-II $\alpha$ в группах опухолей с разным ИГХ статусом рецепторов к эстрогену (ER).....	61
3.3.2. Анализ уровня экспрессии белка Top-II $\alpha$ в группах опухолей с разным статусом рецепторов к прогестерону (PR) .....	63
3.3.3. Анализ уровня экспрессии TopII- $\alpha$ в группах инвазивного неспецифического типа РМЖ с коэкспрессией рецепторов к эстрогену и прогестерону .....	66
3.4. Анализ экспрессии белка Top-II $\alpha$ в группах опухолей с разным статусом Her2/neu в клетках карциномы молочной железы.....	70
3.4.2. Результаты исследования зависимости экспрессии Top-II $\alpha$ от амплификации гена HER2 в группе раковых клеток с Her2/neu ИГХ статусом 2+.....	74
3.5. результаты исследования экспрессии белка Top-II $\alpha$ в опухолях с различным уровнем экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67.....	75
3.6. Анализ экспрессии фермента топоизомераза-II $\alpha$ в опухолях с различным рецепторным статусом.....	77
3.7. Анализ клинических показателей по классификации TNM в опухолях, принадлежащих различным молекулярно-биологическим подтипам РМЖ.....	79
3.8. Анализ экспрессии топоизомеразы-II $\alpha$ в опухолях, принадлежащих различным молекулярно-биологическим подтипам РМЖ.....	83
ГЛАВА 4: ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	94
ВЫВОДЫ.....	108
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	112

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

Топоизомеразы в клетках контролируют уровень суперскрученности ДНК, который может изменяться в процессе ее репликации, транскрипции, гомологичной рекомбинации, а также во время перестроек хроматина. ДНК-топоизомеразы II типа функционируют в виде димеров, осуществляя АТФ-зависимое расщепление обеих цепей молекулы ДНК с переносом их через разрыв и последующим лигированием. ДНК-топоизомеразы принимают участие в росте и делении клеток и их уровень увеличивается в 2-3 раза во время фазы G<sub>2</sub> и M (Bower J.J. et al, 2010). Каталитическая активность ДНК-топоизомеразы- II типа в клетках молочной железы осуществляется посредством двух изоформ: 170- кДа топоизомераза- II альфа (Top-II $\alpha$ ) и 180- кДа и топоизомераза- II бета (Wang J.C. et al, 2012; Nakoroulou L. et al., 2000). Изоформы альфа или бета играют важную роль в поддержании динамической структуры хроматина в интерфазу и митотических хромосом. В частности, топоизомераза- II $\alpha$  была обнаружена в качестве главного регулятора клеточного цикла, где ее роль состоит в декатенации хроматина, что является ключевым механизмом, необходимым для осуществления фазы G<sub>2</sub> и M. Кроме того, показано, что Top-II $\alpha$  является необходимым компонентом ДНК-связывающего партнера транскрипции комплекса TCF (T-cell factor) (Zhou Q. et al, 2016; Nitiss J.L. et al, 2009). В ходе ряда исследований выявлена корреляция Top-II $\alpha$  с пролиферативными маркерами такими как, MIB-1, фракцией опухоли S фазы (Jarvinen T.A. et al, 1996; Linch V.J. et al, 1997), Ki-67 (Petit T. et al, 2007), на основании чего был сделан вывод о роли топоизомеразы- II $\alpha$  в качестве пролиферативного маркера (Smith K. et al, 1993; Depowski P.L. et al, 1999; Depowski P.L. et al, Rosenthal S.I. et al, 2000).

Впервые интерес к ядерному ферменту топоизомераза- II $\alpha$  был проявлен Wang J.C. в 1971 году (Wang J.C. et al, 1971) и резко возрос в 1996 году после заключений Jarvinen T.A. о том, что ген Top-II $\alpha$ , расположен в хромосоме 17q12-21

часто коамплифицируется с геном HER2/neu (Jarvien T.A., et al, 1999; Jarvinen T.A., et al, 2000; Jarvinen T.A. et al, 2003; Press M.F. et al, 2010). Последующие работы, включая результаты международных исследовательских групп: Cancer International Research Group 006 Trial; the Danish Breast Cancer Cooperative Group 89-D trial; the Scandinavian Breast Group Trial 9401, имели противоречивые результаты (Coon J.S. et al, 2002; Di Leo A. et al, 2008). Еще в 1996 г. Jarvinen T.A. при изучении 230 случаев рака молочной железы обнаружил, что экспрессия топоизомеразы- II ассоциировалась с высокой пролиферативной активностью опухоли, анеуплоидией и гиперэкспрессией HER2/neu (Jarvinen T.A. et al, 1996).

Ориентация на Top-IIα опосредованное ДНК- расщепление и клеточную пролиферацию было привлекательным подходом в терапии рака молочной железы (Hande K.R. et al, 2008). Считается, что только уровень Top-IIα является основным фактором, определяющим клеточную чувствительность к нацеливанию химиопрепаратов на этот фермент, так как изоформа Top-IIβ не претерпевает существенных изменений во время клеточного цикла (Nitiss J.L. et al, 2009).

Исследования *in vitro* и *in vivo*, показали, что чувствительность к ингибиторам Top-IIα зависит от уровня ее экспрессии в раковых клетках-мишенях (Linch B.J. et al, 1997; Holland R. et al, 1994; Leo D. A. et al, 2001; Arpmo G. et al, 2005; Coon J.S., et al, 2002; Di Leo et al, 2002; Mac Grogan et al, 2003; Park et al, 2003; Knoop et al, 2005; Tanner M. et al, 2006; Martin-Richard M., 2004; Bhargava R. et al, 2005). Так, антрациклины ингибируют Top-IIα в ходе репликации ДНК, образуя нестойкие комплексы, включающие в себя препарат, Top-IIα и нить ДНК, активируя действие токсинов, а также запускают процесс апоптоза в пролиферирующих опухолевых клетках (Asano T. et al, 1996; Davis P.L. et al, 1988; Castaneda C.A. et al, 2009; Glynn et al, 2010; Pommier et al, 2010; Durbecq V. et al, 2004). Было доказано, что при амплификации гена Top-IIα наблюдается высокая чувствительность опухолевых клеток к антрациклинам (Tanner M. et al, 2006), а делеция гена Top-IIα сопровождается резистентностью (Harns L. et al, 1998, Harns L.N. et al, 2001; Schgindback C. et al, 2010; Du Y., et al, 2011).

Экспрессия Top-II $\alpha$  зависит от множества уровней регуляции: количества копий гена и контроля их экспрессии, посттрансляционных модификаций, взаимодействия партнерских белков и циклов обратной связи (Tao Chen et al, 2015). Всесторонняя оценка экспрессии топоизомеразы- II $\alpha$  в различных молекулярно-биологических подтипах будет способствовать лучшему пониманию гетерогенности и сложности молекулярной биологии рака молочной железы. В связи с этим, изучение особенностей экспрессии Top-II $\alpha$  в клетках карциномы молочной железы с различным рецепторным статусом является актуальной научной задачей.

### **Цель исследования:**

Изучить уровень экспрессии фермента топоизомеразы- II $\alpha$  в опухолевых клетках карциномы молочной железы с различным рецепторным статусом.

### **Задачи исследования:**

1. Определить уровень экспрессии фермента топоизомеразы - II $\alpha$  в опухолевых клетках карциномы молочной железы.
2. Выяснить взаимосвязь экспрессии фермента топоизомеразы- II $\alpha$  с особенностями статуса рецепторов к эстрогену (ER) и прогестерону (PR) в опухолевых клетках.
3. Выявить взаимосвязи между амплификацией и экспрессией HER2(ErbB2) и Top-II $\alpha$  в клетках карциномы молочной железы.
4. Установить степень взаимосвязи экспрессии фермента топоизомеразы- II $\alpha$  с уровнем пролиферативных процессов в опухолевой ткани.
5. Оценить экспрессию фермента топоизомеразы- II $\alpha$  при разном рецепторном статусе опухолевых клеток в молекулярно-биологических подтипах карциномы молочной железы.

## **Основные положения, выносимые на защиту**

1. В клетках инвазивного неспецифического типа рака молочной железы наблюдается увеличение уровня экспрессии фермента топоизомеразы- $\alpha$ .
2. При развитии опухоли молочной железы отмечается коэкспрессия ядерного фермента топоизомеразы- $\alpha$  и мембранного рецептора HER2/neu.
3. В опухолевых клетках молочной железы экспрессия фермента топоизомеразы – $\alpha$  имеет прямую зависимость от экспрессии ядерного белка Ki-67- маркера клеточной пролиферации.
4. В гормон-рецептор-негативных опухолях, а также в опухолях с гиперэкспрессией HER2/neu уровень экспрессии Топ- $\alpha$  выше общего среднего уровня, а в гормон-рецептор-позитивных опухолях уровень экспрессии Топ- $\alpha$  напрямую зависит от экспрессии ядерного белка Ki-67.

## **Научная новизна**

Впервые проведено молекулярно-биологическое исследование экспрессии ядерного фермента топоизомеразы- $\alpha$  при разном рецепторном статусе клеток опухоли на модели молекулярно-биологических подтипов инвазивного неспецифического типа рака молочной железы. Выявлен ряд особенностей экспрессии Топ- $\alpha$  при раке молочной железы. Так, при развитии опухоли гиперэкспрессия мембранного рецептора HER2/neu (ErbB2) сопровождается усилением пролиферации опухолевых клеток и повышением уровня экспрессии Топ- $\alpha$ . Обнаружено, что в гормон-рецептор-негативных опухолях экспрессия Топ- $\alpha$  усиливается независимо от статуса HER2/neu, а в гормон-рецептор-позитивных - уровень экспрессии Топ- $\alpha$  напрямую зависит от экспрессии ядерного белка Ki-67, подтверждая независимость механизмов экспрессии Топ- $\alpha$  от экспрессии рецепторов к эстрогену и прогестерону.

## **Научно-практическая значимость работы**

Выявленные особенности экспрессии Top-II $\alpha$  в зависимости от рецепторного статуса раковых клеток молочной железы могут быть использованы для более полного понимания внутриклеточных механизмов регуляции при развитии опухолевого роста. Результаты диссертационной работы могут использоваться в учебном процессе вузов медико-биологического профиля при изучении дисциплин гистология, цитология и онкология.

## **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов в ходе исследования была обеспечена с помощью подбора адекватных гистологических, иммуногистохимических, морфологических, молекулярно-генетических (FISH) методов и последующей статистической обработки результатов исследования 766 случаев инвазивного неспецифического типа рака молочной железы. Основные научные положения, выводы и результаты доложены и обсуждены на 67-й всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Current issues of modern medicine and health care» (Екатеринбург, 2012), Всероссийской научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «морфология человека в норме и при патологии» (Уфа, 2012), Международном Молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения» (Санкт-Петербург, 2013), 68-й всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием (Екатеринбург, 2014), II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные подходы к морфологической диагностике новообразований человека» (Челябинск, 2016), 69-й всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием (Екатеринбург, 2016), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 120-летней годовщине со дня рождения

профессора Б.М. Соколова, (Рязань, 2016), Международной (72 всероссийской) научно-практической конференции молодых учёных и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения», посвященная 80-летию студенческого научного общества Уральского государственного медицинского университета, (Екатеринбург, 2017).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликована 22 научная работа, из них 9- в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов докторских и кандидатских диссертаций.

### **Личный вклад автора в проведенное исследование**

Автором произведен отбор материала, проведение ИГХ исследования на автостейнере, оценка ИГХ- реакции, обработка полученных данных, сведение в таблицы первичных данных, статистическая обработка и анализ полученных результатов, установление закономерностей и связей экспрессии Top-Па и других характеристик РМЖ, написание научных статей, доклад результатов на научных конференциях, оформление диссертационной работы.

### **Реализация результатов исследования**

Теоретические положения и выводы работы используются при выполнении научно-исследовательских работ студентов на кафедрах гистологии, цитологии и эмбриологии и онкологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Получено положительное решение рассмотрения заявки на промышленный образец (патент) «Схема распределения уровня экспрессии фермента топоизомеразы 2 альфа при

различном рецепторном статусе рака молочной железы» № 104 от 06.07.2017 (регистрационный № 201702829).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, глав с описанием материала и методов исследования, результатов собственных исследований, их обсуждения, выводов, списка литературы. Работа содержит 32 таблицы и 50 рисунков. Список литературы содержит 225 источника, включая 52 отечественные и 173 зарубежные работы.

## ГЛАВА 1

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### Введение

Достижения последних лет в области молекулярной биологии позволили выявить многие особенности фенотипа, механизмы канцерогенеза карциномы молочной железы: индукцию опухолью сигналов роста, высокий уровень репликационного потенциала, резистентность к рост-ингибиторным сигналам, уклонение от апоптоза, ангиогенез, тканевую инвазию и метастазирование. Описано более ста факторов прогноза, дающих представление о биологическом поведении опухоли (Боженко В.К. и соавт., 2011; Именитов Е.Н. и др., 2010).

ДНК-топоизомераза II типа является жизненно важным ферментом любого эукариотического организма, который локализован в ядре и в больших количествах ассоциируется с ДНК как в интерфазных так и митотических ядрах. ДНК-топоизомераза II - единственный известный фермент эукариот, способный разъединить двунитевую молекулу ДНК (Osheroff E. et al, 1991). Топоизомеразы контролируют в клетках уровень суперскрученности ДНК, который может изменяться в процессе ее репликации, транскрипции, гомологичной рекомбинации, а также при хроматидной сегрегации в клетках млекопитающих. Ассоциация ДНК-топоизомеразы II с участками хроматина, где активна транскрипция указывает на ее возможную роль в регуляции экспрессии генов (Sandri M.I. et al, 1996).

В клетках млекопитающих есть два вида ДНК-топоизомеразы- II; 170 кДа (-альфа) и 180 кДа (-бета) белки, кодируемые генами 17 и 3 хромосомы соответственно (Woessner R.D. et al, 1991; Wang J.C. et al, 1996; Nakopoulou L. et al, 2000). Изоформы -альфа или -бета играют важную роль в поддержании динамической структуры хроматина в интерфазу и митотических хромосом. ДНК-топоизомераза- II альфа (Тор-II $\alpha$ )- это ядерный фермент, который обладает 2-мя функциями: 1-я функция – она обеспечивает проверку целостности ДНК путем отрицательного ее суперскручивания. Если в ДНК имеется хоть один разрыв, то

суперскручивание не будет происходить; 2-я функция – прямо противоположная – Top-II $\alpha$  делает в ДНК двухцепочечный разрыв и, перемещая часть запутанной ДНК через разрыв, расплетает петли ДНК (декатенация) (Чиссов В.И., Старинский В.В., 2002). Также Top-II $\alpha$  имеет важное значение при сегрегации сестринских хроматид на метафазно-анафазном переходе, где ее роль состоит в декатенации хроматина, что является ключевым механизмом, необходимым для прогрессирования фазы G<sub>2</sub> и M, поэтому это клеточный цикл-зависимый белок, который максимально экспрессируется в G<sub>2</sub> и M фазах клеточного цикла (Deming P.V. et al, 2001). Также Top-II $\alpha$  является необходимым компонентом ДНК-связывающего партнера транскрипции комплекса TCF (T-cell factor) (Zhou Q. et al, 2016).

Tsai и др. сообщили, что два фермента деацетилирования гистонов (HDAC1 и HDAC2), были связаны с Top-II $\alpha$  *in vivo* при нормальных физиологических условиях. Top-II $\alpha$  и Top-II $\beta$  являются субстратами для ферментов HDAC1 и HDAC2, а их комплексы, могут увеличивать активность Top-II $\alpha$ , облегчая модификацию хроматина путем нацеливания субъединицы Top-II $\alpha$  на регионы хроматина, которые активно подвергаются деацетилированию гистонов (Tsai S.C. et al, 2000).

Top-II $\alpha$  может участвовать в нелигитимной рекомбинации - это перегруппировка ДНК, которая происходит между сегментами нуклеиновых кислот, которые имеют малые гомологичные области (менее 10 пар нуклеотидов) или без видимой гомологии (Ikeda H. et al, 2004).

Из-за близкого расположения генов Top-II $\alpha$  и HER2/neu на хромосоме 17q12-21, гиперэкспрессия гена HER2/neu часто влечет усиление экспрессии гена Top-II $\alpha$  (Faratian D. et al, 2008). Амплификация и гиперэкспрессия гена Top-II $\alpha$  являются неблагоприятными прогностическими факторами для пациентов с ER-положительными опухолями молочной железы и показателем благоприятного прогноза при HER2/neu - положительных случаях (Семиглазов В.Ф. и др., 1992). Данные в отношении прогностической роли Top-II $\alpha$  не являются окончательными, так как некоторые из подходов фокусировались на определении белка Top-II $\alpha$ ,

другие, рассчитывали число копий гена Top-II $\alpha$  (Linch B.J. et al, 1997; Nakopulou L. et al, 2000).

### **1.1. ДНК-топоизомераза- II альфа и ее роль в клетке**

Топоизомеразы были открыты в 1971 году, эти ферменты необходимы для регуляции топологии ДНК в том числе суперспирализации/ релаксации, завязывания / развязывания, катенации/ декатенации. Современные представления о строении геномной ДНК позволяют заключить, что любые клеточные процессы, связанные с разделением комплементарных цепей ДНК вызывают в молекулах ДНК ее различного рода структурные изменения, включая сверхспирализацию (Zhou Q. et al, 2016).

Сверхспирализация стимулирует начальную стадию генетической рекомбинации и необходима для процессов нормального деления клеток, репликации хромосомной ДНК, а также влияет на индуцированный мутагенез. Особенно чувствительны процессы инициации репликации и транскрипции, а также дифференциальная регуляция транскрипции различных генов, поскольку сверхспирализация ДНК приводит к тому, что некоторые участки становятся доступными для связывания с определенными белками (Wang, J.C. et al, 1996; Champroux J.J. et al, 2001).

В отличие от топоизомераз I типа, ферменты II типа производят временный двухцепочечный разрыв, гидролизуя АТФ; они протягивают один участок двухцепочечной ДНК через другой. Данные ферменты также можно разделить на релаксирующие топоизомеразы и топоизомеразы, способные катализировать образование топологически напряженной формы ДНК. Совместное действие двух данных типов ферментов и их клеточная регуляция обеспечивает поддержание нужного уровня топологического состояния генома, необходимого для проявления активности различных ферментов, взаимодействующих с ДНК (Champroux J.J. et al, 2001).

Топоизомеразы II делятся на два класса по структурным и эволюционным принципам. Ферменты типа топоизомеразы- Пальфа повсеместно распространены у эубактерий и эукариотов и включают в себя бактериальные ДНК-гиразу и Top-IV (Aravind L., et al, 1998; Nichols M.D., et al, 1999), а также эукариотическую топоизомеразу-II $\alpha$ . Топоизомеразы- II $\beta$  – это дальние родственники по некоторым доменам с Top-IIAs, которые находятся в археях, растениях и нескольких бактериях (Andrew D. Bates et al, 2011; Gadelle D. et al, 2003; Forterre P. et al, 2009) (рисунок 1.2.1).

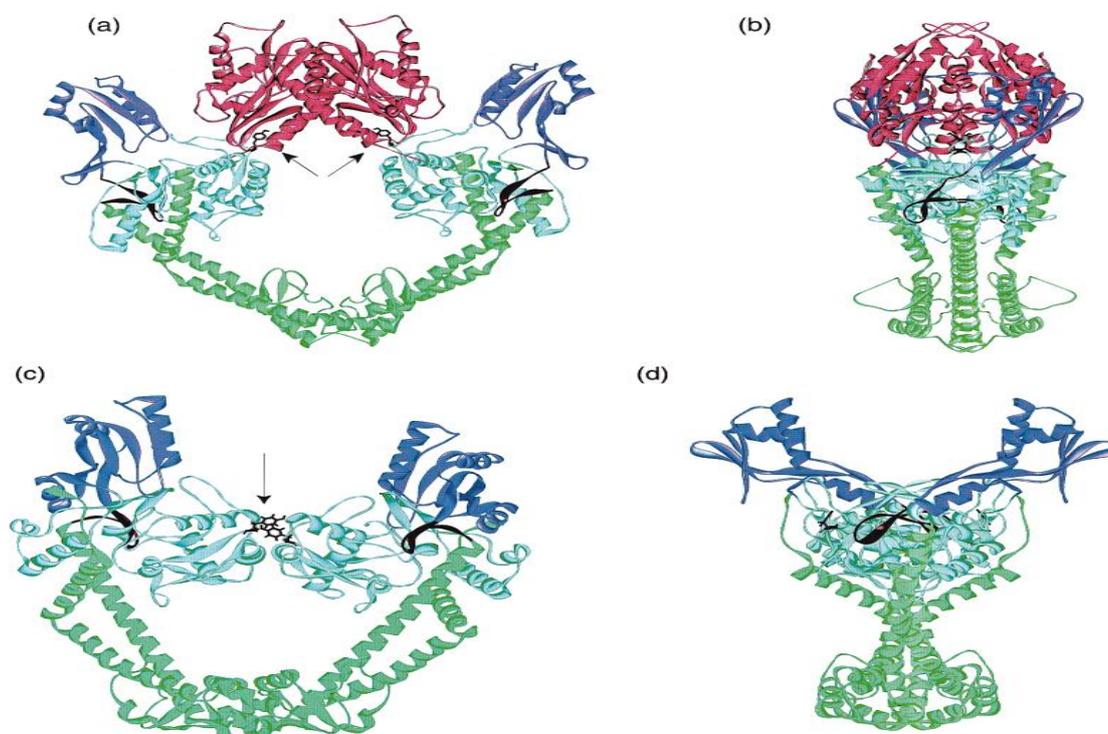


Рисунок 1.2.1. Кристаллографически детерминированные фрагменты ДНК-топоизомеразы- II $\alpha$ , представленные в двух перпендикулярных ракурсах (рис. а и b); гиразы А (рис. с и d). Домен В обозначен красным (1-й группе, остатки 420-633). Домен А делится на четыре части: 2-я группа обозначена голубым (остатки 683-873), 3-я группа обозначена фиолетовым (остатки 874-972), 4-я группа обозначена коричневым (остатки 973-990), 5-я группа обозначена зеленым (остатки 991-1178). Использованные цифры из базы Protein Data Bank (PDB) (Jernigan R.L., Dermirel M.C., Bahar I., 1999)

У человека топоизомеразы I и II типа подразделяются на три подсемейства: I A (Top-3 $\alpha$ ; Top-3 $\beta$ ); I B (Top- I и Top- MT), II A (Top-II $\alpha$ ; Top- II $\beta$ ) во время репликации ДНК и транскрипции, топоизомеразы I A типа могут релаксировать только отрицательную сверхспирализацию ДНК, топоизомеразы II A могут ослаблять не только отрицательную, но и положительную сверхспирализацию (Wang J.C., 2009). Каждая топоизомераза имеет свою уникальную биологическую функцию в топологии ДНК (Xu Y., Her C., 2015).

ДНК- топоизомеразы ферменты, способные расщиплять однонитевые (I-тип) или двунитевые ДНК (II- тип) и помогают прохождению второй нити ДНК через разрыв между участком расщипленной двуцепочечной молекулы ДНК. Эти три этапа: расщипление, открытие разрыва и перенос второго сегмента ДНК сменяются лигированием разорванного участка ДНК, где фермент служит в качестве «моста», который соединяет транзистентным ковалентным 5'- концом и нековалентным связыванием 3'- гидроксильным концом (Jernigan R.L. et al, 1999). Оба класса топоизомераз II типа взаимодействуют с двумя сегментами ДНК. Сегмент G (или 'Gate') вначале связывается с ферментом и сильно сгибается им (на 150°) (Dong K.C. et al, 2007; Vologodskii A.V. et al, 2001). Каждая цепочка ДНК затем расщепляется одним из пары тирозинов на участках в 4 нуклеотида друг от друга, образуя два ковалентных промежуточных продуктов 5'- фосфотирозина (Sander M. Et al, 1983) (рисунок 1.2.2. А).

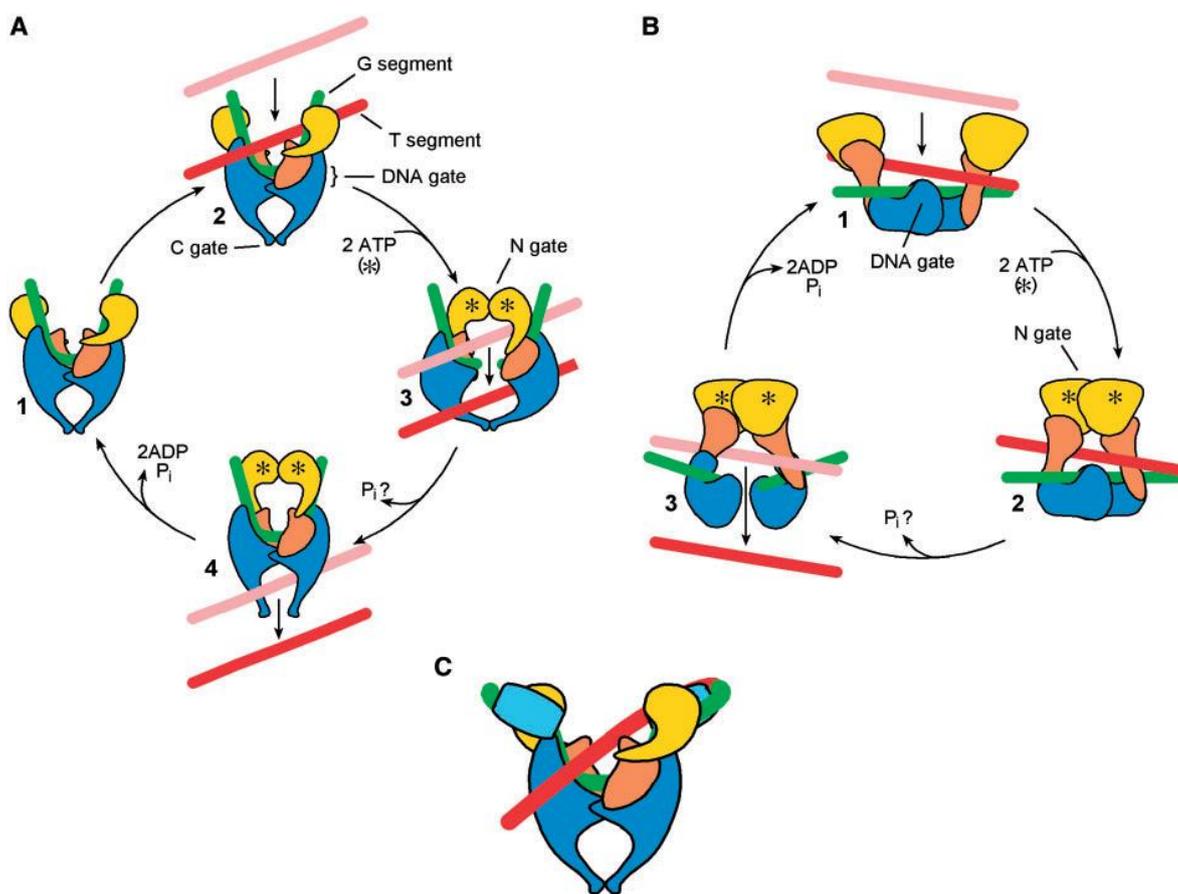


Рисунок 1.2.2. Структура и механизм топоизомеразы типа II. (А) Основной механизм Торо IIА. Указаны различные домены белка: желтый, домен АТФазы (N-концевая В-субъединица в прокариотических ферментах); оранжевый, С-концевая В-субъединица (или гомологичная область в гомодимерных эукариотических ферментах); синий, N-концевой А-белковый домен обрыва-воссоединения (или гомолог). Домен С-концевого А-белка не показан. Указаны G-сегмент (зеленый), Т-сегмент (красный / розовый) и ДНК, N- и С-ворота. Движение Т-сегмента показано от розовой до красной позиции. (В) Механизм IIВ-типа (Торо VI). (С) Структура ДНК-гиразы (Sander M. Et al, 1983)

Почти для всех реакций, катализируемых топоизомеразами типа II, необходим сопряженный гидролиз АТФ. Именно он делает возможной реакцию сверхспирализации кольцевой замкнутой ДНК, при которой происходит увеличение ее свободной энергии (Stuart-Harris R., et al, 2008; Yerushalmi R., et al, 2010). Связывание АТФ с каждым мономером приводит к димеризации N-

концевых доменов для формирования нового белок-белкового взаимодействия (названного N-воротом) путем приближения второй ДНК (Т- или "Transported"-сегмента), который проходит через G-сегмент; этот процесс требует не только расхождения ДНК, но и разделения ДНК, что заканчивается разрушением существующего белкового интерфейса димера (G- ворота ДНК). Т-сегмент затем выходит из комплекса через третий интерфейс белка (С- или выходные ворота), пройдя через G-сегмент и по всему интерфейсу димера этого фермента. Гидролиз АТФ и высвобождение продукта позволяет N-воротам открыться и сбрасывает фермент для дальнейших этапов реакции (Baird C.L. et al, 2001). Специфическая реакция осуществляется топоизомеразой II типа в зависимости от топологических отношений между G- и Т-сегментами. Внутримолекулярный проход нити (G- и Т-сегменты на той же кольцевой молекуле) приводит либо к суперспирализации/релаксации с изменением числа сцеплений на  $\pm 2$ , либо к реакции связывания/распутывания. Если G- и Т- сегменты находятся на отдельных молекулах, результатом будет катенация или декатенация (Bates A.D. et al, 2011) (рисунок 1.2.2.).

С помощью специфических антител выяснена важная роль ДНК-топоизомеразы- II $\alpha$  в формировании высших уровней структуры хроматина, показано, что молекулы фермента располагаются преимущественно вдоль центральной продольной оси обоих плеч хромосом. Такое аксиальное распределение топоизомеразы- II $\alpha$  в хромосомах наблюдается даже после удаления из них большей части гистонов в результате многократных солевых экстракций. Специфическая локализация этого фермента в хромосомах очень показательна в свете петельно-доменных особенностей организации хроматина в ядрах. Топоизомераза- II $\alpha$  находится в виде гомодимера в основании петель, взаимодействуя с MAR/SAR-последовательностями ДНК. Хотя топоизомераза- II $\alpha$  не обнаруживает строгой специфичности в отношении расщепляемых последовательностей нуклеотидов, на выбор сайтов большое влияние оказывают структурные компоненты хроматина. *In vivo* показано, что существуют два класса сайтов, по которым происходит расщепление ДНК этим ферментом: одни из них

локализованы в активно транскрибируемых участках хроматина, гиперчувствительных к действию нуклеаз, а другие - непосредственно в MAR/SAR- последовательностях (Brown P.O. et al, 1979). Кроме релаксации суперскрученных молекул ДНК Топ-II $\alpha$  может осуществлять образование или развязывание узлов, а также образование или разделение катенанов (кольцевых замкнутых ДНК, сцепленных друг с другом). Реакции развязывания узлов и разделения катенанов являются прерогативой ДНК-топоизомераз II типа и не выполняются топоизомеразами I типа (Brown P.O. et al, 1979; Liu L.F. et al, 1980).

На рисунке изображен АТФ - зависимый механизм переноса обеих нитей ДНК с последующим переносом цепей через двухцепочечный разрыв и его лигированием (рисунок 1.2.3.).

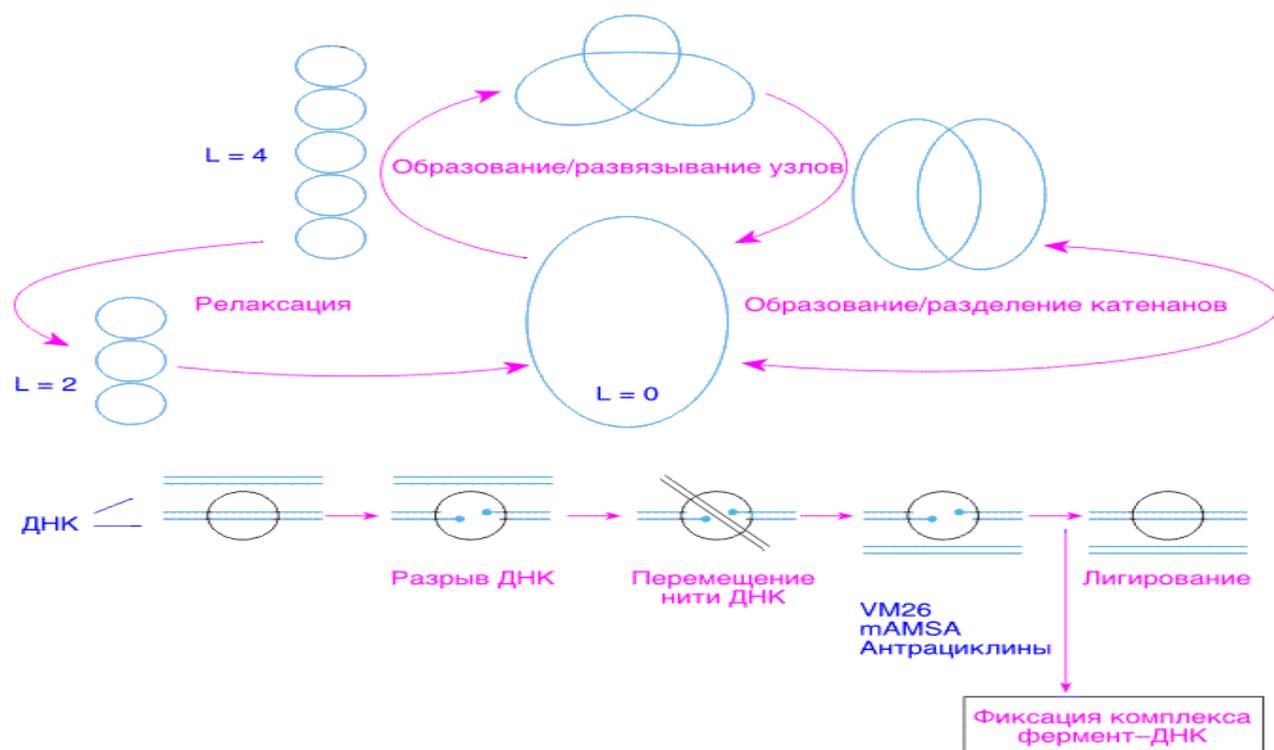


Рисунок 1.2.3. Основные этапы каталитического цикла топоизомеразы- II альфа: точками отмечены места ковалентного присоединения фермента к 5'-концам ДНК в двухцепочечных разрывах. VM26, mAMSA, антрациклины - ингибиторы топоизомеразы- II $\alpha$ , фиксирующие ковалентный комплекс фермент- ДНК и предотвращающие лигирование двухцепочечного разрыва; L - число зацеплений ДНК в суперскрученной молекуле (Brown P.O. et al, 1979)

Во время репликации двунитевые молекулы ДНК сестринских хроматид неизбежно сцепляются. Это сцепление должно быть разрушено при подготовке к анафазному разделению хроматид (Cook P.R. et al, 1991). Но для последней стадии клеточного деления деятельность топоизомеразы-II $\alpha$  (Top-II $\alpha$ ) не нужна, при отсутствии сегрегации хроматид цитокинез не прекращается (Sandri M.I. et al, 1996). Повреждения ДНК действуют, задерживая Top-II $\alpha$  в переходном состоянии, когда она ковалентно связана с ДНК на участках двойных разрывов. Это предотвращает посредничество Top-II $\alpha$  в повторном лигировании реакции, которая является последним шагом декатенации и в конечном счете приводит к двойным разрывам нитей ДНК, что замедляет G<sub>2</sub> фазу и может объяснять задержки клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК что, в конечном счете, ведет к апоптозу опухолевой клетки (Durbecq V. et al, 2004; Knoop et al, 2005; Oakman C. et al, 2009; Pommier et al, 2010).

### **1.1.2. Значение экспрессии фермента ДНК топоизомеразы II-альфа в клетках карциномы молочной железы**

По данным ВОЗ, рак молочной железы (РМЖ) второе по частоте после рака лёгких онкологическое заболевание в популяции (Давыдов М.И., Ганцев Ш.Х., 2010; Engstrom M.J. et al, 2014). Определение молекулярно-биологических подтипов опухоли может дать дополнительную информацию о скорости ее роста, способности к метастазированию, чувствительности или устойчивости к химиотерапии (Пожарисский К.М., Лееман Е.Е., 2000; Аничков Н.М., Зиновьев А., 1993; Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е., 2002; Кушлинский Н.Е., Немцова М.В., 2014; Петров С.В. и др., 2004; Берштейн Л.М., Семиглазов В.Ф. и др., 2011; Семиглазов В.Ф. и др., 2013; Семиглазов В.Ф. и др., 2015; Cheang M. et al, 2009; Runnak M.A. et al, 2012; Гуревич Л.Е., 2012).

В карциноме молочной железы ДНК топоизомеразы-II $\alpha$  имеет гораздо более широкую роль, чем только пролиферативный маркер (Чиссов В.И., Старинский

В.В., 2002). Экспрессия, мутации гена и ферментативная активность Top-II $\alpha$  изучались в нескольких типах злокачественных новообразований. При первичной инвазивной карциноме яичников и молочной железы наблюдалось увеличение экспрессии Top-II $\alpha$ , как белка, так и м-РНК на поздних стадиях заболевания (Jarvinen T. et al, 2000; Penauit- Lorca E. et al, 2003; Du Y. et al, 2011; Schindbacke C. et al, 2010). Также повышенная экспрессия Top-II $\alpha$  была обнаружена при карциноме носоглотки, раке пищевода, раке легкого, раке желчного пузыря, гепатоцеллюлярном раке и колоректальном раке и ассоциировалась с агрессивным фенотипом опухоли, прогрессирующей стадией заболевания и снижением общей выживаемости (Mueller R.E. et al, 2004; Hou G.X., et al, 2017).

Top-II $\alpha$  предпочтительно экспрессируется в более агрессивных молекулярно-биологических подтипах РМЖ, с гиперэкспрессией рецептора HER2/neu поэтому является кандидатом в маркеры клеточной пролиферации и плохого прогноза при РМЖ (Campiglio M. et al, 2003).

Уровень экспрессии Top-II $\alpha$  контролируется его промоторной областью. Активность промотора Top-II $\alpha$  регулируется различными внешними раздражителями, включая стадии клеточного цикла и белком-супрессором опухоли p53. Экспериментальные исследования с использованием клеточных линий показали, что экспрессия Top-II $\alpha$  негативно регулируется p53 «дикого типа» через его промоторную область (Sandri M.I. et al, 1996; Wang Q. et al, 1997). Кроме того, Liu и соавт. сообщили, что экспрессия гена Top-II $\alpha$  регулируется статусом гена p53 и что несколько мутаций p53 нарушают подавление экспрессии гена Top-II $\alpha$  (Liu D. et al, 2002), поэтому раковые клетки с мутацией гена p53 имеют повышенный уровень Top-II $\alpha$  (Кит О.И. и соавт., 2014). Эта регуляция была объяснена как следствие p53, препятствующего связыванию NF- $\Upsilon$  (ядерный фактор транскрипции) с регуляторными последовательностями промотора гена Top-II $\alpha$ , снижение рекрутирования регуляторных областей гена NF- $\Upsilon$  в промоторе Top-II $\alpha$  уменьшает его транскрипцию (Belluti S. et al, 2013; Stros M. et al, 2009).

Посттрансляционная модификация, включая фосфорилирование, убиквитинирование и небольшие убиквитин- подобные модификаторы (SUMO-

илирование), может изменять белковую активность, стабильность или локализацию Top-II $\alpha$  (Watt P.M. et al, 1994). Фосфорилирование является ключевым механизмом, который регулирует функцию Top-II $\alpha$ . Было показано, что казеинкиназа- II $\beta$ , протеинкиназа C и связанная с внеклеточным сигналом киназа-2 фосфорилируют Top-II $\alpha$  и усиливают ее активность (Redwood C. et al, 1998; Shapiro P.S. et al, 1999).

Из взаимодействующих с Top-II $\alpha$  партнеров ген BRCA1 расположенный на хромосоме 17q21.31, при низкой своей экспрессии увеличивает скорость роста доброкачественной и злокачественной ткани молочной железы. BRCA1 играет ключевую роль в поддержании стабильности хромосом, которая участвует в Top-II $\alpha$ -зависимой декатентации ДНК. BRCA1 может регулировать декатентацию ДНК посредством убиквитинирования Top-II $\alpha$  (Thompson M.E. et al, 1995), образуя комплекс, который включает BRCA1 и pRb (retinoblastoma protein—белок супрессора опухоли) для деградации Top-II $\alpha$  (Shinagawa H. et al, 2008). Lou X. и соавт. сообщили, что в отсутствии BRCA1 активность декатенации хроматина была только на одну треть, и это способствовало дефекту сегрегации хромосом в митозе (Luo X. et al, 2000). Еще в 1996 г. Jarvinen при изучении 230 случаев РМЖ обнаружил, что экспрессия топоизомеразы- II $\alpha$  ассоциировалась с высокой пролиферативной активностью опухоли (S-фракцией), низким содержанием гормональных рецепторов, анеуплоидией и гиперэкспрессией Her2/neu. Экспрессия Top-II $\alpha$  также коррелирует со статусом EGFR, p53, Ki-67, что указывает на взаимодействия между этими показателями, регулирующими прогрессирование онкогенеза и метастазирование РМЖ (Urruticoechea A. et al, 2005; Nikolenyi A. et al, 2011). Ряд исследований показали, что уровень экспрессии Top-II $\alpha$  изменяется в зависимости от фазы клеточного цикла, тем самым указывая на количество пролиферирующих клеток, а не статус ядерного уровня экспрессии Top-II $\alpha$  в данной ткани (Копнин Б.П., и др., 2009; Hicks D.G. et al, 2005). Также экспрессия белка Top-II $\alpha$ , связана с более высоким гистопатологическим уровнем опухоли (Rody T. et al, 2009; Mueller R.E. et al, 2004; Fritz P. et al, 2005). Поэтому

уровень экспрессии Top-Па может отражать пролиферативный и метастатический статус опухоли.

Ряд авторов предполагают, что биологическое поведение опухоли ассоциировано не с уровнем экспрессии белка Top-Па, а с амплификацией его гена. Так, делеция гена Top-Па не была связана со снижением экспрессии белка, что может быть связано с другим генетическим нарушением, наиболее вероятно вовлечение соседнего гена (Usha L. et al, 2008).

Ген топоизомеразы- Па, расположен в локусе хромосомы 17q12-17q21 и амплифицируется в значительном числе случаев рака молочной железы (Rybencov V.V. et al, 1997). В исследовании Meng H. (2012) все образцы РМЖ с полисомией 17 хромосомы, где имелись aberrации гена Top-Па, демонстрировали уровень экспрессии белка Top-Па в пределах 5- 60%, из них все случаи с амплификацией гена показали уровень экспрессии Top-Па выше 20%. Все образцы с моносомией 17 хромосомы продемонстрировали уровень экспрессии белка 2- 50%, и так же среди всех случаев с амплификацией гена Top-Па наблюдался уровень экспрессии белка >20% (Meng H. et al, 2012). Этот результат может быть ответом на гипотезу, что aberrантной может быть только одна из двух аллелей и что аллель дикого типа могла бы дать компенсацию в условиях, требующих высокого уровня активности Top-Па (Goswami P.C. et al, 2000; Tanner M. et al, 2006; Abramson J. et al, 2010).

Rohit Bhargava и соавт. сделали вывод о том, что амплификация гена топоизомеразы- Па только в 72% случаев вызывает гиперэкспрессию Top-Па (Bhargava R. et al, 2000; Beiyun Chen et al, 2005), тогда как гиперэкспрессия возможна и без амплификации гена (Zhu Li et al, 2000).

Так как Top-Па является белком- регулятором клеточного цикла возможная причина несоответствия между амплификацией и гиперэкспрессией может быть связана со скоростью клеточной пролиферации (Nesck M.M. et al, 1988; Noklen I.A. et al, 1997). Уровень белка колеблется обычно в течение клеточного цикла без увеличения копий гена. Гиперэкспрессия белка Top-Па была выявлена в 18 (72%) из 25 опухолей с амплификацией гена Top-Па. Из 25 опухолей в 7 (28%) не

обнаружена гиперэкспрессия Top-II $\alpha$  несмотря на амплификацию гена. В противоположность этому, из 79 опухолей, в которых ген Top-II $\alpha$  не был амплифицирован, 76 (96%) не имели гиперэкспрессии белка, только 4% имели гиперэкспрессию белка и все эти опухоли были высоко пролиферативны с обилием митозов (>30 митозов на 10 участков высокой мощности) (Abramson J. et al, 2010). Этот вывод согласуется с ролью Top-II $\alpha$  в качестве маркера пролиферации. Также Mueller R.E. и соавт. в своем исследовании показали, что экспрессия белка Top-II $\alpha$  находится под сильным влиянием уровня клеточной пролиферации, (Mueller R.E. et al, 2004).

Кроме того, альтернативный сплайсинг м-РНК может повреждать различные изомеры белка Top-II $\alpha$  с различными уровнями активности и разной субклеточной локализацией, т.о. один только уровень гена Top-II $\alpha$  не может предсказать уровень белка. Гиперэкспрессия Top-II $\alpha$  редко происходит в отсутствие амплификации гена, и это происходит только в сильно пролиферирующих опухолях (Payne J.L. et al, 2008).

В клетках рака молочной железы некоторые фланкирующие гены в участке 17q12-p21, в том числе и ген Top-II $\alpha$ , часто, либо коамплифицируются, либо делецируются при амплификации гена HER2/neu (C-erbB). Амплификация Top-II $\alpha$  ассоциируется с размером опухоли, стадией и HER2-положительностью, но не одна из характеристик не была связана с экспрессией белка Top-II $\alpha$  (Hala S. et al, 2014). Хотя высокий, статистически значимый уровень экспрессии Top-II $\alpha$  наблюдался в 90% случаев HER2-позитивных опухолей, не было обнаружено статистически значимой связи между экспрессией белков Top-II $\alpha$  и HER2 (Fritz P. et al, 2005; Mac Grogan G. et al, 2003). Амплификация и экспрессия Top-II $\alpha$  являются показателями различных биологических процессов, в связи с тем, что данные явления не связаны и характеризуют разные подтипы опухолей. Так, при базальноподобных опухолях наблюдается гиперэкспрессия белка Top-II $\alpha$  и отсутствует изменение числа копий гена (Hala S. et al, 2014). Экспрессия белка Top-II $\alpha$  более релевантна, чем генный статус Top-II $\alpha$  в предсказании ответа на химиотерапию (Oakman C. et al, 2009), но ИГХ более субъективный метод по

сравнению с генетическими методами исследования, поэтому экспрессия белкового продукта Top-II $\alpha$  исследованного с помощью ИГХ часто коррелирует не с амплификацией гена Top-II $\alpha$ , а с клеточной пролиферацией (Callagy G. et al, 2005).

Амплификация гена Top-II $\alpha$  встречалась значительно чаще в ER- негативных опухолях (28% в ER- негативных против 24% в ER- позитивных опухолях;  $p=0,017$ ). Гиперэкспрессия белка Top-II $\alpha$  наблюдалась в большинстве образцов (65%), и была связана с ER- позитивностью и гиперэкспрессией белка Ki-67, но между ER- статусом опухоли и генным статусом и экспрессией белка Top-II $\alpha$  значимой корреляции не было выявлено ( $p>0,05$ ) (Fountzilias G. et al, 2012). PR- негативность, часто была связана с делецией гена Top-II $\alpha$  (Jarvinen T. et al, 2000). ER/HER2- позитивные опухоли демонстрировали более высокую экспрессию Top-II $\alpha$  (Clark S.E. et al, 2011). Между экспрессией гормональных рецепторов и Top-II $\alpha$  наблюдалась низкая отрицательная корреляция (Fritz P. et al, 2005; Di Leo A. et al, 2008; Muller R.E. et al, 2004; Bhargava R. et al, 2005; Callagy G. et al, 2005), что подтверждает независимость экспрессии Top-II $\alpha$  от гормональных рецепторов (Mueller R.E. et al, 2004; Fritz P. et al, 2005).

## **1.2. Взаимосвязь между амплификацией и экспрессией фермента топоизомеразы- II $\alpha$ и рецептора Her2/neu (C-erbB2) в клетках карциномы молочной железы**

Вопрос о наличии или отсутствии взаимосвязи между экспрессией ядерного фермента топоизомеразы- II $\alpha$  и трансмембранного рецептора с тирозинкиназной активностью, относящегося к семейству рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) HER2/neu до конца не решен (Di Augustine R.P. et al, 1997; Yarden Y. et al, 2001; Akiyama T. et al, 1986).

Рецептор HER2/neu вовлечен в сигнальные пути регуляции транскрипции включая Ras / митоген- активный протеин -киназный путь (МАРК), фосфатидилинозитол 3 киназный (PI3R) /Akt путь и фосфолипазный C- гамма

путь (Jeffrey S. Ross et al, 2009), стимуляция этого рецептора приводит к запуску транскрипционных механизмов (Mokbel K. et al, 2001). При раке молочной железы, часто происходит активация гена HER2/neu, что в 89,4% случаев сопровождается гиперэкспрессией белка (Guerin M. et al, 1988; Tiwan R.K. et al, 1992; Bhargava R. et al, 2005; Walker R.A. et al, 2004). Как следствие нарушается нормальный клеточный цикл и клетки начинают бесконтрольно делиться (Nitiss J.L. et al, 2009). Амплификация гена HER2/neu в опухолевых клетках молочной железы ассоциирована с мутацией p53, отсутствием гормональных рецепторов, амплификацией гена топоизомеразы- IIα (Dowsett M. et al, 2001; Engstrom M.J. et al, 2014).

С одной стороны, гены Top-IIα и HER2/neu расположены близко в 17 хромосоме, но не смотря на геномную близость, эти гены относятся к разным ампликонам, а ген HER2/neu является ключевым водителем 17q12- ампликона, это подтверждается тем фактом, что в опухолях с коамплификацией эти белки часто имеют разное количество (Bhargava R. et al, 2005; Olsen K.E. et al, 2004; Hicks D.G. et al, 2005).

Не было зафиксировано ни одного случая амплификации Top-IIα в отсутствие амплификации гена HER2/neu (Arriola E. et al, 2008; Brunello E. et al, 2012; Nielsen K.V. et al, 2010; Sircoulomb F. et al, 2010; Zhu Li et al, 2000; Coon J.C. et al, 2002). В опухолях с коамплификацией генов HER2/neu и Top-IIα часто наблюдается их гиперэкспрессия (Fritz P. et al, 2005; Di Leo A. et al, 2008), (Nielsen K.V. et al, 2010; Hicks D.G. et al, 2005; Olsen K.E. et al, 2004).

Гиперэкспрессия Top-IIα независимо от амплификации гена Top-IIα наблюдается как в HER2- позитивных, так и в HER2- негативных опухолях (Rody A. et al, 2009), но не было обнаружено амплификации гена Top-IIα в HER2- негативных опухолях (Gambacorta M. et al, 1993; Fountzilias G. et al, 2012), а при делеции гена Top-IIα, не наблюдалась гиперэкспрессия белка HER2/neu (Wang J. et al, 2012). Высокая частота амплификации и наличие гиперэкспрессии гена Top-IIα в HER2- негативных опухолях ставит под сомнение теорию, что генетические aberrации Top-IIα являются вторичными при амплификации гена HER2/neu (Anna

J. Zaczek et al, 2012). Одна из возможных причин того, что амплификация гена Тор-Па происходит только в присутствии амплификации гена HER2/neu, из-за большего количества поломок теломерных участков и вторичное увеличение Тор-Па идет через повторные циклы восстановления моста поломки по механизму breakage-fusion-bridge (Bhargava R. et al, 2005). Тот факт, что в опухолях с коамплификацией Тор-Па и HER2/neu, амплификация Тор-Па ниже, чем HER2/neu подтверждает эту гипотезу (Coquelle A. et al, 1997; Nielsen K.V. et al, 2010; Hicks D.G. et al, 2005; Olsen K.E. et al, 2004).

Процесс начинается с двуцепочечного разрыва на 17-й хромосоме, либо дистальнее гена Тор-Па (редко), либо между HER2/neu и Тор-Па (в значительной части опухолей). Результатом будет «классическая» амплификация с множеством копий гена HER2/neu и нормальным количеством CEP17. Такой паттерн амплификации характерен для большинства HER2/neu- позитивных (78%) и половины люминальных В опухолей с амплификацией HER2/neu (рисунок 1.2.1.).

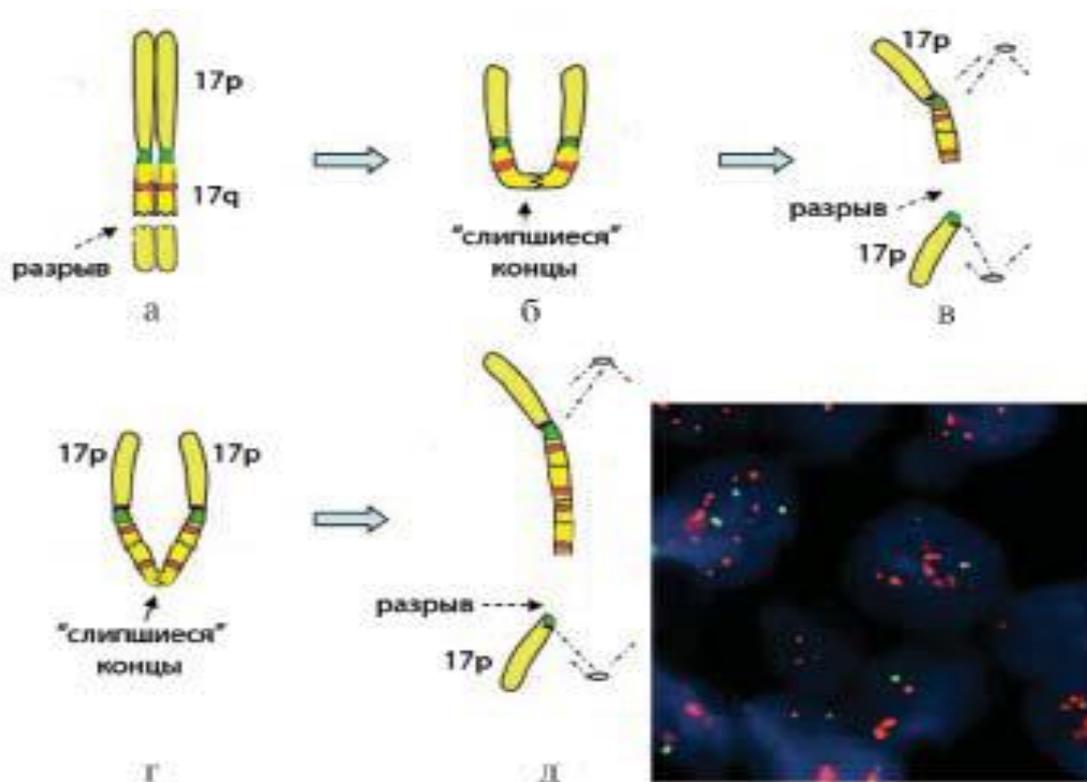
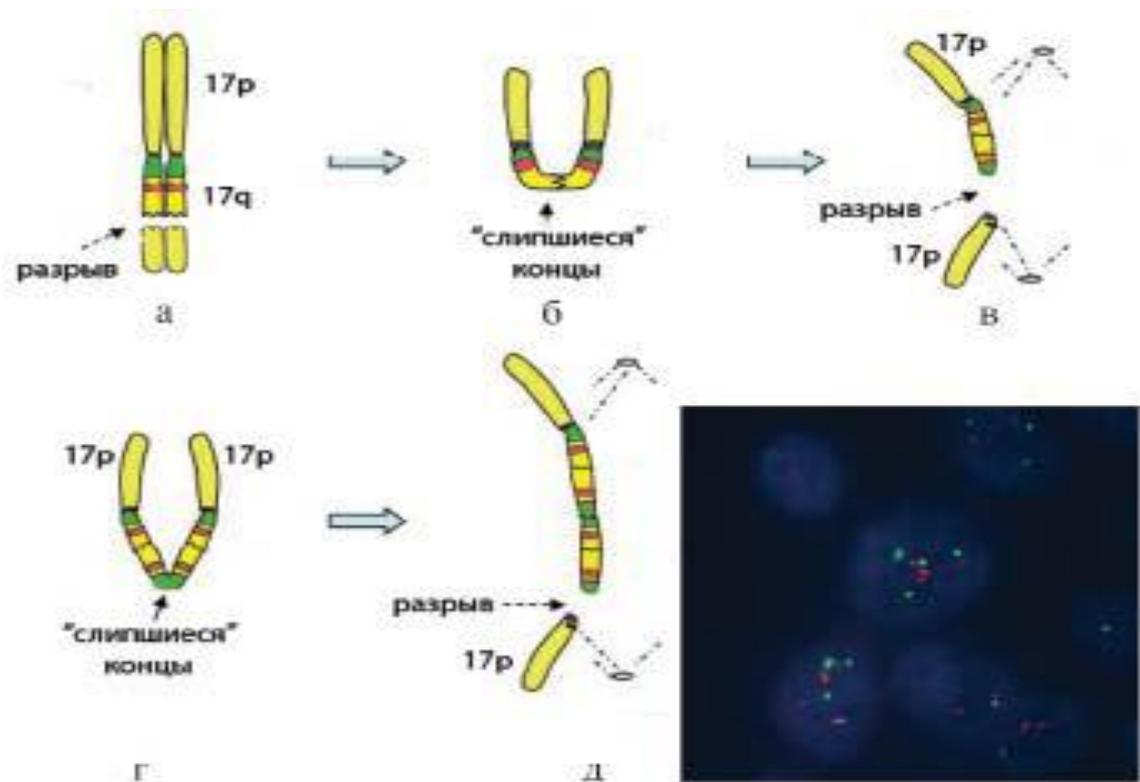


Рисунок 1.2.1. Предполагаемая последовательность событий, ведущая к возникновению амплификаций HER2/neu при РМЖ

Если первоначальный разрыв локализуется дистальнее Top-II $\alpha$  (вероятность такого события невелика и характерна для люминальных В опухолей), а второй двуцепочечный разрыв произойдет достаточно далеко от центromеры, результатом такого события будет коамплификация генов HER2/neu и Top-II $\alpha$ . Такое событие при РМЖ и происходит в том случае, если первый двуцепочечный разрыв локализовался дистальнее гена Top-II $\alpha$ , а второй в районе центromеры (Завалишина Л.Э. и др., 2014; Kim A. et al, 2012) (рисунок 1.2.2.).



*Рисунок 1.2.2. Предполагаемая последовательность событий, ведущая к возникновению амплификаций HER2/neu и увеличению числа центромерных сигналов 17-й хромосомы при РМЖ*

### **1.3. Взаимосвязь пролиферативных процессов в опухолевой ткани и уровня экспрессии белка топоизомеразы- Па**

Топоизомеразы- Па локализуется в ядре, а ее уровень экспрессии в пролиферирующих клетках в разы выше, чем в покоящихся, поэтому уровень экспрессии Топ-Па отражает пролиферативный статус опухоли (Demoulin B., et al, 2015; Wu Z., et al, 2014; Hou G.X., et al, 2017).

Негистоновый протеин Ki-67 экспрессируется во всех клетках, вышедших из фазы  $G_0$ , и позволяет определить пролиферативный потенциал опухоли (Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е., 2002). Ki-67 короткоживущий белок, который разрушается через 1,5- 2 часа, его выделяют только в делящихся клетках (Петров С.В., Райхлин Н.Т., 2014). Циклзависимая экспрессия гена Ki-67, локализованного в 10 хромосоме, является абсолютно необходимой для осуществления клеточной пролиферации (Пожарисский К.М., Леенман Е.Е., 2000). Сильное увеличение количества Ki-67, так же как и Топ-Па, наблюдается в S-фазе клеточного цикла и достигает максимума в  $G_2$  и М фазах, в постмитотических клетках происходит быстрое снижение содержания Ki-67 (Petit T. et al, 2004).

В составе структуры белка Ki-67 обнаружены потенциальные сайты фосфорилирования для различных киназ, а также домен для связывания с вилкой репликации. Фосфорилирование и дефосфорилирование Ki-67 контролируется ключевыми регуляторными механизмами клеточного цикла и имеет место во время распада и реорганизации ядра в течение митоза (Inwald E.C. et al, 2013). Было показано, что Ki-67 претерпевает посттрансляционные модификации путем фосфорилирования, сопровождающиеся заметным перемещением из нуклеоплазмы в перихромосомный слой и обратно в течение митоза. В ходе иммуно-электронно микроскопического исследования интерфазных клеток линии MCF-7, белок Ki-67 был идентифицирован, главным образом в области плотного фибриллярного компонента ядрышек, также слабое иммунное окрашивание было обнаружено в участках гетерохроматина. В течение профазы белок Ki-67 был локализован на поверхности конденсирующихся хромосом, а в метафазе в

перихромосомном слое (Isola J. et al, 2011). Ki-67 покрывает хромосомы слоем до 160 нм, предотвращая слипание хроматид, и к окончанию телофазы перемещается к концу теломер (Deniel G. Boothetal et al, 2016). В норме Ki-67 экспрессируется на низком уровне (менее 3%), а также в ER- негативных клетках молочной железы, но не в ER- позитивных (Moon W.K. et al, 2011). Выявлена обратная корреляционная зависимость между уровнями рецепторов к эстрогену и прогестерону и пролиферативной активностью опухоли: между экспрессией Ki-67 и ER ( $r=-0,46$ ) и PR ( $r=-0,40$ ). ER- положительные опухоли были связаны с низким уровнем Ki-67, относительно PR этот эффект был менее четким. Высокие уровни Ki-67 были обнаружены в опухолях с гиперэкспрессией HER2/neu, однако линейной корреляции между данными показателями не выявлено ( $r=0,07$ ) (Wang Z.B. et al, 2005; Inwald E.C. et al, 2013). Положительная корреляция между Ki-67 и HER2/neu выявлена только в гормон-рецептор-негативных опухолях и была более выражена по сравнению с гормон-рецептор-позитивными (En-Qi Qiao et al, 2013; Urruticoechea A. et al, 2005). Уровень экспрессии Ki-67 значительно снижался в HER2- негативных опухолях без амплификации гена Top-II $\alpha$  (Rody T. et al, 2009). Ряд исследований показали наличие корреляции между уровнями экспрессии белков Top-II $\alpha$  и Ki-67 (Bagwell C.B. et al, 2001; Petit T. et al, 2004; Mueller R.E. et al, 2004; Pritchard K.I. et al, 2008).

В 2011 и в 2013 годах на конференции в Санкт- Галене (St- Gallen Consensus Conferens) Ki-67 был рекомендован для определения и дифференцировки люминальных А и В молекулярно-биологических подтипов РМЖ (Переводчикова Н.И., 2016). Низкий уровень экспрессии Ki-67 отличает люминальный А подтип от подтипа В (Joensuu K. et al, 2013; Stuart-Harris R. et al, 2008; Yerushalmi R. et al, 2010; Untch M. et al, 2011; Goldhirsch A. et al, 2011; Azambuja E. et al, 2007). Уровень экспрессии Ki-67 более 20% рассматривался как крайне неблагоприятный прогностический фактор (Fitzgibbons M.D. et al, 2000; Penault- Llorca F. et al, 2003; Faneyte J.F. et al, 2003; Petit T. et al, 2004; Urruticoechea A. et al, 2005; Moon W.K. et al, 2011).

#### **1.4. Взаимосвязь экспрессии топоизомеразы-II $\alpha$ от особенностей статуса рецепторов к гормонам в опухолевых клетках**

Эстрогены регулируют широкий спектр биологических функций, связываясь с внутриклеточными рецепторами, активируют экспрессию разных генов. К наиболее значимым функциям относят; активацию пролиферации, ингибирование процесса апоптоза, а также стимуляцию выработки факторов роста (трансформирующий фактор роста альфа, эпидермальный фактор роста), что может обуславливать развитие пролиферативных, гиперпластических процессов и рака тканей, в которых имеются рецепторы эстрогенов (Берштейн Л.М., и др., 2000).

Рецепторы ER и PR регулируют транскрипцию генов либо путем непосредственного связывания с элементами ДНК или путем связывания с другими факторами транскрипции. Кроме того, их сигнальные пути перекрещиваются с другими путями через негеномные механизмы. Негеномный механизм действия эстрогена и прогестерона включает перекрестную связь с рецепторами фактора роста и G- белками, соединенными с рецепторами, находящимися в цитозоле. Лиганд-связанные рецепторы могут запускать мембранные каскадные системы киназ (Payne J.L. et al, 2008).

Существуют изоформы рецепторов эстрогенов- альфа и -бета (ER $\alpha$  и ER $\beta$ ), которые являются ядерными белками и транскрипционными факторами (Семиглазов В.Ф. и др., 2000; Marotti J.C. et al, 2010; Brestein L.M. et al, 2010; Pavlaki K. et al, 2009; Mc Cormack O. et al, 2008).

ER $\alpha$  может активировать Src- киназу, связываясь с рецепторами эпидермального фактора роста (EGFR), митоген- активированную протеинкиназу (MAPK) через негеномные механизмы и в естественных условиях лиганд EGFR, который является важным паракринным медиатором действия эстрогена (Payne J.L. et al, 2008) и фосфатидилинозитол-3-киназу, тогда как прогестерон подавляет сигналы Src- MAPK и Akt- киназ (Kushner P.J. et al, 2000; Pearson G. et al, 2001; Красильников М.А., Щербakov А.М., 2014).

Гормон-рецептор-позитивные клетки размножаются с меньшей скоростью, чем гормон-рецептор-негативные. Это обусловлено отрицательным регулирующим эффектом трансформирующего ростового фактора-бета, который специфически активирован во внеклеточном матриксе ER $\alpha$ -позитивных клеток. В ответ на действие прогестерона, ER/PR-позитивные сенсорные клетки высвобождают несколько паракринных факторов таких, как Wnt4 рецептор активатора NF – лиганда (RANKL) и кальцитонин, которые действуют на соседние клетки, вызывая пролиферацию и активируя стволовые клетки (Щербаков А.М. и соавт., 2013).

Fuqua и соавт. изучая экспрессию ER $\beta$ , обнаружили, что совместная экспрессия двух видов рецепторов определяется в большинстве опухолей (Fuqua S.A.W. et al, 2000). Иммунореактивность ER $\beta$  была обнаружена в большинстве образцов (71,2%) и была положительно связана с повышением уровня Top-II $\alpha$  (p=0,045) (Семиглазов В.Ф. и др., 2007).

Рецептор прогестерона (PR) – это эстроген-регулируемый белок. PR может быть обнаружен в ER-негативных случаях при ложно негативном анализе или при очень низкой концентрации ER, неспособной распознаваться антителами, но еще способной стимулировать синтез PR (Payne J.L. et al, 2008; Allred D.C., et al, 1998).

Рецепторы к прогестерону определяются как активированный лиганд фактора транскрипции, который регулирует транскрипцию генов путем связывания непосредственно или косвенно с ДНК. Три изоформы PR являются продуктом одного гена, расположенного на хромосоме 11 в q22-23: PRB (116 кДа) необходим для нормального развития молочной железы, PRA (94 кДа из N-терминального конца PRB) имеет важное значение для развития матки, PRC (60 кДа) лишен классической транскрипционной активности и выполняет функцию ингибитора PRB в миометрии во время родов (Carol A. et al, 2007). PRB, которому приписывается большая функциональная активность по сравнению с PRA, в ткани РМЖ позитивно коррелирует с содержанием в ER $\alpha$  (Mc Cormack O. et al, 2008).

Эстроген индуцирует экспрессию PR только в присутствии эпидермального фактора роста (EGFR), из чего можно предположить о существовании важного

перекреста между EGFR и обоими стероидными гормонами, поэтому, отделить эффекты одного эстрогена от прогестерона довольно сложно (Cui X. et al, 2005). PR активируются чрезвычайно низким или пороговыми концентрациями гормона или фосфорилированный PR в отсутствие гормона может активировать ассоциированные с клеточной мембраной сигнальные пути, включая с- Src киназу, HER2/neu и p42/p44 пути, что может влиять на регуляцию транскрипции, обеспечивая сильный стимул для выживания и пролиферации раковых клеток молочной железы. Активность PR наибольшая в S- фазе и ниже в G<sub>0</sub> и G<sub>1</sub> фазах клеточного цикла, но это действие нарушается во время G<sub>2</sub> и M фазе и сопровождается пониженным фосфорилированием PR. Избыточная экспрессия циклина A, который взаимодействует с N- концом PR, расширяет транскрипционную активность PR (Narayanan et al, 2014). Фосфорилирование и активация негеномного действия PR одно из критических событий для роста клеток РМЖ, прогестерон, через PRB / с-Src- путь, в сочетании с PR- зависимыми транскрипционными событиями, повышает регуляцию и активирует эпидермальный фактор роста (MAPK- путь), чтобы индуцировать пролиферацию клеток (Tanos T. Et al, 2008). Инсулиноподобный фактор роста-1 ингибирует экспрессию PR с помощью фосфатидилинозитол 3- киназы (Akt). Пути снижения экспрессии PR могут служить индикатором активированных факторов роста в клетках РМЖ и обуславливать агрессивный фенотип опухоли (Lui S. et al, 2010).

Между экспрессией рецепторов к гормонам наблюдалась обратная корреляция с экспрессией белка HER2/neu и Top-II $\alpha$ , а также прямая положительная корреляция между экспрессией PR и HER2/neu. ER/HER2- позитивные опухоли демонстрировали более высокий уровень экспрессии Top-II $\alpha$  (Clark S.E. et al, 2011).

Амплификация гена Top-II $\alpha$  значительно чаще встречалась в ER- негативных опухолях. Между ER- статусом опухоли и генным статусом Top-II $\alpha$  или экспрессией белка Top-II $\alpha$  значимой корреляции не было выявлено (Fountzilias G., 2012). В PR- негативных опухолях часто наблюдается делеция гена Top-II $\alpha$  (Jarvinen T. et al, 2000). Между экспрессией ER, PR и Top-II $\alpha$  была выявлена

низкая отрицательная корреляция (Nikolenyi A. et al, 2011), также повышение экспрессии Top-II $\alpha$  было связано с отрицательным значением ER, что подтверждает вывод о независимости экспрессии Top-II $\alpha$  от гормональных рецепторов (Mueller R.E. et al, 2004; Fritz P. et al, 2005).

Одним из ведущих факторов, связанным с наличием или отсутствием в опухоли рецепторов стероидных гормонов является возраст больных с границей, нередко проходящей на рубеже завершения репродуктивного периода и наступления менопаузы (Шашова Е.Е. и др., 2009). Уровень экспрессии Top-II $\alpha$  существенно различался в опухолях больных с различной сохранностью овариально-менструальной функции: минимальные значения отмечались в опухолях женщин в перименопаузе, при сохранной репродуктивной функции показатели были средними, а в опухолях женщин в постменопаузе – максимальными и статистически достоверно превышающими показатели остальных групп (Шатова Ю.С. и др., 2015; Шашова Е.Е. и др., 2009; Закирова Л.Т. и др., 2015; Deniel G. Cyr et al, 2016; Payne J.L. et al, 2008).

Данные литературы свидетельствуют, что ядерный фермент топоизомераза- II $\alpha$  является перспективным предективным маркером, но до сих пор остаются недостаточно изученными механизмы экспрессии топоизомеразы- II $\alpha$  в молекулярно-биологических подтипах РМЖ. В связи с этим обоснован интерес к дальнейшему изучению особенностей экспрессии Top-II $\alpha$  при различном сочетании рецепторов в клетках карциномы молочной железы.

## ГЛАВА 2

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для исследования был предоставлен лабораторией иммуногистохимии ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий» (г. Екатеринбург). Предметом исследования являлся операционный и биопсийный материал пациенток с диагнозом инвазивный неспецифического типа рак молочной железы, который направлялся из ГБУЗ СО «Свердловский областной онкологический диспансер», Городского маммологического центра при муниципальном автономном учреждении здравоохранения «Городская клиническая больница № 40» (г. Екатеринбург).

Исследование основано на анализе 766 случаев инвазивного неспецифического типа рака молочной железы за период с 2011 по 2015 г. Во всех случаях иммуногистохимическим методом определялась экспрессия рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR), эпидермального фактора роста 2 (HER2/neu), маркера клеточной пролиферации (Ki-67), топоизомеразы- II альфа (Top-II $\alpha$ ). В контрольную группу вошло 12 случаев, взятых от пациенток с разными диагнозами в пределах здоровой ткани молочной железы. Во всех случаях иммуногистохимическим методом определялась экспрессия молекул белка топоизомеразы- II $\alpha$ .

Программа исследования одобрена ЛЭК ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», протокол № 1/13 от 11.04.2013 г.

Материал отобранных групп исследовался гистологическим, иммуногистохимическим, методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и статистическими методами.

## 2.1. Гистологический метод

Материал фиксировался, заливался в растворе нейтрального фармрина в течение 1-2 суток, затем осуществлялась его проводка через спирты, после чего проводилась заливка материала в парафиновые блоки (Калантарли С.С., Мацко Д.Е., 2012). Изготовление гистологических срезов толщиной 4 мкм осуществляли на ротационном микротоме Mikrotom HM340 (MIKROM, Германия) с системой переноса срезов. После депарафинизации производили гистологическую окраску гематоксилином Майера и эозином (Коржевский Д.Э., Гиляров А.В., 2010).

Патоморфологический диагноз инвазивного рака молочной железы с указанием стадии по классификации TNM устанавливался врачом-патологоанатомом в патологоанатомическом отделении ГБУЗ СО «Свердловский областной онкологический диспансер» (заведующая отделением Казанцева Н.В.).

## 2.2. Иммуногистохимические исследования

Исследования проводились с использованием автоматических систем окрашивания Ventana (США) и DAKO (Дания). Определение экспрессии топоизомеразы- II $\alpha$  в клетках опухоли осуществлялось с помощью кроличьих моноклональных антител Anti-Human topoisomerase- II alpha (clone 3F6, MONOSAN, DAKO, Дания), HER2/neu- с помощью кроличьих моноклональных антител c-erb-2/HER-2 (Clone 4B5, Ventana, США). Для определения ядерного индекса пролиферации опухоли использовались кроличьи моноклональные античеловеческие антитела KI-67 Antigen (Clone SP6, Spring Bioscience, США), рецепторов эстрогена и прогестерона на ядрах клеток опухоли с помощью кроличьих моноклональных античеловеческих антител Estrogen Receptor (Clone SP1, Spring Bioscience, США), Progesterone Receptor (Clone SP2, Spring Bioscience, США) (табл. 1). Предварительная демаскировка антигенов для антител к HER2/neu проводилась в автостейнере Ventana BenchMark GX с использованием

Ultra Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1, Ventana, США). Для остальных антител предварительная демаскировка производилась в PT Link с использованием EnVision Flex Target Retrieval Solution Low pH (ДАКО, Дания).

Таблица 2.2.1.

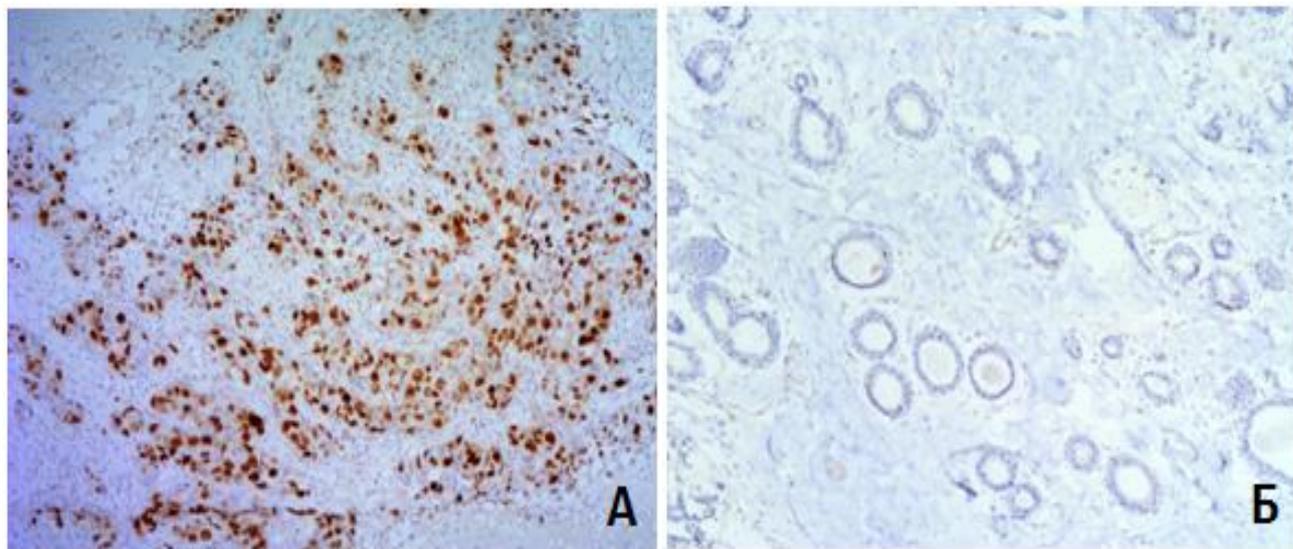
*Характеристика использованных антител для иммуногистохимического исследования*

	<b>Автоматический иммуностейнер Ventana Bench Mark GX (Ventana Medical Systems, США)</b>	<b>Автоматический иммуностейнер ДАКОАУТОСТАЙНЕР Universal staining system (ДАКО, Дания)</b>
Антитела	<b>HER2/neu</b> (Clone 4B5, Ventana)	<b>Estrogen receptor</b> (Clone SP1, Spring Bioscience) <b>Progesterone receptor</b> (Clone SP2, Spring Bioscience) <b>Ki-67</b> (Clone SP6, Spring Bioscience) <b>Anti-Human topoisomerase II alpha</b> (clone 3F6, MONOSAN)
Система визуализации	ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana)	Dako EnVision + Dual Link System - HRP, хромоген Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (ДАКО)
Предварительная обработка	Ventana BenchMark GX (Ventana) Ultra Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1, Ventana)	PT Link (ДАКО), EnVision Flex Target Retrieval Solution High pH (ДАКО), EnVision Flex Target Retrieval Solution Low pH (ДАКО)

Для иммуногистохимических реакций, осуществляемых в автостейнере Ventana BenchMark GX использовались сопутствующие растворы и система визуализации ultra View Universal DAB Detection Kit (Ventana). Для

иммуногистохимических реакций, осуществляемых в автостейнере ДАКО AUTOSTAINER Universal staining system использовались буфер Dako Wash Buffer, система визуализации Dako EnVision + Dual Link System - HRP, хромоген Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (ДАКО, Дания). Для проведения иммуногистохимических исследований использовались положительно заряженные стекла SUPERFROST PLUS (Thermo scientific, Германия). Оценку реакции осуществляли на микроскопе “Zeiss Imager M” (Германия) (Сазонов С.В., 2014).

Оценка иммуногистохимического окрашивания экспрессии Топ-II $\alpha$  определяли по процентному отношению числа окрашенных ядер опухолевых клеток ко всем клеткам рака молочной железы (%) (рис. 2.2.1.). В каждом случае просчитывали не менее 600 опухолевых клеток (Петров С.В. и соавт., 2012; Петров С.В., 2014; Jalava P.,2006; Kumar L., 2011).

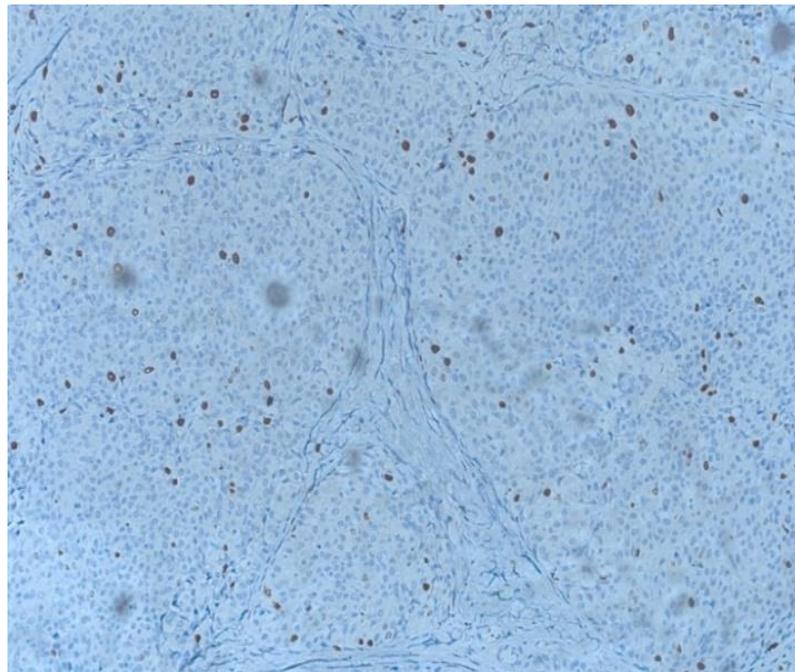


*Рисунок 2.2.1. Экспрессия фермента топоизомеразы-II альфа: (А) в инвазивном неспецифического типа раке молочной железы; (Б) в эпителиальной ткани протоков молочной железы (норма). Увеличение  $\times 100$ . Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*

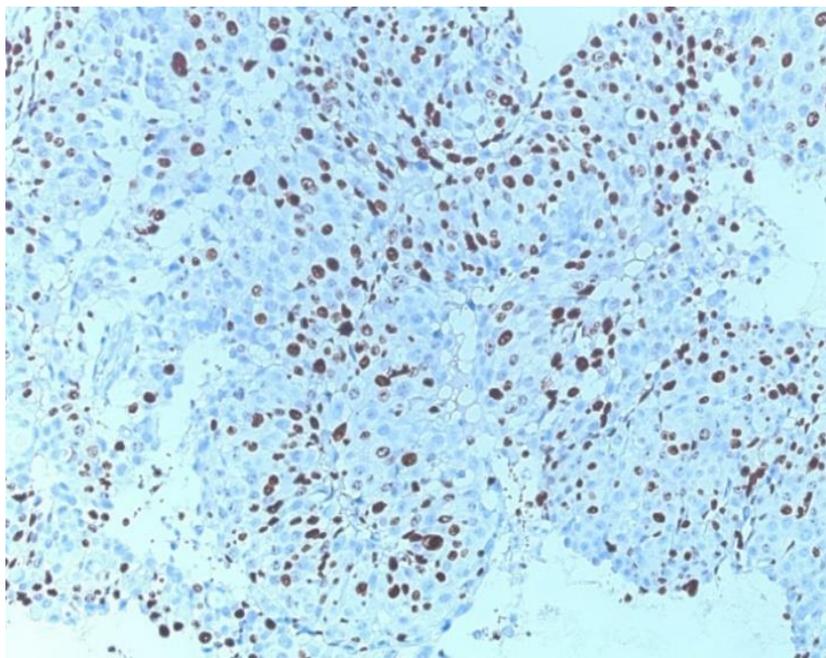
Уровень маркера пролиферации клеток опухоли Ki-67 определяли по процентному отношению числа окрашенных ядер опухолевых клеток ко всем

клеткам РМЖ. При подсчете количества окрашенных визуализирующим агентом ядер опухолевых клеток учитывается процентное соотношение окрашенных и неокрашенных ядер на 100 учтенных клеток в 10-ти репрезентативных полях зрения при увеличении  $\times 40$ . Результат индекса пролиферативной активности выдаётся с указанием индекса пролиферативной активности (процент клеток, в которых определяется экспрессия антител к Ki-67). Если в исследуемом образце менее 10% клеток имеют положительный результат ИГХ реакции, то экспрессия характеризуется как низкая; если от 10 до 20% - как промежуточная; если более 20% - высокая экспрессия (Jalava P. et al, 2006; Калантарли С.С. и др., 2012).

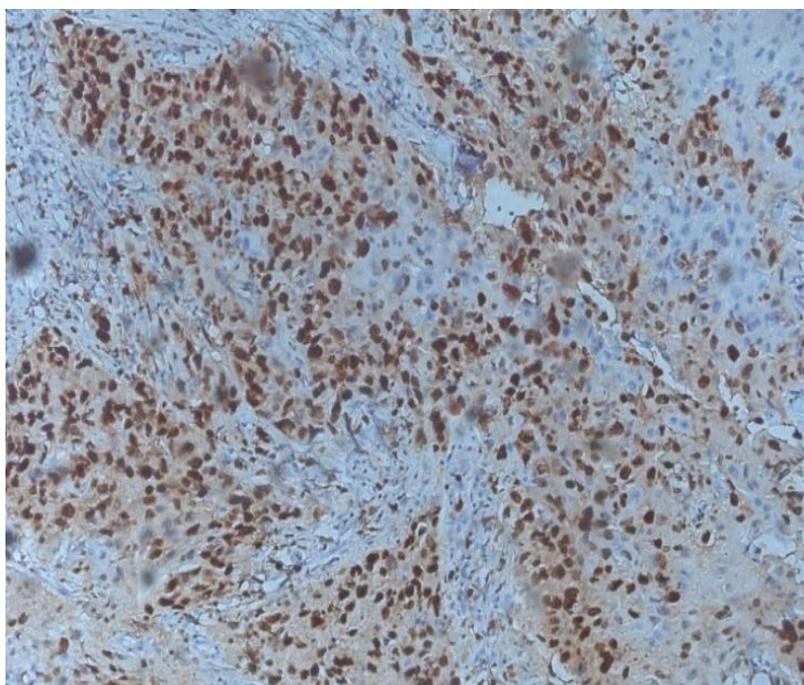
Примеры иммуногистохимической оценки опухолей представлены на рисунках (2.2.1.2.- 2.2.4.).



*Рисунок 2.2.2. ИГХ- анализ уровня экспрессии Ki-67 в клетках инвазивного неспецифического типа РМЖ (5% окрашенных ядер- низкий уровень)*



*Рисунок 2.2.3. ИГХ- анализ уровня экспрессии Ki-67 в клетках инвазивного неспецифического типа РМЖ (20% окрашенных ядер- средний уровень)*



*Рисунок 2.2.4. ИГХ- анализ уровня экспрессии Ki-67 в клетках инвазивного неспецифического типа РМЖ (80% окрашенных ядер- высокий уровень)*

Уровень ядерной экспрессии рецепторов к гормонам ER и PR в опухолевых клетках оценивали по шкале от 0 до 8 (Allred D.S. et al, 1998) (таблица 2.2.2.).

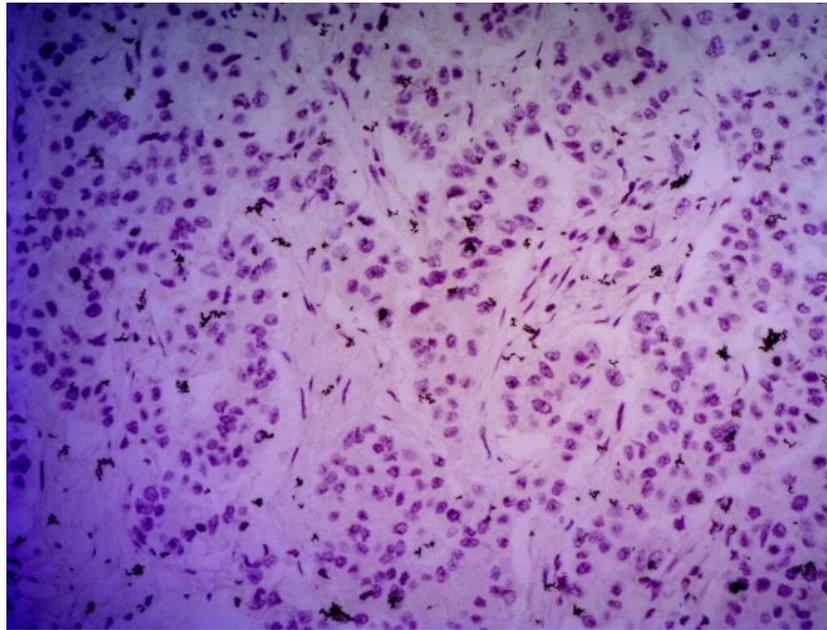
Таблица 2.2.2.

*Полуколичественная оценка иммуногистохимического определения рецепторов стероидных гормонов (Allred D.S. et al., 1998)*

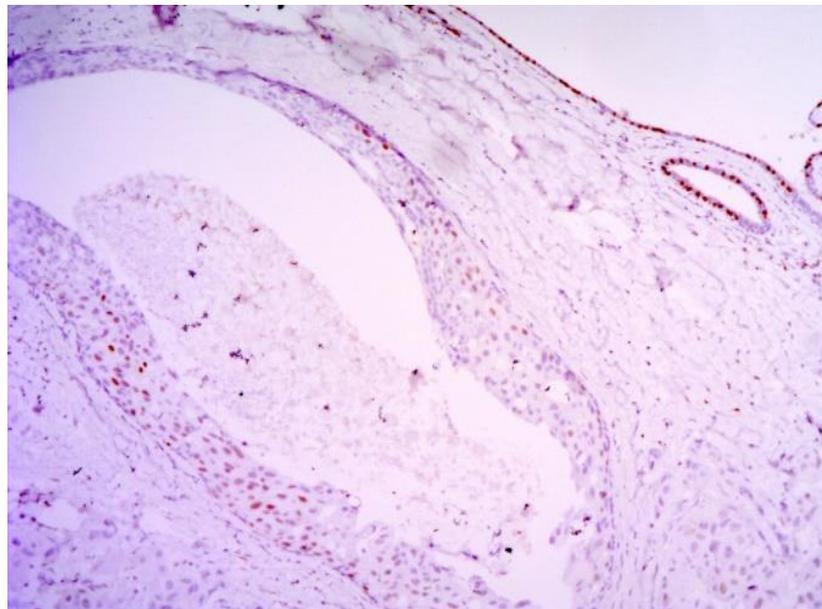
<b>А. доля позитивно окрашенных клеток</b>	<b>Баллы</b>
0	0
От 0 до 1/100	1
От 1/100 до 1/10	2
От 1/10 до 1/3	3
От 1/3 до 2/3	4
От 2/3 до 1	5
<b>В. Интенсивность окраски</b>	
Негативная	0
Слабая	1
Промежуточная	2
Сильная	3

Интегральный показатель степени экспрессии рецепторов к гормонам определяет сумма баллов, отражающих долю окрашенных клеток и интенсивность окраски. Рецептор позитивными опухоли считаются при сумме баллов 3 и более (Allred D.S. et al, 1998; Hammond M.E. et al, 2010; Невожай В.И., Мюллер Е.С., 2007; Кириллина М.П., 2011).

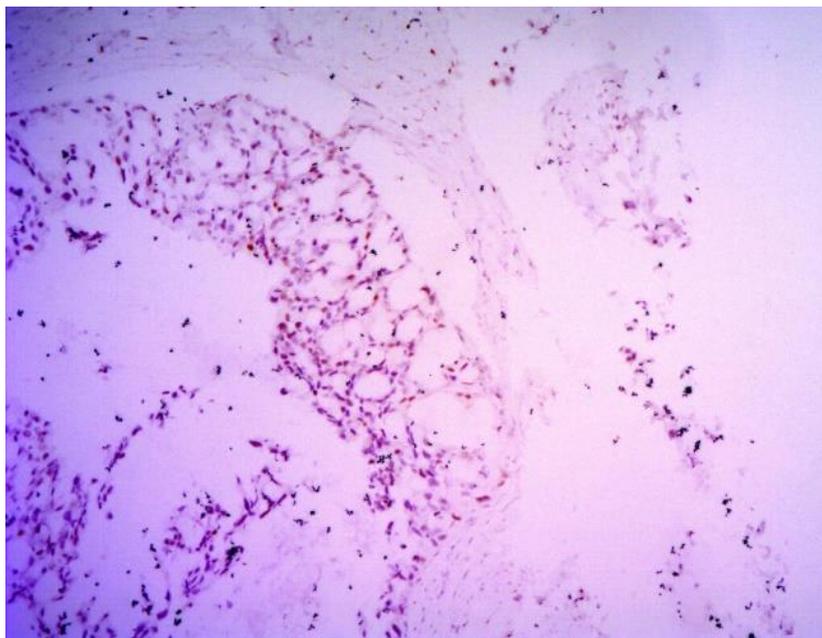
Примеры иммуногистохимической оценки экспрессии рецепторов к эстрогену представлены на рисунках 2.2.5- 2.2.12.



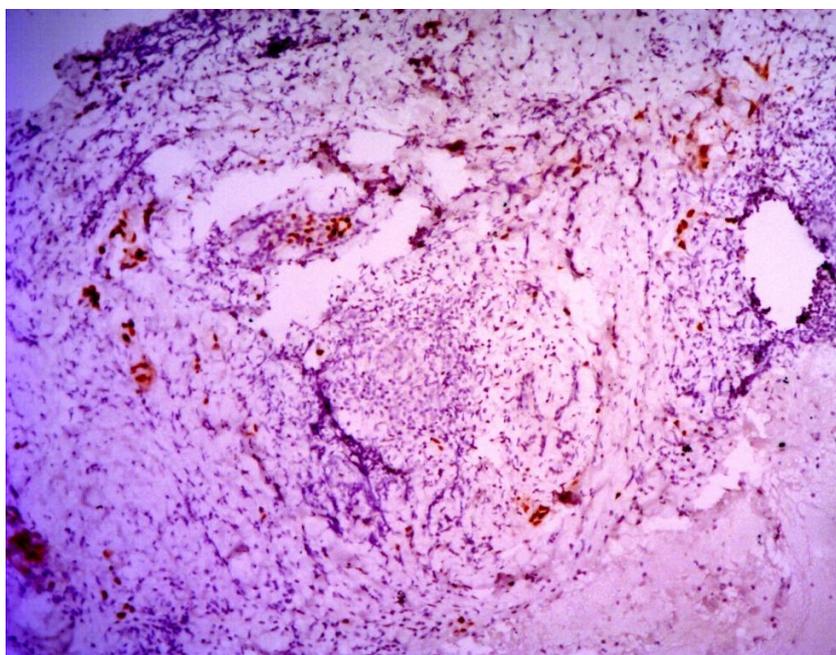
*Рисунок 2.2.5. ИГХ- анализ уровня экспрессии рецепторов к эстрогену клетках инвазивного неспецифического типа (протокового) РМЖ- 0 баллов (отсутствие коричневого ядерного окрашивания) ×100 Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*



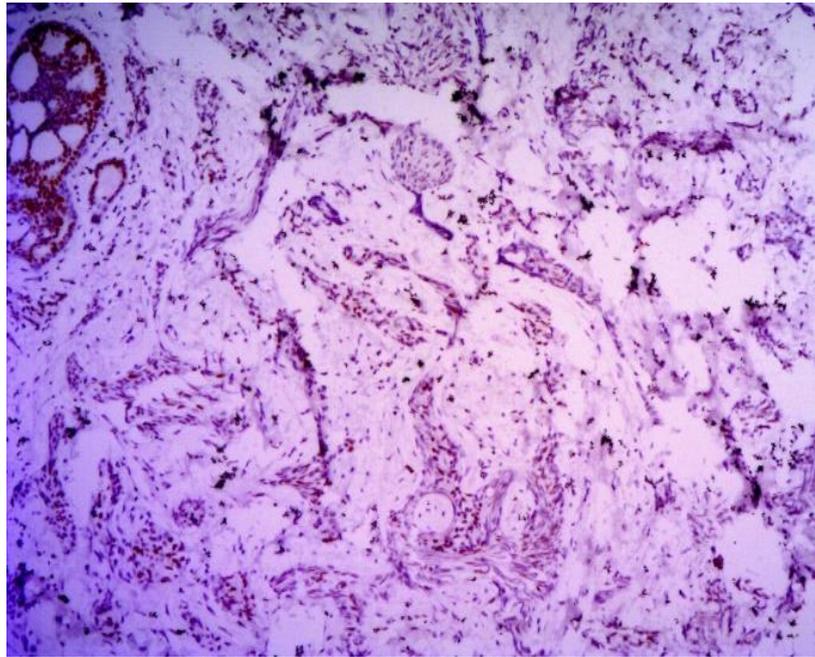
*Рисунок 2.2.6. ИГХ- анализ уровня экспрессии рецепторов к эстрогену – 2 баллов (коричневые ядра до 1/10 опухолевых клеток), ×100 Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*



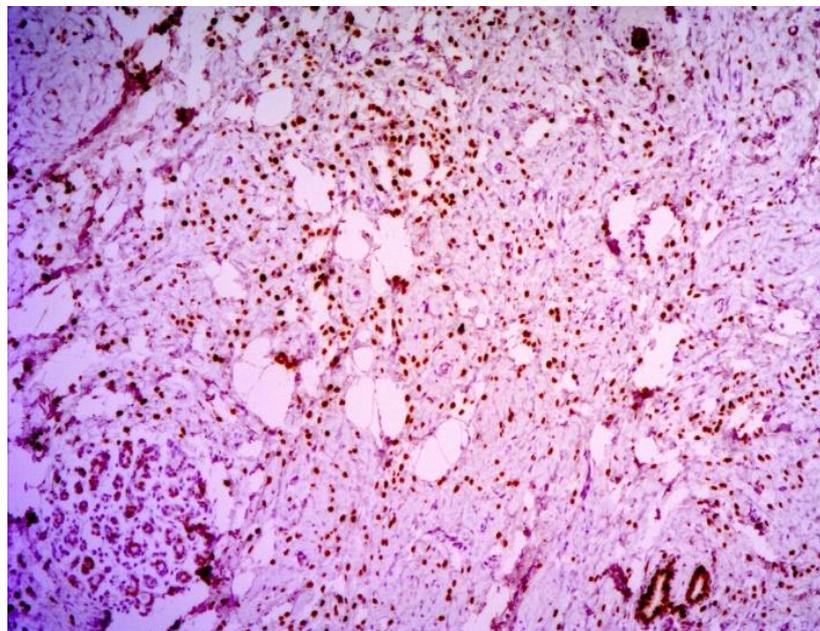
*Рисунок 2.2.7. ИГХ- анализ уровня экспрессии рецепторов к эстрогену – 3 баллов (коричневые ядра до 1/3 опухолевых клеток), ×100 Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*



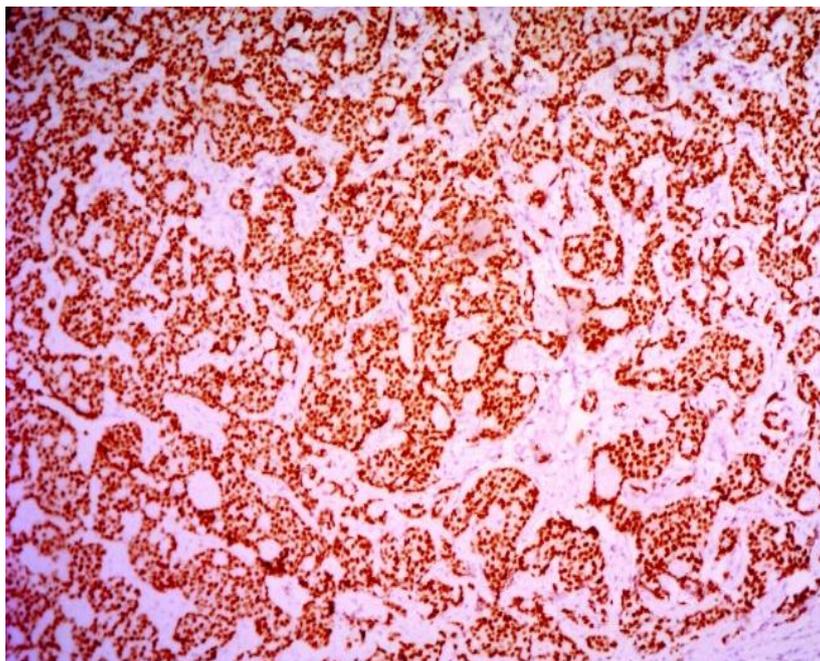
*Рисунок 2.2.8. ИГХ- анализ уровня экспрессии рецепторов к эстрогену – 4 баллов (коричневые ядра до 2/3 опухолевых клеток), ×100 Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*



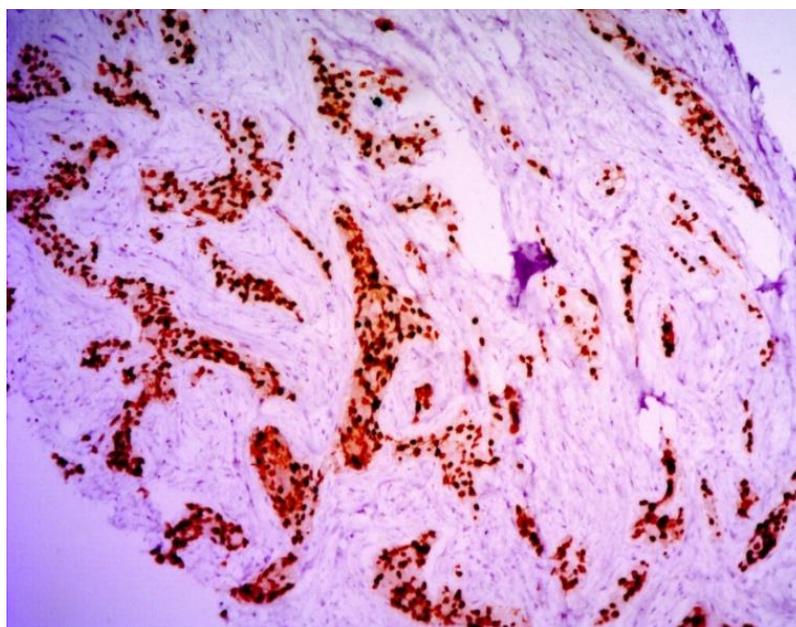
*Рисунок 2.2.9. ИГХ- анализ уровня экспрессии рецепторов к эстрогену – 5 баллов (коричневые ядра до 2/3 опухолевых клеток), ×100 Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*



*Рисунок 2.2.10. ИГХ- анализ уровня экспрессии рецепторов к эстрогену – 6 баллов (коричневые ядра от 2/3 опухолевых клеток), ×100 Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*



*Рисунок 2.2.11. ИГХ- анализ уровня экспрессии рецепторов к эстрогену – 7 баллов (коричневые ядра от 2/3 опухолевых клеток), ×100 Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*



*Рисунок 2.2.12. ИГХ- анализ уровня экспрессии рецепторов к эстрогену – 8 баллов (коричневые ядра от 2/3 опухолевых клеток), ×100 Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*

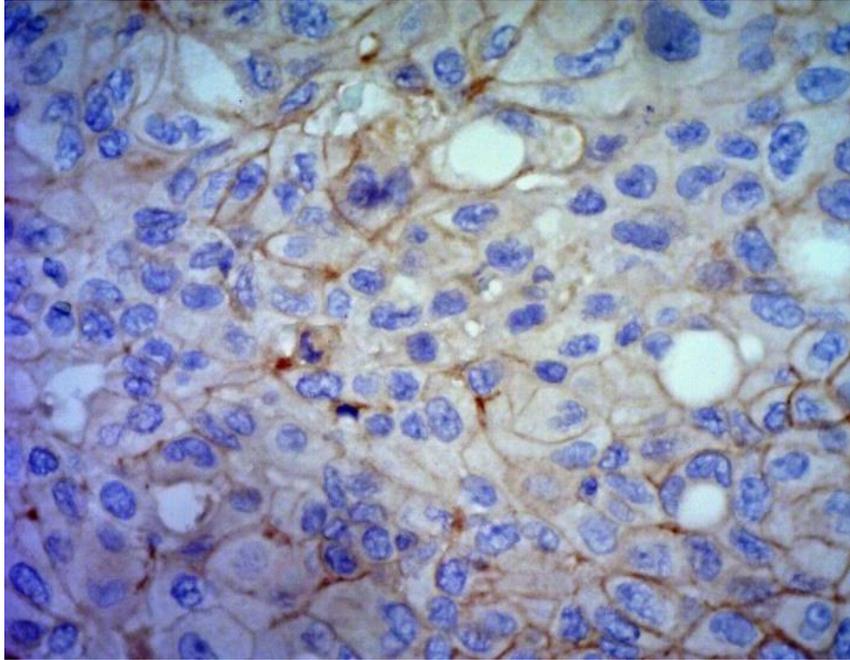
Оценка уровней мембранной экспрессии HER2/neu опухолевыми клетками производилась по шкале от 0 до 3+ (Bilous M. et al, 2003; Wolff A.C. et al., 2007; Франк Г.А. и соавт., 2013). Система оценки экспрессии HER2/neu учитывает, как процент клеток опухоли, демонстрирующих окрашивание полной мембраны, так и интенсивность окрашивания. Окрашивание должно быть локализовано на клеточной мембране и полностью повторять её контур (таблица 3.4.1.).

Таблица. 2.2.3.

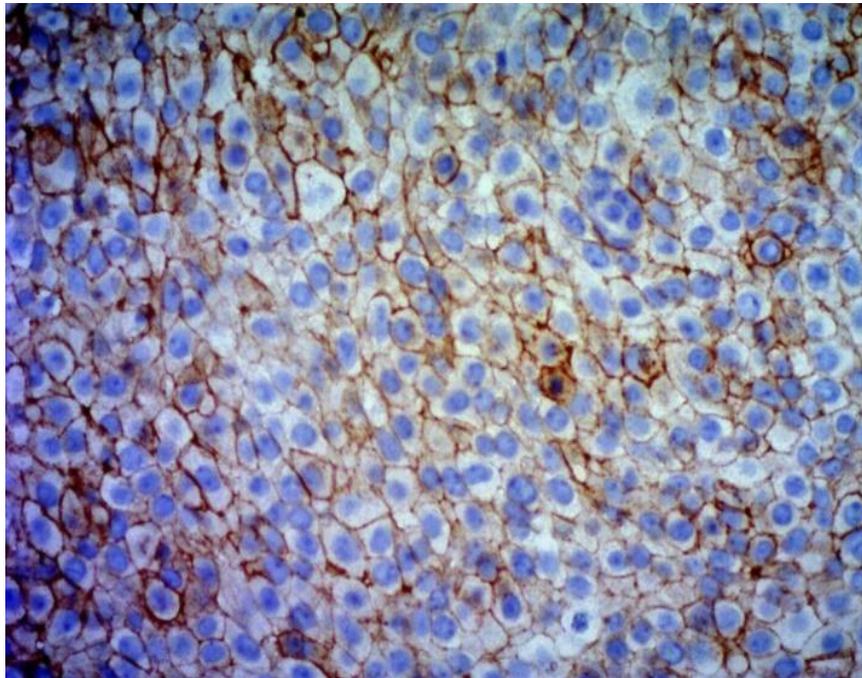
*Оценка уровней мембранной экспрессии HER2/neu опухолевыми клетками по шкале от 0 до 3+*

<b>Характер окрашивания</b>	<b>Оценка в баллах</b>	<b>Оценка HER2 статуса</b>
Отсутствие мембранного окрашивания или наличие слабого окрашивания	менее 10% опухолевых клеток	0 негативный
Слабое мембранное окрашивание	более 10% опухолевых клеток	1+ негативный
Умеренное мембранное окрашивание	менее 10% опухолевых клеток	2+ неопределённый (рекомендуется провести гибридизацию in situ)
Сильное полное окрашивание мембран	более 30% опухолевых клеток	+3 позитивный

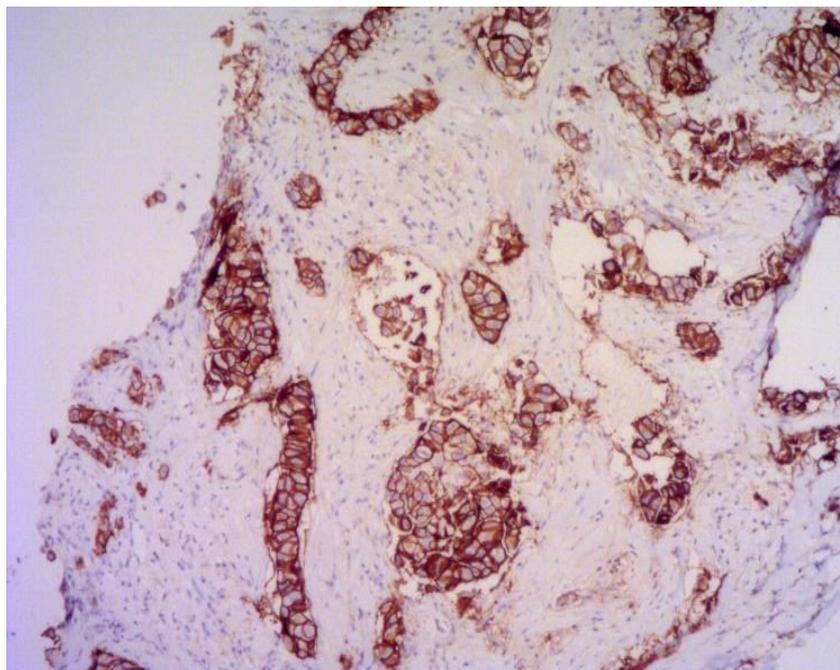
Примеры иммуногистохимической оценки опухолей представлены на рисунках 2.2.13.- 2.2.16.



*Рисунок 2.2.13. Иммуногистохимический анализ уровня рецепторов HER2 (1+ слабое неполное мембранное окрашивание опухолевых клеток 10% и более)*



*Рисунок 2.2.14. Иммуногистохимический анализ уровня рецепторов HER2 (2+ неполное мембранное окрашивание слабое и умеренное более 10% опухолевых клеток или полное интенсивное мембранное окрашивание  $\leq 10\%$ )*



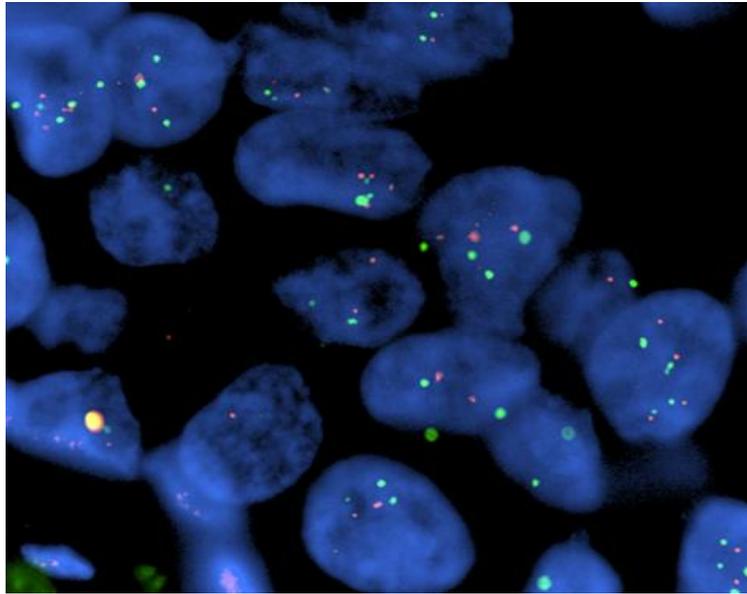
*Рисунок 2.2.15. Иммуногистохимический анализ уровня рецепторов HER2 (3+ сильное полное мембранное окрашивание >30% опухолевых клеток)*

При ИГХ- статусе HER2/neu 2+, дополнительно определяли наличие амплификации гена HER2 с помощью метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

### **2.3. Метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH)**

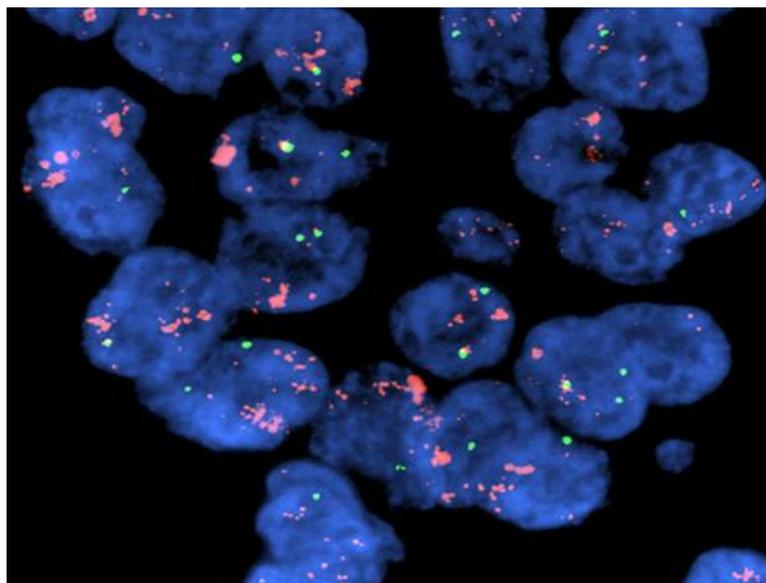
Для определения амплификации гена HER2/neu срезы получали с тех же парафиновых блоков, которые использовались для ИГХ исследований, перед проведением исследования высушивали при температуре 560°C в течение 18 часов. Если при оценке экспрессии белка HER2/neu получали результат 2+ по трехбалльной шкале, то с помощью наборов для флуоресцентной гибридизации наборов HER2 IQFISH pharmDx Kit «Dako» с использованием гибридазера «Hybridazer Dako» определяли наличие амплификации гена HER2/neu. Денатурацию проводили при температуре 82°C гибридизацию - при 45°C в течение 20 часов. Количественный анализ статуса гена HER2/neu оценивали, подсчитывая метку в 20 ядрах опухолевых клеток с увеличением в 400 и 1000,

после чего вычисляли соотношение красных (локус гена HER2) и зеленых (CHR17) меток (HER2:CHR17) (рисунок 2.3.1.).



*Рисунок 2.3.1. Метод флюоресцентной гибридизации in situ (FISH).  
Амплификация гена HER2 отсутствует*

При соотношении  $HER2:CHR17 > 2$  наличие амплификации считали установленным (рисунок 2.3.2.).



*Рисунок 2.3.2. Метод флюоресцентной гибридизации in situ (FISH).  
Наличие амплификации гена HER2*

В группу с положительным HER2- статусом были отнесены опухоли с наличием гиперэкспрессии (ИГХ 3+) или с амплификацией гена HER2/neu, в группу с отрицательным статусом- все остальные случаи (Завалишина Л.Э., Франк Г.А., 2006; Kumar G.L., Rudbeck L., 2011; Богомолов А.Г. и соавт., 2014).

#### 2.4. Характеристика исследуемой группы пациенток

Из медицинской документации пациенток были проанализированы клинические показатели по классификации TNM. В 670 случаях был указан показатель Т (размер опухоли), в 567 случаях показатель N (метастазирование в регионарные лимфатические узлы) и в 661 случаях показатель М (отдаленные метастазы).

Средний возраст пациенток составлял  $53,4 \pm 0,39$  года (диапазон от 23 до 85 лет) (Таблица 2.5.1).

*Таблица 2.5.1.*

*Возрастная структура пациенток с РМЖ, которым проводилось ИГХ*

<b>возраст</b>	<b>n= 766</b>	<b>(%)</b>
До 40 лет	n= 47	7%
41-50 лет	n= 107	16%
51- 60 лет	n= 235	36%
Старше 60 лет	n= 273	41%

В связи с гетерогенностью рака молочной железы для выявления особенностей экспрессии топоизомеразы- IIa в зависимости от особенностей рецепторного аппарата опухолевых клеток (Франк Г.А. и др., 2014; Семиглазов В.Ф. и др., 2013; Завьялова М.В. и др., 2013; Perou S.M. et al, 2000), все случаи рака молочной железы были разделены на 5 молекулярно-биологических подтипов. Использовалась классификация, согласно рекомендациям ASCO/CAP (Hammond M.E. et al, 2010; Wolff A.C. et al, 2007), принятая на конференции в Санкт-Галлене в 2011 году (с уточнением в 2013 году), а так же лечебно-

ориентированная классификация (St. Gallen, 2015), основанная на иммуногистохимическом определении рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR), эпидермального фактора роста 2 (HER-2/neu) и маркера клеточной пролиферации (Ki-67) (Cheang M.C.U. et al, 2009; Пак Д.Д. и др., 2012; Семиглазов В.Ф и др., 2015;) (таблица 2.5.2.).

Таблица 2.5.2.

*Иммуногистохимическая классификация подтипов рака молочной железы*

<b>Молекулярно-биологический подтип</b>	<b>Иммуногистохимическая характеристика</b>
Гормон-рецептор-позитивный, HER2-негативный, (Ki-67<20%) (Люминальный А)	ER и/или PR - положительный* HER-2/neu - негативный* Ki-67 низкий (<20%)
Гормон-рецептор-позитивный, HER2-негативный, (Ki-67<20%) (Люминальный В (HER2-))	ER и/или PR - положительный * HER-2/neu - негативный* Ki-67 высокий (≥20%)
Гормон-рецептор-позитивный, HER2-позитивный (Люминальный В (HER2+))	ER и/или PR - положительный* HER-2/neu- сверхэкспрессирован или амплифицирован, Ki-67 любой
Гормон-рецептор-негативный, HER2-позитивный (HER2- сверхэкспрессирующий)	ER и/или PR - отсутствуют* HER-2/neu - сверхэкспрессирован или амплифицирован* Ki-67 любой
Гормон-рецептор-негативный, HER2-негативный («тройной негативный»)	ER и/или PR - отсутствуют* HER-2/neu - негативный* Ki-67 любой

\*согласно рекомендациям ASCO/CAP (Hammond M.E. et al, 2010; Wolff A.C. et al, 2007; Семиглазов В.Ф. и др., 2015).

## 2.5. Статистические методы

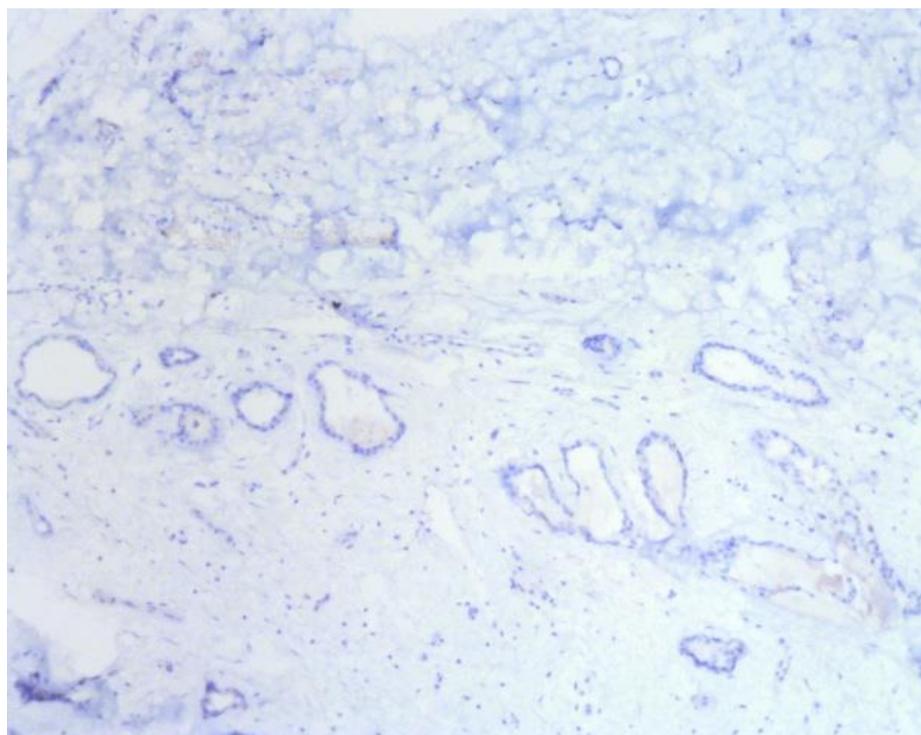
По результатам исследования формировались базы данных с использованием программы Microsoft Office Excel 2010. Статистические исследования выполнены в программном пакете «Statistica 10.0». Для количественных показателей использовали вычисление М-среднего значения (среднее арифметическое), стандартное отклонение по выборке ( $\sigma$ ), ошибку среднего арифметического ( $m$ ). Проверку на нормальность распределения проводили по критерию Колмогорова-Смирнова. Для выявления достоверности различий между двумя выборками применялся критерий  $\chi^2$  (Хи-квадрат) Пирсона. Если величина вероятности случайного появления ошибок анализируемых выборок была меньше уровня значимости ( $p=0,05$ ), то нулевая гипотеза (различия между группами не достоверны) отклонялась. В таком случае различия между выборками неслучайные, и средние выборок считались достоверно отличающимися друг от друга. Значимость различий вариационных рядов, связанных попарно в выборках, оценивали с помощью t-критерия Стьюдента (односторонний тест для зависимых выборок), не связанных попарно в выборках, оценивали с помощью t-критерия Стьюдента (двусторонний тест для независимых выборок). Различия между исследуемыми группами считались достоверными при уровне значимости  $p<0,05$ . Оценку и силу связи между явлениями или признаками проводили с помощью коэффициентов парной корреляции Пирсона ( $r$ ) или ранговой корреляции Спирмена  $R_{(s)}$ . При анализе корреляции считали ее незначимой при значении модуля коэффициента корреляции от 0 до 0,3; значимой - от 0,3 до 0,75 и высокой - выше 0,75 (Zar J.H. et al 2010; Герасимов А.Н., 2007; Зайцев В.М., 2006; Петри А., Сэбин К., 2015).

### ГЛАВА 3

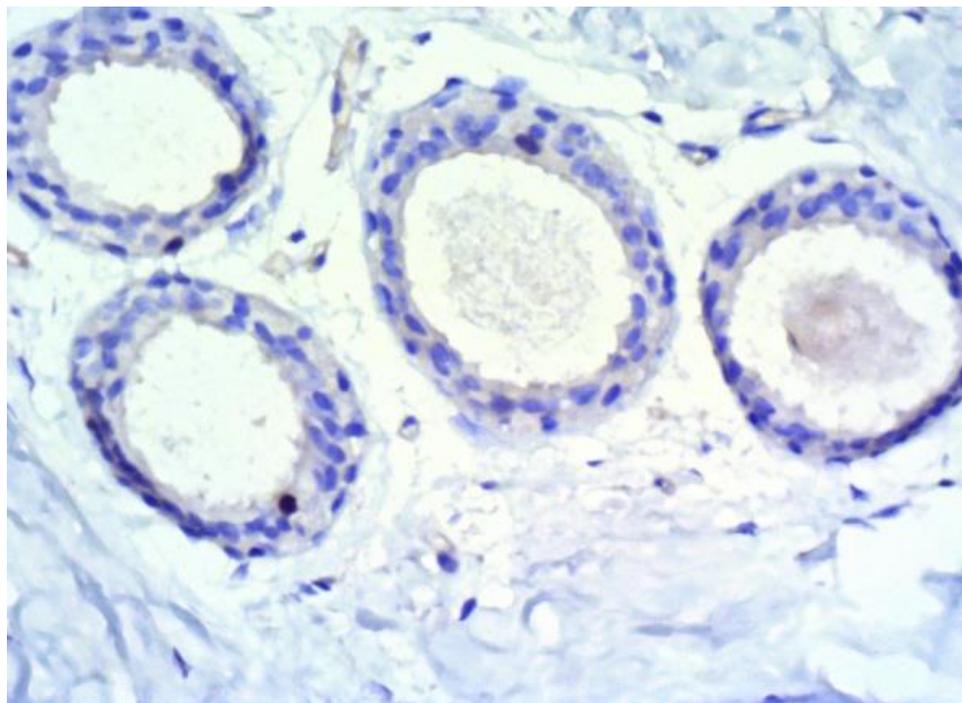
## ОЦЕНКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ФЕРМЕНТА ТОПОИЗОМЕРАЗА- $\alpha$ В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С РАЗНЫМ РЕЦЕПТОРНЫМ СТАТУСОМ

### 3.1. Характеристика экспрессии фермента топоизомеразы- $\alpha$ в норме

Исследованы 12 случаев материала, взятого от пациенток с разными диагнозами в пределах здоровой ткани молочной железы, где уровень экспрессии фермента топоизомеразы-  $\alpha$  составил  $1,8\% \pm 0,3$  (1-3%) (рис.3.1., 3.2.), что согласуется с исследованиями Aejaz Nasir et al (2011).



*Рисунок 3.1. Экспрессия Top-II $\alpha$  в эпителиальных клетках протоков молочной железы  $\times 100$  Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*

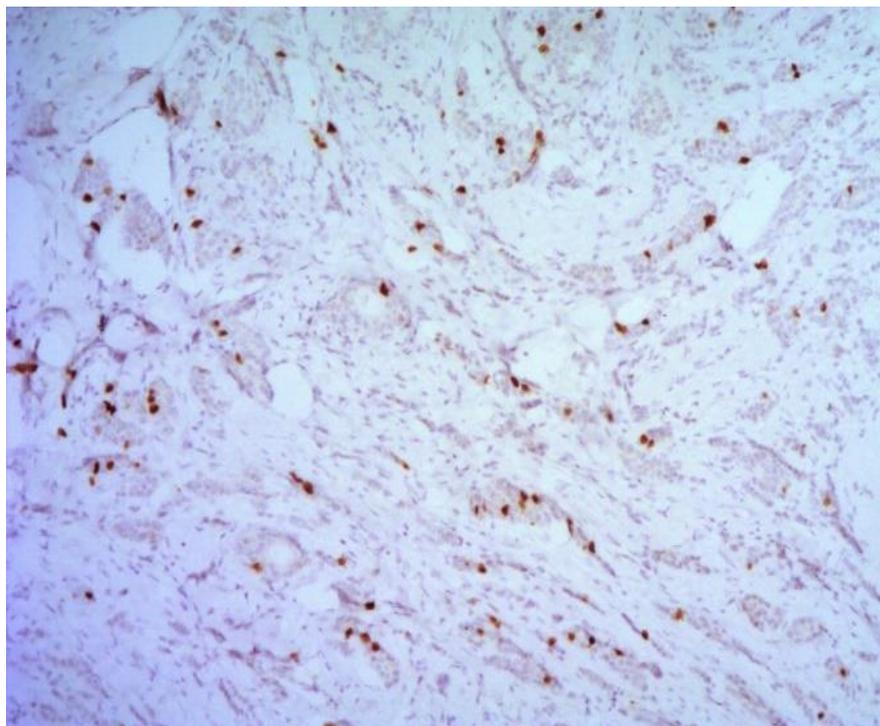


*Рисунок 3.2. Экспрессия Тор-IIα в эпителиальных клетках протоков молочной железы (норма) ×400 Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер гематоксилин Майера*

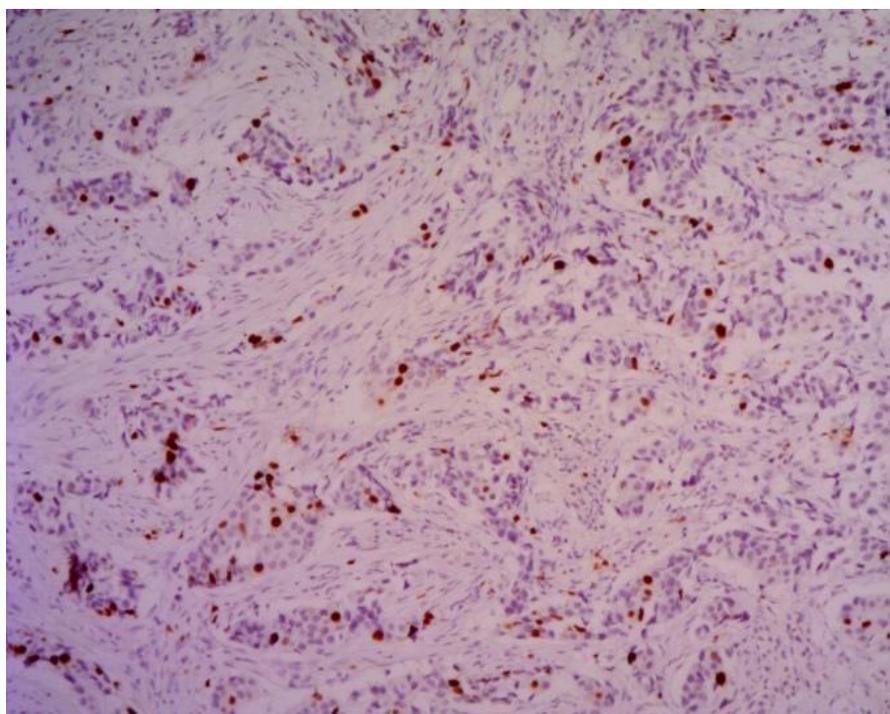
### **3.2. Результаты изучения экспрессии фермента топоизомераза- IIα в клетках инвазивного неспецифического типа рака молочной железы**

#### **3.2.1. Анализ иммуногистохимического окрашивания фермента топоизомераза- IIα в клетках инвазивного неспецифического типа рака молочной железы**

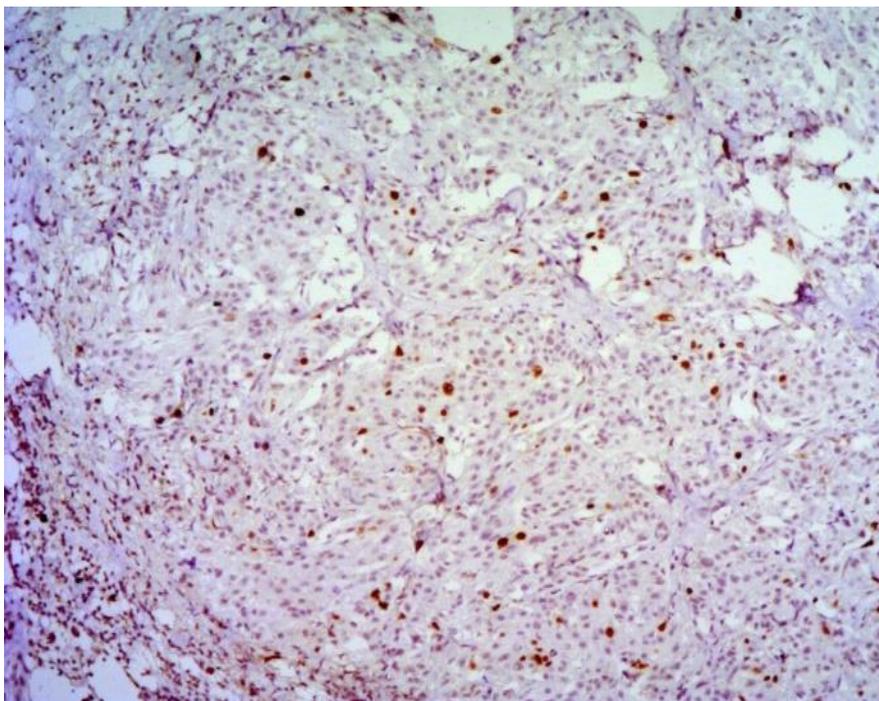
Исследовано 766 случаев инвазивного рака молочной железы иммуногистохимическим методом. Уровень экспрессии Тор-IIα опухолевыми клетками представлен на рисунках 3.2.1.1.- 3.2.1.8.



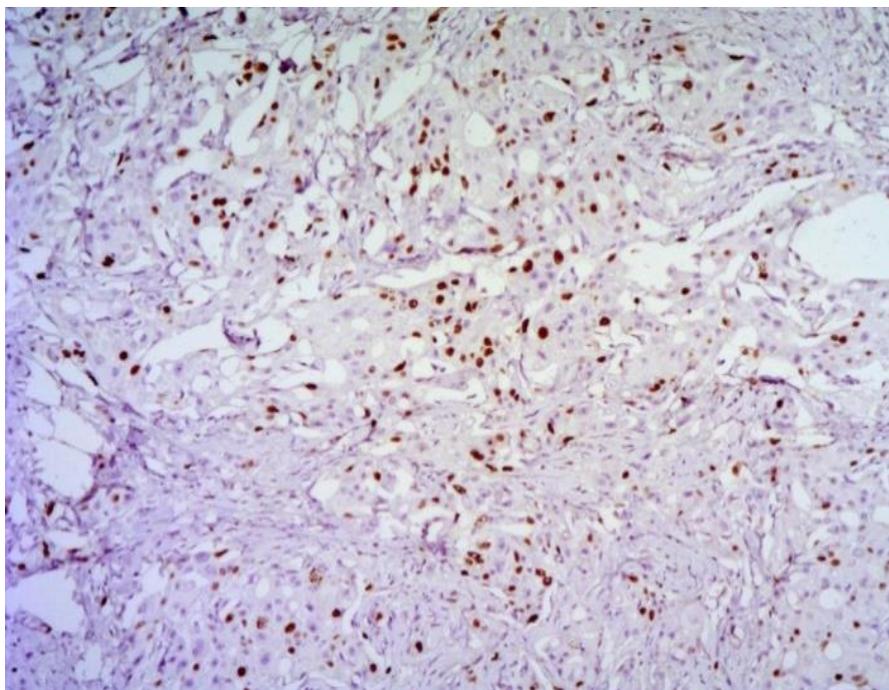
*Рисунок 3.2.1.1. ИГХ- анализ уровня белка Тор-1а в клетках инвазивного неспецифического типа РМЖ, (5% окрашенных ядер), ×100 Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*



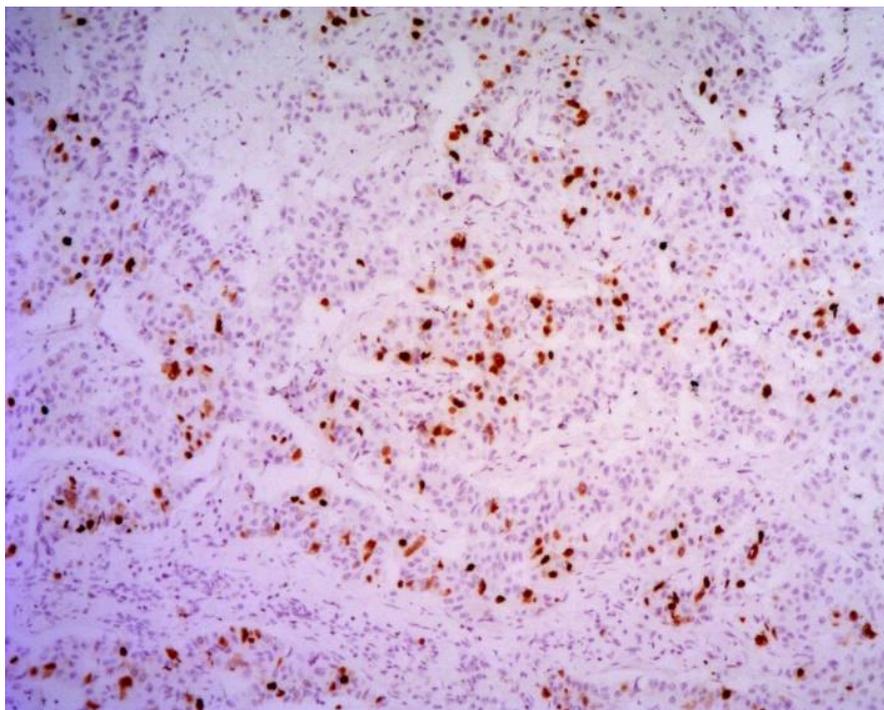
*Рисунок 3.2.1.2. ИГХ- анализ уровня белка Тор-1а клетках инвазивного неспецифического типа РМЖ, (10% окрашенных ядер), ×100 Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*



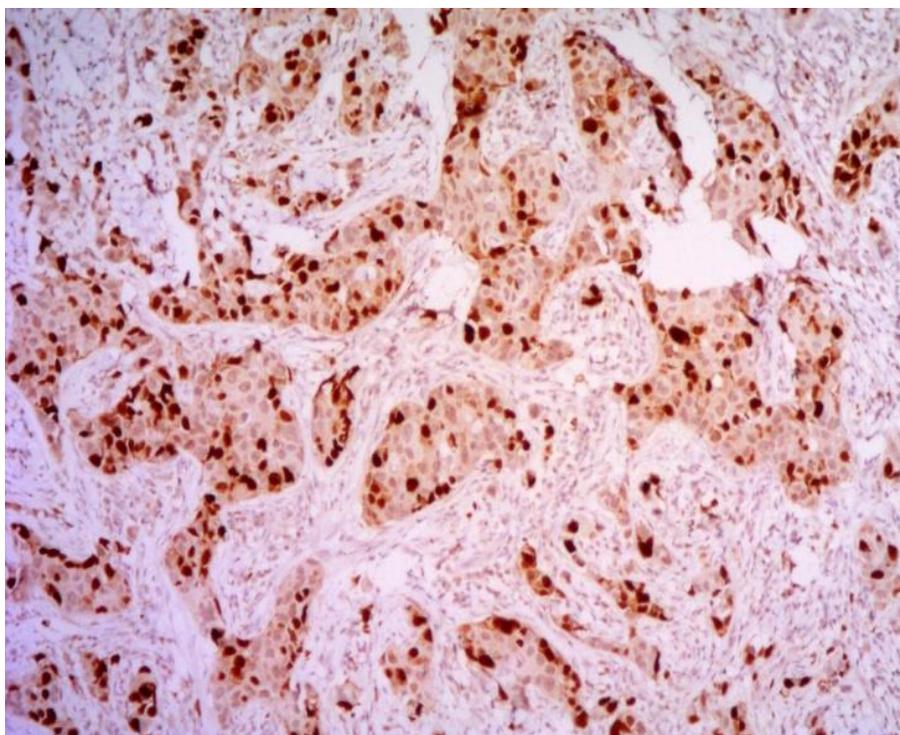
*Рисунок 3.2.1.3. ИГХ- анализ уровня белка Тор-2α клетках инвазивного неспецифического типа РМЖ, (15% окрашенных ядер), ×100 Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*



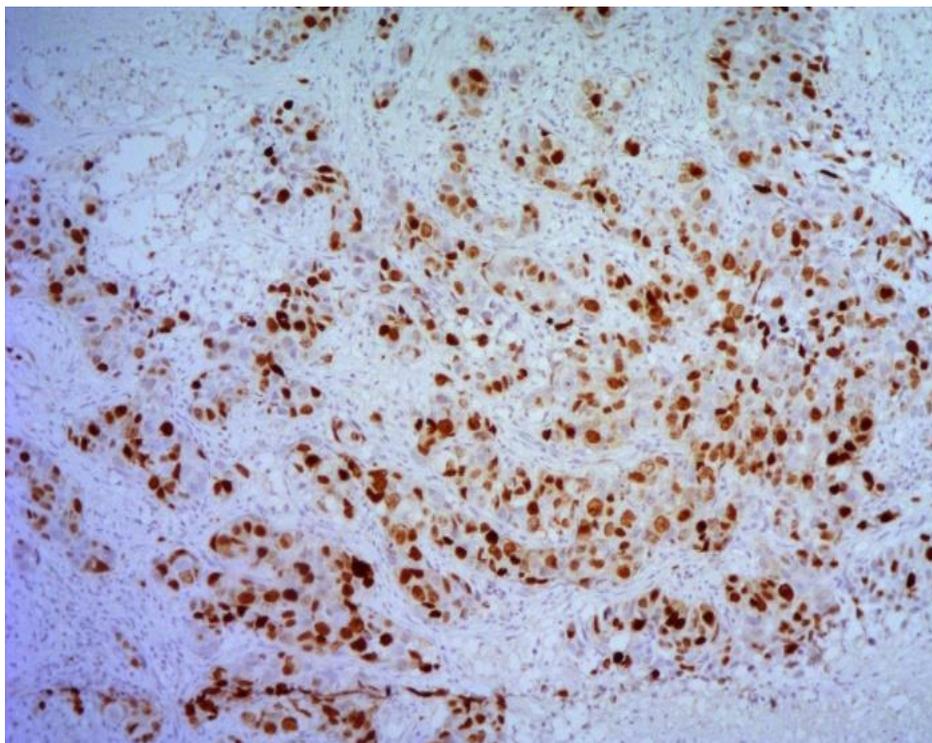
*Рисунок 3.2.1.4. ИГХ- анализ уровня белка Тор-2α клетках инвазивного неспецифического типа РМЖ, (20% окрашенных ядер), ×100 Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*



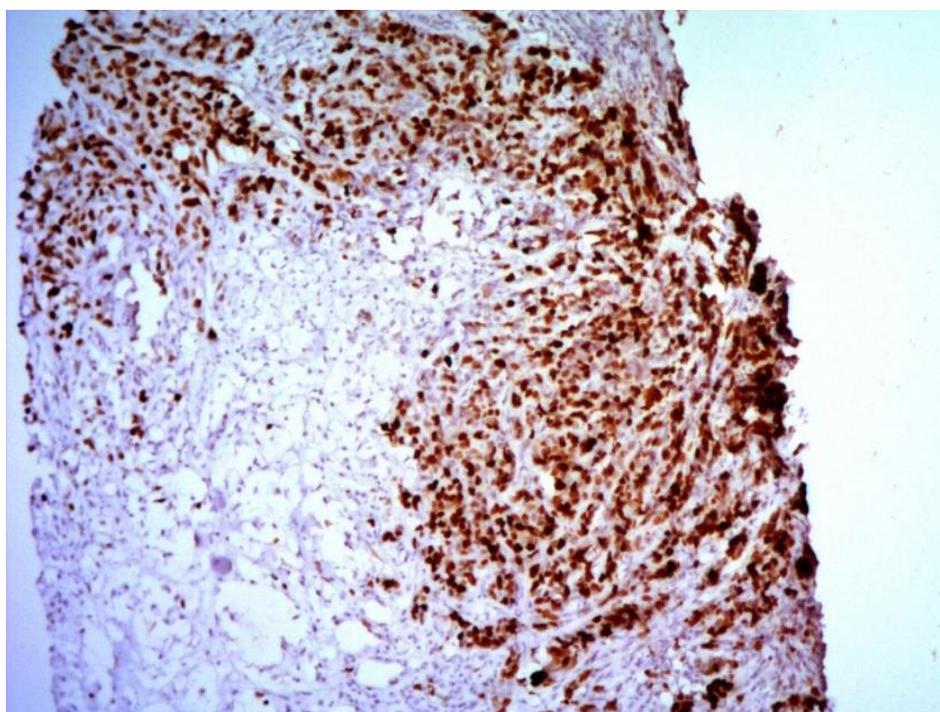
*Рисунок 3.2.1.5. ИГХ- анализ уровня белка Тор-1а, клетках инвазивного неспецифического типа РМЖ (25% окрашенных ядер), ×100 Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*



*Рисунок 3.2.1.6. ИГХ- анализ уровня белка Тор-1а клетках инвазивного неспецифического типа РМЖ, (30% окрашенных ядер), ×100 Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*



*Рисунок 3.2.1.7. ИГХ- анализ уровня белка Тор-Па в клетках инвазивного неспецифического типа РМЖ, (50% окрашенных ядер), ×100 Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*



*Рисунок 3.2.1.8. ИГХ- анализ уровня белка Тор-Па клетках инвазивного неспецифического типа РМЖ, (80% окрашенных ядер), ×100 Окраска: ИГХ реакция HRP/DAB, докраска ядер - гематоксилин Майера*

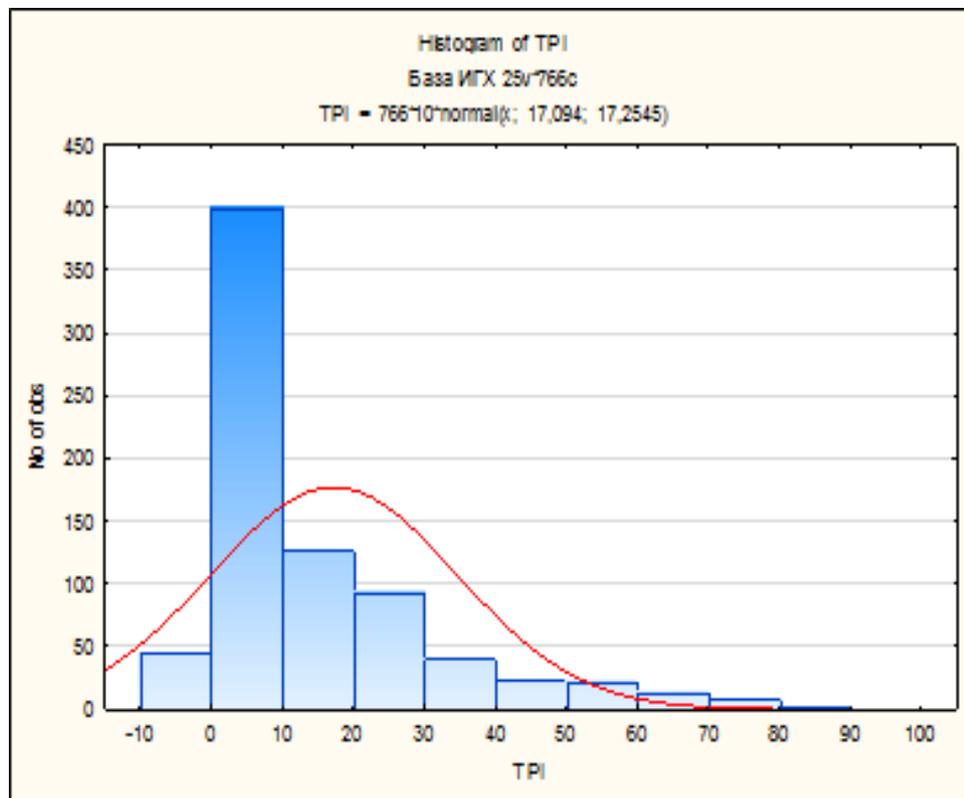
В 766 исследованных случаях инвазивного неспецифического типа рака молочной железы был определен уровень экспрессии белка Топ-IIα (таблица 3.2.1.)

Таблица 3.2.1.

*Уровень экспрессии белка Топоизомеразы II-альфа в клетках РМЖ*

Уровень экспрессии Топ-IIα (%)	Количество случаев (n=766)	
	абс. (n=)	(%)
0	45	5,8
1	8	1
2	23	3
3	18	2,3
5	182	23,7
7	3	0,3
10	165	21,6
15	55	7,3
20	71	9,3
25	26	3,4
30	66	8,6
35	3	0,3
40	36	4,7
45	1	0,1
50	22	2,8
60	21	2,7
70	12	1,5
80	7	0,9
90	2	0,2

Средний уровень экспрессии белка Топ-Па=17,09±0,62% (95% CI: 17,05–17,14); разброс значений (0- 90%); медиальное значение Md=10%; наиболее частое значение (мода) Мо=5% (рисунок 3.2.1.9.).



*Рисунок. 3.2.9. Распределение уровня экспрессии белка Топоизомеразы II-альфа в клетках РМЖ*

Для установления факта наличия или отсутствия зависимости между экспрессией фермента топоизомеразы- Па и другими ИГХ маркерами, а также клиническими показателями по классификации TNM, применяли корреляционный анализ используется коэффициент линейной корреляции Пирсона (r). Высокая значимая корреляция наблюдалась только между экспрессией Топ-Па и Ki-67 (r = 0,74; p<0.05), средняя значимая корреляция обнаружена между рецепторами эстрогена (ER) и прогестерона (PR) (r=0,64; p<0.05), слабая значимая корреляция была обнаружена между клиническими показателями Т (размера опухоли) и N

(метастазированием в регионарные лимфатические лимфоузлы) ( $r=0,38$ ;  $p<0,05$ ). Между остальными показателями корреляция не выявлена (таблица 3.2.1.).

Таблица 3. 2. 1.

*Корреляционный анализ экспрессии ИГХ маркеров и клинических показателей*  
*TNM*

	T	N	M	ER	PR	HeR2/neu	Ki-67	Top-2 $\alpha$
T	1,00	0,28	0,17	-0,11	-0,13		0,20	0,14
N	0,38	1,00	0,06	0,03	0,01	-0,04	0,08	0,03
M	0,17	0,06	1,00	-0,03	-0,03	0,01	0,02	0,02
ER	-0,11	0,03	-0,03	1,00	0,64	0,03	-0,01	-0,01
PR	-0,13	0,01	-0,03	0,64	1,00	0,00	-0,05	-0,04
HER2/neu	-0,11	-0,04	0,01	0,03	0,00	1,00	0,02	0,06
Ki-67	0,20	0,08	0,02	-0,01	-0,05	0,02	1,00	0,74
Top-2 $\alpha$	0,14	0,03	0,02	-0,01	-0,04	0,06	0,74	1,00

### 3.3. Анализ уровня экспрессии белка Top-2 $\alpha$ в группах опухолей с разным статусом рецепторов к гормонам

Все исследованные случаи были разделены на 7 групп в зависимости от статуса рецепторов к гормонам (от 0 до 8 по шкале Allred D.C. et al (1998)). В каждой группе определяли средний уровень экспрессии Top-2 $\alpha$ .

### 3.3.1. Анализ уровня экспрессии белка Топ-IIα в группах опухолей с разным статусом рецепторов к эстрогену (ER)

Из исследованных случаев 35,6% опухолей оказались ER- негативными, 19,5% имели средний уровень экспрессии рецепторов к эстрогену (ИГХ- статус 3, 4, 5) и 44,9% случаев имели высокий уровень экспрессии рецепторов к эстрогену (ИГХ- статус 6, 7, 8) (таблица 3.3.1.1.).

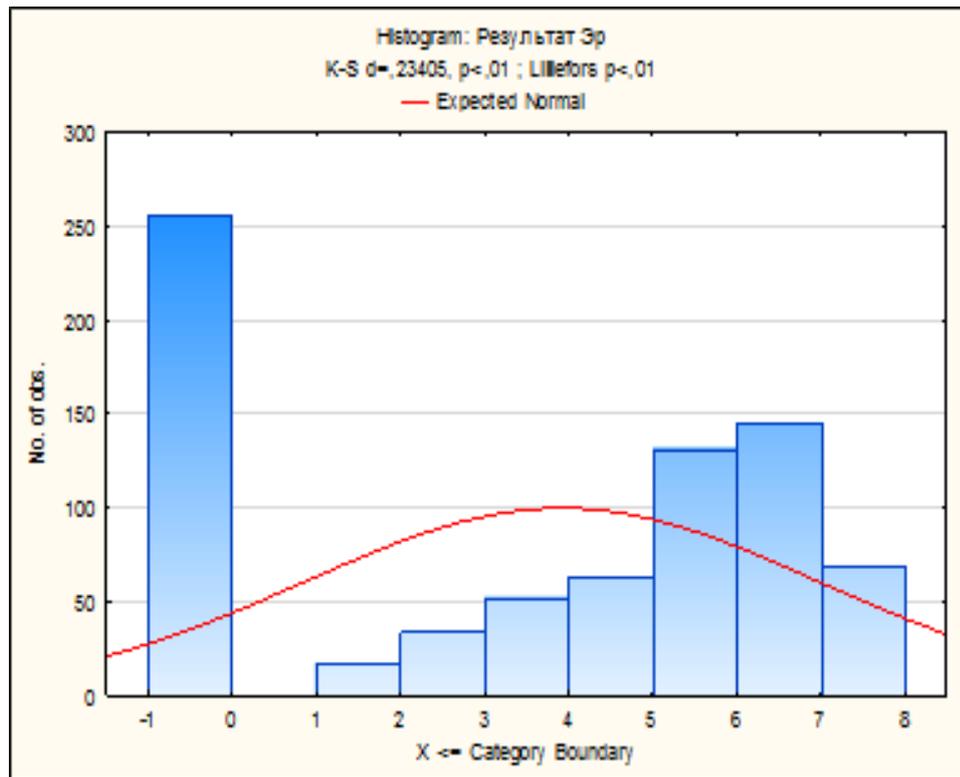
Таблица 3.3.1.1.

*Экспрессия Топ-IIα в группах опухолей с разным уровнем экспрессии ER по шкале Allred D.C. et al (1998)*

ИГХ- статус опухолей (0-8)	Количество случаев (n=766)		Средний уровень экспрессии Топ-IIα (%)
	Абс.	(%)	
0	256	33,4	16,91±0,6%
1	17	2,2	18,23±0,6%
3	34	4,5	17,35±0,6%
4	52	6,7	15,52±0,3%
5	63	8,3	14,81±0,3%
6	131	17,2	18,73±0,3%
7	145	18,9	17,83±0,11%
8	68	8,8	15,93±0,11%

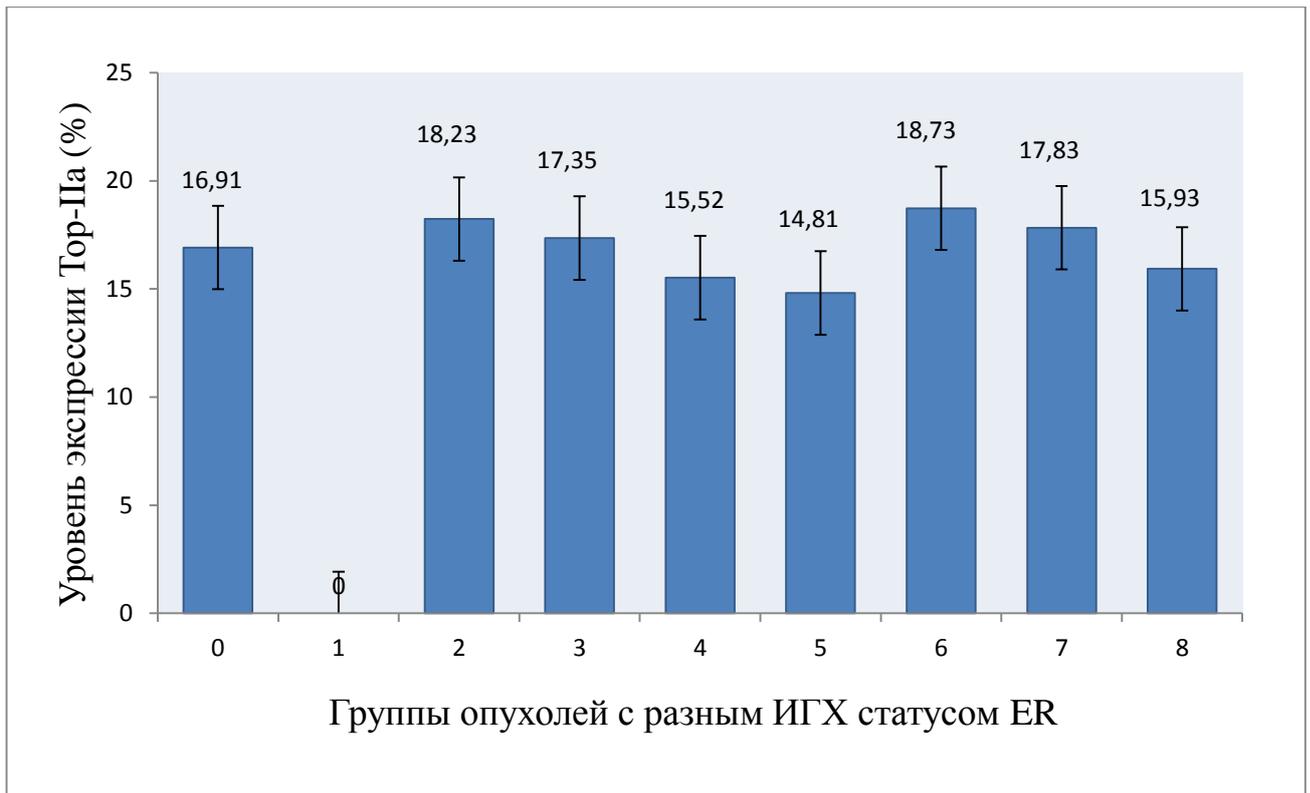
*При сравнении с общим средним значением во всех группах  $p > 0,05$*

При анализе экспрессии рецепторов к эстрогену (ER), наблюдается наличие двух пиков. Чаще встречались две группы: опухоли без экспрессии ER (0 баллов по шкале Allred), отражающие наиболее частое значение и опухоли с высоким уровнем экспрессии ER (6, 7 баллов по шкале Allred) (рисунок 3.3.1.1.).



*Рисунок. 3.3.1.1. Распределение значений экспрессии рецепторов к эстрогену в клетках РМЖ*

При анализе экспрессии белка TopII-α в группах опухолей с разным ИГХ статусом рецепторов к эстрогену (ER) по шкале Allred D.C., et al. (1998), средний уровень TopII-α находится в пределах от  $14,81 \pm 0,3\%$  (в группе ИГХ 5+) до  $18,73 \pm 0,3\%$  (в группе ИГХ 6+) (рисунок 3.3.1.2.).



*Рисунок 3.3.1.2. Средний уровень экспрессии TopII-a в группах опухолей с разным уровнем экспрессии ER по шкале Allred D.C. et al, (1998)*

### **3.3.2. Анализ уровня экспрессии белка Top-IIa в группах опухолей с разным статусом рецепторов к прогестерону (PR)**

Из всех исследованных случаев, 46,9% опухолей оказались PR- негативными, 26,7%- имели средний уровень экспрессии рецепторов к прогестерону (ИГХ-статус 3, 4, 5) и 26,4% случаев имели высокий уровень экспрессии рецепторов к прогестерону (ИГХ- статус 6, 7, 8) (таблица 3.3.2.1.).

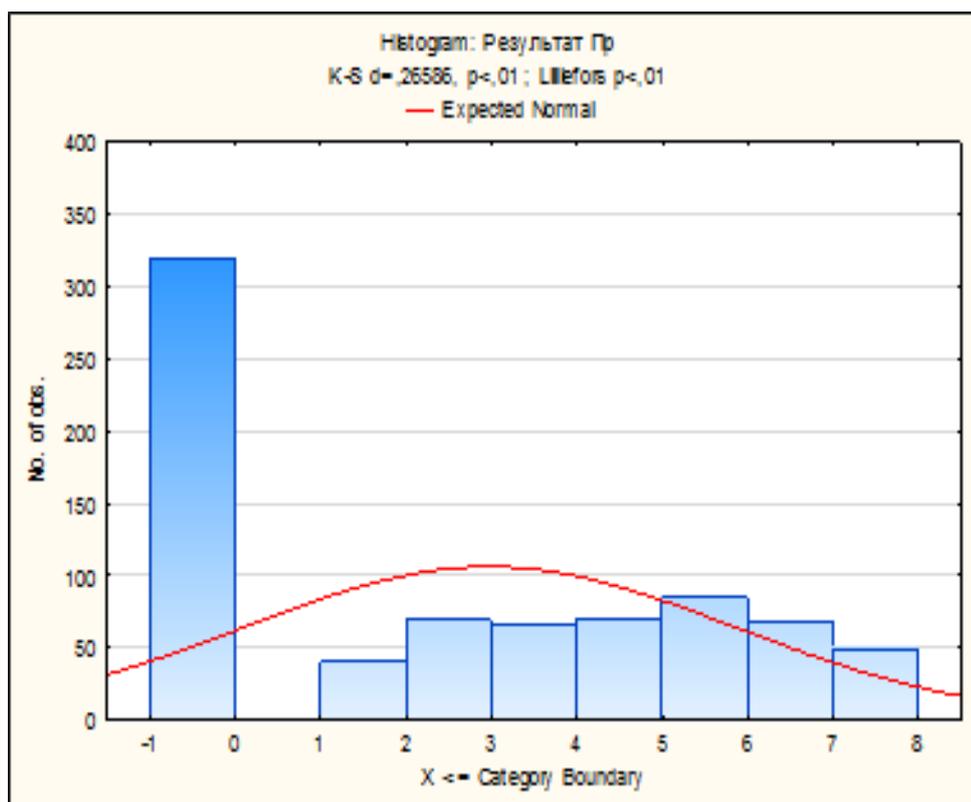
Таблица 3.3.2.1.

*Экспрессия Top-II $\alpha$  в группах опухолей с разным уровнем экспрессии PR по шкале Allred D.C. et al, (1998)*

ИГХ- статус опухолей (0-8)	Количество случаев (n=766)		Средний уровень экспрессии Top-II $\alpha$ (%)
	Абс.	(%)	
0	319	41,7	17,29 $\pm$ 0,6%
1	40	5,2	16,68 $\pm$ 0,3%
3	69	9	16,49 $\pm$ 0,3%
4	66	8,6	17,04 $\pm$ 0,6%
5	70	9,1	18,39 $\pm$ 0,91%
6	85	11,1	16,25 $\pm$ 0,3%
7	68	8,9	18,28 $\pm$ 0,91%
8	49	6,4	15,12 $\pm$ 0,3%

*При сравнении с общим средним значением во всех группах  $p > 0,05$*

При анализе экспрессии рецепторов к прогестерону (PR), наблюдается смещение центральной тенденции в сторону опухолей без экспрессии PR (ИГХ 0) и распределение остальных групп опухолей по уровню экспрессии PR было равномерным (рисунок 3.3.2.1.).



*Рисунок. 3.3.2.1. Распределение значений экспрессии рецепторов к прогестерону (PR) в клетках РМЖ*

При анализе экспрессии белка Тор-II $\alpha$  в группах опухолей с разным ИГХ статусом рецепторов к прогестерону (PR), средний уровень экспрессии Тор-II $\alpha$  находится в пределах  $15,1 \pm 0,11$  (в группе ИГХ 8+) –  $18,39 \pm 0,11\%$  (в группе ИГХ 5+) (рисунок 3.3.2.2.).

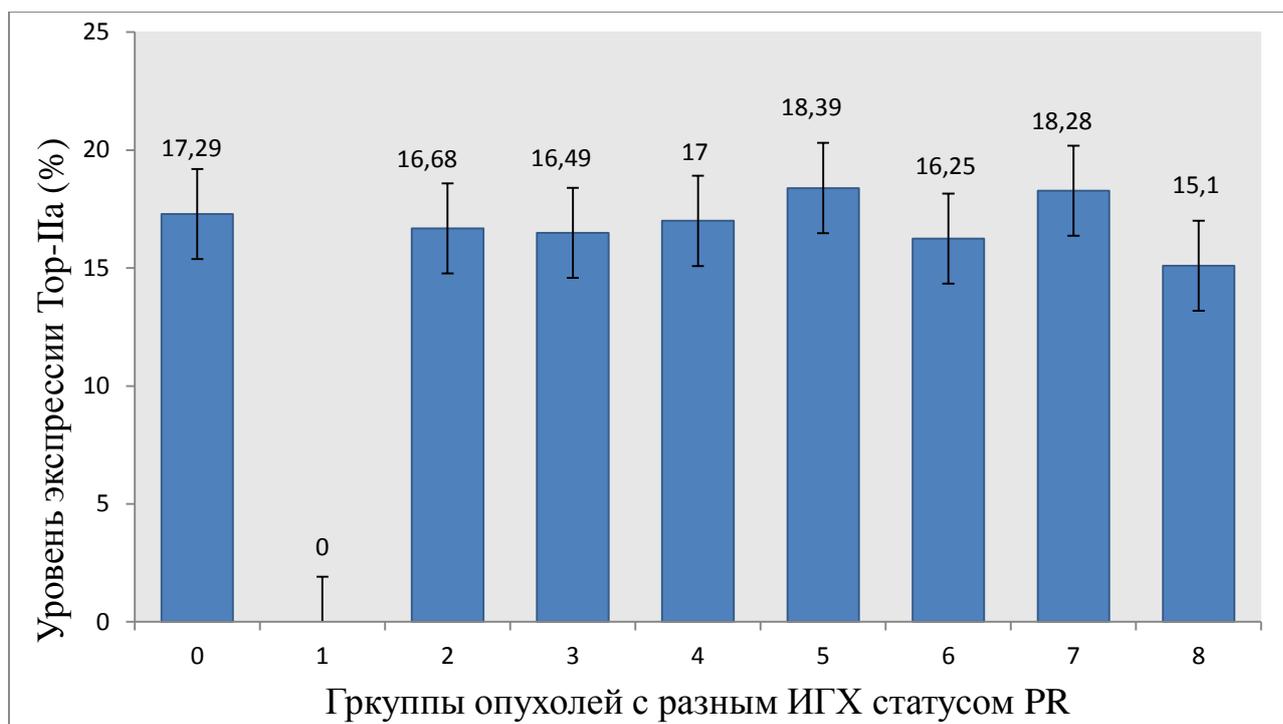


Рисунок 3.3.2.2. Средний уровень экспрессии TopII-α в группах с разным уровнем экспрессии PR по шкале Allred D.C. et al (1998)

### 3.3.3. Анализ уровня экспрессии TopII-α в группах инвазивного неспецифического типа РМЖ с коэкспрессией рецепторов к эстрогену и прогестерону

Ген рецептора прогестерона является эстроген - регулируемым геном. Рецептор PR может быть обнаружен в ER- отрицательных случаях при ложно негативном анализе PR или при очень низкой концентрации ER, которая неспособна распознаваться антителами, но еще способна стимулировать экспрессию PR, поэтому данный результат определяют как ложно негативный (Payne J.L. et al, 2008; Allred D.C. et al, 1998). На основании выше изложенного все случаи инвазивного РМЖ были разделены на три группы, исключая группу ER-/PR+. Внутри групп средний уровень экспрессии белка топоизомераза- IIα достоверно не отличался от среднего общего уровня экспрессии TopIIα ( $17,09 \pm 0,62\%$ ), (таблица 3.3.3.1.).

Таблица 3.3.3.1.

Уровень экспрессии ТопII-α в группах инвазивного неспецифического типа РМЖ с коэкспрессией рецепторов к эстрогену (ER) и прогестерону (PR)

Статус опухоли	Абс. (n=)	(%)	Средн. значение Топ-IIα (%)
ER+/PR+	447	58,4	16,95 ±0,2%
ER+/PR-	96	12,5	17,35 ±0,25%
ER-/PR-	223	29,1	17,26±0,38%

Во всех группах с совместной экспрессией рецепторов к гормонам наблюдалось медиальное значение экспрессии Топ-IIα Md=10%; наиболее частое значение (мода) Мо = 5% (риснок 3.3.3.1.).

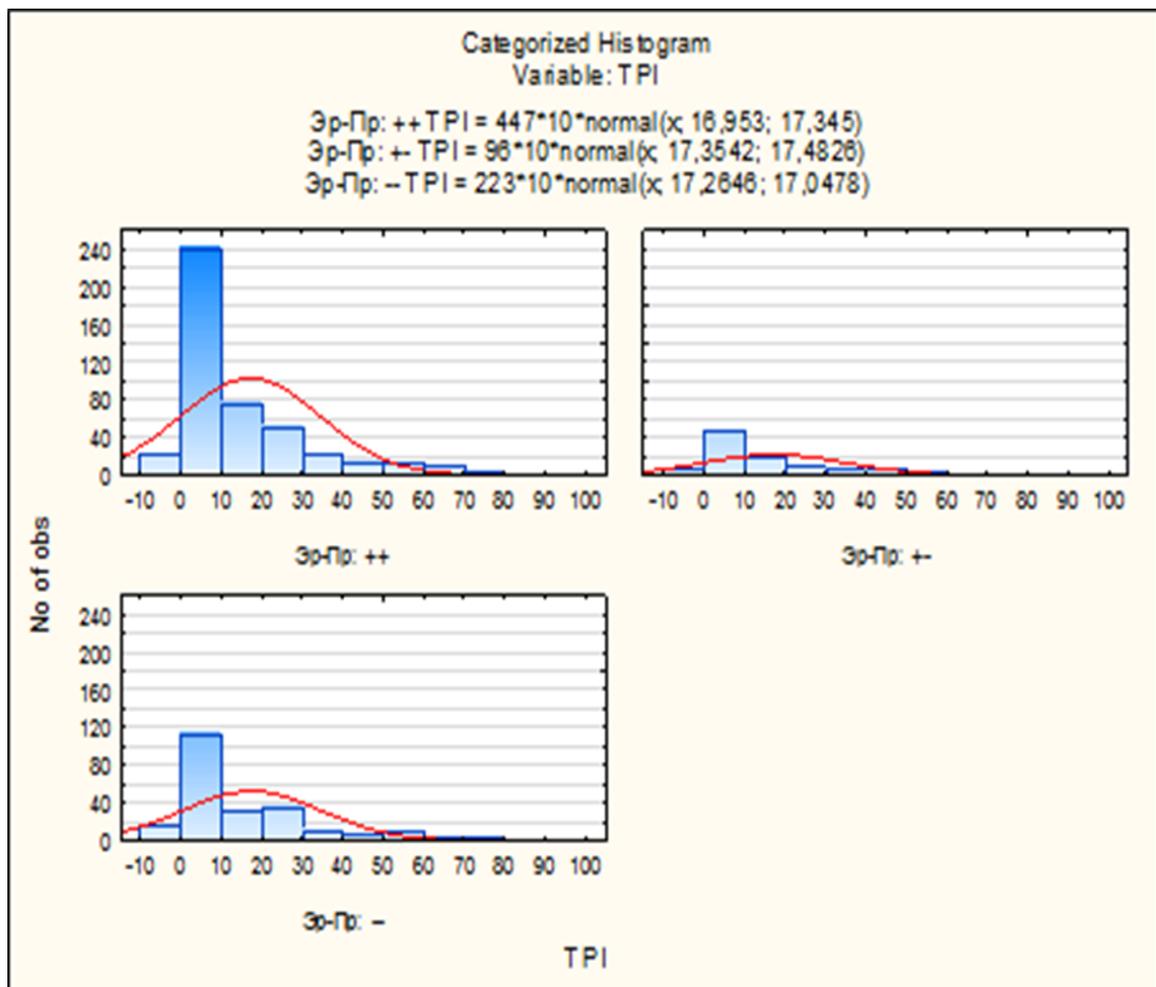


Рисунок 3.3.3.1. Распределение значений экспрессии белка топоизомераза-IIα в группах инвазивного неспецифического типа РМЖ с совместной экспрессией рецепторов к эстрогену (ER) и прогестерону (PR)

При корреляционном анализе с использованием коэффициента линейной корреляции Пирсона ( $r$ ), между экспрессией белка Top-II $\alpha$  и ER, PR корреляция не выявлена для (ER  $r = -0,01$ , для PR  $r = -0,04$ ;  $p < 0,05$  (табл. 3.2.1.).

Для корреляционного анализа экспрессии Top-II $\alpha$  была осуществлена проверка на возможность применения гипотезы о нормальном распределении к параметрам выборки. При проверке гипотезы о нормальном распределении ( $\chi^2$ ), был произведен расчёт эмпирического хи-квадрат ( $\chi^2_{\text{эмп.}}$ ). При сравнении с хи-квадрат критическим удалось установить, что  $\chi^2_{\text{эмп.}} \gg \chi^2_{\text{кр.}}$ , следовательно, гипотеза о нормальном распределении Пирсона отвергается. Поэтому для расчёта корреляции использовали ранговые критерии Спирмена. Значимость коэффициента определялась автоматически программой STATISTICA 10.

При оценке корреляции в ранговой шкале с помощью непараметрического критерия Спирмена ( $r$ -Spearman's). Между Top-II- $\alpha$  и PR, ER значимая корреляция не выявлена (Top-II- $\alpha$  и PR  $R_{(s)} = -0,206206$ ;  $p < 0,05$ ; Top-II- $\alpha$  и ER  $R_{(s)} = 0,107469$ ;  $p < 0,05$ ), внутри групп с коэкспрессией обоих рецепторов PR, ER корреляция также не выявлена (между Top-II- $\alpha$  и ER  $R_{(s)} = 0,189958$ ;  $p < 0,05$ ; между Top-II- $\alpha$  и PR  $R_{(s)} = -0,290028$ ;  $p < 0,05$ ) (Рисунок. 3.3.3.2.).

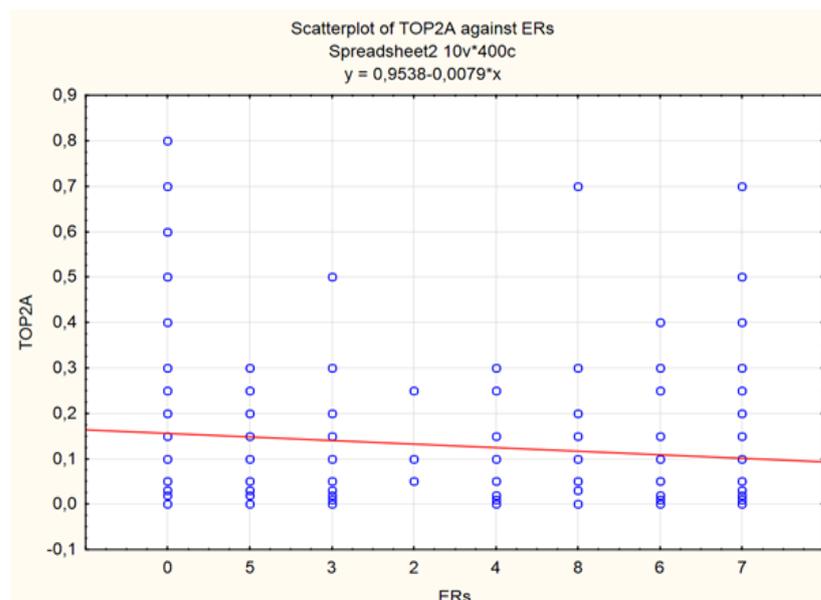


Рисунок 3.3.3.2. График рассеивания значений при корреляционном анализе по критерию Спирмена между Top-II $\alpha$  и ER, PR

При оценке корреляции с помощью непараметрического критерия Спирмена (r-Spearman's) между экспрессией маркера клеточной пролиферации Ki-67 и экспрессией рецепторов стероидных гормонов также корреляция не выявлена (между Ki-67 и PR  $R_{(s)} = -0,259825$ ;  $p < 0,05$ , Ki-67 и ER  $R_{(s)} = -0,173846$ ;  $p < 0,05$ ), внутри групп корреляция также отсутствует (Рис. 3.3.3.3.).

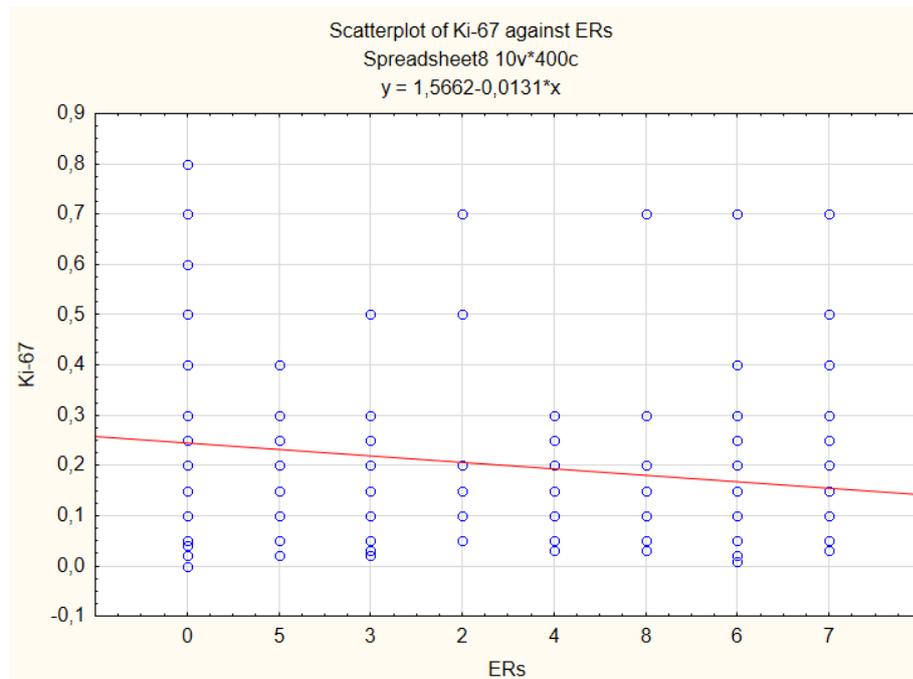


Рисунок 3.3.3.3. График рассеивания значений при корреляционном анализе по критерию Спирмена между Ki-67 и рецепторами ER, PR

Отсутствие корреляции между экспрессией рецепторов к гормонам и ядерными белками Тор-Па, Ki-67 подтверждает, что гормон-зависимые пути регуляции в опухолевых клетках молочной железы не влияют на экспрессию Тор-Па, что согласуется с данными литературы (Nikolényi A. et al, 2012).

### 3.4. Анализ экспрессии белка Тор-IIα в группах опухолей с разным статусом Her2/neu в клетках инвазивного неспецифического типа РМЖ

Исследованные 766 случаев инвазивного неспецифического типа РМЖ случаи были разделены на 4 группы с разным иммуногистохимическим статусом мембранного рецептора Her2/neu по шкале от 0 до 3+ (Bilous M. et al, 2003; Wolf F. et al, 2007). В каждой группе определялся средний уровень экспрессии Тор-IIα.

В половине исследованных опухолей (50,5%) на мембранах клеток не определялся рецептор Her2/neu (ИГХ- статус 0) и только 15,7 % опухолей имели гиперэкспрессию Her2/neu (ИГХ- статус 3+) (таблица 3.4.1.).

Таблица 3.4.1.

*Экспрессия Тор-IIα в группах опухолей с разным уровнем экспрессии белка Her2/neu в клетках РМЖ*

ИГХ- статус опухолей (0-3+)	Количество случаев (n=766)		Средний уровень экспрессии Тор-IIα (%)
	Абс.	(%)	
0	387	50,5	17,02±1,5%
1+	106	13,8	14,69±1,3%
2+	153	20	<b>12,06±1,3%*</b>
3+	120	15,7	<b>22,60±0,77%*</b>

*\*p<0,05, при сравнении с общим средним значением*

Средний уровень экспрессии Her2/neu=1,01 (95% CI:1,0- 1,01); разброс значений (0- 3 согласно шкале); медиальное значение Md=0; наиболее частое значение (мода) Mo=0 (Рисунок 3.4.2.).

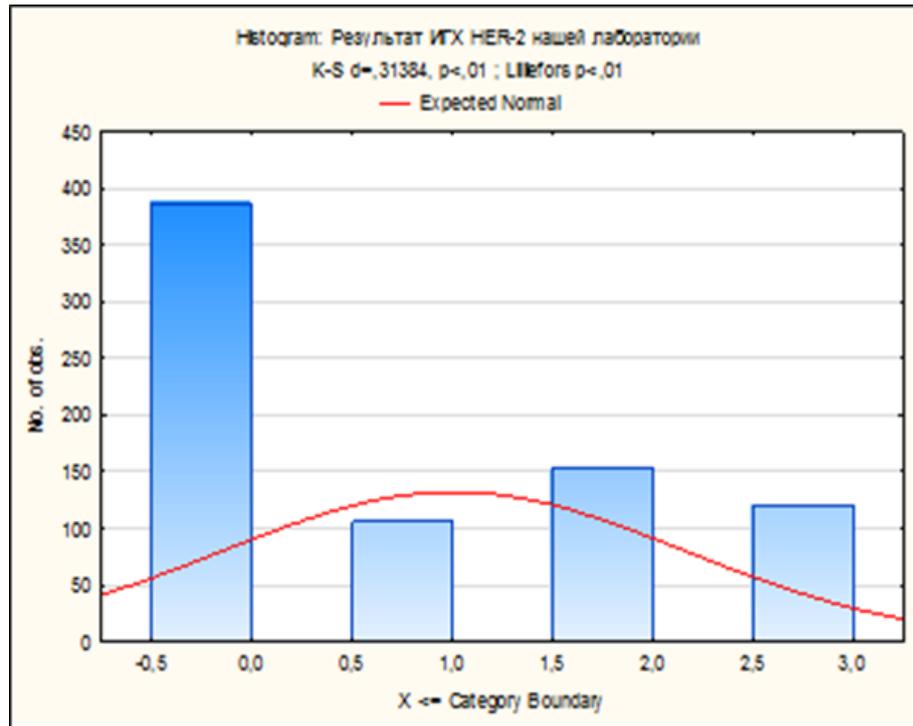


Рисунок. 3.4.2. Распределение уровня экспрессии белка Her2/neu в клетках РМЖ

При анализе экспрессии белка Тор-Па в группах опухолевых клеток с разным ИГХ статусом рецепторов Her2/neu обнаружено повышение уровня экспрессии Тор-Па, в группе с гиперэкспрессией Her2/neu (ИГХ 3+) до  $22,6 \pm 0,77\%$ . В группе клеток не экспрессирующих Her2/neu (ИГХ 0) средний уровень экспрессии Тор-Па составил  $17 \pm 1,5\%$ , в группах со статусом Her2/neu (ИГХ 1+; 2+) средний уровень Тор-Па составлял ( $14,69 \pm 1,3\%$ ;  $12,06 \pm 1,3\%$  соответственно) (рисунок 3.4.3.).

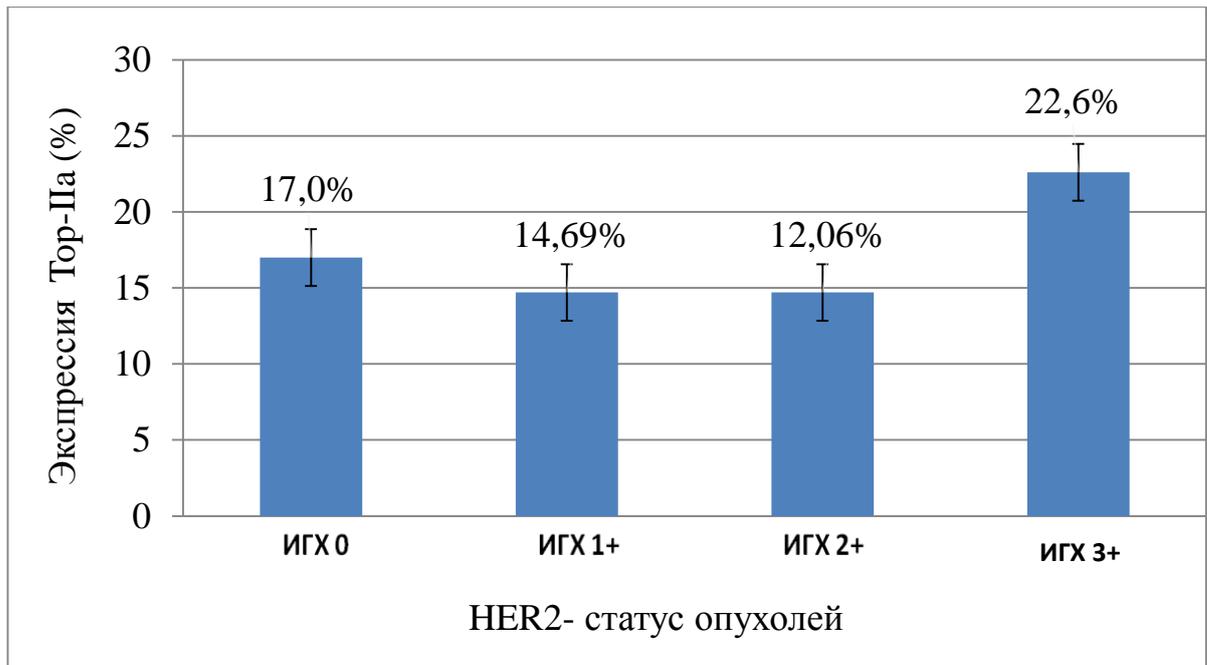


Рисунок 3.4.3. Средний уровень экспрессии Top-IIa в группах с разным ИГХ-статусом рецептора Her2/neu: 1- Her2/neu (ИГХ 0); 2- Her2/neu (ИГХ 1+); 3- Her2/neu (ИГХ 2+); 4- Her2/neu (ИГХ 3+)

Для оценки достоверности различия экспрессии Top-IIa в группах опухолей с различным Her2/neu ИГХ- статусом и общим средним общим значением Top-IIa ( $17,09 \pm 0,62\%$ ) использовался t- критерий Стьюдента.

При оценке достоверности разности средних значений экспрессии Top-IIa в группе опухолей с гиперэкспрессией рецептора Her2/neu (ИГХ 3+) ( $22,6 \pm 0,77\%$ )  $T_{эмп} = 3,3$  ( $p < 0,05$ ),  $T_{эмп} > T_{кр}$  ( $= 1,96$ ;  $p < 0,05$ ), следовательно, полученные различия достоверны. При изучении уровня экспрессии Top-IIa в группе опухолей с Her2/neu (ИГХ 0) (среднее значение Top-IIa  $17 \pm 1,5\%$ )  $T_{эмп} = 0,13$  ( $p < 0,05$ ), что меньше критического значения ( $= 1,96$ ;  $p < 0,05$ ). Подобные результаты получены и в группе Her2/neu (ИГХ 1+) (среднее значение Top-IIa  $14,69 \pm 1,3\%$ ), где  $T_{эмп} = 1,4$  ( $p < 0,05$ ), что достоверно ниже критического значения ( $T = 1,96$ ;  $p < 0,05$ ), следовательно значения экспрессии Top-IIa в данных группах опухолей достоверно не отличаются от среднего общего уровня экспрессии Top-IIa.

При оценке достоверности различия средних значений экспрессии Top-IIa в группе опухолей Her2/neu (ИГХ 2+) (среднее значение Top-IIa  $12,06 \pm 1,3\%$ ) и

общим средним значением,  $T_{эмп}=2,0$ ;  $p<0,05$ ,  $T_{эмп}>T_{кр}$  ( $T=1,96$ ;  $p<0,05$ ), следовательно, полученные различия достоверны.

Среднее значение экспрессии Тор-Па в группе с гиперэкспрессией рецептора Her2/neu (ИГХ 3+) ( $22,6\pm 0,77\%$ ) статистически достоверно выше чем в группах с Her2/neu (ИГХ 0)  $T_{эмп} = 3,0$ ; в группах с Her2/neu (ИГХ 1+)  $T_{эмп} = 3,5$ ; в группах с Her2/neu (ИГХ 2+)  $T_{эмп} = 3,0$ .

Таким образом, уровень экспрессии Тор-Па достоверно выше в опухолях с гиперэкспрессией рецептора Her2/neu (ИГХ 3+), а также выше среднего общего значения экспрессии Тор-Па. Уровень экспрессии Тор-Па в группе опухолей с Her2/neu (ИГХ 2+) достоверно ниже общего среднего значения экспрессии Тор-Па ( $17,09\pm 0,62\%$ ).

При корреляционном анализе полученных данных с использованием коэффициента линейной корреляции Пирсона ( $r$ ), между экспрессией белка Тор-Па и Her2/neu корреляция не выявлена ( $r = 0,06$ ;  $p < 0,05$ ) (Табл. 3.3.2.3.).

Удалось обнаружить слабую положительную значимую корреляцию между Her2/neu и Тор-Па, используя ранговые критерии Спирмена ( $R_{(s)} = 0,110869$ ;  $p < 0,05$ ) (Рисунок 3.4.4.).

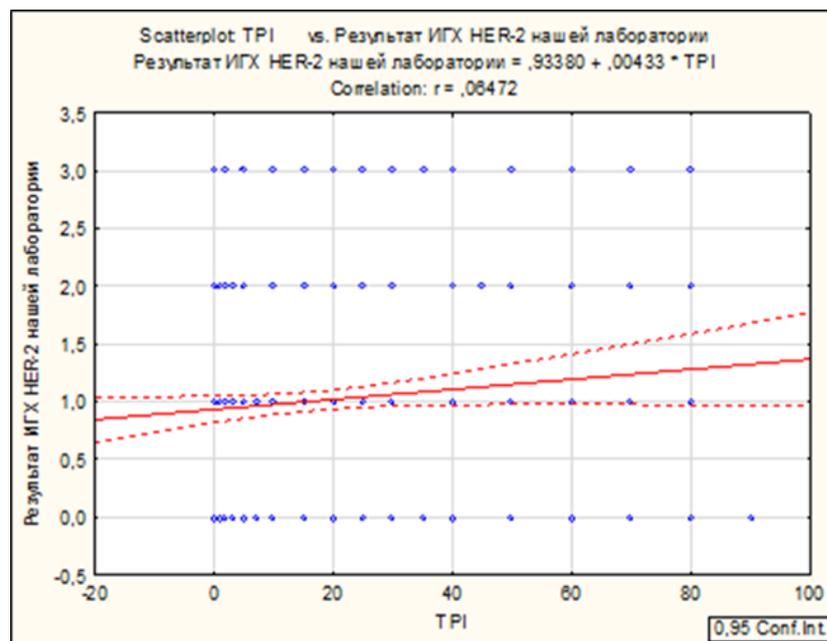


Рисунок. 3.4.4. График рассеивания значений при ранговой корреляции Спирмена между экспрессией Тор-Па и Her2/neu в клетках РМЖ

### 3.4.1. Результаты исследования зависимости экспрессии Топ-IIα от амплификации гена HER2 в группе раковых клеток с Her2/neu ИГХ статусом 2+

152 случая рака молочной железы со статусом HER2/neu 2+ были исследованы молекулярно-генетическим методом FISH. Для определения амплификации гена HER2/neu срезы получали с тех же парафиновых блоков, которые использовались для иммуногистохимического исследования. Статус гена HER2 определялся отношением среднего числа копий данного гена к среднему числу копий хромосомы 17 в клетках РМЖ. При соотношении HER2: CHR17 более 2 наличие амплификации считали установленным (Завалишина Л.Э., Франк Г.А., 2006; George L. Kumar, Rudbeck L., 2011).

В зависимости от наличия или отсутствия амплификации гена Her2/neu все случаи были разделены на две группы (таблица 3.4.2.1.).

Таблица 3.4.1.1.

*Экспрессия Топ-IIα в группах опухолей с Her2/neu (ИГХ 2+) в зависимости от амплификации гена Her2/neu.*

Показатели Топ-IIα	амплификация гена Her2/neu n=31 (20,4%)	без амплификации гена Her2/neu n=121 (79,6%)
Среднее значение (%)	20,35±3,36%	15,92±1,53%
95% CI:	[19,12 ; 21,59]	[15,64 ; 16,19]
Медиана (%)	15	10
Мода (%)	5	5

Средний уровень экспрессии белка Топ-IIα в группе с амплификацией гена Her2/neu выше на 4,43%, но статистически достоверной разницы не выявлено (p=0,24), т.о. изменения экспрессии белка Топ-IIα могут идти независимо от амплификации гена HER2/neu.

### 3.5. Результаты исследования экспрессии тпоизомеразы- Па в опухолях с различным уровнем экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki-67

766 случаев инвазивного неспецифического типа РМЖ были разделены на 3 группы, в которых определялся средний уровень экспрессии Top-Па. Если в исследуемом образце менее 10% клеток имеют положительный результат ИГХ реакции, то экспрессия характеризуется как низкая; если от 10 до 20% - как пограничная; если более 20% - высокая экспрессия (Jalava P., Kuorio T., 2006) (таблица 3.5.1.).

Таблица 3.5.1.

Экспрессия Top-Па в группах опухолей с разным уровнем экспрессии белка Ki-67 в клетках РМЖ

Уровень экспрессии Ki-67	Количество случаев (n=766)		Средний уровень экспрессии Top-Па (%)
	Абс.	(%)	
<10%	145	18,9	<b>5,37±0,74%*</b>
10-20%	286	37,4	<b>10,19±0,46%*</b>
>20%	335	43,7	<b>28,07±1,06%*</b>

\* $p < 0,001$ , при сравнении с общим средним значением

При анализе экспрессии Ki-67 наблюдается смещение центральной тенденции относительно среднего показателя в сторону меньших значений. Средний уровень экспрессии белка Ki-67=26,34±0,05% (95% CI: 26,28–26,39); разброс значений (0-90%); медиальное значение Md= 20%; наиболее частое значение (мода) Mo = 10% (Рис. 3.5.1.).

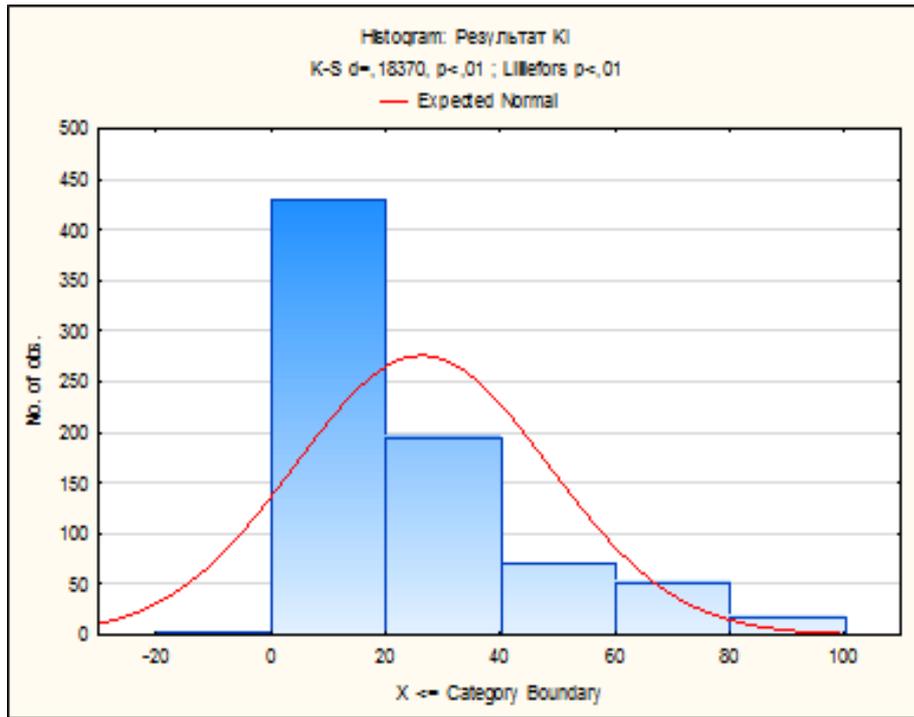
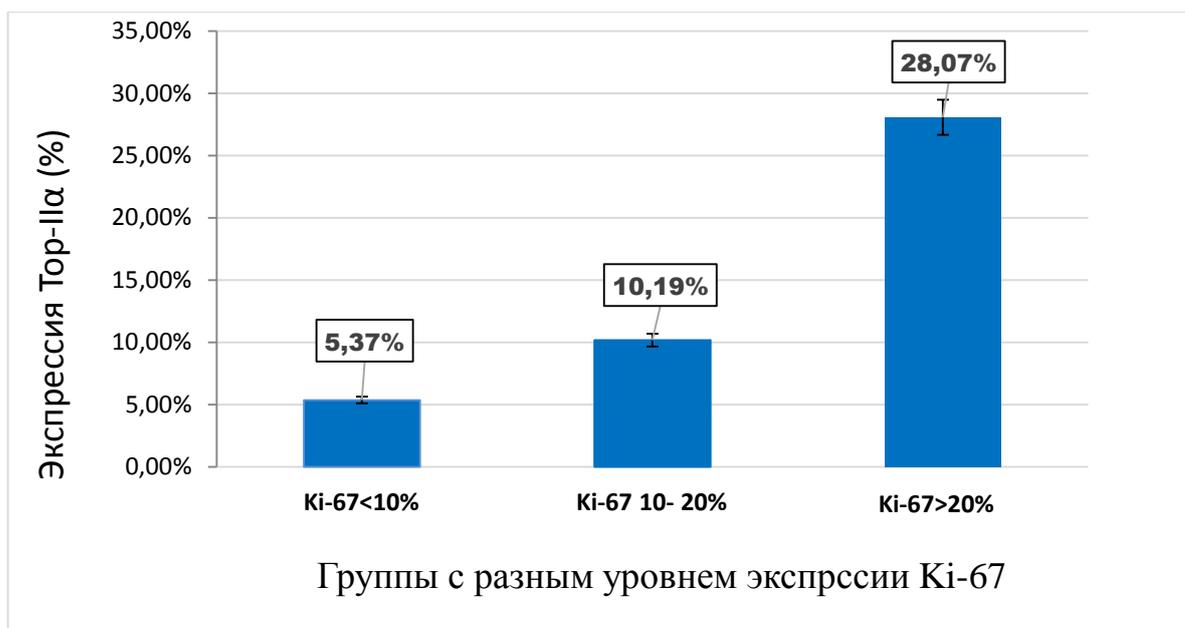


Рисунок. 3.5.1. Уровень экспрессии Ki-67 в клетках РМЖ

В группе опухолей с высоким уровнем экспрессии Ki-67 (>20%) обнаружен наиболее высокий показатель экспрессии Top-IIa ( $28,07 \pm 1,06\%$ ), который достоверно выше среднего общего уровня экспрессии Top-IIa в ( $17,09 \pm 0,62\%$ ). В группах с низким и средним уровнем экспрессии Ki-67, средний уровень экспрессии Top-IIa составлял  $5,37 \pm 0,74\%$ ;  $10,19 \pm 0,46\%$  соответственно и был достоверно ниже общего среднего уровня экспрессии Top-IIa ( $17,09 \pm 0,62\%$ ) (Рис. 3.5.2.).



*Рисунок 3.5.2. Средний уровень экспрессии Top-IIα в группах опухолевых клеток с различным уровнем экспрессии Ki-67*

Для установления факта наличия или отсутствия зависимости экспрессии между Ki-67 и Top-IIα применяли корреляционный анализ используется коэффициент линейной корреляции Пирсона ( $r$ ). Между экспрессией Top-IIα и Ki-67 выявлена высокая значимая корреляция ( $r = 0,74$ ;  $p < 0.05$ ) (таблица 3.2.3.).

### **3.6. Анализ экспрессии фермента тптоизомеразы- IIα в опухолях с различным рецепторным статусом**

Для анализа экспрессии Top-IIα, на основании иммуногистохимической реакции все случаи были разделены на ER/PR- негативные опухоли (статус ИГХ 0, 2 по шкале Allred) и RE/PR- позитивные опухоли (статус ИГХ 3 -8 по шкале Allred); HER-2 – негативные (статус ИГХ 0, 1+, 2+ без амплификации гена) и HER-2- позитивные (статус ИГХ 3+, 2+ с амплификацией гена); с низким уровнем экспрессии Ki-67 (<20%) и высоким уровнем экспрессии Ki-67 (>20%) (таблица 3.6.1.).

Таблица 3.6.1.

Уровень экспрессии Топ-Па между группами опухолей с различным ИГХ статусом

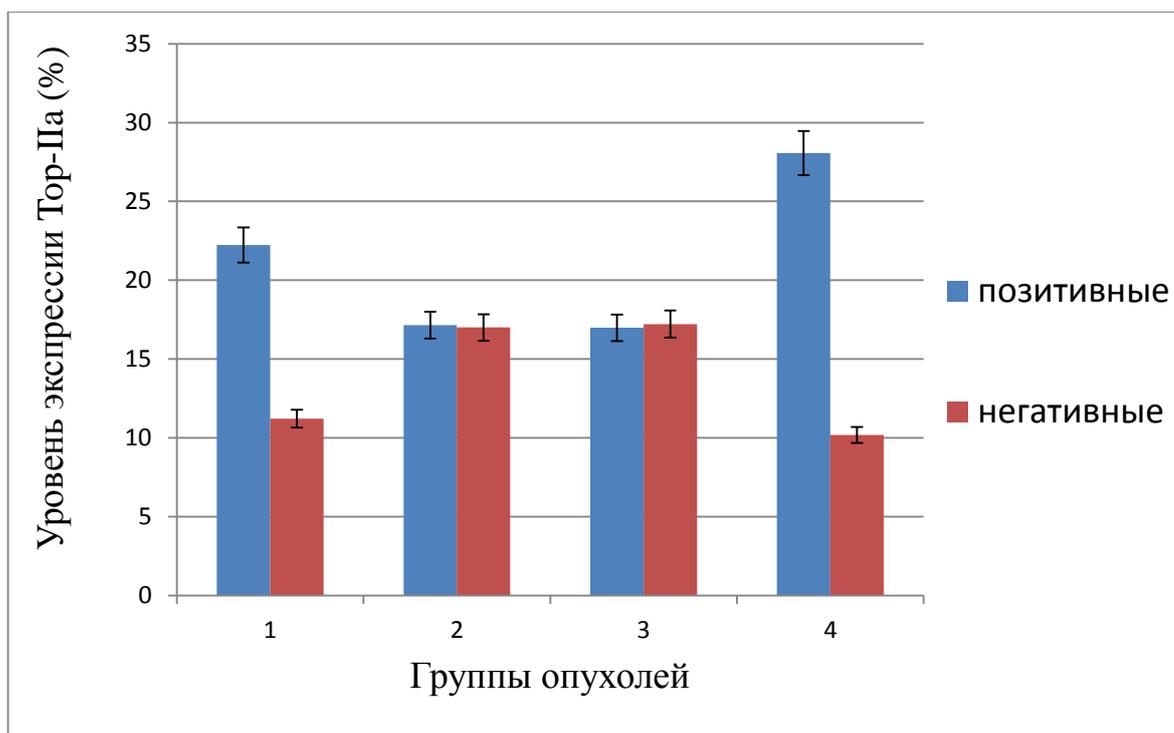
ИГХ статус опухоли	Количество случаев		Уровень экспрессии Топ-Па			
	абс.	%	Среднее (%)	Ме (%)	Мо (%)	p=
ER+	493	64,4	17,15 ±0,79	10	5	p= 0,9064
ER-	273	35,6	17,00 ±0,48	10	10	
PR+	407	53,2	16,98 ±0,86	10	5	p= 0,8462
PR-	359	46,8	17,22 ±0,91	10	10	
HER2+	128	19,8	<b>22,24 ±0,24*</b>	20	30	p<0,05
HER2-	518	80,2	<b>16,22 ±0,55*</b>	10	5	
Ki 67 <10%	145	18,9	<b>5,37 ±0,74*</b>	5	5	p<0,001
Ki 67 10-20%	286	37,4	<b>10,2 ±0,46*</b>	10	10	
Ki 67 >20%	335	47,7	<b>28,1 ±1,60*</b>	25	30	

\*p<0,05, при сравнении с общим средним значением

С помощью парного критерия Стьюдента статистически значимая разница экспрессии Топ-Па выявлена между HER2- негативными и HER2- позитивными опухолями (16,2%±1,50 и 22,2%±0,77; p=0,000454).

Между группами опухолей с высоким и низким уровнем экспрессии Ki-67 также выявлены статистически значимые различия уровня экспрессии Топ-Па (28,07%±0,46 и 10,19%±1,06; p<0,01)

Не было выявлено статистически значимых различий уровня экспрессии Топ-Па между ER- позитивными и ER- негативными опухолями (17,15±0,79% и 17,0%±1,02; p= 0,846214), а также между PR- позитивными и PR- негативными опухолями (16,98%±0,86 и 17,22%±0,91; p= 0,906451) (рисунок 3.6.1.).



*Рисунок 3.6.1. Различия среднего уровня экспрессии Тор-IIa между группами опухолей: 1- HER2/neu-позитивными и -негативными; 2- ER-позитивными и -негативными; 3- PR-позитивными и -негативными; 4- с высоким уровнем экспрессии Ki-67 (>20%) и низким уровнем экспрессии Ki-67 (<20%)*

### **3.7. Анализ клинических показателей по классификации TNM в опухолях, принадлежащих различным молекулярно - биологическим подтипам РМЖ**

Размер опухоли (Т) отражает пролиферативную активность опухоли. При многомерном анализе в качестве зависимой переменной (Т) не было выявлено никакой значимой связи с экспрессией ER, PR, HER2/neu (Clark S.E. et al, 2011; Ep-Qi Qiao et al, 2013). Показатели N (метастазирование в регионарные лимфатические узлы) и M (отдаленные метастазы) являются мерой ее агрессивности (Давыдов М.И., Ганцев Ш.Х., 2010).

Из исследованных 766 образцов инвазивного неспецифического типа РМЖ в 670 случаях был известен показатель Т, в 567 случаях показатель N и в 661 случаях показатель М (таблица 3.7.1.).

Таблица 3.7.1.

*Клиническая характеристика случаев РМЖ на основе классификации TNM*

	Клинические показатели TNM	N= (абс.)	(%)
Т- первичная пухоль	T1- опухоль до 2 см	226	34%
	T2- опухоль 2 - 5 см	367	55%
	T3- опухоль от 5 см	35	5%
	T4- опухоль любого размера с распространением на грудную стенку, кожу (изъязвления узелки на коже)	42	6%
N- регионарные лимфоузлы	N0- нет метастазов в регионарных лимфоузлах	296	51%
	N1- метастазы в подмышечных лимфоузлах I, II уровня не спаяны между собой	184	32%
	N2- метастазы в подмышечных лимфоузлах I, II уровня спаяны между собой, клинически определяемый внутренний маммарный узел при отсутствии клинических признаков	83	15%
	N3- метастазы в подключичных лимфоузлах III уровня, метастазы во внутренних маммарных и подмышечных лимфоузлах, метастазы в надключичных лимфоузлах	12	2%
M- отдаленные метастазы	M0- отдаленные метастазы не определяются	653	99%
	M1- наличие дистантных гематогенных метастазов	8	1%

Большинство случаев (89%) имели опухоли размером до 5 см (T1, T2), в 83% случаев отсутствие или наличие регионарных метастазов (N0, N1). И небольшая

часть (11%) имели опухоли размером более 5 см (Т3, Т4), 17% случаев (N2, N3) и только 8 случаев наличие отдаленных метастазов (M1) (рисунок 3.7.1.)

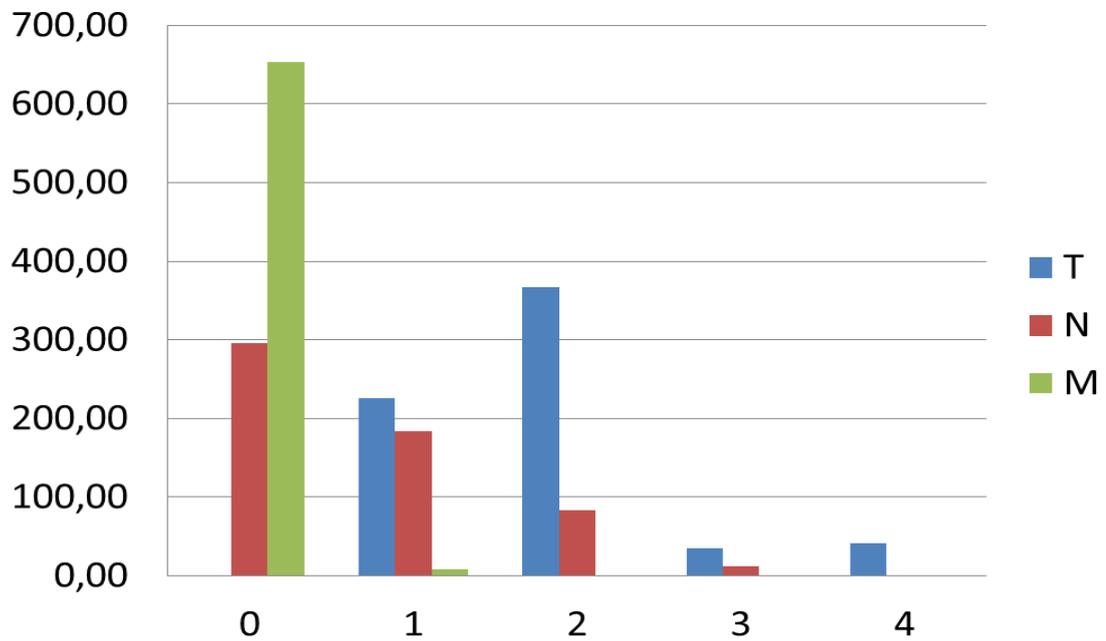


Рисунок 3.7.1. Общее распределение клинических показателей TNM

В молекулярно-биологических подтипах РМЖ клинические показатели по классификации TNM внутри групп, относящихся к различным подтипам РМЖ значительно не отличались (таблица 3.7.2.).

Таблица 3.7.2.

Распределение клинических показателей по классификации TNM внутри молекулярно- биологических подтипов РМЖ

	Общее (%)	ER+/PR+, HER2-, Ki-67<20% (%)	ER+/PR+, HER2-, Ki-67>20% (%)	ER+/PR+, HER2+ (%)	ER/PR-, HER2+ (%)	«тройной негативный» (%)
<b>T</b>						
<b>1</b>	34	31	27	47	26	34
<b>2</b>	55	61	62	43	57	55
<b>3</b>	5	2	3	6	6	5
<b>4</b>	6	6	8	4	11	6
<b>N</b>						
<b>0</b>	51	53	42	57	48	51
<b>1</b>	32	31	42	27	38	32
<b>2</b>	15	13	14	14	13	15
<b>3</b>	2	3	2	2	1	2
<b>M</b>						
<b>0</b>	99	99	97	99	99	99
<b>1</b>	1	1	3	1	1	1

Только в «тройном негативном» подтипе между экспрессией Top-IIa и размером опухоли (T) обнаружена слабая корреляционная связь и умеренная между Top-IIa и M (отдаленные метастазы) и умеренная корреляция между показателями T и N (коэффициент Пирсона:  $r=0,34$ ;  $r=0,42$ ;  $r=0,43$  соответственно) (таблица 3.7.3.).

Таблица 3.7.3.

Корреляционный анализ экспрессии ИГХ маркеров и клинических показателей по классификации TNM в «тройном негативном» подтипе РМЖ (r- Пирсона).

	T	N	M	ER	PR	HER2	Ki-67	Top-IIa
T	1,00	0,43	0,24				0,43	0,24
N	0,43	1,00	0,05				0,10	0,09
M	0,34	0,05	1,00				0,26	0,27
ER				1,00				
PR					1,00			
HER2						1,00		
Ki-67	0,43	0,10	0,26				1,00	0,75
Top-IIa	0,34	0,09	0,42				0,75	1,00

### 3.8. Анализ экспрессии топоизомеразы- IIa в опухолях, принадлежащих различным молекулярно- биологическим подтипам РМЖ

Классификация РМЖ на основе экспрессии иммуноистохимических маркеров была впервые сформулирована Moll в 1982 г., когда он предложил разделить опухоли на «люминальные» и «базальные» в зависимости от того, какие цитокератины в них экспрессируются. Экстенсивный геномный анализ опухолей у больных РМЖ открыл 4 группы, определяемые профилированием генной экспрессии (Sorlie T., Perou C.M. et al, 2001).

Динамизм, присущий молочной железе в период беременности, лактации и инволюции, имеет в своих истоках три клеточные линии, формируемые на базе стволовых клеток: миоэпителиальные или базальные (наружные), клетки протоков и альвеол, клетки люминальной (внутренней) выстилки, синтезирующие белки молока. Классификация молекулярно-биологических подтипов РМЖ основана на следующих характеристиках:

1. Клетка прародительница (люминальный или базальный),
2. Присутствие или отсутствие стероидных рецепторов (ER / PR),
3. Наличие или отсутствие HER2/neu (ErbB-2) – рецепторной тирозиназы,
4. Пролиферативный потенци (Ki-67),
5. Наличие или отсутствие цитокератина 5/6, характерного для мезоэпителиальных (базальных) клеток (Engstrom M.J. et al, 2014).

Гормон-рецептор-позитивный, HER2- негативный (ER+/HER2-) молекулярный подтип является наиболее распространенным, на него приходится 50-80% случаев РМЖ (Dunnwald L.K. et al, 2007).

Основываясь на ИГХ определении рецепторов HER2/neu, ER, PR и Ki-67 все исследованные случаи рака молочной железы были разделены на 5 молекулярно-биологических подтипов.

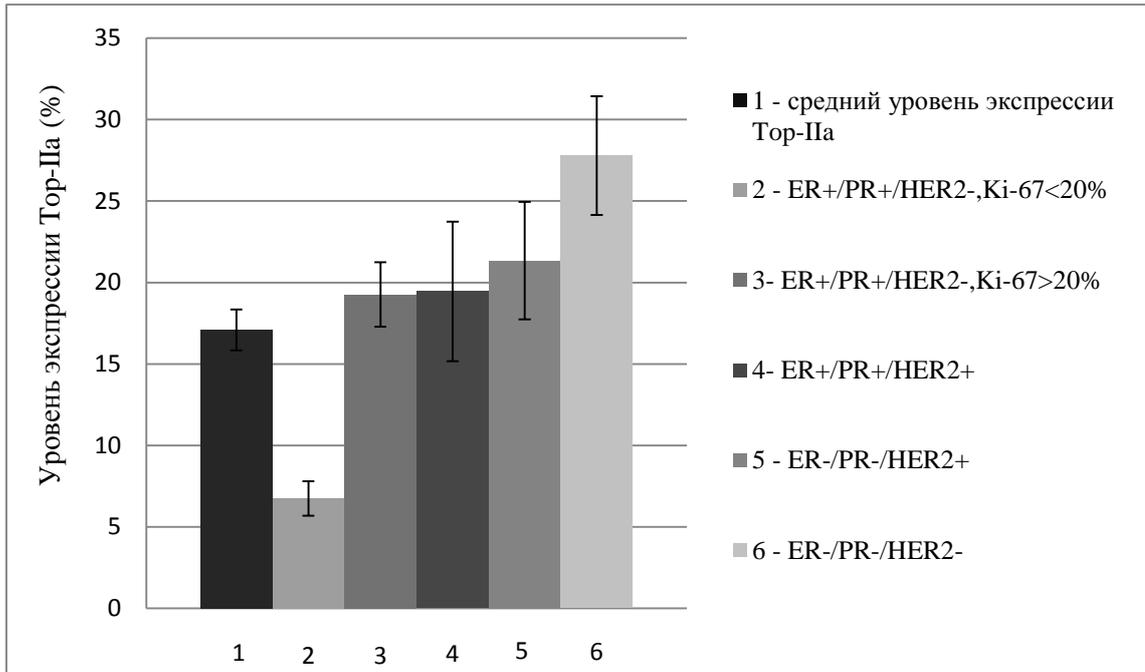
Проведенный анализ показал, что доля Люминального А подтипа (ER+/ PR+, HER2-, Ki-67<20%) (28,4%) оказалась ниже, чем общепринятые значения, а доминирующим подтипом РМЖ в нашем исследовании являлся люминальный В (ER+/ PR+, HER2- или HER2+ , Ki-67 $\geq$ 20% (35,7%), к люминальному В (HER2- негативному) относится 26,9% случаев и HER2 - позитивному 8,8%. «Тройной негативный» подтип составлял 23,4% случаев РМЖ, HER2+ (нелюминальный)- 12,5%, что соответствует литературным данным (таблица 3.8.1.).

Средний уровень экспрессии Топ-IIα в различных молекулярно- генетических подтипах РМЖ (n=691)

Характеристика РМЖ		n=691		Экспрессия Топ-IIα	
Подтип РМЖ		абс.	(%)	Ср. знач. (%)	Т-критерий
ER+/PR+ HER-	Ki-67<20%	196	28,4	<b>6,74 ±0,5*</b>	T <sub>кр</sub> = 8,2 , p<0,05
	Ki-67≥20%	186	26,9	19,27 ±1,0	T <sub>кр</sub> = 1,6, p<0,05
ER+/HER+		61	8,8	19,46 ±2,1	T <sub>эмп</sub> = 1,0, p<0,05
ER-/HER+		86	12,5	<b>21,35 ±1,8*</b>	T <sub>кр</sub> = 2,2, p<0,05
«тройной негативный»		162	23,4	<b>27,79 ±1,8*</b>	T <sub>эмп</sub> = 6,7 p<0,05
Итого		691	100	Ср. 17,09%±0,6	T <sub>кр</sub> =1,96, p<0,05

\*p<0,05, при сравнении с общим средним значением

Наиболее высокий уровень экспрессии Топ-IIα наблюдался в группе «тройного негативного» подтипа (27,79%), наиболее низкий уровень экспрессии Топ-IIα наблюдался в Люминальном А подтипе (6,74%) (рисунок 3.8.1.).



*Рисунок 3.8.1. Средний уровень экспрессии фермента топоизомеразы- IIα в иммуногистохимических подтипах РМЖ: 1- общий средний уровень экспрессии топоизомеразы- IIα; 2 – гормон-рецептор-позитивный, HER2-, Ki-67 < 20%; 3- гормон-рецептор-позитивный, HER2-, Ki-67 > 20%; 4- гормон-рецептор-позитивный, HER2+; 5- гормон-рецептор-негативный, HER2+; 6- «Тройной негативный» подтип*

Для оценки достоверности различия среднего уровня экспрессии Top-IIα в молекулярно- биологических подтипах РМЖ по сравнению с общим средним значением экспрессии Top-IIα ( $17,09 \pm 0,62\%$ ), использовался Т-критерий Стьюдента. При оценке достоверности разности средних значений Top-IIα в Люминальном А подтипе (среднее значение Top-IIα =  $6,74\%$ ), Т-критерий = 8,2 ( $p < 0,05$ ), следовательно уровень экспрессии Top- IIα в Люминальном А подтипе достоверно ниже общего среднего значения.

При изучении уровня экспрессии Top-IIα в Люминальном В (HER-2-) подтипе (среднее значение Top-IIα  $19,27\%$ )  $T_{эмп} = 1,6$  ( $p < 0,05$ ), что меньше критического значения ( $=1,96$ ,  $p < 0,05$ ). Подобные результаты получены и в Люминальном В (HER2+) подтипе (среднее значение Top-IIα  $19,46\%$ ), где  $T_{эмп} = 1$  ( $p < 0,05$ ), что

достоверно ниже критического значения T- критерия ( $=1,96$ ,  $p<0,05$ ), следовательно значения экспрессии Тор-Па в Люминальном В подтипе РМЖ достоверно не отличаются от среднего общего уровня экспрессии Тор-Па. При оценке достоверности различия средних значений выраженности Тор-Па в подтипе HER2+ (нелюминальном) подтипе (среднее значение Тор-Па 21,35%) и общего среднего значения, получены следующие результаты:  $T_{эмп} = 2,2$  ( $p<0,05$ ),  $T_{эмп} > T_{кр}$  ( $=1,96$ ,  $p<0,05$ ), следовательно, полученные различия достоверны.

Среднее значение в «тройном негативном» подтипе РМЖ- 27,79%,  $T_{эмп} = 6,7 > T_{кр}$  ( $=1,96$ ,  $p<0,05$ ), следовательно различия средней экспрессии Тор-Па статистически достоверны. Полученные данные свидетельствуют, о превалировании высокого уровня экспрессии Тор-Па в гормон-рецептор-негативных подтипах РМЖ (таблица 3.8.1.).

При оценке корреляции как с помощью ранговой шкалы (непараметрического критерия Спирмена- R-Spearman's), так и с использованием коэффициента линейной корреляции Пирсона ( $r$ ) во всех подтипах РМЖ выявлена статистически значимая корреляция между экспрессией Тор-Па и Ki-67.

Высокая значимая корреляция между экспрессией Тор-Па и Ki-67 выявлена в «тройном негативном» подтипе ( $R_{(s)}=0,711433$ ;  $p<0,05$ ) (таблица 3.8.2.); ( $r=0,75$ ;  $p<0,05$ ) (таблица 3.8.3.), а также в данном подтипе обнаружена корреляция между экспрессией Тор-Па и клиническими показателями, которые ассоциированы с клеточной пролиферацией, T (размером опухоли) ( $R_{(s)}= 0,34$ ) и M (отдаленные метастазы) ( $R_{(s)}=0,47$ ;  $p<0,05$ ) (таблица 3.8.2.).

Таблица 3.8.2.

Корреляция между ИГХ маркерами в «тройном негативном» подтипе РМЖ

(*R-Spearman's*)

	ER	PR	HER2	Ki-67	Тор-Па	T	N	M
ER	1,000000	-0,033532	0,026121	0,017814	-0,057887	0,035753	0,047992	-0,010303
PR	-0,033532	1,000000	-0,019651	-0,223392	-0,189459	0,005282	-0,043884	-0,020215
HER2	0,026121	-0,019651	1,000000	-0,309499	-0,243457	0,036251	0,068207	0,120759
Ki-67	0,017814	-0,223392	-0,309499	1,000000	<b>0,711433</b>	0,059607	0,014528	-0,040625
Тор-Па	-0,057887	-0,189459	-0,243457	<b>0,711433</b>	1,000000	0,036771	0,003428	0,029658
T	0,035753	0,005282	0,036251	0,059607	0,036771	1,000000	<b>0,477052</b>	0,136150
N	0,047992	-0,043884	0,068207	0,014528	0,003428	<b>0,477052</b>	1,000000	0,087896

Таблица 3.8.3.

Корреляция между ИГХ маркерами в «тройном негативном» подтипе РМЖ

(*r- Пирсона*)

	T	N	M	ER	PR	HER2	Ki-67	Тор-Па
T	1,00	<b>0,43</b>	<b>0,24</b>				<b>0,43</b>	<b>0,24</b>
N	<b>0,43</b>	1,00	0,05				0,10	0,09
M	<b>0,34</b>	0,05	1,00				<b>0,26</b>	<b>0,27</b>
ER				1,00				
PR					1,00			
HER2						1,00		
Ki-67	<b>0,43</b>	0,10	0,26				1,00	<b>0,75</b>
Тор-Па	<b>0,34</b>	0,09	<b>0,42</b>				<b>0,75</b>	1,00

Высокая статистически значимая корреляция между экспрессией Тор-Па и Ki-67 выявлена также в гормон-рецептор-позитивном, HER2-позитивном подтипе ( $R_{(s)}=0,692338$ ;  $p<0,05$ ), а также обнаружена корреляция между экспрессией Тор-Па и HER2 ( $R_{(s)}= 0,37$ ;  $p<0,05$ ) (таблица 3.8.4.); ( $r=0,67$ ;  $p<0,05$ ) (таблица 3.8.5.).

Таблица 3.8.4.

Корреляция между ИГХ маркерами в гормон-рецептор-позитивном, HER2-позитивном подтипе РМЖ (*R-Spearman's*)

	ER	PR	HER2	Ki-67	Тор-Па	T	N	M
ER	1,000000	0,206501	0,000954	0,112678	-0,071451	0,075133	0,120210	-0,187422
PR	0,206501	1,000000	-0,047279	0,216749	0,186657	-0,052783	0,017417	-0,043749
HER2	0,000954	-0,047279	1,000000	<b>0,357830</b>	<b>0,241178</b>	-0,185194	-0,053101	0,001367
Ki-67	0,112678	0,216749	<b>0,357830</b>	1,000000	<b>0,692338</b>	-0,052474	0,146391	0,074006
Тор-Па	-0,071451	0,186657	<b>0,241178</b>	<b>0,692338</b>	1,000000	-0,136033	0,049760	0,016544
T	0,075133	-0,052783	-0,185194	-0,052474	-0,136033	1,000000	<b>0,214583</b>	0,211486
N	0,120210	0,017417	-0,053101	0,146391	0,049760	<b>0,214583</b>	1,000000	0,049540

Таблица 3.8.5.

Корреляция между ИГХ маркерами в гормон-рецептор-позитивном, HER2-позитивном подтипе РМЖ (*r-Пирсона*)

	T	N	M	ER	PR	HER2	Ki-67	Тор-Па
T	1,00	<b>0,25</b>	<b>0,23</b>	-0,10	-0,07	-0,03	<b>0,16</b>	<b>0,20</b>
N	<b>0,35</b>	1,00	0,11	0,10	0,06	0,06	0,07	0,04
M	<b>0,33</b>	0,11	1,00	-0,05	0,03	-0,01	-0,06	-0,07
ER	-0,10	0,10	-0,05	1,00	<b>0,18</b>	0,07	-0,10	0,02
PR	-0,07	0,06	0,03	0,18	1,00	-0,06	-0,12	-0,08
HER2	-0,03	0,06	-0,01	0,07	-0,06	1,00	<b>0,17</b>	<b>0,17</b>
Ki-67	0,16	0,07	-0,06	-0,10	-0,12	0,17	1,00	<b>0,67</b>
Тор-Па	0,20	0,04	-0,07	0,02	-0,08	0,17	<b>0,67</b>	1,00

Средняя значимая корреляция между экспрессией Тор-Па и Ki-67 выявлена в гормон-рецептор-негативном, HER2-позитивном подтипе РМЖ ( $R_{(s)} = 0,666819$ ;  $p < 0,05$ ) (таблица 3.8.6.), по результатам линейного корреляционного анализа сильная ( $r = 0,80$ ;  $p < 0,05$ ), а также обнаружена слабая корреляционная связь между экспрессией Тор-Па и HER2/neu ( $r = 0,37$ ;  $p < 0,05$ ) (таблица 3.8.7.).

Таблица 3.8.6.

Корреляция между ИГХ маркерами в гормон-рецептор-негативном, HER2-  
позитивном подтипе РМЖ (*R-Spearman's*)

	ER	PR	HER-2	Ki-67	Тор-Па	T	N	M
ER	1,000000	0,283333	-0,085402	0,224300	0,241573	-0,054681	-0,007612	-0,029704
PR	0,283333	1,000000	-0,085402	0,187225	0,193259	0,014444	-0,116361	-0,029704
HER-2	-0,085402	-0,085402	1,000000	0,088942	0,170530	0,007690	0,037487	0,032287
Ki-67	0,224300	0,187225	0,088942	1,000000	0,666819	-0,179215	-0,051819	-0,074886
Тор-Па	0,241573	0,193259	0,170530	0,666819	1,000000	-0,098489	-0,056418	0,011040
T	-0,054681	0,014444	0,007690	-0,179215	-0,098489	1,000000	0,235265	0,044131
N	-0,007612	-0,116361	0,037487	-0,051819	-0,056418	0,235265	1,000000	0,180897

Таблица 3.8.7.

Корреляция между ИГХ маркерами в гормон-рецептор-негативном, HER2-  
позитивном подтипе РМЖ (*r- Пирсона*)

	T	N	M	ER	PR	HER2	Ki-67	Тор-Па
T	1,00	0,14	0,01			-0,23	0,30	0,12
N	0,14	1,00	0,17			-0,25	0,00	-0,06
M	0,01	0,17	1,00			0,13	0,03	0,01
ER				1,00				
PR					1,00			
HER2	-0,33	-0,35	0,13			1,00	0,28	0,37
Ki-67	0,40	0,00	0,03			0,37	1,00	0,80
Тор-Па	0,12	-0,06	0,01			0,37	0,80	1,00

При корреляционном анализе спирмена Низкая значимая корреляция между экспрессией Тор-Па и Ki-67 выявлена в гормон-рецептор-негативных, HER2-негативных подтипах РМЖ, как с высоким уровнем экспрессии Ki-67>20% ( $R_{(s)}=0,408934$ ;  $p<0,05$ ) (таблица 3.8.8.), так и низким Ki-67<20% ( $R_{(s)}= 0,375301$ ;  $p<0,05$ ) (таблица 3.8.9.).

Таблица 3.8.8.

Корреляция между ИГХ маркерами в гормон-рецептор-позитивном, HER2-негативном, Ki-67>20% подтипе РМЖ (R-Spearman's)

	ER	PR	HER-2	Ki-67	Топ-IIa	T	N	M
ER	1,000000	-0,102194	0,088142	-0,056984	-0,117174	-0,021573	-0,184009	-0,187422
PR	-0,102194	1,000000	-0,050948	-0,008995	0,001167	0,017422	-0,038067	-0,043749
HER-2	0,088142	-0,050948	1,000000	0,019444	0,028408	-0,017942	0,122277	0,001367
Ki-67	-0,056984	-0,008995	0,019444	1,000000	<b>0,408934</b>	0,083518	<b>0,103609</b>	0,074006
Топ-IIa	-0,117174	0,001167	0,028408	<b>0,408934</b>	1,000000	-0,036268	-0,027427	0,016544
T	-0,021573	0,017422	-0,017942	0,083518	-0,036268	1,000000	<b>0,350371</b>	0,211486
N	-0,184009	-0,038067	0,122277	<b>0,103609</b>	-0,027427	<b>0,350371</b>	1,000000	0,049540

Таблица 3.8.9.

Корреляция между ИГХ маркерами в гормон-рецептор-позитивном, HER2-негативном Ki-67<20% подтипе РМЖ (R-Spearman's)

	ER	PR	HER-2	Ki-67	Топ-IIa	T	N	M
ER	1,000000	0,120487	0,011057	-0,029926	0,077059	-0,008597	-0,035932	-0,187422
PR	0,120487	1,000000	0,078582	0,113151	0,062807	-0,070897	-0,057079	-0,043749
HER-2	0,011057	0,078582	1,000000	-0,060231	-0,104101	-0,057254	-0,088012	0,001367
Ki-67	-0,029926	0,113151	-0,060231	1,000000	<b>0,375301</b>	<b>0,101721</b>	0,025384	0,074006
Топ-IIa	0,077059	0,062807	-0,104101	<b>0,375301</b>	1,000000	0,108353	-0,024469	0,016544
T	-0,008597	-0,070897	-0,057254	<b>0,101721</b>	0,108353	1,000000	<b>0,288946</b>	0,211486
N	-0,035932	-0,057079	-0,088012	0,025384	-0,024469	<b>0,288946</b>	1,000000	0,049540

Однако при корреляционном анализе Пирсона между экспрессией Топ-IIa и Ki-67 в данных подтипах наблюдалась умеренная корреляционная связь ( $r=0,58$ ;  $p<0,05$ ;  $r=0,50$ ;  $p<0,05$  соответственно) (таблицы 3.8.10. и 3.8.11. соответственно).

Таблица 3.8.10.

Корреляция между ИГХ маркерами в гормон-рецептор-позитивном, HER  
негативном, Ki-67>20% подтипе РМЖ (r- Пирсона)

	T	N	M	ER	PR	HER2	Ki-67	Top-IIa
T	1,00	0,27	0,28	-0,03	-0,13		0,09	0,05
N	0,37	1,00	0,03	0,21	-0,03		0,11	-0,05
M	0,38	0,03	1,00	-0,03	-0,04		-0,07	-0,04
ER	-0,03	0,31	-0,03	1,00	0,27		-0,07	-0,10
PR	-0,13	-0,03	-0,04	0,27	1,00		0,01	0,01
HER2						1,00		
Ki-67	0,09	0,11	-0,07	-0,07	0,01		1,00	0,58
Top-IIa	0,05	-0,05	-0,04	-0,10	0,01		0,58	1,00

Таблица 3.8.11.

Корреляция между ИГХ маркерами в гормон- рецептор- позитивном, HER2-  
негативном Ki-67<20% подтипе РМЖ (r- Пирсона)

	T	N	M	ER	PR	HER2	Ki-67	Top-IIa
T	1,00	0,32	0,02	0,08	-0,05		0,15	0,01
N	0,42	1,00	-0,08	0,08	0,12		0,03	0,09
M	0,02	-0,08	1,00	-0,05	-0,16		0,03	0,08
ER	0,08	0,08	-0,05	1,00	0,35		0,01	-0,16
PR	-0,05	0,12	-0,16	0,35	1,00		-0,08	-0,10
HER2						1,00		
Ki-67	0,15	0,03	0,03	0,01	-0,08		1,00	0,50
Top-IIa	0,01	0,09	0,08	-0,16	-0,10		0,50	1,00

Обобщая данные корреляционного анализа, при использовании коэффициента Пирсона наблюдалась более сильная корреляционная связь между экспрессией Top-IIa и Ki-67. При сравнении результатов полученных с помощью обоих коэффициентов корреляции наблюдалась тенденция усиления связи экспрессии Top-IIa от экспрессии Ki-67 в опухолевых клетках, не имеющих рецепторы к гормонам, а также с гиперэкспрессией рецептора HER2/neu (таблица 3.8.12.).

Таблица. 3.8.12.

*Зависимость экспрессии Топ-Па от ИГХ- маркеров и показателей TNM в молекулярно- биологических подтипах РМЖ*

Молекулярно-биологический подтип РМЖ	Коэффициент корреляции между Топ-Па и Ki-67		Коэффициент корреляции между Топ-Па и HER2, ER, показателей TNM	
	Спирмена (R)	Пирсона (r)	Спирмена (R)	Пирсона (r)
Гормон-рецептор-положительный, HER2-негативный, Ki-67<20%	R= 0,35	r=0,50	-	-
Гормон-рецептор-положительный, HER2-негативный, Ki-67>20%	R= 0,40	r=0,58	-	-
Гормон-рецептор-положительный HER2-положительный	R= 0,69	r=0,67	Топ-Па и HER2 R= 0,35	
Гормон-рецептор-негативный, HER2-положительный	R= 0,66	r=0,80	Топ-Па и ER; R=0,24 Ki-67 и ER; R= 0,22	Топ-Па и HER2 r=0,37; Ki-67 и HER2 r=0,40
«тройной негативный»	R= 0,71	r=0,75	Т и N R= 0,47	Топ-Па, Ki-67 и Т r=0,34; r=0,43

## ГЛАВА 4

### ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе изучены особенности экспрессии ядерного фермента топоизомераза- II альфа в 766 случаев инвазивного неспецифического типа рака молочной железы. В опухолевых клетках средний общий уровень экспрессии составил  $17,09 \pm 0,62\%$  (95% CI: 17,05–17,14), при медиальном значении 10% и наиболее часто встречаемое значение 5%.

В клетках нормальной ткани молочной железы уровень экспрессии Топ-II $\alpha$  составлял  $1,8\% \pm 0,3$  (1-3%), что согласуется с исследованиями Aejaz Nasir et al, (2011). Можно заключить, что злокачественная трансформация сопровождается увеличением экспрессии фермента топоизомераза- II $\alpha$  в клетках рака молочной железы.

Так как Топ-II $\alpha$  контролирует в клетке уровень суперскрученности молекул ДНК, решая сложные топологические проблемы, инициируя двуцепочечный АТФ-зависимый процесс разрушения связей при декатенизации хроматина и сегрегации сестринских хроматид при митозе, особенно чувствительны к степени спирализации ДНК являются процессы инициации транскрипции, дифференциальной регуляции транскрипции генов, репликации ДНК, в которых участвует фермент Топ-II $\alpha$ . Также Топ-II $\alpha$  имеет отношение к репарации ДНК, поэтому повышение экспрессии этого фермента предотвращает повреждения ДНК, являясь преимуществом для выживания опухолевых клеток. Поддержание определенного уровня топологического состояния хроматина также необходимо для активности ряда ядерных белков взаимодействующих с ДНК (Wang J.C. et al, 1996; Nakoroulou L. et al, 2000).

Количество Топ-II $\alpha$  также изменяется в разные фазы клеточного цикла, так в S, G<sub>2</sub>, M достигает максимума, в G<sub>1</sub> и G<sub>0</sub> может быть очень низким для определения иммуногистохимическим методом (Bower J.J. et al, 2010).

Повышение экспрессии белка Top-IIa редко происходит без амплификации его гена, но может наблюдаться в сильно пролиферирующих опухолях (Mueller R.E. et al, 2004; Fritz P. et al, 2005). Амплификация гена чаще встречается в ER-негативных опухолях (Fountzilias G. et al, 2012), а PR- негативные опухоли часто связаны с делецией гена Top-IIa (Jarvinen T. et al, 2000).

В нашем исследовании 58,4% опухолей были гормон-рецептор- позитивными (ER+/ PR+), 29,1% гормон- рецептор- негативными (ER-/ PR-) и 12,5% (ER+/ PR). Во всех группах уровень экспрессии достоверно не отличался от среднего общего значения ( $17,09 \pm 0,62\%$ ) и находился в пределах  $14,81 \pm 0,3\%$  -  $18,73 \pm 0,3\%$ .

Нами не обнаружено статистически достоверной разницы в экспрессии Top-IIa между гормон-рецептор-позитивными и гормон-рецептор-негативными опухолями (Top-IIa и ER  $T=0,906451$ ,  $p>0,05$ ; и PR  $T=0,846214$ ,  $p>0,05$ ).

При корреляционном анализе Пирсона линейной зависимости между экспрессией Top- IIa и рецепторами стероидных гормонов (ER, PR) не выявлено ( $r=0,01$ ;  $r=-0,04$  соответственно). Так же не выявлена корреляционная связь между экспрессией Top- IIa и ER, PR В группах с совместной экспрессией рецепторов к гормонам.

Полученные результаты согласуются с рядом исследований (Mueller R.E. et al, 2004; Fritz P. et al, 2005; Linch B.J et al, 1997) в ER- позитивных опухолях корреляционная связь с Top-IIa не наблюдалась, а при гиперэкспрессии рецептора HER2/neu в ER- позитивных опухолях наблюдалась высокая экспрессия Top-IIa.

Наши результаты можно объяснить тем, что рецепторы к эстрогену и прогестерону регулируют транскрипцию генов либо путем непосредственного связывания с элементами ДНК, либо через другие транскрипционные факторы и ко- регуляторы которые связаны также с Top-IIa, их сигнальные пути пересекаются с другими путями через не геномные механизмы, которые включают перекрестную связь с рецепторами фактора роста (HER2) и G- белками и могут запускать киназные каскады.

Эстроген, индуцирует экспрессию PRB (изоформа рецептора прогестерона B) только в присутствие рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), что

указывает на наличие важного перекреста рецепторов гормонов с EGFR (Carol A. et al, 2007). Прогестерон через PRB/c-Src сигнальный путь активирует рецептор HER2/neu, который включен в RAS/ митоген активный протеин- киназный путь (MAPK), PI3K/ Akt (фосфатидилиозитол 3 киназный) путь, фосфолипазный C- гамма путь, которые приводят к активации транскрипции в том числе гена Top-Па, белок которого является необходимым компонентом ДНК- связывающего патерна комплекса транскрипции (TCF). Нарушение одного из плеч этих путей может способствовать неконтролируемой пролиферации опухолевых клеток (Kushner P.J. et al, 2000; Pearson G. et al, 2001; Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е., 2014) (рисунок 4.1.).

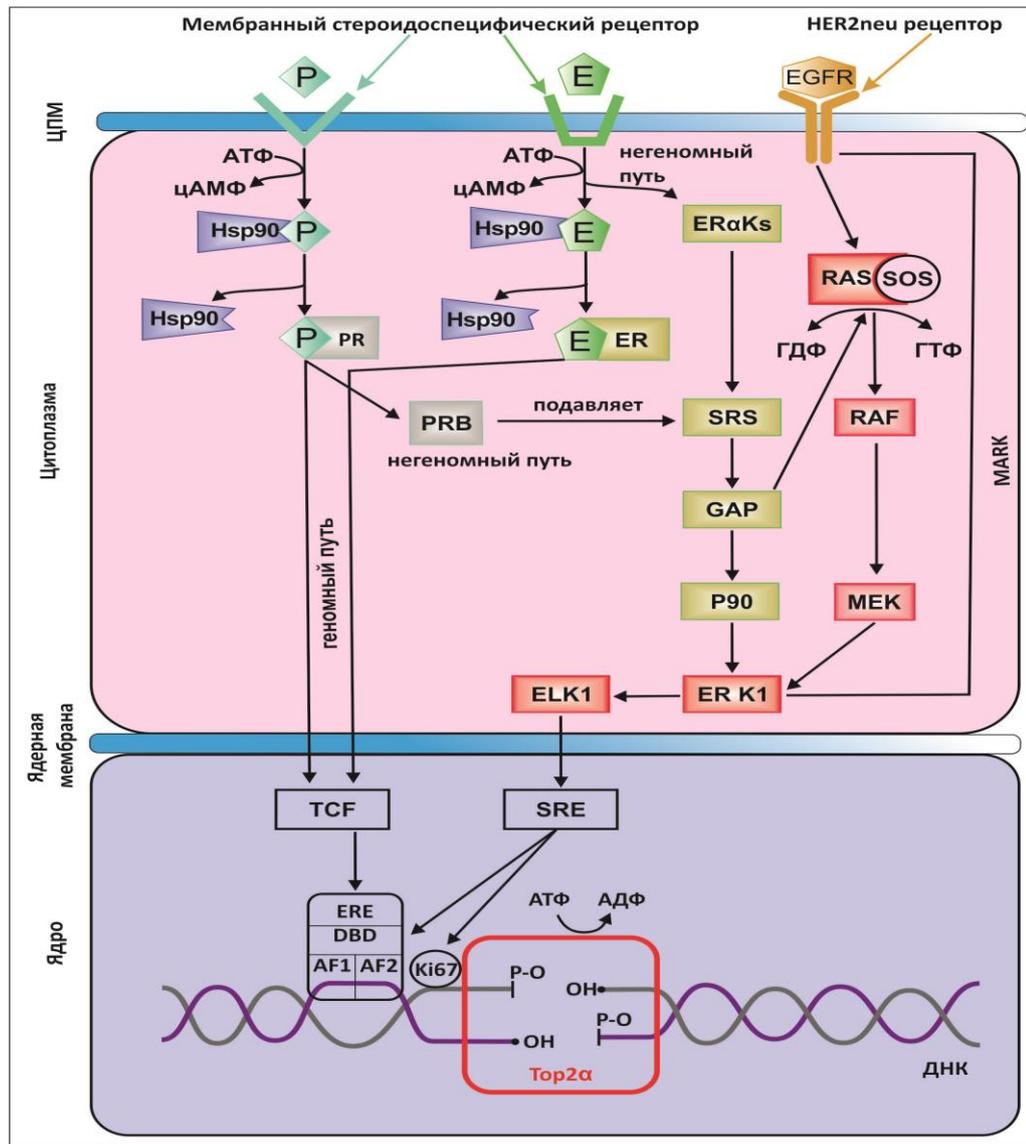


Рисунок 4.1. Пути регуляции транскрипции и пролиферации в клетках РМЖ: Top-IIα- ДНК-топоизомераза- IIα; Ki-67- ядерный белок, маркер клеточной пролиферации; E- эстроген; ER- рецептор к эстрогену; P- прогестерон; PR- рецептор к прогестерону, Hsp90- белок теплового шока; EGFR- трансмембранный рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factorreceptor); HER2/neu- мембранный белок, тирозиновая протеинкиназа семейства рецептора эпидермального фактора роста; ERαKs- внеклеточные регуляторные киназы (extracellular regulated kinases); ERK1/2- фермент фосфорилирующий сигнальные белки в цитоплазме, затем в ядре регулирует транскрипцию; MAPK - митоген- активированные протеин- киназы (mitogen-activated protein kinase); RAF-серин/ треонин- специфичные протеинкиназы, участвуют в RAS-RAF-МЕК каскаде передачи сигнала; ELK1- (transcription activator) активатор транскрипции; SRE- (Serum response factor) связывает с транскрипционным фактором; TCF-общий транскрипционный фактор (general transcription factor) (Carol A. et al, 2007; Kushner H.J. et al, 2000; Pearson G. et al, 2001).

Гормон-рецептор-позитивные опухоли размножаются с меньшей скоростью, чем негативные, это обусловлено отрицательным регулирующим эффектом трансформирующего ростового фактора- бета (TGF- beta), который специфически активирован во внеклеточном матриксе ER- позитивных опухолей, так же усиленно секретируется циклин D1, который выводит клетки в S- фазу клеточного цикла в которой увеличивается экспрессия рецепторов к гормонам и понижается в G<sub>2</sub> и M фазах, в то время как количество белка Top-IIα в эти фазы достигает максимума (Payne J.L. et al, 2008; Zhou Q. et al, 2016), что подтверждает наш вывод о независимости механизмов экспрессии Top-IIα от экспрессии эстрогеновых и прогестероновых рецепторов.

Нами обнаружено в группе с гиперэкспрессией HER2/neu (ИГХ- статус 3+) увеличение уровня экспрессии Top-IIα (22,6±0,77%), который достоверно превышает средний общий уровень экспрессии Top-IIα (17,09±0,62%) в клетках инвазивного неспецифического типа рака молочной железы. В клетках не имеющих рецепторы HER2/neu (ИГХ- статус 0) уровень экспрессии Top-IIα составлял 17±1,5% и достоверно не отличался от общего среднего уровня экспрессии Top-IIα. В HER2- позитивных опухолях экспрессия Top-IIα также достоверно выше по сравнению с HER2- негативными (p<0,05), что свидетельствует в пользу коэкспрессии этих белков. При использовании коэффициента линейной корреляции Пирсона, связи между экспрессией Top-IIα и HER2/neu не выявлено (r=0,06). Однако, при использовании ранговых критериев Спирмена, обнаружена слабая положительная корреляционная связь между экспрессией Top-IIα и HER2/neu ( $R_{(s)} = 0,110869$ ).

Из-за близкого расположения генов обоих белков на длинном плече 17 хромосомы наблюдается их коамплификация в 40-50% случаев РМЖ, но эти гены относятся к разным ампликонам. Не обнаружено ни одного случая амплификации гена Top-IIα в отсутствие амплификации гена HER2/neu, так как ген HER2/neu является ключевым водителем ампликона 17q12 (Arriola E. et al, 2008; Jarvien T.A. et al, 1999). Исследования Brhargava R. et al, (2005) выявили взаимосвязь между

амплификацией обоих генов. Предполагается, что нарушения в гене HER2/neu вызывают амплификацию гена Top-Па по механизму breakage-fusion-bridge.

Методом FISH (флюорисцентная гибридизация in situ) нами исследовано 152 случая инвазивного неспецифического типа (протокового) рака молочной железы с HER2 (ИГХ- статус 2+) среди них обнаружено 31 (20,4%) опухолей с амплификацией гена HER2 в которых наблюдалось повышение уровня экспрессии Top-Па ( $20,35 \pm 3,36\%$ ) по сравнению с группой без амплификации гена HER2 ( $15,9 \pm 1,53\%$ ), но статистически достоверной разницы между этими группами не выявлено ( $p=0,24$ ), т.о. изменения экспрессии белка Top-Па может идти независимо от аббераций гена HER2/neu, так как ген Top-Па не является частью ампликона HER2. Кроме того, амплификация гена Top-Па не всегда сопровождается повышением его экспрессии, но амплификация гена HER2 в клетках РМЖ практически всегда сопровождается его гиперэкспрессией, поэтому высокий уровень экспрессии Top-Па часто связывают с гиперэкспрессией рецептора HER2/neu, но не наоборот. Urruticoechea A. et al, (2005) обнаружили в 72% опухолей с амплификацией гена Top- Па повышенное содержание белка Top-Па. Fritz P., (2005), Di Leo, (2008) наблюдали коэкспрессию белков Top-Па и HER2/neu, напротив Zhu Li, (2008), Coon et al (2002) обнаружили обратную корреляцию между экспрессией Top-Па и HER2/neu, но наблюдали ко-амплификацию этих генов. Fountzilias G. et al, (2012) выявили высокий уровень экспрессии Top-Па в 27% HER2- негативных опухолях, но в этих опухолях никогда не наблюдалась амплификация гена Top-Па.

Top-Па синтезируется в тех же фазах клеточного цикла, что и Ki-67, таким образом, их уровни экспрессии теоретически должны соответствовать друг другу. Ki-67- это ядерный белок, который выявляется только в S, G<sub>2</sub>, M фазах клеточного цикла, поэтому считается маркером клеточной пролиферации. Так как Ki-67 очень короткоживущий белок (1,5 – 2 часа) его связь с белками клеточного цикла точно не определена. В составе первичной структуры белка Ki-67 содержатся потенциальные сайты фосфорилирования для различных киназ, а также для связывания с вилоккой репликации. В митоз при распаде ядра из нуклеоплазмы Ki-

67 перемещается в перихромосомный слой, предотвращая слипание хромосом и имеет структурирующую роль в ходе их сегрегации. В ткани нормальной молочной железы белок Ki-67 экспрессируется на низком уровне (<3% окрашенных ядер) (Keshgegian A. et al, 1995; Пожарисский К.М., Леенман Е.Е., 2000).

В нашем исследовании в 55,2% случаев уровень экспрессии Top-Па был ниже Ki-67; в 40,1% - экспрессия обоих белков была одинаковая и в 4,7% опухолей экспрессия Top-Па была выше Ki-67. Между экспрессией Top-Па и Ki-67 выявлена сильная корреляционная связь ( $r=0,74$ ). Самый высокий уровень экспрессии Top-Па ( $28,07 \pm 1,06\%$ ) обнаружен в опухолевых клетках с высоким уровнем экспрессии Ki-67 (>20%). Обнаружена достоверная разница экспрессии Top-Па между опухолями с высоким уровнем экспрессии Ki-67 (>20%) и низким (Ki-67 <20%).

Полученные нами данные свидетельствуют против наличия линейной зависимости экспрессии Ki-67 от ER, PR- рецепторов (корреляция Спирмена между Ki-67 и PR  $R_{(s)} = -0,259825$ ; Ki-67 и ER  $R_{(s)} = -0,173846$ ) и подтверждают существование более сложных гормональных путей регуляции пролиферации. Аналогичные результаты, полученные Urruticoechea A. et al, (2005) расценивались как наличие гормонально независимого механизма активации клеточного деления, который не имеет вид прямого каскада.

Основываясь на ИГХ определении рецепторов HER2/neu, ER, PR и Ki-67 исследованные случаи рака молочной железы были разделены на 5 иммуногистохимических подтипов. Основы данной классификации заложены американскими молекулярными биологами Perou C.M., Solie T. et al, (2000).

Знание принадлежности опухоли к определённому биологическому подтипу лежит в основе выбора лекарственной терапии, а молекулярно генетические характеристики позволяют дать более точный прогноз и уточнить выбор конкретного препарата (Семиглазов В.Ф. и др., 2013; Берштейн и др., 2011; Cheang M. et al, 2009; Зборовская И.Б., 2014; Колядина И.В. и соавт., 2015).

В нашем исследовании 28,4% опухолей были гормон-рецептор позитивные, HER2- негативные с низким уровнем пролиферации (Ki-67<20%) так называемый люминальный А подтип. Это опухоли, которые отличаются благоприятным прогнозом и низким риском рецидива заболевания (Carey L.A. et al, 2006; Берштейн Л.М., Семиглазов В.Ф., 2011; Завьялова М.В. и соавт., 2013; Новикова И.А. и соавт., 2014).

26,9% опухолей оказались гормон-рецептор-позитивными, HER2- позитивные с высоким уровнем клеточной пролиферации (Ki-67>20%) (люминальный В HER2+ подтип) и 8,8% опухолей были HER2-негативные (люминальный В HER2- подтип). В этих опухолях активирован HER2 сигнальный путь и пролиферация (Cheang M.C.U. et al, 2009). Молекулярно-генетические особенности подтипа: имеется амплификация онкогена HER2 и генов 17q ампликона, а также гиперактивация ключевых промоторов клеточного цикла (cyclin E1) и клеточного роста (Тор-Па) (Melchor L. et al, 2008; Zelco I.N. et al, 2002).

12,5% опухолей оказались гормон- рецептор негативные, HER2- позитивными (HER2 гиперэкспрессирующий подтип). В этих опухолях Ki-67>15%, активирован EGFR/HER2 сигнальный путь (Holm et al, 2010; Cheang M.C. et al, 2009). Это эстроген- независимые агрессивные опухоли, с высокой вероятностью метастазирования (Carey L.A. et al, 2006; Theillet C. et al, 2010; Кит О.И. и соавт., 2014; Шатова Ю.С. и соавт., 2015).

23,4% исследованных опухолей оказались гормон-рецептор-негативными, HER2- негативными («трижды негативный» подтип). Это опухоли, для которых характерны молодой возраст пациенток, высокий пролиферативный индекс, большой размер опухоли, ранее поражение лимфатических узлов, отсутствие мишеней для большинства препаратов, пик раннего рецидива в течение трех лет после постановки диагноза. Выживаемость в этой группе ниже, чем для любого другого молекулярном подтипа (Antoniou et al, 2003; Jensen E.V. et al, 2003; Gluz Q. et al, 2009; Dent R. et al, 2007).

Во всех группах обнаружена корреляционная связь экспрессии Тор-Па с маркером клеточной пролиферации Ki-67: в агрессивных, быстрорастущих

гормон-рецептор-негативных, HER2-позитивном и «тройном негативном» подтипах- высокая ( $R_{(s)}=0,66$ ;  $R_{(s)}=0,71$  соответственно), в гормон-рецептор-позитивном, HER2-позитивном ( $R_{(s)}=0,69$ ); средняя в гормон-рецептор-позитивном, HER2-негативном, (Ki-67 $\geq$ 20%) ( $R_{(s)}=0,40$ ) и низкая в гормон-рецептор-позитивном, HER2-негативном (Ki-67 $<$ 20%) подтипе ( $R_{(s)} = 0,37$ ).

В гормон-рецептор-позитивном, HER2-негативном подтипе уровень экспрессии Top- Па ( $6,74\pm 0,73\%$ ) был значительно ниже общего среднего уровня ( $17,09\pm 0,62\%$ ).

В гормон-рецептор-позитивном подтипе, как HER2+, так и HER2- с низким уровнем экспрессии Ki-67 ( $>20\%$ ), уровень экспрессии Top-Па статистически достоверно не отличался от общего среднего значения ( $19,27\pm 1,34\%$ ;  $19,46\pm 1,66\%$  соответственно). Нами обнаружена в люминальном В (HER2+) подтипе слабая корреляционная связь экспрессии Top-Па с HER2/neu ( $r= 0,35$ ). В данном подтипе РМЖ в 5,4 раза чаще встречается амплификация гена HER2/neu и генов 17q ампликона (Завалишина Л.Э. и др., 2014). Также, для этого подтипа характерна гиперактивация E1- циклинов (промоторов клеточного цикла), что подтверждает факт повышения уровня экспрессии Top-Па при усилении клеточной пролиферации. Результаты нашего исследования свидетельствуют в пользу возможной коэкспрессии Top-Па и HER2/neu при амплификации гена HER2/neu или 17q ампликона.

Самый высокий уровень экспрессии Top-Па обнаружен в гормон-рецептор-негативных опухолях: в «трижды негативном» подтипе ( $27,79\pm 1,62\%$ ) и HER2+ подтипе ( $21,55\pm 1,62\%$ ). ER- негативные опухоли молочной железы имеют более серьезные генетические нарушения, такие как мутация p53, амплификация гена HER2/neu, мутации гена BRCA1 и высокая геномная неустойчивость. При малигнизации клеток снижается потребность во внешних сигналах для инициации пролиферации. Опухолевые клетки приобретают способность генерировать внутри себя пролиферативные сигналы, а также снижается чувствительность к рост-ингибирующим сигналам. В ходе прогрессии опухоли внутри клеток синтезируются специфические белки, которые блокируют процессы клеточной

дифференцировки и клетки теряют специфические рецепторные белки, отсутствие которых придает опухолевым клеткам селективные преимущества (Dontu G., El-Ashry D. et al, 2004; Foulkes W.D., 2004; Liu S. et al, 2008).

В гормон-рецептор-негативных, HER2-позитивном подтипе, нами обнаружена слабая корреляционная связь экспрессии Top-II $\alpha$  и Ki-67 с рецепторами эстрогена ( $r=0,24$ ;  $r=0,22$  соответственно). Это может быть связано с не геномными механизмами действия гормонов (рисунок 4.1.). HER2/neu, связываясь со своими лигандами с ростовыми факторами индуцируют аутофосфорилирование с сигнальными белками, следствием чего является стимуляция пересекающихся сигнальных путей и активация MAPK (киназных каскадов), серин-треониновые киназы (ELK1, ERK1/2, YNK, p38) приводят к активации в ядре циклин-зависимые киназы, которые индуцируют выход клеток в S- фазу в которую идет синтез ДНК и резко увеличивается содержание в ядре Top- II $\alpha$ , участвующей в образовании репликационной вилки, а также белка Ki-67. Активация ингибиторов циклинзависимых киназ (CKI) приводит к остановке клеточного цикла в G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, остановка в митозе (check points), связана с изменением активности молекул, к которым относятся белки Top-II $\alpha$  и Ki-67, контролирующих конденсацию хромосом и разделение сестринских хроматид, что приводит к повышенному их содержанию. Реализация программ дифференцировки клеток требует выхода в фазу G<sub>0</sub>. Стимуляция пролиферации и нечувствительность к действию рост-ингибирующих цитокинов нередко приводит к нарушению дифференцировки и потере клетками специфических рецепторов, в карциноме молочной железы таких как ER, PR, HER2/neu в «трижды негативном» подтипе (Копнин Б.П., 2011).

Самый высокий уровень экспрессии Top- II $\alpha$  (27,79%) обнаружен в «трижды негативном» подтипе рака молочной железы. В данном подтипе часто наблюдаются абберации генов BRCA1 (17q21) и BRCA2 (13q12). Большинство BRCA- ассоциированных РМЖ (68,5 – 80,0%) являются «трижды негативными», при этом мутации в гене BRCA1 составляют до 16% (Easton D. F. et al, 1993). Это гены- супрессоры клеточного роста, белки которых участвуют в репарации двуцепочечных разрывов ДНК в которых, также принимает участие Top- II $\alpha$ .

Белки BRCA могут взаимодействовать с факторами транскрипции и ремодулирующими белками хроматина, таким образом, могут функционировать как регуляторы транскрипции генов, ответственных за выживание клеток. Белки BRCA1 регулируют убиквитинирование Top-II $\alpha$  и снижают ее активность (Kennedy R.D. et al, 2005), в норме они разрушают Top-II $\alpha$  для поддержания стабильности хромосом, поэтому мутации данных генов приводят к нарушению процесса деградации Top-II $\alpha$  и увеличению ее уровня в опухолевых клетках (Hiroko Nogil et al, 2016). Ген BRCA участвует в дифференцировке стволовых клеток молочной железы и при мутации гена стволовые клетки не могут завершить процесс дифференцировки, но при этом сохраняют способность к активной пролиферации (Dontu G. 2004; Foulkes W.D., 2004; Liu S. et al, 2008). Блокировка экспрессии гена BRCA1 приводит к десятикратному снижению синтеза ER-рецепторов в стволовых клетках. Ген BRCA1 ингибирует активность AF2 – транскрипционный домен связывания с ER $\alpha$  и носит гормон-зависимый характер не только в ER-зависимых, но и ER-независимых опухолевых клетках (Fan S. et al, 2001).

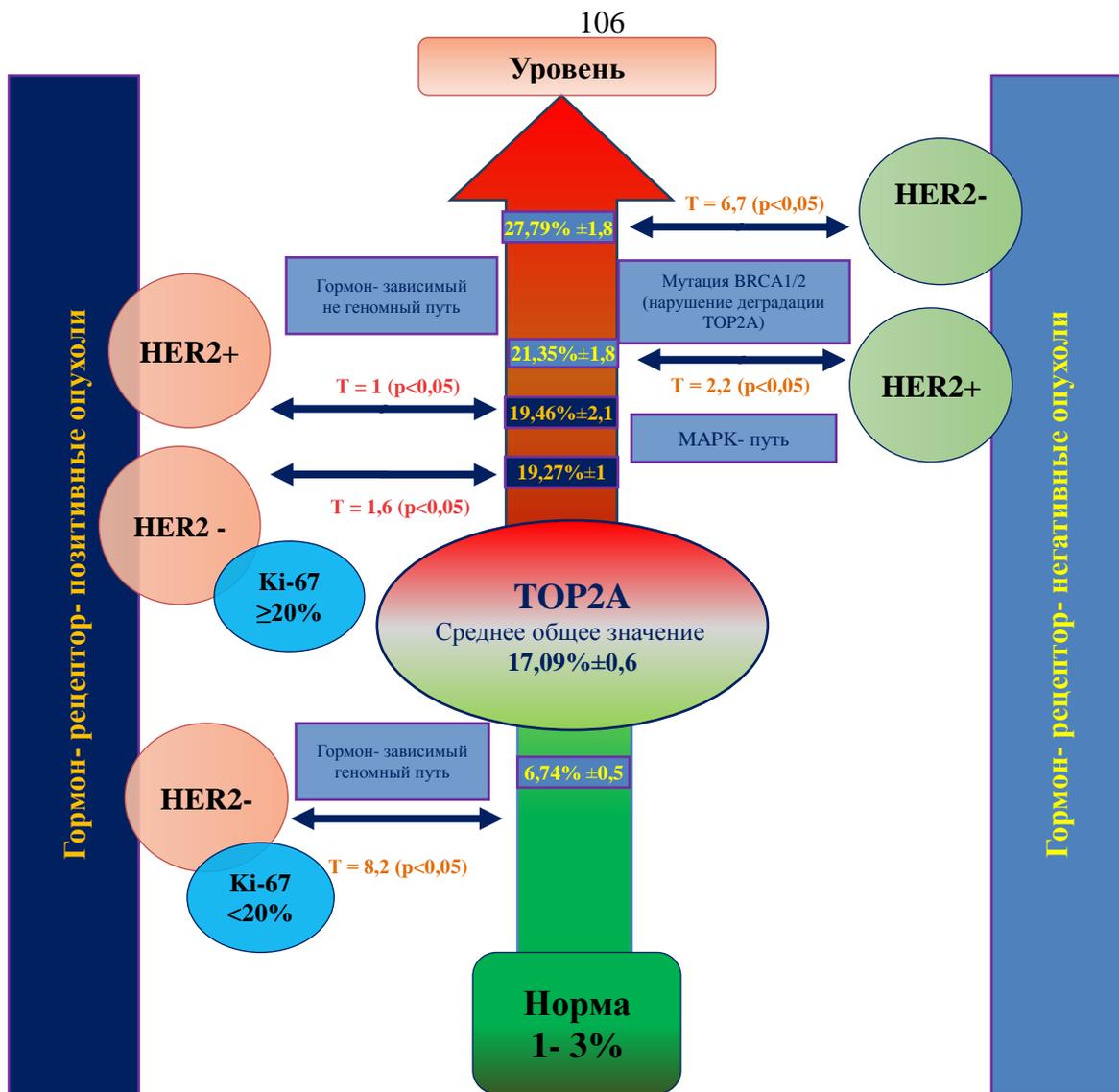
Размер опухоли (T) является результатом ее пролиферативной активности (Колядина И.В. и соавт., 2015). Опухоли, относящиеся к разным молекулярно-биологическим подтипам, значительно не отличались по клиническим показателям TNM. Только в «тройном негативном» подтипе между экспрессией Top-II $\alpha$  и размером опухоли (T) обнаружена слабая корреляционная связь (коэффициент Пирсона;  $r=0,34$ ) и умеренная между размером опухоли (T) и показателем (N) метастазированием в регионарные лимфоузлы (коэффициент Спирмена  $R_{(s)}=0,47$ ), что отражает агрессивное поведение данного подтипа РМЖ.

Фермент Top-II $\alpha$  контролирует механизм сегрегации хромосом в митозе, декатенация ДНК необходима для сегрегации сестринских хроматид в анафазе, поэтому в клетках инвазивного неспецифического типа рака молочной железы может происходить нарушение этого процесса, связанное с увеличением уровня Top-II $\alpha$ , которое часто приводит к анеуплоидии. Через подобные дефекты могут удаляться или амплифицироваться группы генов, в опухолевых клетках молочной

железы часто встречаются абберации 17 хромосомы, где расположены гены, кодирующие Top-II $\alpha$ , HER2/neu, ген BRCA1. Амплификация гена HER2/neu в опухолевых клетках усиливает экспрессию белка HER2/neu, что приводит к активации MAPK- пути регуляции и в итоге, к усилению клеточной пролиферации. В опухолях с гиперэкспрессией белка HER2/neu уровень экспрессии Top-II $\alpha$  достоверно выше, но не выявлена достоверная разница экспрессии Top-II $\alpha$  между опухолями с амплификацией гена HER2 и без амплификации. Протеинкиназы могут усиливать фосфорилирование Top-II $\alpha$ , активируя ее при митозе, а из-за мутаций генов BRCA1/2 нарушаются процессы убиквитинилирования Top-II $\alpha$  поэтому ее уровень возрастает в G<sub>2</sub>, M фазах клеточного цикла. Это подтверждает сильная корреляционная связь экспрессии Top-II $\alpha$  с маркером клеточной пролиферации Ki-67, уровень которого так же повышается в G<sub>2</sub>, M фазах клеточного цикла, оба белка принимают участие в процессе сегрегации митотических хромосом.

Отсутствие корреляционной связи между Top-II $\alpha$  и рецепторами стероидных гормонов подтверждает, что гормон-зависимые пути регуляции в опухолевых клетках молочной железы не влияют на экспрессию Top-II $\alpha$ , но из-за наличия перекреста с EGFR нарушение данных путей регуляции может привести к усилению MAPK- пути, что подтверждает наличие слабой корреляции между Top-II $\alpha$  и HER2/neu, поэтому в гормон-рецептор-негативных опухолях, как HER2-позитивных так и HER2- негативных молекулярно- биологических подтипах, статистически достоверно уровень экспрессии Top-II $\alpha$  выше по сравнению со средним общим уровнем экспрессии Top-II $\alpha$ .

Выявленные особенности экспрессии фермента топоизомераза-II $\alpha$  при разном рецепторном статусе опухолевых клеток в молекулярно-биологических подтипах рака молочной железы отражены на итоговой схеме (рисунок 4.2.).



*Рисунок 4.2. Уровень экспрессии фермента топоизомеразы –IIα при разном рецепторном статусе опухолевых клеток молекулярно-биологических подтипов инвазивного неспецифического типа РМЖ*

В гормон-рецептор-позитивном, HER2-негативном подтипе с низким уровнем пролиферации Ki-67 (<20%) иммуногистохимическом подтипе уровень экспрессии Top-IIα статистически достоверно ниже среднего общего уровня экспрессии Top-IIα в клетках инвазивного неспецифического типа (протокового) рака молочной железы. Так как этот подтип отличается относительно низким уровнем клеточной пролиферации и регулируется гормонами, усиление пролиферации происходит за счет увеличения эстрагеновых и прогестероновых рецепторов, которые контролируют геномный путь регуляции, при этом большая часть клеток успевает выходить в G<sub>0</sub> фазу клеточного цикла, а в данной фазе белок

Ki-67 не определяется. Это также подтверждается наличием слабой корреляционной связи между Top-Па и Ki-67 и обуславливает низкий уровень экспрессии Top- Па в данном подтипе опухолей. Наше исследование показало, что в клетках инвазивного неспецифического рака молочной железы повышение уровня экспрессии Top- Па связано с высокой пролиферативной активностью опухоли (Ki-67>20%), отсутствием гормональных рецепторов и гиперэкспрессией белка HER2/neu вне зависимости от амплификации его гена.

## ВЫВОДЫ

1. В опухолевых клетках инвазивного неспецифического типа рака молочной железы средний уровень экспрессии Топ-II $\alpha$  повышен по сравнению с нормой и составляет  $17,09 \pm 0,62\%$ .

2. Уровень экспрессии Топ-II $\alpha$  не зависит от экспрессии рецепторов к гормонам в опухолевых клетках молочной железы.

3. Уровень экспрессии Топ-II $\alpha$  достоверно выше в HER2- позитивных опухолях. Между экспрессией Топ-II $\alpha$  и HER2/neu обнаружена слабая положительная корреляционная связь. Достоверных различий между экспрессией Топ-II $\alpha$  в HER2 (ИГХ 2+) – амплифицированных опухолях и в опухолях без амплификации гена не выявлено.

4. Обнаружена сильная положительная корреляционная связь экспрессии Топ-II $\alpha$  с маркером клеточной пролиферации Ki-67. Уровень экспрессии Топ-II $\alpha$  достоверно выше в опухолях с высоким уровнем экспрессии Ki-67 (>20%).

5. Уровень экспрессии Топ-II $\alpha$  связан с особенностями рецепторного аппарата опухолевых клеток рака молочной железы. Выявлена корреляция между экспрессией Топ-II $\alpha$  и Ki-67: сильная- в гормон-рецептор-негативных опухолях, а также в клетках с наличием только гиперэкспрессии рецептора HER2/neu; умеренная- в гормон-рецептор-позитивных опухолях без экспрессии HER2/neu, Ki-67>20% и слабая - в гормон-рецептор-позитивных опухолях без экспрессии HER2/neu, Ki-67<20%.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При диагностике рака молочной железы помимо Ki-67 в качестве дополнительного критерия определения пролиферативного потенциала опухоли целесообразно проводить оценку уровня экспрессии фермента топоизомераза- $\alpha$  в гормон-рецептор негативных опухолях, а также в опухолях с гиперэкспрессией рецептора HER2/neu. В данных молекулярно-биологических подтипах РМЖ наблюдается высокий уровень экспрессии Top- $\alpha$ , который влияет на чувствительность опухоли к ингибиторам Top- $\alpha$  и может учитываться при назначении персонифицированной химиотерапии.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

**АТФ** – аденозинтрифосфорная кислота

**ИГХ** – иммуногистохимический анализ

**РМЖ** – рак молочной железы

**p-РНК**– рибосомные рибонуклеиновые кислоты

**Akt1**– (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase) – внутриклеточный фермент, один из трёх членов семейства протеинкиназ В, является ключевым ферментом сигнального пути PI3K/AKT и вовлечена в регуляцию пролиферации, роста и выживания клеток

**BRCA1**- ген, кодирующий белок - супрессор клеточного роста

**CEP17**– центромерный регион 17 хромосомы

**CI** – доверительный интервал

**EGFR** – трансмембранный рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factorreceptor)

**ELK1** – (transcription activator) активатор транскрипции

**ER** – рецепторы к эстрогену

**ERαKs**– внеклеточные регуляторные киназы (extracellular regulated kinases)

**ERK1/2** – фермент фосфорилирующий сигнальные белки в цитоплазме, затем в ядре регулирует транскрипцию

**FISH** флуоресцентная гибридизация *in situ*

**G<sub>0</sub>**– аутосинтетическая интерфаза клеточного цикла

**G<sub>1</sub>**– пресинтетический период интерфазы клеточного цикла

**G<sub>2</sub>**– постсинтетический период интерфазы клеточного цикла

**HER2/neu (C-erbB)** – мембранный белок, тирозиновая протеинкиназа семейства рецептора эпидермального фактора роста

**Hsp90** – белок теплового шока

**Ki-67** – ядерный белок, маркер клеточной пролиферации

**M** – митоз

**MAPK** – (mitogen-activated protein kinase) митоген-активируемая протеинкиназа - группа мультифункциональных внутриклеточных сигнальных путей, содержащих одну из митоген-активируемых протеинкиназ и контролирующих транскрипцию генов, метаболизм, пролиферацию и подвижность клеток, апоптоз

**MAR/SAR последовательности ДНК** – последовательности 300-1000 пар нуклеов, которые содержат многочисленные сайты ДНК- белкового взаимодействия и обогащены АТ- парами, локализованы исключительно в некодирующих последовательностях генома, главным образом в нетранскрибируемых участках, реже в интронах

**NF –рецептор активатора лиганда (RANKL)** – (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) – мембранный белок, цитокин семейства факторов некроза опухоли

**NF- $\Upsilon$**  – ядерный фактор транскрипции **S** – синтетический период интерфазы клеточного цикла

**PR** – рецепторы прогестерона

**p53** – транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл, выполняет функцию супрессора образования злокачественных опухолей, является антионкогеном

**pRb** – (retinoblastoma protein) белок супрессора опухоли

**RAF** – серин / треонин- специфичные протеинкиназы

**SRE**– (Serum response factor) связывает с транскрипционным фактором

**TCF** – общий транскрипционный фактор (general transcription factor)

**TGF- beta** – трансформирующего ростового фактора- бета

**Top-II $\alpha$**  – ДНК- топоизомераза- II альфа

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Берштейн Л. М. Гормональный канцерогенез/ Берштейн Л. М. – СПб.: Наука – 2000. – 199с.
2. Берштейн Л.М. Подтипы рака молочной железы и их гормонально-метаболическое «обеспечение» / Берштейн Л.М., Семиглазов В.Ф. // Вопросы онкологии. –2011. –том 57. – № 5. – С. 559-567.
3. Богомолов А.Г. Флуоресцентная гибридизация in situ ДНК-проб, полученных из индивидуальных хромосом и хромосомных районов / А.Г. Богомолов, Т.В. Карамышева, Н.Б. Рубцов // Молекулярная биология. – 2014. – Т. 146, № 5. – С. 78–82.
4. Боженко В.К. Профиль экспрессии генов как фактор прогноза при раке молочной железы. Обзор [Электронный ресурс] / В.К. Боженко, Н.И. Рожкова, Е.А. Кудинова и соавт. // Вестник Российского Научного Центра рентгенорадиологии. – 2011. – Выпуск 11. Адрес документа для ссылки: [http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v11/papers/bozh2\\_v11.htm](http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v11/papers/bozh2_v11.htm)
5. Герасимов А.Н. Медицинская статистика / Герасимов А.Н.- М: Медицинское информационное агентство,– 2007. – 480с.
6. Герштейн Е.С. Тканевые маркеры как факторы прогноза при раке молочной желез / Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. // Практическая онкология. – 2002. –3(1) – С. 38–44.
7. Герштейн Е.С. Факторы роста, их рецепторы и нижележащие сигнальные белки: от эксперимента к клинике / Е.С. Герштейн, Н.Е. Кушлинский // Успехи молекулярной онкологии. – 2014. – № 1. – С. 27–35.
8. Гуревич Л.Е. Значение иммуногистохимии для таргетной терапии и прогнозирования в онкологии / Л.Е. Гуревич, И.А. Казанцева, Н.А. Корсакова, М.А. Бобров // Альманах клинической медицины. – 2012. – Т. 27, . – С. 27–34.
9. Давыдов М. И. Онкология: учебник / Давыдов М. И., Ганцев Ш. Х.- М.: ГЭОТАР – Медиа, 2010. – 920 с.

10. Завалишина Л.Э. Морфологическое исследование HER2 статуса. Методика и атлас / Завалишина Л.Э., Франк Г.А. – М.: Media Medica. – 2006. – С.98.
11. Завалишина Л.Э. Особенности амплификации генов на длинном плече 17-й хромосомы в различных молекулярно-генетических подтипах рака молочной железы / Завалишина Л.Э., Данилова Н.В., Мационис А.Э., Павленко И.А. // Архив патологии. – 2014. – № 2. – С. 8–12.
12. Завьялова М.В. Особенности морфологического строения люминального А типа рака молочной железы / М.В.Завьялова, Н.С.Телегина, С.В.Вторушин и соавт. // Сибирский онкологический журнал. – 2013.– №1. – С. 38–41.
13. Зайцев В.М. Прикладная медицинская статистика / Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкин В.И. – Фолиант. – 2006.– 432 с.
14. Закирова Л.Т. Прогностическая значимость иммуногистохимических маркеров RE, RP, Her2/neu рака молочной железы у женщин молодого возраста / Л.Т. Закирова, Д.А. Нишанов, Л.Т. Алимходжаева // Евразийский онкологический журнал. – 2015. – Т. 6, № 3. – С. 42–47.
15. Зборовская И.Б. Современные стратегии исследования маркеров опухолевого роста в клинической практике / И.Б. Зборовская // Успехи молекулярной онкологии. – 2014. – № 2. – С. 4–15.
16. Злокачественные новообразования в России в 2000 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. Чиссова В.И., Старинского В.В. – М.: МНИОИ им. П.А.Герцена. – 2002. – С. 264.
17. Иммуногистохимические методы: Руководство / Ed. by L. Kumar, L. Rudbeck DAKO / Пер. с англ. под ред. Франка Г.А., Малькова П.Г.- М., – 2011. – 224 с.
18. Именитов Е.Н. Молекулярные механизмы опухолевого роста / Именитов Е.Н. // Вопросы онкологии. – 2010. – Т. 56 – №2. – С.117–130.
19. Имянитов Е.Н. Молекулярная онкология: клинические аспекты/ Имянитов Е.Н., Хансон К.П. – Санкт-Петербург – 2007. – С. 211.
20. Калантарли С.С. К вопросу об определении KI-67 в биологических тканях, залитых в парафин (на примере рака молочной железы) / С.С. Калантарли, Д.Е.

Мацко // Вестник Санкт-Петербургского университета.– Серия 11.-Медицина. – 2012. – № 1. С.182–186.

**21.** Карселадзе Д.А. Морфология тройного негативного рака молочной железы / Карселадзе Д.А., Поддубная И.В., Карселадзе А.И. // Архив патологии. – 2010. –Т. 72– №2. – С. 8–12.

**22.** Кириллина М.П. Иммуногистохимическое исследование рецепторов стероидных гормонов при раке молочной железы / М.П. Кириллина // Онкохирургия. – 2011. – Т. 3, № 2. – С. 37–38.

**23.** Кит О.И. Экспрессия p53 и BCL2 при различных подтипах рака молочной железы / Кит О.И., Шатова Ю.С., Новикова И.А. и др. // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 10(1). – С. 85–88.

**24.** Колядина И.В. Иммунная гетерогенность рака молочной железы I стадии: биологическое, популяционное и прогностическое значение (опыт международного сотрудничества) / И.В. Колядина, И.В. Поддубная, С.J.H. Van de Velde, P.J.K. Kuppen, Г.А. Франк, Д.В. Комов, А.И. Карселадзе, E. Bastiaannet, N.G. Dekker-Ensink // Современная онкология. – 2015. – Т. 17, № 1. – С. 30–38.

**25.** Копнин Б.П. Основные свойства неопластической клетки и базовые механизмы их возникновения / Копнин Б.П. // Российское общество клинической онкологии, Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина – Copyright. – Москва: РАМН, 2011.

**26.** Копнин Б.П. Механизмы действия онкогенов и опухолевых супрессоров. Обзор [Электронный ресурс].- Российский Онкологический Портал. – 2009.

**27.** Коржевский Д.Э. Основы гистологической техники / Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров. – СПб: СпецЛит, 2010. – 95 с.

**28.** Красильников М.А. Сигнальные пути, регулируемые эстрогенами, и их роль в опухолевой прогрессии: новые факты и направления поиска / М.А. Красильников, А.М. Щербаков // Успехи молекулярной онкологии. – 2014. – № 1. – С. 12–26.

**29.** Кушлинский Н.Е. Молекулярные механизмы опухолевого роста / Н.Е. Кушлинский, М.В. Немцова // Патогенез. – 2014. – Т. 12, № 1. – С. 4–14.

- 30.** Невожай В.И. Иммуногистохимическое исследование рецепторов стероидных гормонов при раке молочной железы / В.И. Невожай, Е.С. Мюллер // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2007. – № 4. – С. 79–80.
- 31.** Новикова И.А. Пролиферативные иммунологические характеристики молекулярно-биологических подтипов рака молочной железы / Новикова И.А., Шатова Ю.С., Златник Е.Ю. и др. // Междунар. журн. прикл. и фундам. исслед. — 2014. — № 11 (1). — С. 116–119.
- 32.** Пак Д.Д. Подтипы рака молочной железы / Д.Д. Пак, Е.А. Рассказова, Т.В. Данилова // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2012. – № 3–4. – С. 13–19.
- 33.** Петри А. Наглядная медицинская статистика / А. Петри, К. Сэбин. – Москва: ГЭОТАР-Медиа. – 2015. Вып. 3. – 216 с.
- 34.** Петров С.В. Возможности и ограничения иммуногистохимического анализа в клинической онкологии / С.В. Петров // Уральский медицинский журнал. – 2014. – № 8. – С. 5–9.
- 35.** Петров С.В. Новые подходы в диагностике мелко-круглоклеточных опухолей костей и мягких тканей / Петров С.В., Мачадо И., Булычева И.В., Ногузэра Р., Пеллин А., Баччини П., Бертони Ф., Лломбарт-Бош А. // Архив патологии. – 2009. – Т. 71 – № 1. – С. 34–40.
- 36.** Петров С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Петров С.В., Райхлин Н.Т.- Издание 3-е, дополненное и переработанное. – Казань, 2014.
- 37.** Переводчикова Н.И. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / Переводчикова Н.И. // Практическая медицина. – 2016. – 38 с.
- 38.** Петров С.В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / Петров С.В., Райхлин Н.Т.- Издание 3-е, дополненное и переработанное. – Казань, 2014.
- 39.** Пожарисский К.М. Значение иммуногистохимических методик для определения характера лечения и прогноза опухолевых заболеваний / Пожарисский К.М., Леенман Е.Е. // Архив патологии – 2000. – № 62(5). – С.3-11.

- 40.** Пожарисский К.М. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. Прогностическое и предсказательное значение иммуногистохимических маркеров / Пожарисский К.М., Леенман Е.Е. - Под ред. Петрова С.В., Райхлина Н.Т. –Казань. – 2004. – С. 310–329.
- 41.** Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. – 4-е изд., доп. и перераб. / Под ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. – Казань, 2012. – 624 с., с ил.
- 42.** Сазонов С.В. ИГХ диагностика рака молочной железы / С.В.Сазонов - LAP LAMBERT Academic Publishing, 2014. – 140 с.
- 43.** Семиглазов В.Ф. Минимальный рак молочной железы (профилактика, выявление, лечение) / Семиглазов В.Ф., Веснин А.Г., Моисеенко В.М. – Санкт Петербург: Гиппократ, 1992. – С.240.
- 44.** Семиглазов В.Ф. Значение прогностических и предсказывающих факторов при выборе лечения у больных метастатическим раком молочной железы // Практическая онкология. – 2000. – № 2. – С. 26-30.
- 45.** Семиглазов В.Ф. Новые подходы к лечению рака молочной железы. // Вопросы онкологии. – 2013. – N 3.– С.288–291.
- 46.** Семиглазов В.Ф. Общие рекомендации по лечению раннего рака молочной железы St. Gallen-2015, адаптированные экспертами Российского общества онкомаммологов / Семиглазов В.Ф., Палтуев Р.М., Семиглазов В.В., Дашян Г.А., Семиглазова Т.Ю., Криворотько П.В., Николаев К.С. // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2015.– № 11(3). – С.43 – 60.
- 47.** Семиглазов В.Ф. Биологически направленная (таргетная) терапия рака молочной железы / Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., Криворотько П.В., Малодушева А.А., Коларькова В.В., Кочетов И.А., Шамина Е.А., Иванов В.Г. // Русский медицинский журнал. –2007. – № 25. – С.1912-1914.
- 48.** Франк Г.А. Рак молочной железы. Практическое руководство для врачей / Г.А. Франк, Л.Э. Завалишина, К.М. Пожарисский. – М.: Практическая медицина, 2014. – 176 с.

- 49.** Франк Г.А. Морфологическое исследование HER2-статуса рака молочной железы и желудка / Г.А.Франк, Л.Э.Завалишина, Н.В.Данилова, Ю.Ю.Андреева // Методические рекомендации и атлас. Архив патологии. – 2013. –Т.75. – В.2. – С. 1–64.
- 50.** Шатова Ю.С. Экспрессия топоизомеразы- 2 альфа и E- кадгерина при различных подтипах рака молочной железы и репродуктивном статусе больных / Шатова Ю.С., Ващенко Л.Н., Новикова И.А., Златник Е.Ю., Владимирова Л.Ю., Ульянова Е.П., Комова Е.А., Черникова Е.Н., Машурова С.А. // современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3. – С. 156.
- 51.** Шашова Е.Е. Ферменты метаболизма эстрогенов при раке молочной железы и их связь с клинико-морфологическими параметрами / Шашова Е.Е., Кондакова И.В., Слонимская Е.М., Глущенко С.А. // Российский онкологический журнал. – 2009. – № 6. – С.52–55.
- 52.** Щербаков А.М. Молекулярные механизмы гормональной резистентности рака молочной железы: роль сигнальных путей NF-каппаВ и Snail1 / А.М. Щербаков, О.Е. Андреева, А.А. Шарапов, Р.К. Таноян // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – Т. 11, № 12. – С. 42–52.
- 53.** Abramson J. Aires Partners in the Molecular Control of Immunological Tolerance /Abramson J., Giraud M., Benoist C. et al // Cell. – 2010. – Vol. 140 – P.123-135.
- 54.** Akiyama T. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity /Akiyama T., Sudo C., Ogawara H. et al // Science. – 1986. – Vol. 232 – P.1644–1646.
- 55.** Allred D.C. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis /Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M., Clark G.M. // Modern Pathology. – 1998. – Vol. 11 (2). – P. 155-168.
- 56.** Andrew D. Bates The ancestral role of ATP hydrolysis in type II topoisomerases: prevention of DNA double-strand breaks / Andrew D. Bates, James M. Berger, Anthony Maxwell. // Nucleic Acids Research. – 2011. – P.1–13.
- 57.** Antoniou A. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined

analysis of 22 studies/ Antoniou A., Pharoah P. D., Narod S., et al // *Am. J. Hum. Genet.* – 2003.– Vol. 72.– P.1117–1130.

**58.** Arpino G. Predictive value of apoptosis, proliferation, HER-2, and topoisomerase IIalpha for anthracycline chemotherapy in locally advanced breast cancer /Arpino G., Ciocca D.R., Weiss H., Allred D.C., Daguerre P., Vargas-Roig L., Leuzzi M., Gago F., Elledge R., Mohsin S.K. // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2005. – Vol. 92 – P.69–75.

**59.** Arriola E. Genomic analysis of the HER2/TOP2A amplicon in breast cancer and breast cancer cell lines/ Arriola E., Marchio C, David S.P. Tan et al // *Laboratory Investigation.* – 2008. – Vol. 88. – P.491-503.

**60.** Arriola E. Predictive value of HER2 and Topoisomerase II alpha in response to primary doxorubicin in breast cancer/ Arriola E., Marchio C., Varela M. et al // *Eur. J. Cancer.* – 2006. – Vol. 42. – P.2954-2960.

**61.** Asano T. However, the significance of statins' In our recent study, we examined / Asano T., An T., Zwelling L.A.T., Takano H., Fojo A. // *Journal of the National Cancer Institute.* - 1996 - Vol. 8(3). - P.101-10.

**62.** Babiker F.A. Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function / Babiker F.A., De Windt L.J., van Eickels M., Grohe C., Meyer R., Doevendans P.A. // *Cardiovascular Research.* – 2002. – Vol. 53 (3). – P. 709-719.

**63.** Bagwell C.B. Optimizing flow cytometric DNA ploidy and S-phase fraction as independent prognostic markers for nodenegative breast cancer specimens / Bagwell C.B., Clark G.M., Spyrtos F., Chassevent A., Bendahl P.O., Sta O., Killander D., Jourdan M.L., Romain S., Hunsberger B., Baldetorp B. // *Cytometry.* – 2001. – Vol. 46(3). – P.121-135.

**64.** Baird C.L. Topoisomerase II drives DNA transport by hydrolyzing one ATP / Baird C.L., Harkins T.T., Morris S.K., Lindsley J.E. // *Proc. Natl Acad. Sci. USA,* 1999. – Vol. 96. – P. 13685–13690.

**65.** Bates A.D. The ancestral role of ATP hydrolysis in type II topoisomerases: prevention of DNA double-strand breaks, *Nucleic Acids*/ Bates A.D., Berger J.M., Maxwell A. // *Cancer Res.*- 2011.– Vol. 39. – P.6327-6339.

- 66.** Belluti S. Concurrent inhibition of enzymatic activity and NF- $\kappa$ B-mediated transcription of Topoisomerase-II $\alpha$  by bis-DemethoxyCurcumin in cancer cells./ Belluti S., Basile V., Benatti P., Ferrari E., Marverti G., Imbriano C. // *Cell Death Dis.* – 2013. – 4: e – P. 756.
- 67.** Bhargava R. HER-2/neu and topoisomerase II alpha gene amplification and protein expression in invasive breast carcinomas- Chromogenic *in situ* hybridization and immunohistochemical analyses / Bhargava R., Lad P., Chen B.Y. // *Am. J. Clin. Pathol.* – 2005. – Vol. 123. – P. 889-895.
- 68.** Bilous M. Current perspectives on HER2 testing: A review of national testing guidelines/ Bilous M., Dowsett M., Hanna W., Isola J., Lebeau A., Moreno A., Penault-Llorca F., Rüschoff J., Tomasic G., van de Vijver M. // *Mod. Pathol.* – 2003. – Vol. 16. – P. 173– 182.
- 69.** Bower J.J. Topoisomerase II alpha maintains genomic stability through decatenation G (2) checkpoint signaling / Bower J.J., Karaca G.F., Zhou Y., Simpson D.A., Cordeiro-Stone M., Kaufmann W.K. // *Oncogene.* – 2010. – Vol. 29. – P.4787– 4799.
- 70.** Brestein L.M. Excretion of estrogens, catecholestrogens and phytoestrogens in carriers of BRCA1 gene mutations: effects of meformin / Brestein L.M., Koskela A., Boyarkina M. P., Adlercreutz H. // *Neoplasma.* – 2010. – Vol. 57. – P. 333- 338.
- 71.** Brown P.O. A sign inversion mechanism for enzymatic supercoiling of DNA /Brown P.O. , Cozzarelli N.R. // *Science .* – 1979. – Vol. 206. – P. 1081-1083.
- 72.** Brunello E. Classical lobular carcinoma consistently lacks topoisomerase- IIa gene amplification: implications for the tailored use of anthracycline- based chemotherapies / Brunello E., Brunelli M., Manfrin E. , Nottegar A., Bersani S., Vergine M. // *Histopathology .* – 2012. – Vol. 60. – P. 482- 488.
- 73.** Campiglio M. Role of proliferation in HER2 status predicted response to doxorubicin / Campiglio M., Somenzi G., Olgiati C. et al // *Int J Cancer.* – 2003. – Vol. 105 – P. 568-573.

- 74.** Carey L.A. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study / Carey L.A., Perou C.M., Livasy C.A. et al // JAMA. – 2006. – Vol. 21(295). – P. 2492–2502.
- 75.** Carol A. Lange. Integration of progesterone receptor action with rapid signaling events in breast cancer models / Carol A. Lange // J. Steroid Biochem, Mol.Biol. – 2014. - Vol. 12 (32).
- 76.** Castaneda C.A. Prolonged Disease Control in a Patient With Anthracycline and Taxane-Resistant Breast Cancer / Castaneda C.A., Gomez H.L. // Clin. Breast Cancer. – 2009. – Vol. 9 (4). – P. B1-E3.
- 77.** Clark S.E. Molecular subtyping of DCIS: heterogeneity of breast cancer reflected in pre-invasive disease / Clark S.E., Warwick J., Carpenter R., Bowen R.L., S.W. Duffy S.W., Jones J.L. // B. J. C. – 2011. – Vol.104. – P.120– 127.
- 78.** Coon J.S. Amplification and overexpression of topoisomerase II<sub>α</sub> predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer / Coon J.S., Marcus E., Gupta-Burt S. et al // Clin. Cancer Res. –2002. – Vol. 8. – P.1061–1067.
- 79.** Cui X. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy / Cui X., Schiff R. et al // J. of Clin. Oncol. –2005. – Vol. 23(30). – P. 7721-7735.
- 80.** Champoux J.J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism / Champoux J.J. // Annu. Rev. Biochem. –2001. –Vol. 70. – P. 369–413.
- 81.** Chang D-Y Locoregional therapy improves survival for metastatic breast cancer patients? Benefit remains questionable! / Chang D-Y, Lin C-H, Lu Y-S. // J Clin Oncol. 2009 -27:e. – P.179.
- 82.** Cheang M.C.U. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer /Cheang M.C.U., Chia S.K., Voduc D., Gao D., Leung S., Snider J., Watson M., Davies S., Bernard P.S., Parker J.S. // Journal of the National Cancer Institute. – 2009. – Vol. 101, №10. – P. 736-750
- 83.** Cook P.R. The nucleoskeleton and the topology of replication / Cook P.R. // Cell-1991. – Vol. 6. – P.627-635.
- 84.** Dent R. Triple- negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence

- / Dent R., Trudeau M., Pritchard K.I., Hanna W.M., Kahn H.K., Sawka C.A., Lickley A.A., Rawlinson F., Sun P., Narod S.A. // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – № 13 – P. 4429-34.
- 85.** Davis P.L. Complex response of breast epithelial cell lines to topoisomerase inhibitors / Davis P.L., Shaiu W.L., Scott G.L., Iglehart J.D., Hsieh T.S., Marks J.R. // *Anticancer Res.* –1988. – Vol. 18(29) – P.19-32.
- 86.** Deming P.B. The human decatenation checkpoint / Deming P.B., Cistulli C.A., Zhao H., Graves P.R., Piwnica-Worms H., Paules R.S. et al // *Proc Natl Acad Sci USA.* –2001. – Vol. 98 – P. 12044–12049.
- 87.** Demoulin B. Resveratrol induces DNA damage in clon cancer cells by poisoning topoisomerase II and activates the ATM kinase to trigger p53- dependent- apoptosis / Demoulin B., Hermant M., Castrogiovanni C., Staudt C., Dumont P. // *Toxicology in vitro: an international jornal published in association with BIBRA.* – 2015. – Vol.29(5). – P.1156–65
- 88.** Deniel G.C. Immunohistochemistry and Female Reproductive Toxicology: The Ovary and Mammary Glands / Daniel G. Cyr, Patrick J. Devine, Isabelle Plante // *Molecular Cell.* – 2016. – Vol. 7. – P.113–145.
- 89.** Depowski P.L. Topoisomerase II alpha expression in breast cancer: correlation with outcome variable / Depowski P.L., Rosenthal S.I., Brien T.P., Stylos S., Johnson R.L., Ross J.S. // *Mod. Pathol.* – 2000. – № 3. – P. 542–547.
- 90.** Depowski P.L. Prognostic significance of p34 cyclin dependent kinase and MIB-I overexpression and HER2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization in breast cancer / Depowski P.L., Brien T.P., Sheehan Ctylos E., Jonson R.L., Ross J.S. // *Am. J. Clin. Phatol.* –1999. – Vol. 112. – P.459-469.
- 91.** Di Leo A. A meta-analysis of phase III trials valuating the predictive value of HER2 and topoisomerase II alpha in early breast cancer patients treated with CMF or anthracycline- based adjuvant therapy / Di Leo A., Isola J., Pietta F., Ejlertsen B., Bartlett J.M. // *Breast Cancer Treat.* – 2008. – Vol. 107. – P. 705.
- 92.** Di Leo A. HER-2 and topo-isomerase II as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin

plus cyclophosphamide / Di Leo A., Larsimont D., Gancberg D. et al // *Ann Oncol.* - 2001. - Vol. 12. - P.1081-1089.

**93.** Dong K.C. Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type IIA topoisomerases / Dong K.C., Berger J.M. // *Nature.* - 2007. - Vol. 450. - P.1201-1205.

**94.** Dontu G. Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor / Dontu G., El-Ashry D., Wicha M.S. // *Trends Endocrinol. Metab.* - 2004. - Vol. 15- P. 193-197.

**95.** Dong K.C. Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type IIA topoisomerases / Dong K.C., Berger J.M. // *Nature.* - 2007. - Vol. 450. - P.1201-1205

**96.** Dontu G. Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor / Dontu G., El-Ashry D., Wicha M.S. // *Trends Endocrinol. Metab.* - 2004. - Vol. 15. - P.193-197.

**97.** Dunnwald L.K. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients / Dunnwald L.K., Rossing M.A., Li C. // *Breast Cancer Research.* - 2007. - Vol. 9. - P. 6.

**98.** Durbecq V. Correlation between topoisomerase-IIa (Topo-II) gene amplification and protein expression in Her-2 amplified breast cancer patients/ Durbecq V., Desmedt C., Di Leo A. et al // *Int. J. Oncol.* In press. - 2008. - Vol. 33(6). - P.1165-76.

**99.** Durbecq V. Topoisomerase-II alpha expression as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel / Durbecq V., Paesmans M., Cardoso F., Desmedt C., Di Leo A., Chan S., Friedrichs K., Pinter T., Van Belle S., Murray E., Bodrogi I., Walpole E., Lesperance B., Korec S., Crown J., Simmonds P., Perren T.J., Leroy J.Y., Rouas G., Sotiriou C., Piccart M., Larsimont D. // *Mol. Cancer Ther.* - 2004. - № 3. - P. 1207-1214.

**100.** Du Y. The role of topoisomerase IIA in predicting sensitivity to anthracyclines in breast cancer patients: a meta- analysis of published literatures / Du Y., Zhou Q., Yin W., Zhou L., Shen Z., Shao Z., Lu J. // *Breast Cancer Res. Treat.* - 2011. - Vol. 129. - P. 839-848.

- 101.** Easton D.F. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium / Easton D.F. et al // *Am. J. Hum. Genet.* – 1993. – Vol. 52. – № 4. – P. 678–701.
- 102.** Engstrom M.J. TOP2A gene copy number change in breast cancer / Engstrom M.J., Ytterhus B., Vatten L.J., Opdahl S., Bofin A.M. // *Clin. Pathol.* – 2014. – Vol. 67. – P. 420–425.
- 103.** En-Q.I. Qiao Joint detection of multiple immunohistochemical indices and clinical significance in breast cancer / En-Q.I. Qiao, Minghua J., Jianzhong W.U., Jianli, Xinyu X.U., Rong M.A., Xiaohua Zhang, Yuejun H.E., Quanbln Z., X. Song, Liwei Z., Ji-Hai Tang. // *Molecular and clinical oncology.* – 2013. – Vol. 1. – P.703–710.
- 104.** Fan S. Role of direct interaction in BRCA inhibition of estrogen receptor activity / Fan S., Ma Y.X., Wang C. et al // *Oncogene.* – 2001. –Vol. 20 (1). – P. 77–87.
- 105.** Faneyte J.F. Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: predictive markers and relation with outcome / Faneyte J.F., Schrama J.G., Peterse J.L. et al // *Br. J. Cancer.* – 2003. – Vol. 10 – Vol. 88 (3). – P. 406–12.
- 106.** Faratian D. Predictive markers in breast cancer- the future / Faratian D., Bartlertt J. // *Histopathology.* – 2008. – Vol. 52. – P. 91-98.
- 107.** Fitzgibbons M.D. Prognostic Factors in Breast Cancer / Fitzgibbons M.D. et al // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2000. – Vol. 124. – P. 966- 978.
- 108.** Forterre P. Phylogenomics of DNA: their origin and putative roles in the emergence of modern organisms / Forterre P., Gadelle D. // *Nucleic Acids Research.*– 2009.– V.37(3). – P. 679–692.
- 109.** Fountzilas G. HER2 and TOP2A in high- risk early breast cancer patients treated with adjuvant epirubicin- based dose- dense sequential chemotherapy / Fountzilas G., Valavanis C., Kotoula V. et al // *J. Transl. Med.* – 2012. – Vol.10. – P. 10.
- 110.** Fountzilas G. Topoisomerase II alpha gene amplification is a favorable prognostic factor in pations with HER2- positive metastatic breast cancer treated with trastusumab / Fountzilas G., Christodoulou C., Bobos M., Kotoula V., Eleftheraki A.G.,

Xanthakis I., Batistatou A., Pentheroudakis G., Xiros N., Papaspirou I. // *Journal of Translational Medicine*. – 2012. – Vol. 10. – P. 212.

**111.** Foulkes W.D. BRCA1 functions as a breast stem cell regulator / Foulkes W.D. // *J. Med. Genet.* – 2004. – Vol. 41. – P. 1–5.

**112.** Fritz P. C-ErbB2 and topoisomerase II alpha protein expression independently predict poor survival in primary human breast cancer: a retrospective study / Fritz P., Cabrera C.M., Dippon J., Gerteis A., Simon W., Aulitzky W.E., van der Kuip H. // *Breast Cancer Res.* – 2005. – Vol. 7(3). – P. 374–384.

**113.** Fuqua S.A.W. Expression of estrogen receptor beta protein in human breast cancer: correlation with clinical parameters / Fuqua S.A.W., Schiff R., Parra I. et al // In: Program and abstracts of the 23rd Annual San Antonio Breast Cancer Symposium; December 6-9, 2000; San Antonio, Texas. Abstract 123. *Breast Cancer Res Treat.* – 2000. – Vol. 64 – P. 41.

**114.** Gadelle D. Phylogenomics of type II DNA topoisomerases / Gadelle D., Filee J., Buhler C., Forterre P. // *Bioessays*. – 2003. – Vol. 25. – P. 232–242.

**115.** Glynn R.W. TOP2A amplification in the absence of that of HER-2/neu: toward individualization of chemotherapeutic practice in breast cancer / Glynn R.W., Mahon S., Curran C. et al // *Oncologist*. – 2011. – Vol. 16(7). – P. 949-55.

**116.** Gluz O. Triple- negative breast cancer- current status and future directions / Gluz O., Liedtke C., Gottschalk N., Pusztai L., Nitz U., Harbeck N. // *Ann. Oncol.* – 2009. – Vol. 20. – P. 1913–1927.

**117.** Goldhirsch A. Strategies for subtypes- dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer / Goldhirsch A., Wood W.C., Coates A.S., Gelber R.D., Thurlimann B., Senn H.J. // *Ann. Oncol.* – 2011. – Vol. 22 – P. 1736–1747.

**118.** Goldhirsch A. Prognostic Significance of TOP2A Gene Dosage in HER-2 Negative Breast Cancer / Goldhirsch A., Wood W.C., Coates A.S., Gelber R.D., Thürlimann B. // *Oncologist*. – 2012. – Vol. 17. – P. 1246–1255.

- 119.** Gordon M.S. The ATPase reaction cycle of yeast DNA topoisomerase II. Slow rates of ATP resynthesis and P(i) release / Gordon M.S., Andrenyak D.M., Marecek J.F., Lindsley J.E. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 27893–27898.
- 120.** Goswami P.C. Cell cycle-coupled variation in topoisomerase II alpha mRNA is regulated by the 3'- untranslated region- Possible role of redox-sensitive protein binding in mRNA accumulation / Goswami P.C., Sheren J., Albee L.D. et al // *J. Biol.Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 384–392.
- 121.** Guerin M. Overexpression of either c-myc or c-erbB-2/neu proto-oncogenes in human breast carcinomas: correlation with poor prognosis / Guerin M., Barrois M., Terrier M.J. et al // *Oncogene Res.* – 1988. – № 3. – P. 21–31.
- 122.** Hala S. Immunohistochemical expression of topoisomerase II a and tissue inhibitor of mrtalloproteinases 1 in locally advanced breast carcinoma / Hala S., Redey E.I., Aiad H.A., Asaad N.Y. et al // *Menoufia Medical Journal* . – 2014. – Vol. 27. – P. 1–9.
- 123.** Hande K.R. Topoisomerase II inhibitors / Hande K.R. // *Update on Cancer Therapeutics.* –2008. – Vol. 3(1). – P. 13–26.
- 124.** Harris L.N. Induction of topoisomerase II activity after ErbB2 activation is associated with a differential response to breast cancer chemotherapy / Harris L.N., Yang L., Liotcheva V. et al // *Clin. Cancer Res.* –2001. –№ 7. – P. 1497–1504.
- 125.** Heck M.M. In vivo phosphorylation of the 170-kDa form of eukaryotic DNA topoisomerase II and localization of the gene to chromosome region 17q21-22 / Heck M.M., Hittelman W.N., Ernshaw W.C. // *Prac. Nat.l Acad. Sci. USA.* –1988. – Vol. 85. – P. 7177–7181.
- 126.** Hicks D.G. 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 / Hicks D.G., Yoder B.J., Pettay J. et al. // *Hum. Pathol.* – 2005. – Vol. 36. – P. 348–356.
- 127.** Hoklen I.A. Human deoxyribonucleic acid topoisomerase molecular targets of anticancer drags / Hoklen I.A. // *Ann. Clin. Lab. Sci.* –1997. – Vol. 27. – P. 402–412.

- 128.** Holm K. Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns / Holm K., Hegardt C., Staaf J. et al // *Breast Cancer Res.* – 2010. – Vol. 12(3). – P. 36.
- 129.** Hou G.X. Mining expression and prognosis of topoisomerase isoforms in non-small-cell lung cancer by using OncoPrint and Kaplan- Meier plotter / Hou G.X., Liu P., Yang J., Wen S. // Franco R., ed. *PLoS ONE.* – 2017. – 12(3): 0174515. Doi:10.1371/journal.pone.0174515
- 130.** Hui Meng Correlations of TOP2A gene aberrations and expression of topoisomerase II $\alpha$  protein and TOP2A mRNA expression in primary breast cancer: A retrospective study of 86 cases using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry / Hui Meng, Renyin Chen, Wencai Li, Li Xu, Lina Xu. // *Pathology International.* – 2012. – Vol. 62. – P. 391–399.
- 131.** Ikeda H. Illegitimate recombination: Involvement of DNA gyrase / Ikeda H., Shiraishi K., Ogata Y. // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* – 2004. – Vol. 45. – P. 399–408.
- 132.** Inwald E.C. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry / Inwald E.C., Klinkhammer-Schalke M., Hofstädter F. et al // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2013. – Vol. 139(2). – P. 539–552.
- 133.** Isola J. HER2 and TOP2A as predictive markers for anthracycline- containing chemotherapy regimens as adjuvant treatment of breast cancer: a meta-analysis of individual patient data / Isola J., Di Leo A., Desmedt C., Bartlett J.M.S., Piette F., Ejlertsen B., Pritchard K.I., Larsimont D., Poole C., Earl H., Mouridsen H., Frances P. O'Malley, Cardoso F., Tanner M., Munro A., Twelves C.J., Sotiriou C., Shepherd L., Cameron D., Piccart, Marc Buyse M.J. // *Lancet Oncol.* – 2011. – № 12. – P. 1134–42.
- 134.** Jalava P. Immunohistochemical staining of estrogen and progesterone receptors: aspects for evaluating positivity and defining the cutpoints / Jalava P., Kuopio T., Huovinen R. et al // *Anticancer Res.* – 2005. – Vol. 25(3c). – P. 2535–42.
- 135.** Jarvinen T.A. Expression of topoisomerase II $\alpha$  is associated with rapid cell proliferation, aneuploidy, and c-erbB2 overexpression in breast cancer / Jarvinen T.A.,

Kononen J., Pelto-Huikko M. et al // *Am. J. Pathol.* –1996. – Vol. 148(6). – P. 2073–2082.

**136.** Jarvinen T. Amplification and deletion of topoisomerase II  $\alpha$  associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer / Jarvinen T., Tanner M., Rantanen V., Grenman S. // *J. Pathol.* –2000. – Vol. 156. – P. 839–847.

**137.** Jarvinen T.A. HER2-neu and topoisomerase II  $\alpha$  in breast cancer / Jarvinen T.A., Liu E.T. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2003. – Vol. 78. – P. 299–311.

**138.** Jeffrey S. Ross The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine / Jeffrey S. Ross, Elzbieta A., Slodkowska, W. Fraser Symmans, Lajos Pusztai, Peter M. Ravdin, Gabriel N. Hortobagyi // *The Oncologist.* – 2009. – Vol. 14 – P. 320–368.

**139.** Jensen, E.V. The estrogen receptor: a model for molecular medicine / Jensen, E.V., Jordan V.C. // *Clin. Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9. – P. 1980–1989.

**140.** Jernigan R.L. Relating Structure to Function Through the Dominant Slow Modes of Motion of DNA Topoisomerase II / Jernigan R.L., Demirel M.C., Bahar I. // *International Journal of Quantum Chemistry.* – 1999. –Vol. 75. – P. 301–312.

**141.** Joensuu K. ER, PR, HER2, Ki-67 and CK5 in Early Late Relapsing Breast Cancer- Reduced CK5 Expression in Metastases./ Joensuu K., Leidenius M., Kero M., Leif C. Anderson, Kathryn B. Horwitz, Heikkila P. // *Breast Cancer: Basic and Clinical Research.* – 2013. – № 7. – P. 23–34

**142.** Kennedy R.D. BRCA1 and c-Myc associate to transcriptionally repress psoriasin, a DNA damage-inducible gene / Kennedy R.D., Gorski J.J., Quinn J.E., Stewart G.E., James C.R., Moore S. et al // *Cancer Res.* – 2005. –№ 65. – P. 10265–10272.

**143.** Kim A. Multiplication of chromosome 17 centromere is associated with prognosis in patients with invasive breast cancers exhibiting normal HER2 and TOP2A status / Kim A., Hyung Chan Shin., Young K.B. // *J. Breast Cancer.* – 2012. – Vol. 15 (1). – P. 24–33.

**144.** Knoop A.S. Retrospective analysis to topoisomerase- II $\alpha$  amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to

cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group / Knoop A.S., Knudsen H., Balslev E. et al // *J. Clin. Oncol.* –2005. – № 23. – P. 7483–7490.

**145.** Konecny G. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer / Konecny G., Pauletti G., Pegram M., Untch M., Dandekar S., Aguilar Z., Wilson C., Rong H.M., Bauerfeind I., Felber M., Wang H.J., Beryt M., Seshadri R., Hepp H., Slamon D.J. // *J. Natl.Cancer Inst.* –2003. – Vol. 95. – P. 142–153.

**146.** Kushner P.J. Estrogen receptor pathways to AP-1 / Kushner P.J., Agard D.A., Greene G.L. et al // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2000. – № 74. – P. 311–317.

**147.** Linch B.J. Human DNA topoisomerase II alpha: a new markers of cell proliferation in invasive breast cancer / Linch B.J., Guinee D.G., Holden J.A. // *Human Pathol.* –1997. – № 28. – P. 1180–1188.

**148.** Liu L.F. Type II DNA topoisomerases: Enzymes that can unknot A topologically knotted DNA molecule via a reversible double strand break / Liu L.F., Liu C.C., Alberts B.M. // *Cell.* –1980. – № 9. – P. 697–708.

**149.** Liu S. BRCA1 regulate human mammary stem / progenitor cell / Liu S., Ginestier C., Charafe-Jauffert E. et al // *Proc. Nat. Acad. Sci.* –2008. – Vol. 105(5). – P. 1680–85.

**150.** Lui S. Progesterone receptor is a significant factor associated with clinical outcomes and effect of adjuvant tamoxifen therapy in breast cancer patients / Lui S., Chia S.K., Mehl E. et al // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2010. – Vol. 119(1). – P. 53–61.

**151.** Luo X. Structure of the Mad2 spindle assembly checkpoint protein and its interaction with CDC20 / Luo X., Fang G., Coldiron M., Lin Y., Yu H., Kirschner M.W. et al // *Nature Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 7. – P. 224–229.

**152.** Mc Cormack O. Progesterone receptor B (PRB) promoter hypermethylation in sporadic breast cancer: Progesterone receptor hypermethylation in breast cancer / Mc Cormack O., Chung W.Y., Fritzpatric P. et al // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2008. – Vol. 111. – P. 45–53.

- 153.** Mac Grogan G. DNA topoisomerase II alpha expression and the response to primary chemotherapy in breast cancer / Mac Grogan G., Rudolph P., Mascarel I.I. et al // *Br. J. Cancer* . –2003. – Vol. 89 (4). – P. 666–671.
- 154.** Marotti J.C. Estrogen receptor-beta expression in invasive breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses Health Study / Marotti J.C., Collins L.C., Hu R., Tamimi R.M. // *Mod. Pathol.* – 2010. – Vol. 23. – P. 197–204.
- 155.** Melchor L. An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes / Melchor L., Benítez J. // *Carcinogenesis*. – 2008. – Vol. 29(8). – P. 1475–82.
- 156.** Mokbel K. From HER2 to herceptin / Mokbel K., Hassanally D. // *Curr. Med. Res. Opin.* – 2001. – Vol. 17(1). – P. 51–59.
- 157.** Moon W.K. Ki-67 can be used for further classification of triple-negative breast cancer in two subtypes with different response and prognosis / Moon W.K., Keam B., Im S.A., Kim H.J., Oh D.Y., Lee S.H., Chie E.K., Han W., Kim D.W. // *Br. Cancer Res.* – 2011. – № 13. – P.22.
- 158.** Mueller R.E. Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples / Mueller R.E., Parkes R.K., Andrulis I., O'Malley F.P. // *Genes Chromosomes Cancer*. – 2004. – Vol. 39(4). – P. 288–297.
- 159.** Nakopulou L. DNA topoisomerase II alpha immunoreactivity as a marker of aggressiveness in invasive breast cancer / Nakopulou L., Lazaris A.C., Kavantzias N. // *Pathobiology*. – 2000. – № 68. – P. 137–143.
- 160.** Narayanan R. Selective androgen receptor modulators (SARMs) negatively regulate triple-negative breast cancer growth and epithelial:mesenchymal stem cell signaling / Narayanan R., Ahn S., Cheney M.D., Yepuru M., Miller D.D., Steiner M.S., Dalton J.T. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 29. – P. 9–7.
- 161.** Nichols M.D. Structure and function of an archeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11 / Nichols M.D., De Angelis K., Keck J.L., Berger J. // *M EMBO J.* – 1999. – № 18. – P. 6177–6188.

- 162.** Nikolenyi A. Tumor Topoisomerase II alpha Status and Response to Anthracycline- Based Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer / Nikolenyi A., Sukosd F., Kaizer L., Csorgo E., Voros A., Uhercsak G., Ormandi K., Lazar G., Thurzo L., Brodowicz T., Kahan Z. // *Oncology*. – 2011. – Vol. 80. – P. 269–277.
- 163.** Nielsen K.V. Aberrations of ERBB2 and TOP2A genes in breast cancer / Nielsen K.V., Miller S., Miller S. et al // *Mol. Oncol.* – 2010. – № 4. – P. 161–168.
- 164.** Nitiss J.L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy / Nitiss J.L. // *Nat. Rev. Cancer*. – 2009. – № 9. – P. 338–350.
- 165.** Nogil H. Triple-negative breast cancer exhibits a favorable response to neoadjuvant chemotherapy independent of the expression of topoisomerase II  $\alpha$  / Nogil H., Uchida K., Kamio M. et al // *Molecular and clinical oncology*. – 2016. – № 4. – P. 383–389.
- 166.** Oakman C. Topoisomerase II alpha and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy / Oakman C., Moretti E., Sotiriou C., Viale G., Di Leo A. // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2009. – Vol. 101– P. 1735–1736.
- 167.** Olsen K.E. Amplification of HER2 and TOP2A genes in breast cancer investigated by new FISH probes / Olsen K.E., Knudsen H., Rasmussen B.B. et al // *Acta Oncol.* – 2004. – Vol. 156. – P. 830–847.
- 168.** Osheroff E. Catalytic function of DNA topoisomerase II / Osheroff E., Zechiedrich E. L., Gale K.C. // *Bioessays*. – 1991. – Vol. 13. – P. 269–273.
- 169.** Park K. Topoisomerase II-alpha (topoII) and HER2 amplification in breast cancers and response to preoperative doxorubicin chemotherapy / Park K., Kim J., Lim S., Han S. // *Eur J Cancer*. – 2003. – Vol. 39(5). – P. 631–634.
- 170.** Pavlaki K. Estrogen receptor beta protein expression in invasive breast cancer / Pavlaki K., Lazaris A., Gakiopoulou H., Markaki S. // *Virchows Arch.* – 2009. – Vol. 2141. – P. 300.
- 171.** Payne J.L. Predictive markers in breast cancer- the present / Payne J.L., Bowen R.L., Jones J.L., Wells C.A. // *Histopathology*. – 2008. – Vol. 52. – P. 82–90.

- 172.** Pearson G. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions/ Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T. et al // *Endocr. Rev.* –2001. – Vol. 22. – P. 153–83.
- 173.** Penauit-Lorca E. Induction chemotherapy for breast carcinoma: predictive markers and relation with outcome / Penauit - Lorca E., Cayer A., Bouchet M.E. et al // *Int. J. Oncol.* – 2003. – № 22. – P. 1319–1325.
- 174.** Perou C.M. Molecular portraits of human breast tumours / Perou C.M., Sorlie T., Elsen M.B. et al // *Nature.* – 2000. – Vol. 406. – P. 747–752.
- 175.** Petit T. Comparative value of tumor grade, hormonal receptors, Ki-67, Her-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy / Petit T., Wilt M., Velten M. et al // *Eur. J. Cancer.* – 2004. – Vol. 40(2). – P. 205–211.
- 176.** Pommier Y. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs / Pommier Y., Leo E., Zhang H.L., Marchand C. // *Chem Biol.* – 2010. – Vol. 28, № 17(5) – P. 421–33.
- 177.** Press M.F. Alteration of topoisomerase II-a gene in human breast cancer: Association with responsiveness to anthracycline- based chemotherapy / Press M.F., Sauter G., Buyes M. et al // *J.Clin. Oncol.* – 2011. – Vol. 29(7). – P. 859–867.
- 178.** Pritchard K.I. HER-2 and topoisomerase II as predictors of response to chemotherapy / Pritchard K.I., Messersmith H., Elavathil L., Trudeau M., O'Malley F., Dhesy-Thind B. // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – Vol. 26(5). – P. 736–744.
- 179.** Redwood C. Casein kinase II stabilizes the activity of human topoisomerase II  $\alpha$  in a phosphorylation-independent manner. / Redwood C., Davies S.L., Wells N.J., Fry A.M., Hickson I.D. // *J Biol Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 3635–3642.
- 180.** Rody A. Gene expression of topoisomerase II  $\alpha$  (TOP2A) by microarray analysis is highly prognostic in estrogen receptor (ER) positive breast cancer / Rody A., Karn T., Ruckhäberle E. et al // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2009. – № 113. – P. 457–466.
- 181.** Sahyoun N. Protein kinase C phosphorylates topoisomerase II: topoisomerase activation and its possible role in phorbol ester-induced differentiation of HL-60 cells /

Sahyoun N., Wolf M., Besterman J., Hsieh T., Sander M., LeVine H. et al // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1986. – Vol. 83. – P. 1603–1607.

**182.** Sander M. Double strand DNA cleavage by type II DNA topoisomerase *Drosophila melanogaster* / Sander M., Hsieh T. // J. Biol. Chem. – 1983. – Vol. 258(13). – P. 8421–8428.

**183.** Sandri M.I. p53 regulates the minimal promoter of the human topoisomerase IIalpha gene / Sandri M.I., Isaacs R.J., Ongkeko W.M., Harris A.L., Hickson I.D., Brogini M. et al // Nucleic Acids Res. – 1996. – Vol. 24. – P. 4464–4470.

**184.** Shapiro P.S. Extracellular signal-regulated kinase activates topoisomerase IIalpha through a mechanism independent of phosphorylation / Shapiro P.S., Whalen A.M., Tolwinski N.S., Wilsbacher J., Froelich-Ammon S.J., Garcia M. et al // Mol Cell Biol. – 1999. – № 19. – P. 3551–3560.

**185.** Shinagawa H. BRCA1-mediated ubiquitination inhibits topoisomerase II alpha activity in response to oxidative stress / Shinagawa H., Miki Y., Yoshida K. // Antioxid. Redox Signal. – 2008. – Vol. 10. – P. 939–949.

**186.** Schindlback C. Schindlback C. Topoisomerase IIa expression rather than gene amplification predicts responsiveness of adjuvant anthracycline-based chemotherapy in women with primary breast cancer / Schindlback C., Mayr D., Oliver C., Rack B., Engelstaedter V., Jueckstock J., Jenderek C., Andergassen U., Jeschke U., Friese K. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. – 2010. – Vol. 136. – P. 1029–1037.

**187.** Sircoulomb F. Genome profiling of ERBB2-amplified breast cancers / Sircoulomb F., Bekhouche I., Finetti P. et al // BMC Cancer. – 2010. – № 10. – P.539–557.

**188.** Smith K. Topoisomerase II alpha co- amplification with c-erbB2 in human primary breast cancer cell lines: relationship to m- AMSA and mitoxantrone sensitivity / Smith K., Houlbrook S., Greenall M., Carmichael J., Harris A.L. // Breast Oncogene. – 1993. – Vol. 8. – P. 933–938.

**189.** Sorlie T. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications/ Sorlie T., Perou C.M., Tibshirani R., et al // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2001. – Vol. 98. – P.10869–10874.

- 190.** Stros M. HMGB1 and HMGB2 proteins up-regulate cellular expression of human topoisomerase II alpha / Stros M., Polanská E., Struncová S., Pospíšilová S. // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – Vol. 37. – P. 2070–2086.
- 191.** Stuart-Harris R. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients / Stuart-Harris R., Caldas C., Pinder S.E., Pharoah P. // *Breast.* – 2008. – Vol. 17 – P. 323–334.
- 192.** Tanner B. Expression of c-erbB-2 and topoisomerase II alpha in relation to chemoresistance in ovarian cancer / Tanner B., Pilch H., Schäffer U. et al // *Zentralbl. Gynakol.* – German. – 2006. – Vol. 124. – P. 176–183.
- 193.** Tanner M. Topoisomerase IIa gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER2/neu –amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401 / Tanner M., Isola J., Wiklund T. et al // *J. Clin. Oncol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 2428–2436.
- 194.** Tanos T. ER- and PR- signaling nodes during mammary gland development / Tanos T., Rojo L., Echeverria P., Brisken C. // *Breast Cancer Research.* – 2012. – P. 214–210.
- 195.** Tao Chen Topoisomerase II $\alpha$  in Chromosome Instability and Personalized Cancer Therapy / Tao Chen, Yan Sun, Ping Ji, Scott Kopetz, Wei Zhang // *Oncogene.* – 2015. – Vol. 34(31). – P. 4019–4031.
- 196.** Theillet C. What do we learn from HER2-positive breast cancer genomic profiles? / Theillet C. // *Breast Cancer Research.* – 2010. – Vol. 12(3). – P. 107–109
- 197.** Thompson M.E. Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression / Thompson M.E., Jensen R.A., Obermiller P.S., Page D.L., Holt J.T. // *Nat Genet.* – 1995. – № 9. – P. 444–450.
- 198.** Tiwan R.K. HER2/neu amplification and overexpression in primary human breast cancer is associated with early metastasis / Tiwan R.K., Borgen P.I., Wong G.Y. et al // *Anticancer Res.* – 1992. – № 12. – P. 419–425.
- 199.** Tsai S.C. Histone deacetylase interacts directly with DNA topoisomerase II / Tsai S.C., Valkov N., Yang W.M., Gump J., Sullivan D., Seto E. // *Nat. Genet.* – 2000. – № 26. – P. 349–353.

- 200.** Usha L. 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* / Usha L., Tabesh B., Morrison L.E. et al // *Oncology*. – 2008. – Vol. 1 – P. 1756–8722.
- 201.** Urruticoechea A. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer / Urruticoechea A., Smith I.E., Dowsett M. // *J. Clin. Oncol.* – 2005. –23 – P. 7212–7220.
- 202.** Vologodskii A.V. Mechanism of topology simplification by type II DNA topoisomerases / Vologodskii A.V., Zhang W., Rybenkov V.V., Podtelezhnikov A.A., Subramanian D., Griffith J.D., Cozzarelli N.R. // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 2001. – № 98. – P. 3045–3049.
- 203.** Venkataramu C. Novel Molecular Markers of Malignancy in Histologically Normal and Benign Breast / Chinnambally Venkataramu, Susan M., Mc Carthy, Heyoung L., Mc Bride, Eleanor Harris, Nazanin Khakpour, Timothy J. Yeatman // *Pathology Research International, Volume*. – 2011. – Article ID 489064. – 18 p.
- 204.** Walker R.A. Immunohistochemistry and Breast Cancer. Diagnosis, Therapy and Prognosis / Walker R.A., Harris A.L., Balslev E. - Corporate Headquartes Denmark. – 2004. – 23p.
- 205.** Wang J.C. Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega / Wang J.C. // *J.Mol. Biol.* –1971. – Vol. 55. – P. 523–533.
- 206.** Wang J.C. DNA topoisomerases / Wang, J.C. // *Annu. Rev. Biochem.* – 1996. – Vol. 65. – P. 635–692.
- 207.** Wang J.C. A journey in the world of DNA rings and beyond / Wang, J.C. // *Annu. Rev. Biochemistry* – 2009. – 78:31. – P. 54
- 208.** Wang J. TOP2A amplification in breast cancer is a predictive marker of anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy efficacy / Wang J., Xu B., Yuan P. et al // *Breast Cancer Res. Treat.* –2012. – Vol. 135(2). – P. 531–537.
- 209.** Wang J.C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective / Wang J.C. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 3. – P. 430–440.

- 210.** Wang Q. Inhibition of DNA topoisomerase II $\alpha$  gene expression by the p53 tumor suppressor / Wang Q., Zambetti G.P., Suttle D.P. // *Mol Cell Biol.* – 1997. – Vol. 17. – P. 389–397.
- 211.** Wang Z.B. Expression of ER, PR and Cyclin D1 in breast infiltrating ductal carcinoma and their clinico- pathological significance / Wang Z.B., Zhao P., Liu M. and Li X.H. // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* – Chinese. – 2005. – Vol. 85. – P. 514–517.
- 212.** Watt P.M. Structure and function of type II DNA topoisomerases / Watt P.M., Hickson I.D. // *Biochem J.* – 1994. – Vol. 303. – P. 681–695.
- 213.** Woessner R.D. Proliferation-dependent and cell-cycle dependent differences in expression of the 170-kilodalton and 180-kilodalton forms of topoisomerase-II in NIH-3T3 cells / Woessner R.D., Mattern M.R., Mirabelli C.K., Johnson R.K., Drake F.H. // *Cell Growth and Differentiation.* – 1991. – Vol. 2. – P. 209–214.
- 214.** Wolff A.C. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer / Wolff A.C., Hammond M.E.H., Schwartz J.N. et al // *J. Clin. Oncol.* – 2007. – № 25– P.118–145.
- 215.** Wu Z. HY-2, a novel DNA topoisomerase II inhibitor, induces G2/M cell cycle arrest in HCT-116 cells / Wu Z., Zhao Y., Zhang Y., Zhu L. // *Journal of chemotherapy.* – 2014. – № 26(6). – P.342–347.
- 216.** Xu Y. Inhibition of Topoisomerase (DNA) I (TOP 1): DNA Damage Repair and Anticancer therapy / Xu Y., Her C. // *Biomolecules.* – 2015. – Vol. 5(3). – P. 1652–70.
- 217.** Yarden Y., Sliwkowski M.X. Untangling the ErbB signaling network // *Nature, Reviews in Molecular and Cellular Biology.* – 2001. – Vol. 2. – P. 127–137.
- 218.** Yerushalmi R. Ki-67 in breast cancer: prognostic and predictive potential / Yerushalmi R., Woods R., Ravdin P.M., Hayes M.M., Gelmon K.A. // *Lancet. Oncol.* – 2010. – Vol. 11. – P. 174–183.
- 219.** Zaczek A.J. Prognostic Significance of TOP2A Gene Dosage in HER-2-Negative Breast Cancer / Zaczek A.J., Markiewicz A., Seroczynska B., Skokowski J., Jaskiewicz J., Pienkowski T., Olszewski W.P., Szade J., Rhone P., Welnicka- Jaskiewicz M., Jassem J. // *The Oncologist.* – 2012. – Vol. 17. – P. 1246–1255.

- 220.** Zar J.H. Biostatistical analysis /J.H. Zar. – NJ: Upper Saddle River, Pearson Prentice-Hall. – 2010. – 960p.
- 221.** Zavyalova M.V. The presence of alveolar structures in invasive ductal NOS breast carcinoma is associated with lymph node metastasis / Zavyalova M.V., Perelmuter V.M., Vtorushin S.V., Denisov E.V., Litvyakov N.V., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V. // Diagn. Cytopathol. – 2013. – Vol. 41. – P. 279–282.
- 222.** Zelko I. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression / Zelko I., Mariani T., Folz R. // Free Radic Biol Med. – 2002. – Vol. 33(3). – P. 337–349.
- 223.** Zhou Q. Topoisomerase Iia mediates TCF- dependent epithelial- mesenchymal transition in colon cancer / Zhou Q., Abraham A.D., Lli A. Babalморad, Bagby S., Arcaroli J.J., Hansen R.J., Vleriote F.A., Gustafson D.L., Schaack J., Messersmith W.A., LaBarbera D.V. // Oncogene. – 2016. – P. 1–10.
- 224.** Zhu Li HER2 and topoisomerase Iia: possible predictors of response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer patients / Zhu Li, Li Ya-fen, Chen Wei-guo, He Jian-rong, Peng Chen- hong, Zhu Zheng-gang and Li Hong-wei // Chinese Medical Journal. – 2000. – Vol. 121(20).
- 225.** Zurich Consensus: Statement of German Experts on St. Gallen International Expert Consensus on Primary Breast Cancer / Untch M., Gerber B., Mobus V., Schneeweiss A., Thomssen C., von Minckwitz G., Beckmann M.W., Blohmer J.U., Costa S.D., Diedrich K. // Brest cancer. – 2011. – Vol. 6. – P. 144–152.

