

А.А. Самусєва

Національний університет
охорони здоров'я України
імені П.Л. Шупика,
Київ, Україна

Ключові слова: тричі негативний рак молочної залози, топоізомераза 2 альфа (ТОР ІІα), таксани, лікувальний патоморфоз, молекулярні маркери.

DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2023.01.069>

ТОПОІЗОМЕРАЗА ІІ АЛЬФА ТА ЇЇ ВПЛИВ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ НЕОАД'ЮВАНТНОЇ ХІМІОТЕРАПІЇ ПРИ ТРИЧІ НЕГАТИВНОМУ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Тричі негативний рак молочної залози (ТН РМЗ) — це агресивний підтип РМЗ, що асоціюється з поганим прогнозом і відсутністю стандартних мішеней для лікування, а також гетерогенністю. Саме відсутності терапевтичних мішеней та гетерогенність пухлини є основними причинами виникнення резистентності до лікування у пацієнтів з ТН РМЗ. Відмінності у властивостях пухлинних клітин забезпечуються ферментами, які є важливими потенційними мішенями для лікування, що робить пошук прогностичних маркерів і потенційних мішеней лікування при ТН РМЗ важливим напрямком досліджень. **Мета:** підвищити результати лікування хворих на ТН РМЗ шляхом оцінки топоізомеразу ІІ альфа (ТОР ІІα) як потенційного предиктивного маркера ефективності лікування. **Об'єкт і методи:** дослідження включало 45 пацієнток з ТН РМЗ стадії ІІ–ІІІ, у яких додатково до стандартних маркерів досліджували рівень експресії ТОР ІІα в пухлинній тканині. В дослідженні використано інструментальні методи діагностики, патоморфологічне та імуногістохімічне дослідження, а також статистичні методи оцінки даних. **Результати:** використання таксановмісних схем хіміотерапії у пацієнток з ТН РМЗ підвищує ефективність лікування. Гіперекспресія ТОР ІІα асоціюється з кращим прогнозом та відповіддю на лікування у пацієнток з ТН РМЗ. **Висновки:** отримані дані дозволяють розглядати ТОР ІІα, як прогностично цінний маркер перебігу захворювання у пацієнток з ТН РМЗ та ефективності медикаментозної терапії, а також демонструють перевагу таксановмісних схем лікування у пацієнток з ТН РМЗ.

Рак молочної залози (РМЗ) є найчастішою в світі онкопатологією у жінок. У 2020 р. за даними GLOBOCAN було зареєстровано понад 2,2 млн нових випадків РМЗ у жінок [1]. Найчастішим підтипом РМЗ, що діагностують, залишається люмінальний HER2-негативний (рис. 1) [2].

Тричі негативний РМЗ (ТН РМЗ), що характеризується відсутністю рецепторів естрогенів, прогестерону та HER2/neu, відноситься до агресивних підтипів РМЗ. Пухлини цього підтипу частіше представлені низькодиференційованими клітинами з високою проліферативною активністю, що у поєднанні з обмеженістю можливостей лікування робить ТН РМЗ прогностично найгіршим підтипом. На ТН РМЗ припадає 10–15% від усіх випадків РМЗ. За рахунок гетерогенності характеристик існує декілька класифікацій ТН РМЗ. У 2011 році B.D. Lehmann зі співавт. визначили наступні підтипи ТН РМЗ [3]: базальноподібний підтип 1 (BL1) з подовженим клітинним циклом та генними сигнатурами пошкодження ДНК; базальноподібний підтип 2 (BL2) з високою експресією сигнальних шляхів факторів росту та міоепітеліальних маркерів (EGF, NGF, MET, Wnt/β-catenin, IGF1R);

мезенхімальний підтип (M); мезенхімальний підтип 2 (MSL) з генними сигнатурами підвищеної активності, пов'язаною з клітинним диференціюванням та сигнальними шляхами факторів росту; імуномодуляторний (IM) “збагачений” імунними клітинами; люмінальний андрогенний підтип (LAR), що характеризується наявністю андрогенових рецепторів; нестабільний варіант (UNS) [4].

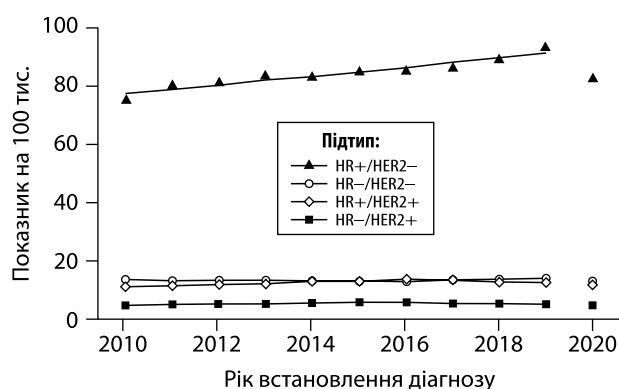


Рис. 1. Показники захворюваності на РМЗ різних молекулярних підтипів за даними SEER (2010–2020 рр.)

Ця класифікація була виділена на основі аналізу хірургічних зразків, що включали ракові та не ракові клітини. Подальше поглиблене дослідження не лише внутрішньоклітинних (цитоплазматичні, ядерні), а й зовнішніх (рецептори, зовнішні сигнальні шляхи і тд.) характеристик клітин пухлини у 2015 р. призвело до виділення 4 підтипів [5]: *люмінальний андрогенний підтип (LAR)*; *мезенхімальний (MES)*; *базальноподібний з імуносупресією (BLIS)*; *базальноподібний з імунною активацією (BLIA)*.

Суттєвий вплив на вибір медикаментозного лікування пацієнтів з РМЗ мають статус рецепторів естрогенів (ER) та HER2/neu. Пацієнти з пухлинами позитивними за статусом ER отримують гормонотерапію, пацієнти з HER2/neu позитивними пухлинами отримують таргетну терапію. В той же час, для пацієнтів з ТН РМЗ основним варіантом лікування є хіміотерапія (ХТ) [6]. Відповідь на неоад'ювантну ХТ (НХТ) є важливим прогностичним маркером у пацієнтів з ТН РМЗ. Пацієнти, у яких був досягнутий повний лікувальний патоморфоз після НХТ, мають набагато кращий прогноз на відміну від пацієнтів, у яких повний лікувальний патоморфоз не був досягнутий, прогноз останніх гірший. Таким чином, важливим залишається пошук мішеней для лікування при ТН РМЗ. Відмінності у властивостях пухлинних клітин (стійкість до несприятливих факторів, морфологічні зміни і тд.) забезпечуються ферментами, які є важливими потенційними мішенями для лікування [7].

Топоізомерази (ТОР) — ферменти, які каталізують топологічні зміни кільцевої молекули ДНК шляхом контролю рівня суперспіралізації (явище пере- або недоскручування топологічно замкнутих ланцюгів ДНК, в результаті якого вісь подвійної спіралі сама закручується в спіраль вищого порядку), який може змінюватися в процесі її реплікації, транскрипції, гомологічної рекомбінації, а також під час перебудов хроматину. ТОР релаксують суперспіралізовані молекули ДНК, знімаючи їх внутрішнє напруження шляхом утворення тимчасових одно- або дволанцюгових розривів з подальшим лігуванням (“зшиванням”) [8]. Першим ТОР описав J.C. Wang в 1971 р. при вивченні ДНК *Escherichia coli*. Початково їх назва була “протеїн ω (омега)” [9]. При подальшому вивченні протеїну ω його переіменували у ТОР I типу (ТОР I), а у 1976 р. M. Gellert описав ТОР II типу (ТОР II) [10]. За механізмом дії ТОР I утворюють розрив тільки одного ланцюга у двоспіральній ДНК, що не вимагає енергетичних витрат. ТОР II утворюють розрив обох ланцюгів двоспіральної ДНК і проводять крізь розрив інший дволанцюговий сегмент. ТОР обох типів поділяються на 4 підтипи: I альфа (I α), I бета (I β), II альфа (II α) та II бета (II β).

Саме ТОР II α необхідні для росту клітин. Їх активність збільшується в проліферуючих кліти-

нах і є максимальною в S-фазі клітинного циклу. В межах своєї життєдіяльності ракові клітини, для забезпечення більш швидкого ділення, потребують більш високого рівня активності ТОР, що, як правило, відображається у їх високій експресії в клітинах пухлини.

Ампліфікація генів — один з механізмів активації онкогенів у процесі розвитку пухлини. Цікавим є те, що на q-плечі хромосоми 17 розміщені багато генів, аберації яких описані при РМЗ. Ампліфікації зачіпають у першу чергу два локуси — 17q12 та 17q21, саме в цих локусах розташовані гени HER2/neu та ТОР II α відповідно [11]. Також у локусі 17q12 розташовується ген *BRCA 1*, відмінним є розташування гену *BRCA 2* на короткому плечі хромосоми 13.

Ферменти, які відповідають за відмінні характеристики пухлинних клітин (прискорена проліферація, стійкість до несприятливих факторів, мінливість, гетерогенність та ін.) є потенційними мішенями для протипухлинної терапії, тому потенційними маркерами чутливості пухлини до останньої вважаються ТОР. Речовини, які блокують дію ТОР називаються інгібіторами топоізомерази. Інгібітори ТОР діляться на два типи: специфічні інгібітори — топоізомеразні “отрути” і неспецифічні інгібітори — топоізомеразні супресори. Представниками першої групи є камптотексин для ТОР I і етопозид для ТОР II. До представників другої групи відносяться антрациклінові антибіотики, новобіоцин, мербарон та ін. [12]. Антрациклінові антибіотики широко використовують у лікуванні при РМЗ, у тому числі при ТН РМЗ. Саме тому, ТОР II α може бути важливим предиктивним маркером ефективності медикаментозної терапії у пацієнтів з ТН РМЗ.

Таким чином, пошук інформативних предиктивних маркерів в лікуванні при ТН РМЗ є надважливим напрямком у вирішенні проблематики цього захворювання.

Метою цього дослідження було підвищити результати лікування хворих на ТН РМЗ шляхом оцінки ТОР II α , як потенційного предиктивного маркеру ефективності лікування.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження включало 45 пацієнток віком від 26 до 74 років (середній вік $52,6 \pm 11,8$), хворих на ТН РМЗ стадії II–III, яким було встановлено діагноз вперше та які отримували лікування у клініці кафедри онкології Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика на базі КНП “Київський міський клінічний онкологічний центр”. Усі залучені у дослідження були поінформовані та дали письмову згоду на залучення у дослідження і використання їх клініко-лабораторних даних та біологічних матеріалів у наукових цілях згідно з Гельсінською декларацією.

Пацієнтки підлягали проведенню стандартного алгоритму обстеження та лікування згідно стандартів. Були використані таксановмісна (АТ: доксорубіцин 50 мг/м², паклітаксел 175 мг/м² — 1-й день, в/в крапельно, кожний 21 день) або нетаксановмісні (FAC: циклофосфамід/ендоксан 500 мг/м², доксорубіцин 50 мг/м², флуороурацил 500 мг/м² — 1-й день, в/в крапельно, кожний 21 день; AC: циклофосфамід/ендоксан 500 мг/м², доксорубіцин 50 мг/м² — 1-й день, в/в крапельно, кожний 21 день; CAP: циклофосфамід/ендоксан 500 мг/м², доксорубіцин 50 мг/м², цисплатин 60 мг/м² 1-й день, в/в крапельно, кожний 21 день) схеми НХТ. Нетаксановмісні схеми НХТ отримали 64% пацієнток, таксановмісну — 36%. Кількість циклів неoad'ювантної ХТ варіювала від 2 до 8. Ад'ювантне лікування проводилось згідно існуючих стандартів, за показами пацієнти отримували ад'ювантну ХТ (використовувались схеми описані вище, кількість курсів варіювала від 2 до 6) та променеву терапію (25 фракцій: разова вогнищева доза 2 Гр, 5 разів на тиж., сумарна вогнищева доза 50 Гр).

Рівень експресії TOP IIα визначали імуногістохімічним методом. Зрізи товщиною 5 мкм виготовляли з парафінових блоків, які поміщали на адгезивні скельця, попередньо оброблені полі-L-лізином. Дослідження проводили на депарафінованих та регідратованих зрізах. Для демаскування антигенів використовували метод теплової обробки зрізів при температурі 98–99 °С з настановами виробника антитіл. Після блокування ендогенної пероксидазної активності, наносили первинні антитіла. Для встановлення задач використовували антитіла до: естроген-рецептору альфа (клон EP1), прогестерон-рецептору (клон PgR 636), онкопротеїну c-erbB-2 (HER-2/neu) (поліклональні), білку Ki-67 (клон MIB-1), TOP IIα (клон Ki-S1) (всі названі антитіла DAKO, Данія). Візуалізацію первинних антитіл проводили за допомогою системи детекції DAKO EnVision FLEX+ (DAKO, Данія). Всі етапи імунозабарвлення проводились в DAKO Autostainer згідно протоколів виробника.

Експресію стероїдних гормонів (ER, PR) вважали негативною при 0%. Експресію HER2 оцінювали як негативну при 0 або 1+ шляхом імуногістохімічного дослідження; при HER2 — 2+

результат вважався сумнівним і додатково проводилась флуоресцентна гібридизація *in situ*.

Для проведення статистичного аналізу отриманих результатів проведеного дослідження використовували програму EZR v. 1.54 (graphical user interface for R statistical software version 4.0.3, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) [13, 14]. Для порівняння середніх значень в двох групах використовувався критерій Стюдента (у разі нормального закону розподілу) або критерій Манна–Уїтні (у випадку закону розподілу відмінного від нормального). Аналіз виживання хворих проводили за методом побудови кривих виживання Каплана–Майєра. Для оцінки впливу факторів ризику на виживання, було використано регресійну модель пропорційних ризиків Кокса, розраховано показник відносного ризику (HR) та його 95% вірогідний інтервал (95% BI). Оцінку ступеню впливу факторних ознак на ефективність лікування проводилася із використанням методу побудови моделей логістичної регресії.

У всіх випадках статистичного аналізу використанні критерії із двосторонньою критичною областю, відмінності вважалися статистично значимими при рівні значимості $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті розподілу хворих ($n = 45$) з ТН РМЗ в залежності від рівня експресії TOP IIα клітинами пухлини до початку лікування було сформовано 2 групи: експресія TOP IIα <45% та експресія TOP IIα >46%. В групу пацієнток з експресією TOP IIα <45% увійшла 21 хвора, у групу пацієнток з експресією TOP IIα >46% — 17. Розподіл пацієнток в залежності від віку наведено у табл. 1.

При гістологічному дослідженні матеріалу трепан-біопсії пухлини молочної залози у більшості пацієнток 27 (65,9%) виявляли помірно диференційовані (G2), у 13 (31,7%) пацієнток — низько диференційовані (G3) і лише у 1 (2,4%) пацієнтки була виявлена недиференційована пухлина (G4), високо диференційовані (G1) пухлини не були виявлені у жодної пацієнтки.

Відмінності за стадією РМЗ, розміром пухлини (T), наявністю метастатичних регіонарних лімфатичних вузлів (N) та ступенем диференціювання (G) пухлини між досліджуваними групами статис-

Таблиця 1

Розподіл пацієнток в залежності від віку на момент встановлення діагнозу

Групи пацієнток	Вік на момент постановки діагнозу, роки			
	≤40	41-50	51-69	≥70
TOP IIα <45%	1 (16,7%)	3 (50,0%)	14 (63,6%)	3 (75,0%)
TOP IIα >46%	5 (83,3%)	3 (50,0%)	8 (36,4%)	1 (25,0%)
Всього	6	6	22	4

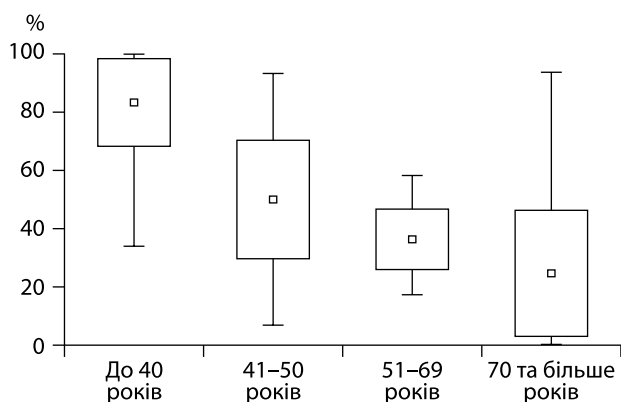


Рис. 2. Рівні TOP IIα залежно від віку пацієток з ТН РМЗ. Вісь ординат — рівень експресії TOP IIα (%); вказано %, стандартну похибку та 95% вірогідний інтервал

тично не достовірні, що свідчить про рівномірний розподіл хворих по групах за вищевказаними критеріями.

Статистично виявлено тренд до зниження рівня TOP IIα з віком ($p=0,032$ за тестом на перевірку наявності тренду для упорядкованих градацій) (рис. 2).

Ефективність НХТ оцінювали за ступенем (I–V) лікувального патоморфозу пухлин. Розподіл пацієток в залежності від ефективності НХТ та рівня експресії TOP IIα до початку лікування наведений у табл. 2.

Таблиця 2

Розподіл пацієток в залежності від ефективності проведеної НХТ та рівня експресії TOP до початку лікування

Ступінь лікувального патоморфозу	TOP IIα <45%		TOP IIα >46%	
	п	%	п	%
I	1	6,2	2	10,5
II	8	50,1	8	42,1
III	2	12,5	6	31,6
IV–V	5	31,2	3	15,8

При проведенні аналізу ризиків недосягнення лікувального патоморфозу було виявлено достовірне ($p=0,015$) зниження такого ризику при використанні таксановмісної НХТ у порівнянні з нетаксановмісними схемами.

Після НХТ проведено хірургічне лікування: органозберігаючі операції виконано у 58,8% пацієток з рівнем TOP IIα <45% проти 42,9% у підгрупі з рівнем TOP IIα >46%. Мастектомію було виконано у 41,2% пацієток з рівнем експресії TOP IIα <45% проти 57,1% з підгрупи з рівнем TOP IIα >46%. Виявлено зниження ($p=0,001$) ризику мастектомії для пацієток, що отримали таксановмісну НХТ, у порівнянні з пацієтками після НХТ за нетаксановмісними схемами.

Слід також зазначити, що виявлено зниження ризику рецидиву при зростанні рівня експресії TOP IIα до НХТ ($p=0,040$), а також зниження ($p=0,017$) ризику виникнення рецидиву при зростанні кількості курсів медикаментозного лікування.

Аналіз загальної виживаності дозволив виявити сильний зв'язок показників розміру пухлини (Т) та рівня експресії TOP IIα до НХТ з імовірністю летального випадку. На рис. 3 наведено криві загального виживання пацієток із різним рівнем експресії TOP IIα при стандартизації за розміром первинної пухлини (Т). У підгрупі пацієток з ТН РМЗ з початково вищим рівнем експресії TOP IIα (>46%) медіани загальної виживаності протягом 70 міс. спостереження не досягнуто. У підгрупі пацієток з початковою експресією TOP IIα ≤45% згаданий показник становив біля 50 міс.

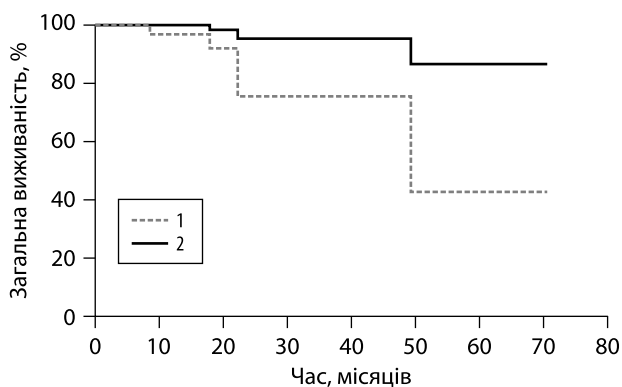


Рис. 3. Криві загального виживання (стандартизовані за показником розміру пухлини (Т)) для пацієток із рівнем TOP IIα до НХТ ≤45% (1) та >46% (2)

Таким чином, наведене дослідження оцінювало ефективність визначення рівня експресії TOP IIα в якості маркера прогнозування ефективності НХТ у пацієток з ТН РМЗ. Результати дослідження вказують на можливість використання рівня експресії TOP IIα клітинами пухлини, як прогностичного маркера ефективності низки схем НХТ та перебігу захворювання у пацієток з ТН РМЗ.

ВИСНОВКИ

1. Початково вищий рівень експресії TOP IIα (>46%) клітинами пухлини асоціюється з кращою загальною виживаністю пацієток з ТН РМЗ.

2. Використання таксановмісних схем НХТ у пацієток з ТН РМЗ підвищує вірогідність досягнення повного лікувального патоморфозу після НХТ.

3. Отримані дані дозволяють розглядати TOP IIα як прогностично цінний для прогнозування перебігу захворювання та ефективності медикаментозної терапії маркер у пацієток з ТН РМЗ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Cancer today [Internet]. [cited 2023 Apr 18]. Available from: <http://gco.iarc.fr/today/home>
2. SEER*Explorer Application [Internet]. [cited 2023 Apr 24]. Available from: https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=55&data_type=1&graph_type=2&compareBy=subtype&chk_subtype_622=622&chk_subtype_623=623&chk_subtype_620=620&chk_subtype_621=621&hdn_rate_type=1&sex=3&race=1&age_range=1&stage=101&advopt_precision=1&advopt_show_ci=on&hdn_view=0&advopt_show_apc=on&advopt_display=2
3. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011; **121** (7): 2750–67. doi: 10.1172/JCI45014.
4. Hon JDC, Singh B, Sahin A, *et al.* Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC. *Am J Cancer Res* 2016; **6** (9): 1864–72.
5. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, *et al.* Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2015; **21** (7): 1688–98. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0432.
6. Jabbarzadeh Kaboli P, Shabani S, Sharma S, *et al.* Shedding light on triple-negative breast cancer with Trop2-targeted antibody-drug conjugates. *Am J Cancer Res* 2022; **12** (4): 1671–85.
7. Asano T. Drug resistance in cancer therapy and the role of epigenetics. *J Nippon Med Sch Nippon Ika Daigaku Zasshi* 2020; **87** (5): 244–51. doi: 10.1272/jnms.JNMS.2020_87-508.
8. Delgado JL, Hsieh CM, Chan NL, Hiasa H. Topoisomerases as anticancer targets. *Biochem J* 2018; **475** (2): 373–98. doi: 10.1042/BCJ20160583.
9. Wang JC. Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega. *J Mol Biol* 1971; **55** (3): 523–33.
10. Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH, Nash HA. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; **73** (11): 3872–6. doi: 10.1016/0022-2836(71)90334-2.
11. Tibau A, López-Vilaró L, Pérez-Olabarria M, *et al.* Chromosome 17 centromere duplication and responsiveness to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Neoplasia NYN* 2014; **16** (10): 861–7. doi: 10.1016/j.neo.2014.08.012.
12. Huang WC, Lee CY, Hsieh T. Single-molecule Förster resonance energy transfer (FRET) analysis discloses the dynamics of the DNA–topoisomerase II (Top2) interaction in the presence of TOP2-targeting agents. *J Biol Chem* 2017; **292** (30): 12589–98. doi: 10.1074/jbc.M117.792861.
13. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013; **48** (3): 452–8. doi: 10.1038/bmt.2012.244.
14. Biostatistics guide. Analysis of the results of medical research in the EZR package (R-statistics) OA Lib [Internet]. [cited 2023 Apr 24]. Available from: <https://litpro2.oa.edu.ua/books/preview/8172>.

THE EFFECT OF TOPOISOMERASE II ALPHA ON THE RESPONSE TO NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY OF TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER

A.A. Samusieva

Shupyk National Healthcare University of Ukraine,
Kyiv, Ukraine

Summary. Triple-negative breast cancer (TNBC) is an aggressive subtype of breast cancer associated with poor prognosis, lacks of standard biomarkers and tumor heterogeneity. So it is the lack of therapeutic biomarkers and tumor heterogeneity are the main causes of therapeutic resistance in the case of TNBC. Differences in tumor cell properties are provided by enzymes that are important potential therapeutic targets. This makes the exploring of prognostic biomarkers and potential therapeutic targets of TNBC an important area of research. **Aim:** to improve treatment outcomes for patients with TNBC by evaluating topoisomerase 2 alpha as a potential predictive marker of treatment efficacy. **Objects and methods:** the study involved 45 patients with II-III stages of TNBC. In addition to standard biomarkers, the level of topoisomerase II alpha expression was determined by the immunohistochemistry. Instrumental methods of diagnosis, pathomorphological

and immunohistochemistry, as well as statistical methods of evaluating the obtained data were used in the study. **Results:** the taxane-containing chemotherapy regimens in patients with TNBC increases the response to treatment. Topoisomerase II alpha overexpression is associated with better prognosis and response to treatment in patients with TNBC. **Conclusions:** the main results of study allow us to consider topoisomerase II alpha as a prognostically valuable marker for predicting the course of the disease and the response to chemotherapy, as well as the advantage of taxane-containing treatment regimens in patients with TNBC.

Key words: triple-negative breast cancer, topoisomerase II alpha (TOP II α), taxanes, pathological response, molecular markers.

Адреса для листування:

Самусєва А.А.
04112, м. Київ, вул. Дорогожицька, 9
Національний університет охорони здоров'я
України імені П.Л. Шупика
E-mail: a_samusieva@yahoo.com

Одержано: 26.05.2023