

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

БАШАРИНА АННА АЛЕКСАНДРОВНА

**ЭСТРОГЕНОВЫЕ РЕЦЕПТОРЫ КАК МАРКЁРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ХИМИОТЕРАПИИ РАКА ЯИЧНИКОВ**

14.01.12 – Онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор

Богущ Татьяна Анатольевна

доктор медицинских наук, профессор

Тюляндин Сергей Алексеевич

Москва – 2020 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1 Эстрогеновые рецепторы альфа и бета	10
1.2 Эстрогеновые рецепторы и канцерогенез.....	14
1.3 Рак яичников.....	16
1.4 Эстрогены и рак яичников.....	18
1.5 Эстрогеновые рецепторы и рак яичников.....	20
1.6 Эстрогеновые рецепторы и эффективность химиотерапии	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	30
2.1 Материалы	30
2.2 Методы	31
2.2.1 Получение одноклеточной суспензии культуры клеток	31
2.2.2 Получение одноклеточных суспензий из хирургических биопсийных образцов	31
2.2.3 Одинокое и двойное иммунофлуоресцентное окрашивание ER α и ER β в одноклеточных суспензия рака яичников	32
2.2.4 Метод проточной цитометрии	33
2.2.5 Статистический анализ данных	35
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	39
3.1 Характеристика группы больных, включенных в исследование	39
3.2 Экспрессия эстрогеновых рецепторов в ткани рака яичников	41
3.3 Связь экспрессии эстрогеновых рецепторов с клинико-морфологическими характеристиками заболевания пациенток с раком яичников.....	51
3.4 Оценка клинической значимости показателей экспрессии ER α и ER β на унифицированной когорте больных	53
3.5 Оценка клинической значимости показателей экспрессии ER α и ER β на общей когорте больных	59
3.6 ROC-анализ для анализа значимости ER α и ER β в прогнозе выявления рецидива	65
3.7 Оценка предиктивной значимости коэкспрессии ER α и ER β в опухоли в прогнозе эффективности препаратов платины и таксанов.....	67
3.8 Анализ независимости предиктивной значимости ER α и ER β	70
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	78
ВЫВОДЫ.....	84
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	85
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	86

ПРИЛОЖЕНИЯ.....	100
Приложение 1 – Изменения показателей селективности и 1-специфичности ROC-кривой при разных уровнях экспрессии ER α	100
Приложение 2 – Изменения показателей селективности и 1-специфичности ROC-кривой при разных уровнях экспрессии ER β	101

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования и степень ее разработанности

В последние годы разочаровывающие результаты применения таргетных препаратов вновь стимулировали исследование предиктивных маркеров эффективности широко используемых классических цитостатиков. Применительно к раку яичников актуальна проблема персонализации применения препаратов платины и таксанов, которые являются стандартом первой линии химиотерапии, так как приблизительно у 30% пациенток высокотоксичное лечение оказывается неэффективным, начало адекватной терапии отодвигается, а результат лечения остается неудовлетворительным.

Анализируя данные литературы, мы предположили, что клинически значимым предиктором резистентности платиносодержащие химиотерапии могут являться показатели экспрессии в ткани рака яичников эстрогеновых рецепторов (ER) разных типов – ER α и ER β . С одной стороны, в клинических исследованиях показано, что эффективность платиносодержащей химиотерапии рака яичников коррелирует с пролиферативной активностью опухоли [1,2]. С другой стороны, в фундаментальных исследованиях описано участие ER α и ER β (в ряде работ – диаметрально противоположное) в реализации пролиферативных стимулов, регулирующих рост нормальных и опухолевых клеток [3]. Сопоставив эти данные, мы и предположили возможный вклад ER α и/или ER β в эффективность химиотерапии, которую в рамках запланированного исследования оценивали по продолжительности безрецидивного периода рака яичников после завершения первой линии стандартного терапии с включением препаратов платины и таксанов.

Возвращаясь к проблеме оптимизации лечения больных раком яичников, еще одним весомым основанием для выбора ER α и ER β в качестве объекта настоящего исследования послужил возродившийся в последние годы интерес к антиэстрогенам при лечении опухолей разных локализации, в том числе и рака яичников. Результаты клинических исследований показывают, что антиэстрогены могут выступать в качестве альтернативы химиотерапии при лечении платино-резистентного рака яичников, при этом отмечено значительно меньшее количество серьезных побочных реакций и лучшее качество жизни [4]. Более того, в клинических рекомендациях Российского общества клинической онкологии антиэстроген тамоксифен рекомендован как дополнительная опция при лечении рака яичников низкой степени злокачественности [5]. Однако вопрос о предиктивных маркерах ответа на гормональную терапию рака яичников до настоящего времени остаётся не решенным, так как не определены мишени, по экспрессии которых можно прогнозировать эффективность терапии: это – ER α ? ER β ? или коэкспрессия ER α и ER β ? Мы считаем, что ответ на этот вопрос

необходим для включения антиэстрогенов в практику терапии рака яичников и только количественная характеристика показателей экспрессии ER α и ER β в ткани рака яичников большой когорты пациентов позволит составить мотивированное представление о перспективах новой опции в терапии этого заболевания.

Цель исследования

Характеристика количественных показателей экспрессии и коэкспрессии в опухоли ER α и ER β и оценка предиктивной ценности маркёров в прогнозе эффективности первой линии химиотерапии серозного рака яичников препаратами платины и таксанов.

Задачи исследования

1. Отработать оптимальные условия проведения иммунофлуоресцентного анализа, ассоциированного с проточной цитометрией, для определения количественных показателей экспрессии ER α и ER β , а именно: разработать методику получения одноклеточных суспензий из солидных образцов опухоли, оптимизировать временные параметры инкубации и концентрации антител, методы математической обработки гистограмм распределения клеток в зависимости от внутриклеточной концентрации и т.д.

3. Используя разработанный методический подход, провести количественную оценку уровня и интенсивности экспрессии в ткани рака яичников ER α и ER β (суммарно в хирургических биопсийных образцах опухоли не менее 70 больных).

4. Оценить ассоциативную связь между выявленными показателями экспрессии ER α и ER β .

5. Сформировать базу данных, включающую клинико-морфологические характеристики опухолей и сведения о течении заболевания больных раком яичников, включенных в исследование.

6. Методом однофакторного анализа оценить корреляцию количественных показателей экспрессии ER α и ER β с клинико-морфологическими характеристиками заболевания.

7. В группе больных, унифицированных по клинически значимым характеристикам заболевания, и в общей когорте пациенток оценить методом однофакторного анализа корреляцию количественных показателей экспрессии ER α и ER β с продолжительностью безрецидивного периода болезни после завершения первой линии химиотерапии препаратами платины и таксанов.

8. Методом многофакторного анализа оценить независимость клинической значимости количественных показателей экспрессии ER α и ER β как предикторов эффективности первой линии химиотерапии препаратами платины и таксанов.

9. Сформулировать заключение о клинической значимости количественных показателей

экспрессии ER α и ER β в ткани рака яичников в прогнозе эффективности химиотерапии препаратами платины и таксанов и определить перспективы новой опции лечения рака яичников – антиэстрогеновой терапии.

Научная новизна

Проведена адаптация иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитометрией, для количественной оценки экспрессии в солидных опухолях эстрогеновых рецепторов (ER) двух типов – ER α и ER β . Определены оптимальные условия проведения анализа (концентрации первичных и вторичных антител, продолжительность инкубации, выведение из анализа дробиса и клеток крови и т.д.).

Впервые на большом клиническом материале строго количественно охарактеризованы показатели экспрессии ER α и ER β в ткани рака яичников: частота, уровень и интенсивность экспрессия этих важнейших молекулярных опухолевых маркёров. Определены количественные показатели границы деления опухолей на группы с низкой и высокой экспрессией исследованных маркёров.

Сформирована база данных о клинико-морфологических характеристиках опухолей и течении заболевания большой когорты больных раком яичников, которая может быть использована в дальнейших исследованиях при оценке клинической значимости других молекулярных маркёров рака яичников.

Впервые на большой когорте больных раком яичников с использованием статистических методов однофакторного анализа оценена корреляция строго количественных показателей экспрессии ER α и ER β с клинико-морфологическими характеристиками болезни и объемом хирургического циторедуктивного вмешательства.

На большом клиническом материале проведена оценка корреляции количественных показателей экспрессии ER α и ER β в ткани рака яичников с продолжительностью безрецидивного течения заболевания после завершения первой линии стандартной химиотерапии препаратами платины и таксанов, что позволило определить клиническую значимость экспрессии ER α и/или ER β как предиктивных маркёров эффективности данной терапии.

Впервые оценена ассоциативная связь между показателями экспрессии ER α и ER β , что повышает точность предполагаемой предиктивной ценности количественных показателей экспрессии ER α и/или ER β в прогнозе резистентности больных раком яичников к препаратам платины и таксанов.

Результаты количественной оценки показателей частоты, уровня и интенсивности экспрессии и коэкспрессии ER α и ER β в опухолевой ткани позволили аргументированно

обосновать перспективы использования антиэстрогенов как новой опции в лечении рака яичников.

Теоретическая и практическая значимость

Количественная характеристика большой когорты больных раком яичников по частоте, уровню и интенсивности экспрессии в опухоли двух типов эстрогеновых рецепторов – ER α и ER β , ассоциированных с реализацией пролиферативных эндо- и экзогенных стимулов, и занимающих важную позицию в клеточном сигналинге, представляет безусловный научный интерес, так как расширяет фундаментальные знания о молекулярных особенностях этого широко распространенного и тяжелого заболевания. В полной мере это относится и к новым данным об ассоциативной связи между количественными показателями экспрессии ER α и ER β , которые вносят существенный вклад в реализацию механизмом резистентности к цитостатикам и другим повреждающим воздействиям.

Что касается возможности выявления предиктивной значимости количественных показателей экспрессии ER α и/или ER β в прогнозе резистентности химиотерапии рака яичников препаратами платины и таксанов, то безусловна клиническая значимость этих результатов, так как проведение высоко токсичного и заведомо неэффективного лечения отодвигает адекватную терапию, эффективность которой в значительной степени зависит от начала ее проведения.

И наконец, важнейшим практически значимым результатом проведенного исследования явится мотивированное обоснование перспектив использования антиэстрогенов в качестве самостоятельной опции или альтернативы химиотерапии при лечении платино-резистентного рака яичников. Полученные данные о количественных показателях экспрессии и коэкспрессии в опухоли ER α и ER β явятся необходимым аргументом для включения антиэстрогенов в клиническую практику терапии рака яичников.

Методы и методология и исследования

Образцы ткани рака яичников, полученные во время хирургической первичной циторедукции от пациенток, оперированных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2009 по 2016 г. Суммарно изучено 74 образца, полученные от 74 пациенток с раком яичников.

С использованием разработанной в лаборатории запатентованной методики из образцов ткани приготовлены одноклеточные суспензии, пригодные для анализа на проточном цитометре. Далее методом иммунофлуоресцентной окрасивания, ассоциированного с проточной цитометрией, исследована экспрессия двух типов эстрогеновых рецепторов – ER α и ER β . Измерение флуоресценции проводили на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter,

США) с применением программного обеспечения Navios Software.

Исследовались два показателя экспрессии ER α и ER β . Во-первых, уровень экспрессии, т.е. количество клеток, экспрессирующих маркёров, выраженное в процентах. Во-вторых, интенсивность экспрессии – средняя интенсивность флуоресценции в экспериментальном образце относительно контроля (инкубация только с вторичными антителами), выраженная в условных единицах. Расчет данных показателей проводили с применением программного обеспечения FlowJo 10.0.8.

Проанализированы истории болезни 74 пациенток с раком яичников. Оценивались клинически значимые характеристики заболевания: возраст, гистологический тип опухоли, степень злокачественности, стадия заболевания, объем первичной циторедукции, тип и количество курсов химиотерапии.

Связь экспрессии ER α и ER β с данными параметрами исследована с использованием современных статистических методов. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакетов прикладных программ STATISTICA 12.0 и GraphPad Prism 6.0, SPSS 22.0.

Для выявления предиктивной значимости ER α и ER β в качестве маркёров эффективности первой линии химиотерапии препаратами платины и таксанов прослежена безрецидивная выживаемость 74 больных раком яичников. Разделение больных на группы сравнения проводилось по уровню и интенсивности экспрессии ER α и ER β . Анализ безрецидивной выживаемости пациенток с разным уровнем и интенсивностью экспрессии ER α и ER β проведен методами Каплана–Майера, регрессионной Cox-модели, построения ROC-кривых.

Положения, выносимые на защиту

1. Ткань рака яичников характеризуется экспрессией эстрогеновых рецепторов разных типов – ER α и ER β , с выраженными различиями у разных больных как по уровню экспрессии в опухоли, так и по интенсивности экспрессии в каждой опухолевой клетке.
2. ER α и ER β коэкспрессируются не только в разных клетках рака яичников, но и в одних и тех же клетках злокачественного новообразования.
3. Главной потенциальной мишенью гормональной терапии рака яичников могут являться ER β , уровень и интенсивность экспрессии которых более чем в полтора раза превышает данные показатели для ER α .
4. Уровень и интенсивность экспрессии как ER α , так и ER β не коррелирует с клинически значимыми показателями – возраст пациентки, стадия болезни, степень злокачественности опухоли.

5. Высокий уровень экспрессии в опухоли как ER α ($\geq 25\%$), так и ER β ($\geq 44\%$) является благоприятным предиктивным маркером эффективности первой линии химиотерапии рака яичников с включением препаратов платины и таксанов.

6. Высокая интенсивность экспрессии в опухолевых клетках как ER α ($\geq 1,7$ усл.ед.), так и ER β ($\geq 2,6$ усл.ед.) является благоприятным предиктивным маркером эффективности первой линии химиотерапии рака яичников с включением препаратов платины и таксанов.

7. Наибольшая предиктивная информативность отмечена при выявлении в ткани рака яичников низкого уровня экспрессии обоих маркеров: риск развития рецидива увеличивается более чем в 3 раза по сравнению с низким уровнем экспрессии одного из маркеров.

8. В многофакторном анализе доказана независимая значимость уровня экспрессии ER β как предиктора эффективности первой линии химиотерапии серозного рака яичников препаратами платины и таксанов.

Степень достоверности и апробации результатов

Диссертация выполнена на большом объеме клинического материала (n=74) с использованием современных методик иммунофлуоресцентного анализа и проточной цитометрии, а также с применением современных методов статистического анализа данных, что позволяет считать полученные результаты достоверными.

По теме диссертации опубликовано 14 статей в отечественных и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России. Основные положения научной работы представлены на следующих научных российских и международных конференциях: XX Российский онкологический конгресс 2016, XXI Российский онкологический конгресс 2018, EACR25 Congress 2018, XV Всероссийская научно-практическая конференция имени А.Ю. Барышникова "Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы достижения, перспективы" 2018, Конгресс молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» 2018, III Национальный конгресс «Онкология репродуктивных органов» 2018, IV Всероссийской конференции по молекулярной онкологии 2018, 6th Asia Pacific Congress of Interventional Oncology 2019.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эстрогеновые рецепторы альфа и бета

Чуть меньше века назад, в 1929 г., Эдуарду Дойзи и Адольфу Бутенанду практически одновременно удалось выделить эстрон – соединение из класса эстрогенов [6]. А уже в 1931 г. на его основе появились препараты, получаемые из мочи беременных женщин [7]. Однако потребовалось 30 лет для открытия рецептора, с которым взаимодействуют эстрогены. В конце 50-х годов XX века с помощью радиоактивно-меченого 17β -эстрадиола Элвуд Дженсен и коллеги обнаружили в тканях женской репродуктивной системы ядерный белок, связывающийся с меткой и отвечающий критериям рецептора [8]. Так был открыт первый эстрогеновый рецептор (ER). Но появился новый вопрос: почему не во всех тканях, отвечающих на эстрогены, были обнаружены эстрогеновые рецепторы? Ответ был дан в 1996 г., когда удалось клонировать новый тип ER из тканей простаты и яичников крыс [9]. Сегодня эти два рецептора известны как ER α и ER β , соответственно.

Эстрогеновые рецепторы кодируются двумя генами (ESR1 и ESR2, соответственно), расположенными на разных хромосомах – 6 и 14 [10,11]. Оба гена включают 8 экзонов, при этом ESR1 кодирует 66 КДа белок, состоящий из 595 аминокислот, а ESR2 – белок с молекулярной массой 60 КДа и 530 аминокислот [12–14].

Эстрогеновые рецепторы имеют схожие структурные домены, которые отвечают за аналогичные функциональные особенности. Однако разные аминокислотные составы в структурных областях обуславливают специфичные для подтипов рецепторов свойства при передаче сигналов эстрадиола (E2). Как и другие члены семейства ядерных рецепторов, эстрогеновый рецептор состоит из шести функциональных областей, которые выполняют определенные роли [15]. На Рисунке 1 представлены структуры каждой области эстрогеновых рецепторов, а также указан процент аминокислотой гомологии. NH₂-терминальный A/B - домен имеет 17% гомологии, C-домен, он же называется ДНК-связывающим доменом (DBD) — 97% гомологии [16]. Следующий D-домен (36% гомологии) является шарнирным участком, который связывает ДНК-связывающим доменом с E-доменом, более известным как лиганд-связывающий домен (LBD), имеющий 56% гомологии. LBD представляет собой глобулярную область, в которой находятся сайт связывания гормонов, сайт димеризации (гомо- и гетеродимеризация) рецепторов. И последний F-домен, расположенный на –COOH конце, имеет 18% гомологии [17].

Связывание E2 является ключевым этапом в клеточном действии эстрогеновых рецепторов, которые присутствуют в виде димеров в цитоплазме, митохондриях и ядре [18–20]. Связывание эстрадиола вызывает конформационные изменения LBD, которые преобразует

неактивную форму эстрогеновых рецепторов в функционально активную, повышая стабильности димера эстрогеновых рецепторов [21].

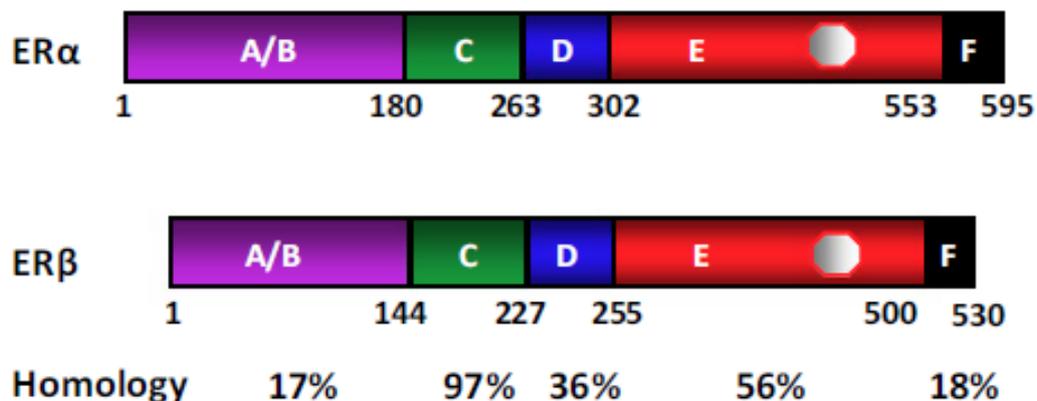


Рисунок 1 – Строение доменных структур эстрогеновых рецепторов двух типов

Эстрогеновые рецепторы (ER) имеют доменную структуру, которая схематически изображена на рисунке. В состав ER α входят 595 аминокислот, а ER β – 530. Структура ER представлена шестью доменами, А – F. Для каждого домена процентами указана степень аминокислотной гомологии для ER α и ER β . В E-домене, также известном как лиганд-связывающий домен, отмечено место связывания с лигандом (■) [14].

Эстрогеновые рецепторы могут связываться с хроматином двумя путями: зависимый и независимый от эстроген-чувствительных элементов (estrogen response element, ERE) – пути. ERE представляют собой палиндром ДНК 5'-GGTCAnnnTGACC-3', где «n» обозначает неспецифический трехнуклеотидный спейсер. Палиндром может располагаться на разных расстояниях от сайта начала транскрипции и/или внутри локус гена. Регулирование экспрессии гена путем связывания комплекса E2-ER с ERE называется «ER-зависимым сигнальным путем» [20,22–24]. С другой стороны, регулирование транскрипции генов-мишеней может происходить через взаимодействия комплекса E2-ER α с факторами транскрипции, примером которых является белок SP-1 (specificity protein 1) и AP-1 (активирующий протеин-1), которые в свою очередь связываются с их регуляторные элементы на ДНК, обозначает «ERE-независимую сигнализацию путь» [22,23,25]. Однако основной механизм ERE-независимого сигнального пути непонятен. Предполагается, что эстрогеновые рецепторы прямо или опосредованно через ко-регуляторные белки взаимодействие с транскрипционными факторами с помощью аминокислот, входящих в состав ДНК-связывающего домена, а, в свою очередь, домены, расположенные на NH₂- и COOH-концах эстрогеновых рецепторов, отвечают за регуляцию транскрипции [14,20,22,23,25].

ДНК-связывающий домен (DBD) опосредует способность эстрогеновых рецепторов связываться с ERE (Рисунок 2). Данный домен в ER α содержит два цинк-связывающих мотива, и каждый мотив содержит α -спираль, которая образуется путем связывания иона цинка [26]. Две спирали ориентированы перпендикулярно друг другу и пересекаются в их средних точках [26]. Каждый DBD димера ER α делает аналогичные контакты с одним из перевернутых мотивов, что приводит к вращательно-симметричной структуре. Отличительные аминокислотные остатки P-бок в области первого цинкового пальца, в частности Glu203, Gly204 и Ala207, определяют специфичность ДНК-связывания, которая имеет решающее значение для распознавания последовательности и связывания с ERE [26–28]. Аминокислотные остатки D-бок второго цинкового пальца участвуют в белок-белковом взаимодействии между двумя ER-мономерами для стабилизации димера [26–28].

Экспрессия эстрогеновых рецепторов обнаружена не только в ядре, но и в цитоплазме и митохондриях, поэтому необходимо рассказать о функциях в данных локализациях. Показано, что в клетках ткани гипофиза, яичников, сосудистого эпителия, костей и молочной железы E2 может быстро индуцировать потоки ионов и активировать многие протеинкиназы через плазматическую мембрану независимо от синтеза белка. Это наблюдение свидетельствует о наличии эстрогеновых рецепторов в цитоплазме, и связанных с мембраной сигнальных путей, причем были обнаружены G-белки, связанные с эстрогеновыми рецепторами [29,30]. Установлено, что мембранные ER-изоформ являются продуктами генов, которые кодируют ядерные эстрогеновые рецепторы [18,31]. После синтеза эстрогеновых рецепторов в аппарате Гольджи, происходит пальмитилирование (присоединение остатка пальмитиновой кислоты к аминокислоте) остатка Cys447 в ER α и Cys399 ER β с помощью белка теплового шока 27. Это в свою очередь, по-видимому, приводит к взаимодействию эстрогеновых рецепторов с белком кавеолин-1, который служит транспортером эстрогеновых рецепторов в клеточную мембрану [18,29,31–33]. Пальмитилированные эстрогеновые рецепторы переносятся на мембрану в виде мономеров, а их димеризация происходит через несколько секунд после воздействия E2, что приводит к активации белков G α и G $\beta\gamma$ зависимым от типа клетки [34,35]. Это приводит к быстрой передаче сигналов E2 [29–31]. E2-зависимое депальмитилирование, по крайней мере, ER α , уменьшает связь рецептора с кавеолин-1, что, в свою очередь, способствует активации каскадов ERK/MAPK и PI3K/AKT, влияющих на клеточные сигналинг, миграцию, пролиферацию и многих других процессов [34–37].

Накопленные данные свидетельствуют о том, что митохондрии являются важными мишенями действия E2, которые ингибируют ранние стадии апоптоза [38,39]. Митохондрии участвуют в контроле и активации апоптоза, который индуцируется несколькими стимулами, в том числе тех, которые увеличивают количество активных форм кислорода [40].

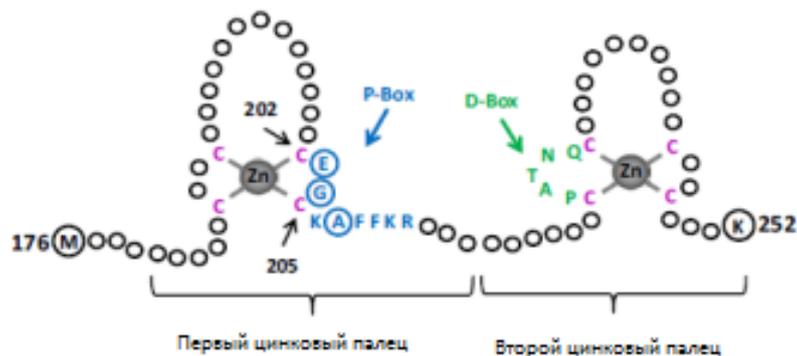


Рисунок 2 – Строение ДНК-связывающего домена эстрогеновых рецепторов

ДНК-связывающий домен (DBD) содержит два цинк (Zn)-связывающих мотива, образованный четырьмя остатками цистеина (розовый), координирующие один ион Zn (серый). Область P-box (синий) первого цинкового пальца содержит аминокислоты, такие как глутаминовую кислоту (E), глицин (G) и аланин (A) в положениях 203, 204 и 207 соответственно (обведены в синий кружки). Данные аминокислоты имеют решающее значение для распознавания последовательности и связывания с ERE, что определяет специфичность ДНК-связывания. Аминокислотные остатки D-box (зеленый) второго цинкового пальца ответственны за стабилизацию димера эстрогеновых рецепторов [14].

Показано, что как ER α , так и ER β локализуются в митохондриях в различных тканях, которые включают матку, яичники, сердце, а также в клетках MCF-7, полученные из аденокарциномы молочной железы [41–44]. Оказывается, например, что хотя оба подтипа эстрогеновых рецепторов локализованы в основном в ядре, однако ER β высоко экспрессированы в митохондриях клеток MCF-7, тогда как экспрессия ER α в митохондриях эндотелия сосудов выше по сравнению с ER β [20]. Наличие эстрогеновых рецепторов в митохондриях в клетках различных тканей указывает на то, что они могут напрямую опосредовать эффекты E2 в митохондриях. Показано, что 17 β -эстрадиол увеличивает мРНК, синтезированную с митохондриальной ДНК (мтДНК), кодирующая субъединицу E АТФ-синтазы [44]. ER α и ER β связываются с ERE-подобными последовательностями, которые присутствуют в D-петле мтДНК мыши и человека, поэтому предлагают, что эффекты E2 в митохондриях опосредуются через ERE-регулируемые транскрипции [45]. Также показано, что активация эстрогеновых рецепторов в клетках MCF-7 приводит к увеличению концентрации фермента митохондриальной супероксиддисмутазы, что приводит к уменьшению количества активных форм кислорода, и как следствие ингибирование апоптоза.

Таким образом, эстрогеновые рецепторы оказывают значительное влияние не только опосредовано через активацию ядерной ДНК, но также и запуская каскады в цитоплазме, и

активируя транскрипцию с митохондриальной ДНК. Детальное изучение механизмов активации транскрипции, а также каскадов, в которых участвуют эстрогеновые рецепторы, помогает в понимании процессов канцерогенеза, речь о котором пойдет дальше.

1.2 Эстрогеновые рецепторы и канцерогенез

В первую очередь остановимся на влиянии ER α на данный процесс. После того, как ученые доказали, что активированные ER α способны увеличивать пролиферацию клеток, было выдвинуто предположение, что данные рецепторы участвуют в канцерогенезе. Рассмотрим несколько фактов о взаимосвязи ER α с развитием опухолей разной локализации.

Исследования влияния эстрогенов и диметилбензантрацен (один из распространенных и сильнейших канцерогенов) показало, что количество случаев возникновения рака молочной железы у мышей уменьшается с потерей ER α [46,47]. Эстрогены стимулировали пролиферацию и появление многослойных эпителиальных клеток предстательной железы, фенотипа, известного как плоскоклеточная метаплазия, у мышей дикого типа, но не у Esr1-нокаутированных, что указывает на участие ER α в индукции этого заболевания [48]. Это ER α -опосредованное увеличение пролиферации вызывало воспаление и развитие опухоли.

Было высказано предположение, так как ER α увеличивает число делений клеток, что может привести к накоплению случайных мутаций ДНК, некоторые из которых приводят к развитию опухолей. Множество исследований подтвердило митогенные эффекты ER α в клетках и тканях животных. Повышенная экспрессия протоонкогенного белка MYC, которая приводит к активации перехода из G1 в S-фазу клеточного цикла, относится к факторам, которые связывают активность ER α с индукцией пролиферации. Показано, что ER α увеличивает транскрипцию гена CCND1, кодирующего белок циклин D1, специфически регулирующий фазовый переход G1/S-фаза в клеточном цикле, и в следствии этого активация ER α увеличивает пролиферацию клеток рака молочной железы как *in vivo*, так и *in vitro* [49–52]. Более того, избыточная экспрессия рецепторов к эпидермальному фактору роста усиливает транскрипционную активность ER α через MAPK- и PI3K-опосредованное фосфорилирование и индуцирует пролиферацию клеток рака молочной железы [53,54].

Таким образом, на сегодняшний день, экспрессия ER α имеет не только прогностическое значения для больных раком молочной железы, но и предиктивное – для гормонотерапии опухолей, как адьювантное лечение. Интересен факт, что уровень экспрессии ER α значительно различается как между разными пациентами с ER α -положительным опухолями молочной железы, так и в разных клетках одного и того же пациента. Поэтому в настоящее время все пациенты с раком молочной железы с экспрессией ER α в более чем 1% опухолевых клеток рассматриваются как ER-положительные [55].

Теперь перейдем к изучению влияния ER β на развитие опухолей. В то время как на нескольких моделях мышей подтвердили участие ER α стимуляции в канцерогенезе, роль ER β в биологии опухолей считается противоположной – антипролиферативный эффект. Одна группа исследователей сообщила об уменьшении терминальной дифференцировки и увеличении пролиферации в альвеолах лактирующих мышей, нокаутированных по гену *Esr2*, кодирующем ER β . У данных мышей чаще развивалась кистозная болезнь молочной железы и гиперплазия эпителия простаты [56–59]. Более того, еще одно исследование показало антипролиферативный эффект ER β в моделях с нокаутированным геном [60,61]. Также большинство исследований *in vitro*, изучающие биологические эффекты экспрессии ER β в опухолевых клетках показали, что ER β обладает антипролиферативными свойствами. Однако механизмы, благодаря которым осуществляется данный эффект не совсем ясен. Было обнаружено, что экспрессия ER β ингибирует рост клеток и индуцирует остановку клеточного цикла G1 в различных типах раковых клеток путем регулирования экспрессии циклина D1, CDC25A, p21, MYC, FOXO1, p53 и ARF (также известного как p14), которые действуют на основные контрольные точки клеточного цикла [62–67]. ER-опосредованное изменение в экспрессии регуляторных генов клеточного цикла коррелирует с ингибированием пролиферации клеток *in vitro* и *in vivo* и цитотоксичностью химиотерапии, разрушающей ДНК [66–69].

Говоря о канцерогенезе, стоит также упомянуть о метастазировании, и возможном влиянии на данный процесс эстрогеновых рецепторов. Адгезия между соседними клетками и клеточная адгезия к внеклеточному матриксу влияют на структуру нормального эпителия, а также миграцию клеток и инвазию при канцерогенезе и метастазировании. Эстрогены играют важную роль в регуляции этих процессов. В линии клеток рака молочной железы MCF-7 эстроген стимулирует морфологические изменения, связанные с перегруппировкой промежуточных и актиновых филаментов и модификациями в образовании клеточно-клеточных и клеточно-внеклеточному матриксных адгезионных бляшек [70,71]. В исследованиях на мышах, нокаутированных по гену *Esr2*, показано, что, по-видимому, ER β положительно регулирует терминальную дифференцировку эпителия молочной железы. Потеря ER β приводит к уменьшению адгезии к внеклеточному матриксу и базальной пластинки и, часто, к увеличению межэпителиального клеточного пространства и уменьшению количества молекул адгезии [72]. Если первичные опухоли являются ER α положительными, более 80% случаев в метастазах в лимфатические узлы и 65-70% отдаленных метастазах сохраняется экспрессия ER α [73,74]. Сообщалось также о клинической корреляции между ER α -положительными опухолями и метастазированием в кости [75]. Было также показано, что сигнализация ER α увеличивает метастазирование в легочную ткань [76]. Таким образом, данные свидетельствуют о том, что сигнализация ER α играет роль в метастазировании.

Теперь следует поговорить о роли ER β в процессе метастазирования. Сообщалось о снижении экспрессии ER β в инвазивном раке молочной железы, а экспрессия ER β связана с менее инвазивными и пролиферирующими опухолями [77]. Показано, что подавление экспрессии ER β способствует эпителиально-мезенхимному переходу в клетках рака предстательной железы [41]. Исследование с использованием культур клеток рака молочной железы показало, что ER β -экспрессия ассоциировалась с меньшей клеточной миграцией. Было также выявлено, что ER β влияет на экспрессию и кластеризацию интегрина и, следовательно, модулирует адгезию и миграцию клеток рака молочной железы [78].

1.3 Рак яичников

Рак яичников является пятым наиболее распространенным типом рака у женщин и четвертой наиболее распространенной причиной смерти от онкологических заболеваний у женщин. Предполагаемый риск развития рака яичников составляет примерно 1 на 54 женщины [79].

Рак яичников является преимущественно заболеванием пожилых женщин в постменопаузе, причем большинство (> 80%) случаев диагностируется у женщин старше 50 лет [80]. Точная причина развития рака яичников остается неизвестной, но было выявлено много связанных факторов риска. О тех, что указывают на корреляцию овуляции с развитием рака яичников, речь пойдет в следующей главе. Другими факторами риска являются ожирение и, возможно, использование талька.

Более того, около 10% случаев рака яичников носят наследственный характер, а именно мутации в генах BRCA1 и BRCA2 [81]. Герминальная мутация BRCA1 повышает риск развития рака яичников на 15–45% в течение жизни. Мутация BRCA2 увеличивает риск развития рака яичников в течение жизни до 10–20%. Женщины с наследственным раком яичников, как правило, заболевают на 10 лет раньше, чем женщины с ненаследственными формами рака яичников. Важность выявления мутаций BRCA возросла, поскольку PARP-ингибиторы, применяемые для лечения рака молочной железы у пациенток с мутациями в генах BRCA1 и BRCA2, показали свою эффективность и для рака яичников [82].

Становится все более очевидным, что на тканевом и молекулярном уровнях рак яичников является морфологически - и молекулярно-гетерогенным заболеванием [83]. Хотя большинство случаев рака яичников классифицируются как эпителиальный рак, гистологические подтипы эпителиального рака яичников (90% всех опухолей яичников) включают серозную (высокой и низкой степени злокачественности), эндометриоидную, светлоклеточную, муцинозную, злокачественную опухоль Бреннера и смешанную эпителиальную карциному [84,85]. Причем инвазивный серозный рак яичников является

наиболее распространенным гистологическим типом, на который приходится до 80% случаев рака яичников [79]. В данном литературном обзоре основной акцент – серозный рак яичников, поскольку именно данный тип исследовался в нашей работе.

Традиционно, серозный рак яичников высокой степени злокачественности считался возникшей из серозного рака яичников низкой степени злокачественности [86,87]. Однако достижения в молекулярной характеристике опухолей, рак яичников высокой и низкой степеней злокачественности являются двумя различными заболеваниями [84,86–90]. Опухоли с легкой до умеренной цитологической атипией и низкой частотой митоза классифицируются как низкой степени злокачественности, тогда как высокая цитологическая атипия и высокая частота митоза позволяет классифицировать опухоль как серозный рак яичников высокой степени злокачественности. Клинически серозные опухоли низкой степени злокачественности, на долю которого приходится около 10% случаев серозного рака яичников, имеет тенденцию к развитию у женщин в более молодом возрасте, а также представляет собой менее агрессивную форму по сравнению с раком яичников высокой степени злокачественности [91].

Рак яичников считается гетерогенным заболеванием, и в последние несколько лет появилась дуалистическая модель патогенеза этого заболевания, которая разделяет эпителиальные опухоли на карциномы яичников I и II типа. Эта классификация не предназначена для замены гистологических подтипов [91].

Рак I типа, как правило, представляет собой низкой степени злокачественности и медленно растущие опухоли, которые включают серозный рак яичников низкой степени злокачественности, эндометриоидную, светлоклеточную, и злокачественную опухоль Бреннера. Эти опухоли характеризуются мутациями KRAS, BRAF, ERBB2, PTEN, PIK3CA и ARID1A и являются генетически стабильными. Данные мутации возникают на ранних стадиях развития опухолей яичников I типа, а также наблюдаются при пограничных опухолях и эндометриозе. Ступенчатая последовательность развития опухоли в настоящее время хорошо прослеживается от доброкачественных предшественников (например, пограничной опухоли) до злокачественных поражений при раке типа I.

И наоборот, нет явного предвестника поражения для рака яичников II типа. Это агрессивные опухоли, включающие серозный рак яичников высокой степени злокачественности, эндометриоидные опухоли высокой степени злокачественности, злокачественные смешанные мезодермальные опухоли и недифференцированные опухоли. Опухоли типа II очень часто ассоциируются с мутациями TP53, а именно одно исследование показало, что 97% случаев серозного рака яичников высокой степени злокачественности были связаны с мутацией TP53. Примерно 20% этих опухолей также несут как герминальные, так и соматические мутации генов BRCA1/2 [92].

В последние годы появились данные, свидетельствующие о том, что большинство серозных опухолей яичников высокой степени злокачественности происходят в фимбрии маточной трубы (серозная интраэпителиальная карцинома маточных труб) [93,94]. Эти злокачественные клетки затем метастазируют в яичники и брюшную полость.

Эти данные говорят о том, что требуются индивидуальные подходы к подбору терапии рака яичников, поскольку опухоли яичников генетически-, молекулярно- гетерогенны, а также имеют разное происхождение. Эстрогеновые рецепторы могут выступать не только предиктором ответа на химиотерапию, но и мишенью для гормонотерапии. Поэтому перейдем изучению влияние эстрогенов на развитие рака яичников и его прогрессирование.

1.4 Эстрогены и рак яичников

Эпидемиологические данные говорят о том, что этиология, патогенез и прогрессирование рака яичников сильно зависят от активности эстрогенов. Кроме того, баланс между эстрогеном и прогестероном имеет решающее значение в развитии рака яичников [95].

Статистические данные показывают, что заболеваемость раком яичников значительно выше в промышленно развитых странах, чем в развивающихся странах. В тоже время, уровень рождаемости в промышленно развитых странах является низким по сравнению с развивающимися странами [96]. Имеются убедительные доказательства того, что репродуктивные факторы, включая множественную беременность, грудное вскармливание и использование оральных контрацептивов, защищают женщин от развития рака яичников. С каждой беременностью риск развития рака яичников снижается на 10-16% [96,97]. David C. Whiteman и коллеги показали, что риск развития рака яичников снижается во время беременности у женщин в возрасте старше 35 лет, что согласуются с теорией о том, что апоптоз эпителиальных клеток поверхности яичника, вызванный гормонами беременности, может быть основным защитным механизмом развития опухоли [96]. Кроме того, риск развития рака яичников ниже у женщин, которые кормят грудью более 18 месяцев [98,99]. Аналогичным образом, применение оральных контрацептивов более 3 лет приводит к снижению риска развития рака яичников на 30-50% [100].

С другой стороны, у женщин с ранней первой менструацией и поздней менопаузой, а также у женщин, получающих препараты для лечения бесплодия (антагонисты гонадотропин-высвобождающих гормонов), риск развития рака яичников повышен. Полагают, что последние вызвано высокими концентрациями эстрогена после стимуляции синтеза стероидных гормонов в яичнике [101]. Также было установлено, что применение гормональной заместительной терапии является фактором риска развития рака яичников. Примерно на 22% повышенный риск развития рака яичников в течение 5 лет наблюдался у женщин в постменопаузе с

использованием эстрогена в виде заместительной гормональной терапии. Риск также значительно увеличивался (примерно на 10%) за счет применения комбинации эстрогена и прогестина [102,103]. Результаты исследования, проводимое на большой когорте пациенток показали, что заболеваемость раком яичников возрастала с увеличением продолжительности заместительной гормональной терапии, особенно если её принимали в течение 10 или более лет. Информация, свидетельствующая о том, что эстроген может увеличивать риска появления рака яичников, была получены из исследований, посвященных мониторингу использования заместительной гормональной терапия. Метаанализы больших наборов данных, в том числе исследование «Миллионы женщин» (*Million Women Study*), показали, что риск развития рака яичников у женщин, использующих заместительную гормональную терапию, в 1,28 раза больше, чем у тех, кто не использовал данные препараты [104].

Более того, проспективное исследование женщин в постменопаузе показало, что вероятность развития рака яичников у женщин с повышенным весом и ожирение выше, чем у пациенток с нормальным телосложением. Это объясняется бОльшим образованием эстрогена в периферических тканях, который, вероятно, является промотором прогрессирования рака яичников [105].

Рак яичников чаще возникает спорадически, но небольшое количество случаев (приблизительно 10%) связано с мутациями в генах BRCA1/2 [106]. Интересно, что у пациенток в пременопаузе с мутациями в генах BRCA1/2 удаление яичников и фаллопиевых труб снижает риск развития рака яичников [107].

Более того, в этой главе следует также упомянуть несколько экспериментальных работ, в которых изучалось влияние эстрогенов на пролиферацию культур клеток рака яичников. Ряд исследований ясно показывает, что эстрогены оказывает пролиферативное действие, которое может блокироваться антиэстрогенами тамоксифеном и ICI 182780 [108,109]. Существует также все больше доказательств того, что эстроген опосредует повышенную подвижность и инвазию раковых клеток яичников [110,111]. В недавнем исследовании *in vivo* с использованием мышинной модели лечение эстрогенами вызывало раннее возникновение опухолей, снижение общего времени выживания и характерную папиллярную гистологию [112].

Интересно, что в работах эстроген-опосредованный стимулирующий эффект на клеточную пролиферацию культур рака яичников связывают с ER α . Так O'Donnell и коллеги воздействовали на ER α и ER β -экспрессирующие клеточные культуры рака яичников с помощью ER α и ER β -специфических лигандов [112]. Оказалось, что воздействие пропила пиразол триола (PPT, лиганд ER α), но не диарилпропионитрила (DPN, лиганд ER β) привело к стимуляции клеточной пролиферации, подтверждая роль ER α в таком эстроген-опосредованном

эффекте. А, учитывая возможную опухолевую супрессивную активность ER β , не удивительно, что гиперэкспрессия ER β может привести к ингибированию подвижности и инвазии культур клеток рака яичников [113]. Более того, в недавней работе Susanne Schüler-Toprak и коллег показано, что все исследуемые агонисты ER β оказывали ингибирующий эффект на клеточную пролиферацию культур рака яичников [114].

Таким образом, в данной главе проанализированы литературные данные, доказывающие влияние эстрогенов на развитие рака яичников. Более того, показано, что эстрогены способны увеличивать пролиферацию, инвазию и миграцию опухолевых клеток.

1.5 Эстрогеновые рецепторы и рак яичников

Эпидемиологические данные свидетельствуют о важной роли стероидных гормонов в развитии опухолей яичников. Ограниченные клинические испытания не показали столь значимых результатов, однако они идентифицировали небольшое количество пациентов, которые отвечают на гормонотерапию без выраженных побочных эффектов [115]. Примеры данных исследований будут приведены ниже.

В первую очередь, необходимо изучить данные об экспрессии эстрогеновых рецепторов в раке яичников и возможном влиянии на течение заболевания. В ряде исследований была рассмотрена экспрессия изоформ эстрогеновых рецепторов в клинических образцах нормальной и опухолевой ткани яичников. ER β высоко экспрессируются в ткани яичников в норме, однако его экспрессия постепенно теряется при развитии и прогрессировании опухоли [70,116]. В тоже время, экспрессия ER α сохраняется или даже увеличивается в опухолях яичников, по сравнению с нормальной тканью яичников [115,116].

Интересно проанализировать литературные данные, связанные с корреляцией клинικο-морфологических характеристик заболевания с экспрессией эстрогеновых рецепторов в ткани рака яичников. Сводные данные представлены в Таблице 1, суммируя их можно сделать вывод о том, что четкой взаимосвязи выявить не удалось. Например, для ER α в большинстве работ не найдено корреляции со степенью дифференцировки опухоли [1,117–122], а в некоторых исследованиях получены диаметрально противоположные данные.

Так, в двух работах показано, что наличие экспрессии чаще встречается в высокодифференцированных опухолях по сравнению с низко- и умереннодифференцированными [123,124], в то время как в одной статье – показана обратная корреляция [125]. В случае с ER β наблюдалась похожая картинка – в большинстве статей говорилось об отсутствии взаимосвязи экспрессии маркера со степенью дифференцировки опухоли [118,119,125–127]. В одной публикации показано, что наличие экспрессии ER β в клетках чаще встречается в низкодифференцированных опухолях [122], в то же время в другой статье – отсутствие

экспрессии ER β также коррелирует с низкой степенью дифференцировки [117].

Таблица 1 – Взаимосвязь эстрогеновых рецепторов с клинико-морфологическими характеристиками заболевания

Клинико-морфологические характеристики заболевания	Взаимосвязь эстрогеновых рецепторов с клинико-морфологическими характеристиками заболевания*	
	ER α	ER β
Степень дифференцировки опухоли	<p>Не найдено [1, 117, 118, 119, 120, 121, 122].</p> <p>Выше экспрессия в G1 vs. G2 [123].</p> <p>Чаше экспрессия в G1 vs. G2 и G3 [124].</p> <p>Чаше экспрессия ERα в G2 и G3 vs. G1 [125].</p>	<p>Низкая экспрессия чаще в G3 [117].</p> <p>Не найдено [118, 119, 125-127].</p> <p>Наличие экспрессии выше в G3 vs G1 и G2 [122].</p> <p>Низкая экспрессия в G2 vs G1 [123].</p>
Возраст	<p>Не найдено [118, 122, 125, 128, 130].</p> <p>Найдена слабая обратная корреляция [129].</p>	<p>Не найдено [118, 122, 125, 131].</p>
Стадирование по FIGO	<p>Не найдено [1, 119, 120, 123, 125, 127, 128].</p> <p>Наличие или высокая экспрессия чаще на III и IV стадиях [117, 121, 129].</p>	<p>Низкая экспрессия чаще на IV стадии [117].</p> <p>Низкая экспрессия чаще на I vs II и III стадиях [123].</p> <p>Не найдено [119, 125, 127].</p>
Стадирование по TNM	<p>Не найдено [124, 127, 128]</p>	<p>Наличие экспрессии чаще в опухолях с N0 [127]</p>
Индекс массы тела	<p>Не найдено [125].</p>	<p>Не найдено [125].</p>

* – связь показателей экспрессии эстрогеновых рецепторов с клинико-морфологическими характеристиками заболевания считалась статистически значимой при $p < 0,05$.

Похожая ситуация наблюдалась для стадии заболевания по классификации Федерации гинекологии и акушерства (FIGO). В большинстве работ для экспрессии ER α не было обнаружено корреляции [1, 119, 120, 123, 125, 127, 128], однако авторы трех публикации показали взаимосвязь ER α со стадией заболевания. А именно, наличие экспрессии статистически значимо чаще встречается на III и IV стадиях рака яичников [117, 121, 129]. Что касается ER β , в

трех статья корреляции выявлено не было [119,125,127], в двух получены противоположные результаты – низкий уровень маркера коррелировал с I [123] vs IV стадиями [117].

Интересно, что во всех изученных статьях не было выявлено корреляции с возрастом пациенток как для ER α [1,118,122,125,128–130], так и ER β [118,122,125,126]. Таким образом, проанализированная литература не дает сделать вывод о взаимосвязи эстрогеновых рецепторов с клинико-морфологическими характеристиками заболевания.

И еще одним, по нашему мнению, важным этапом анализа литературных данных является оценка прогностической значимости эстрогеновых рецепторов. В Таблице 2 представлены результаты оценки клинической значимости эстрогеновых рецепторов в прогнозе общей выживаемости пациенток с раком яичников.

Первое, что обращает на себя внимание, за один и тот же проанализированный период – количество исследований, изучающую прогностическую значимость ER α , больше чем для ER β . Скорее всего, это связано с желанием аппроксимировать изученные для рака молочной железы данные о значимости ER α . Так, в 9 из 16 статей прогностической значимости выявлено не было [1,118,122,128,129,131–134]. Однако в остальных статья обнаружена идентичная ситуация – или наличие экспрессии, или высокий уровень ER α говорили о благоприятной прогностической значимости данного маркера, то есть продолжительность жизни у больных раком яичников с экспрессией ER α в опухоли была выше, по сравнению с отсутствием или низким уровнем экспрессии [117,123,125,127,135–137]. Более того, в одной работе многофакторным анализом удалось продемонстрировать независимую прогностическую значимость ER α [127]. Что касается ER β , то все не столько однозначно. В 3 из 11 статей – не найдено взаимосвязи между экспрессией данного маркера и продолжительностью общей выживаемости [122,125,133].

А далее, в четырех статья продемонстрировано, что наличие экспрессии говорит об отрицательной прогностической значимости ER β [118,123,134,138], более того, в одном случае с помощью многофакторного анализа доказана независимая значимость маркера [134]. А оставшихся 4 работах наблюдалась обратная картина – наличие экспрессии являлось прогностически благоприятным маркером и прогнозировало большую продолжительность общей выживаемости [117,119,127,139]. В многофакторном анализе также в одной статье удалось показать независимую значимость маркера [124].

Таким образом, данные об экспрессии обоих типов эстрогеновых рецепторов в ткани рака яичников, а также о влиянии эстрогенов на возникновение и прогрессирование рака яичников, ставят вопрос: эффективна ли гормонотерапия рака яичников? Для ответа на поставленный вопрос был проведен ряд клинических исследований.

Здесь будут приведены два обзора, объединяющих большое число клинические

исследования тамоксифена на когорте больных раком яичников. Williams и коллеги проанализировали данные 35 исследований, включающие 623 пациента. В целом, 63 пациентки (9,6%) ответили на гормонотерапию тамоксифеном, стабилизация заболевания наблюдалась у 131 из 411 (31,9%). Однако в исследованиях наблюдалась гетерогенность как в объективном ответе (0-56%), так и в стабилизации заболевания (0-83%). Это может быть связано с разными критериями отбора пациенток, а также разными критериями ответа на гормонотерапию [140].

Таблица 2 – Анализ литературных данных о клинической значимости эстрогеновых рецепторов в прогнозе агрессивности течения болезни у больных раком яичников

Клинической значимость эстрогеновых рецепторов в прогнозе агрессивности течения болезни у больных раком яичников *		
Маркёр	Однофакторный анализ**	Многофакторный анализ (оценка независимой прогностической значимости) ***
ERα	Не найдено [1, 118, 122, 128, 129, 132, 133, 134, 135]. Наличие или высокий уровень экспрессии – благоприятный маркёр [117, 123, 125, 127, 136, 137, 138]	Не подтвердилась благоприятная независимая прогностическая значимость [123, 125, 136]. Подтвердилась благоприятная независимая прогностическая значимость [127].
ERβ	Наличие или высокая экспрессии – благоприятный маркёр [117, 119, 127, 139]; Наличие экспрессии – неблагоприятный маркёр [118, 123, 131, 135]. Не найдено [122, 125, 134]	Подтвердилась благоприятная независимая прогностическая значимость [127]. Подтвердилась неблагоприятная независимая прогностическая значимость [134].

*– в качестве показателя агрессивности течения болезни использовали показателей общей выживаемости; ** – анализ кривых Каплана-Майера, тест log-rank, статистическая значимость при $p < 0,05$; *** – регрессионная модель Кокса, статистическая значимость при $p < 0,05$.

Обзор Perez-Gracia и Carrasco включает 18 исследований и 648 пациентов. Общее число ответов составило 13%, причем 4% составили полный ответ и 9% – частичный. Более того, у 38% пациенток наблюдалась стабилизацию заболевания [141]. Авторы подчеркнули, что только

в одном исследовании выборка больных была однородной: пациентки с III или IV стадией рака яичников после проведения циторедукции и первой линии химиотерапии [142]. При этом общее число ответов составляло 17,1% и средняя продолжительность безрецидивного периода составила 7,5 месяца (максимум 17 месяцев). Однако ретроспективный анализ полученных данных выявил, что 73% опухолей являлись резистентными к препаратам платины. Таким образом, и данная выборка была неоднородна. Более того, в данном обзоре подчеркивается следующее. По сравнению с раком молочной железы, при котором тамоксифен используется в качестве лечения первой линии, многие пациентки с раком яичников уже подвергались химиотерапевтическую лечению и опухоли были резистентны к химиотерапии к тому времени, когда пациентки начали принимать лечение тамоксифеном. Так, в клинических исследованиях, в которых по крайней мере 50% пациенток не получали более одного режима химиотерапии (240 пациентов), общая частота ответа удвоилась до 25,8% с частотой полного ответа 8,8%; и наоборот, для пациенток, подвергавшихся интенсивному предварительному лечению (314 пациентов), общий ответ составил всего 4,1%.

Из перечисленных выше обзоров вытекают несколько выводов. Во-первых, в клинических испытаниях прошлых лет не было четких критериев отбора пациенток, большинство исследований проводились на неоднородной выборке. То есть полученные результаты нельзя считать однозначными. Во-вторых, авторы утверждают, что, хотя тамоксифен, по-видимому, имеет умеренную активность в лечение рака яичников, не было рандомизированных исследований, сравнивающих тамоксифен с поддерживающей терапией, поэтому было трудно судить об истинном уровне активности препарата.

Недавние исследования тамоксифена как препарата для лечения рака яичников попытались нивелировать данные ошибки. В одном из них сравнивалось качество жизни, связанное со здоровьем, и эффективность химиотерапии и тамоксифена у пациенток с резистентной к препаратам платины формой рака яичников. Были сделаны выводы, что у пациенток, принимающих химиотерапии, наблюдалась лучшая выживаемость без прогрессирования (медиана выживаемости составляла 12,7 и 8,3 недель, соответственно). Однако общая выживаемость была одинаковой. Более того, лечение в группе тамоксифена была значительно менее токсичным и с меньшим числом побочных эффектов, и как следствие, качество жизни пациентов в этой группе было в разы лучше [4]. А восстановление и/или сохранение качества жизни является одной из главных целей всей системы медицинской помощи в онкологии.

В 2009 г. было опубликовано одно клиническое исследование II фазы, изучающие влияние антиэстрогена фулвестранта (Faslodex) [61]. Двадцать шесть пациенток с ER-положительным раком яичников включены в исследование. Все пациентки получили в среднем

5 режимов химиотерапии до лечения фулвестрантом. В исследование показано, что по критерию RECIST у 13 пациенток (50%) произошла стабилизация заболевания. В исследовании сделан вывод о том, что, хотя частота ответа была низкой, стабилизация заболевания была обычным явлением [61].

Теперь следует обсудить известные и наиболее важные клинические исследования ингибиторов ароматазы как терапия рака яичников. Первое клиническое испытание летрозол опубликовано в 2002 году, где эффективность препарата оценивали на 60 пациентках. У десяти пациенток произошла стабилизация заболевания на протяжении 12 месяцев. Интересен тот факт, что у этих пациентов наблюдался более высокий уровень ER, чем в среднем по группе [143]. Более того, в исследовании не обнаружено значительных побочных эффектов, что также важно для выбора терапии.

Недавние исследования описывают опыт первичной циторедуктивной хирургии и адъювантная гормональная монотерапия для женщин с низкодифференцированной серозной карциномой II стадии яичников. Всего участвовало 27 пациенток, 15 из которых принимали летрозол, 10 – анастрозол и 2 – тамоксифен. При этом медиана безрецидивного периода и общая выживаемость не были достигнуты после 41-месячного периода наблюдения, а 3-летняя – 79,0% и 92,6% соответственно. В то время как операция остается неоспоримым этапом лечения этого заболевания, химиотерапия на основе платины и таксанов, возможно, не требуется для пациентов с поздней стадией заболевания, которые получают адъювантную гормональную терапию. Эти результаты, хотя и предварительные, исследования могут улучшить качество жизни для женщины, у которых диагностировано этот редкий подтип рака яичников, они потенциально могут быть избавлены от приема более тяжелых токсических веществ, а также от более высоких затрат, связанных химиотерапией, по сравнению с гормональной терапией [44].

Более того, на сегодняшний день, в клинических рекомендациях RUSSCO поддерживающая эндокринная терапия ингибиторами ароматазы (в стандартных дозах) или тамоксифеном рекомендована для лечения серозного рака яичников низкой степени злокачественности после завершения химиотерапии. Однако в этих рекомендациях говорится, что необходимость определения экспрессии эстрогеновых рецепторов не доказана и не является обязательной. В то же время, в Консенсусе ASCO-ESMO по лечению рака яичников говорится, что средний и высокий уровень экспрессии эстрогеновых рецепторов в опухоли может являться предиктивным маркером эффективности гормонотерапии рака яичников [144].

Таким образом, приведенные выше клинических испытаний селективные модуляторы рецепторов эстрогена и ингибиторов ароматазы демонстрируют значительную активность (низкая частота ответа, но со значительной стабилизацией заболевания) в лечение рака яичников. Безусловно, терапия данными препаратами не может принести пользу всем

пациенткам, важно определить тех больных, для которых гормонотерапия окажется эффективной. Исходя из успешного опыта использования ER α как предиктивного маркера ответа на гормонотерапию, мы считаем, что следует более детально и количественно охарактеризовать экспрессию ER α и ER β в образцах рака яичников.

1.6 Эстрогеновые рецепторы и эффективность химиотерапии

Говоря о возможной клинической значимости экспрессии эстрогеновых рецепторов в ткани рака яичников как предикторов эффективности платиносодержащей химиотерапии, необходимо задаться вопросом: «Каким образом эстрогеновые рецепторы могут быть связаны с эффектом препаратов платины и таксанов?». В нескольких фундаментальных исследованиях на культурах клеток были обсуждены и проверены возможные механизмы данной взаимосвязи, все механизмы были связаны с вовлечением эстрогеновых рецепторов в регуляцию репарации ДНК-повреждений и апоптоза.

Так, в работе Christoforos G. Thomas и коллег на культурах клеток рака молочной железы показано, что индукция экспрессии ER β повышает чувствительность клеток к цисплатину [68]. Авторы показали, что ER β блокирует переход клеток в S- и G2/M- фазы клеточного цикла после воздействия препаратами платины. Это в свою очередь приводит к подавлению активности BRCA1 и активации каспазы-2, и, как следствие, к митотической катастрофе и к гибели опухолевых клеток.

Более того, в другой работе на культуре клеток рака молочной железы MCF-7 продемонстрирован еще один возможный механизм действия ER β как белка, увеличивающий цитотоксический эффект цисплатина – активация белка-опухолевого супрессора p53 [145]. Учитывая, что p53 является основным регулятором ответа на различные повреждения ДНК [146], повышенная активность p53 в клетках, экспрессирующих ER β , может являться одной из причин активации апоптоза в ответ на воздействие цисплатина.

Еще в одной статье, посвященной изучению влияния эстрогеновых рецепторов на цитотоксический эффект цисплатина, рассмотрен следующий возможный механизм [147]. Обнаружено, что Bcl2L12, принадлежащий к семейству Bcl-2, ингибирующий апоптоз посредством связывания с каспазой 7, специфически блокируется ER β при индукции цисплатином. То есть ER β взаимодействует с Bcl2L12 по эстроген-независимому молекулярному пути, что способствует индуцированию химиотерапевтическими агентами апоптоза *in vitro*. Интересно, что в этой статье влияния ER α на цитотоксический эффект препаратов платины показано не было.

Более того, в исследовании на резистентных к химиотерапевтическим агентами культурах клеток рака яичников было показано, что агонисты ER β проявляли цитотоксический

эффект, а также повысили чувствительность клеток к терапии цисплатином и паклитакселом [92].

Что касается изучения влияния ER α на цитотоксический эффект препаратов платины и таксанов, то данные не столь однозначны. Так, в упомянутой выше в статье Lee MT и коллег, а также еще в нескольких статьях, взаимосвязи ER α и с эффектом цисплатина показано не было, причем изучали не только культуры клеток рака молочной железы, но и рака яичников [147–149].

Однако в другой работе обнаружен противоположный ER β эффект [150]. Показано, что ER α под действие 17 β -эстрадиола снижают цитотоксичность цисплатина на культурах клеток рака яичников. Такой эффект связывают со снижением экспрессии расщепленного PARP и увеличиваем экспрессии анти-апоптотического белка Bcl-2. В следующей статье изучали эффект ER α , активированных 17 β -эстрадиолов, на цитотоксический эффект паклитаксела. Авторы показали, что 17 β -эстрадиолов значительно снижает общую цитотоксичность паклитаксела в ER α -трансфицированных VCap37, по сравнению с ER α -отрицательной культурой клеток. При дальнейшей изучении механизма действия обнаружено, что экспрессия ER α в клетках VCap37 главным образом препятствует индуцированной паклитакселом гибели клеток, не затрагивая индуцированное паклитакселом связывание микротрубочек и остановку митоза. Более того, добавление фульвестранта способствовало увеличению чувствительность ER α -положительной VCap37 культуры клеток к паклитакселу. Кроме того, фульвестрант также повышал чувствительность клеточных линий MCF-7 и T47D к паклитакселу, что дополнительно подтвердило корреляцию между ER α и лекарственной устойчивостью ER α -положительных опухолевых клетках.

Еще одна статья представляет интерес. В данной работе изучали влияние соотношения экспрессии ER α /ER β на эффективность нескольких противоопухолевых препаратов, в том числе, цисплатин и паклитаксел [151]. В линии клеток рака молочной железы T47D (низкое отношение ER α /ER β) та же доза цисплатина и паклитаксела оказывала меньшие эффекты, чем в линии клеток рака молочной железы MCF-7 (высокое соотношение ER α /ER β).

Что же касается результатов клинических исследований по оценки клинической значимости эстрогеновых рецепторов в прогнозе эффективности химиотерапии препаратами платины и таксанов у пациенток, больных раком яичников, то данные противоречивы. В Таблице 3 представлены результаты анализа литературных данных. Видно, что как в случае с ER α , так и с ER β наблюдается противоположные результаты. Так, ряд клинических исследований показали повышение эффективности химиотерапии у пациенток с экспрессией ER α в опухоли [117,125,127,137].

Более того, в небольшой части исследований был проведен многофакторной анализ

полученных данных для выявления независимой предиктивной значимости маркёров, который в одном случае подтвердил данные, полученные в однофакторном анализе [127], а в другом – нет [125]. В других же работа были получены противоположные результаты или отсутствие корреляции [1,122,123,128,129,131,133,135]. В случае с многофакторным анализом, неблагоприятную предиктивную роль удалось подтвердить только в одном случае [131].

Таблица 3 – Анализ литературных данных о клинической значимости эстрогеновых рецепторов в прогнозе эффективности химиотерапии препаратами платины и таксанов у больных раком яичников

Клинической значимость эстрогеновых рецепторов в прогнозе эффективности химиотерапии препаратами платины и таксанов у больных раком яичников*		
Маркёр	Однофакторный анализ**	Многофакторный анализ (оценка независимой предиктивной значимости) ***
ERα	<p>Наличие экспрессии – благоприятным маркёр [117, 125, 127, 138].</p> <p>Не найдено [1, 122, 123, 128, 134, 135, 136].</p> <p>Наличие экспрессии – неблагоприятный маркёр [129, 132].</p>	<p>Не подтвердилась независимая благоприятная предиктивная значимость [125].</p> <p>Подтвердилась независимая благоприятная предиктивная значимость [127].</p> <p>Не подтвердилась независимая неблагоприятная предиктивная значимость [129].</p> <p>Подтвердилась независимая неблагоприятная предиктивная значимость [131].</p>
ERβ	<p>Наличие экспрессии – благоприятный маркёр [116, 117, 118, 139].</p> <p>Не найдено [122, 123, 125, 127, 134].</p> <p>Наличие экспрессии – неблагоприятный маркёр [126, 135].</p>	<p>Подтвердилась независимая благоприятная предиктивная значимость [116].</p> <p>Подтвердилась независимая неблагоприятная предиктивная значимость [126, 135].</p>

* – в качестве показателя эффективности химиотерапии использовали продолжительность безрецидивного периода; ** – анализ кривых Каплана-Майера, тест log-

rank, статистическая значимость при $p < 0,05$; ** – регрессионная модель Кокса, статистическая значимость при $p < 0,05$.

Что же касается ER β , то как в случае с ER α , в части работ была подтверждена благоприятная предиктивная значимость наличия экспрессии маркера в ткани рака яичников [116,117,139], а в одном из данных исследование проведен многофакторных анализ, который подтвердил независимую значимость ER β [116]. В тоже время, ряд работ показал отсутствие статистически значимого различия в продолжительности безрецидивного периода в зависимости от экспрессии ER β в опухоли [122,123,125,127,133]. Или же наблюдалась обратная картина – неблагоприятная предиктивная роль [118,126,134].

По нашему мнению, такая противоречивость литературных данных связано с отсутствием унифицирования сравниваемых группы не только по схеме лечения, но и по клинико-морфологическим характеристикам заболевания, а также с использование полуколичественного метода определения маркеров (иммуногистохимия, иммуноблотинг), с отсутствием четкой границы деления на положительную и отрицательную экспрессию эстрогеновых рецепторов. В нашей работе мы попытались максимально нивелировать эти недостатки.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

Реактивы: таблетки фосфатно-солевого буфера pH 7.4 (ПанЭко, Россия), раствор Версена (ПанЭко, Россия), химически чистый 37% водный раствор формальдегида (Carl-Roth, Германия), азид натрия (Sigma, США), ДНК-краситель Hoechst H33258 (Sigma, США), бычий сывороточный альбумин – фракция V (BSA) (Neofroxx, Германия).

Антитела. Для определения ER α и ER β использовали следующие первичные антитела:

1. Рекомбинантные кроличьи моноклональные антитела (ab16660, клон SP1, Abcam, Великобритания), специфичные к фрагменту aa 550 C-конца последовательности белка ER α .
2. Мышиные моноклональные антитела (ab288, клон 14c8, Abcam, Великобритания), специфичные к фрагменту aa 1-153 последовательности белка ER β .

В качестве вторичных антител использовали:

1. Козьи поликлональные антитела, конъюгированные с красителем DyLight 650, специфичные к легким и тяжелым цепям мышинных иммуноглобулинов G (IgG) (ab98729, Abcam, Великобритания).
2. Козьи поликлональные антитела, конъюгированные с красителем DyLight 650, специфичные к легким и тяжелым цепям кроличьих IgG (ab98510, Abcam, Великобритания).
3. Козьи поликлональные антитела, конъюгированные с красителем DyLight 488, специфичные к легким и тяжелым цепям мышинных иммуноглобулинов G (IgG) (ab96899, Abcam, Великобритания).

Все антител валидированы производителем Abcam для использования в экспериментах с проточной цитометрией.

В качестве контроля использовались пробы, окрашенные только вторичными антителами. Рабочие концентрации всех антител получали путём их разведения 1% раствором BSA с добавлением 0,1% раствора азидата натрия в фосфатном буферном растворе (pH 7,4).

Клеточные культуры. Для контроля активности антител в работе использовали монослойные культуры клеток инвазивной аденокарциномы протоков молочной железы человека MCF-7 и MDA-MD-231 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), США). До проведения экспериментов культуру хранили в криобанке НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина. Клетки культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM; Gibco). Среда содержали 10% эмбриональной сыворотки телят (HyClone), 50 ед./мл гентамицина (ПанЭко) и 0,1 мг/мл пирувата натрия (Santa Cruz). В инкубаторе (NuAir) поддерживали температуру 37°C, 5% CO₂ и относительную влажность 80–85%. В экспериментах использовали культуру в логарифмической фазе роста. Один млн. клеток каждой культуры

высевали на чашки Петри (60 мм, Corning) и через 24 часа фиксировали по протоколу.

Опухолевый материал: хирургические биопсийные образцы серозного рака яичников, полученный вовремя циторедуктивных операций, проводимых в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России.

2.2 Методы

Коллективом группы молекулярных маркёров опухолей адаптирован иммунофлуоресцентный метод, ассоциированный с проточной цитометрии для изучения маркёров в солидных опухолях человека [152]. Данный метод обладает рядом преимуществ по сравнению с рутинно используемой в клинической практике иммуногистохимией. Во-первых, значительного «смягчения» преаналитической подготовки опухолевого материала (исключение этапов дегидратации, обратного гидратирования и ревитализации). Во-вторых, многократного увеличения числа исследуемых опухолевых клеток (2-10 тыс). В-третьих, полного исключения субъективизма полуколичественного анализа за счет использования прецизионной проточной цитометрии.

2.2.1 Получение одноклеточной суспензии культуры клеток

Для получения суспензии клеток из культурального матраца сливали питательную среду, добавляли раствор Версена до покрытия клеток тонким слоем жидкости и инкубировали в течение 20 мин. при 37°C. После снятия монослоя рабером клетки переносили в пробирку и центрифугировали в течение 5 мин. при 3000 об/мин. После отбирали над осадочную жидкость, а к полученной суспензии добавляли 1 мл 4% раствор формальдегида (разбавление фосфатным буфером, рН 7,4), тщательно пипетировали до полного растворения комочков. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева и доводили до необходимой концентрации 4% раствором формальдегида при двухминутном встряхивании (для предупреждения образования конгломератов клеток).

2.2.2 Получение одноклеточных суспензий из хирургических биопсийных образцов

Хирургический образец ткани рака яичников до 2 см в диаметре (содержание стромальных клеток в ткани серозного рака яичников не превышает 3-5%, что подтверждено во всех исследованных нами случаях заключением патологоанатомами, верифицирующие диагноз) тщательно измельчали острыми ножницами и инкубировали в растворе Версена при 37°C в течение 30 мин. Полученную «кашицу» гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе шестикратным аккуратным движением пестика и фильтровали через фильтр с диаметром пор 40 мкм («BD Falcon», США). На данном этапе даже минимальные участки стромальных тяжей остаются на поверхности фильтра и не включаются в анализ на проточном цитометре. Далее,

суспензию клеток центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин, осадок ресуспендировали в растворе фосфатного буфера (pH 7,4) и при интенсивном встряхивании в течение 2 мин (для предупреждения образования конгломератов клеток) фиксировали формальдегидом в конечной концентрации 4%.

2.2.3 Единичное и двойное иммунофлуоресцентное окрашивание ER α и ER β в одноклеточных суспензиях рака яичников

Перед началом опыта антитела разводили в 1%-м растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA) с 0,05%-м раствором азиды натрия в фосфатно-солевом буфере pH 7,4. В работе использовались следующие разведения антител: первичные антитела к ER α 1:80, а к ER β – 1:200; вторичные антитела к кроличьему IgG – 1:25, к мышинному IgG – 1:50. Исследование проводили с одноклеточными суспензиями клеток, полученными из опухолевого материала больных, в концентрации 200 тыс./мл. Перед проведением иммунофлуоресцентного окрашивания клетки отмывали от фиксирующего раствора формальдегида путем добавления десятикратного избытка фосфатно-солевого буфера pH 7,4 и осаждения центрифугированием в течение 5 мин при 3700 об/мин и комнатной температуре. С помощью пипетки Пастера объемом 3 мл отбирали надосадочную жидкость, оставляя около 100 мкл, и затем добавляли к нему 0,5%-й раствор BSA с 0,05%-м раствором азиды натрия в фосфатно-солевом буфере pH 7,4, исходя из расчета 100 мкл на пробу. Клетки ресуспендировали и аликвотировали в пробирки 100 мкл для проточного цитометра. Итоговая концентрация клеток составляла 200 тыс. кл./мл. К клеткам добавляли первичные антитела, интенсивно встряхивали и инкубировали в темноте при 4°C в течение от 16 до 20 ч (ночная инкубация). После окончания инкубации клетки отмывали добавлением к каждой пробе 2 мл 0,5% раствора BSA с 0,05%-м раствором азиды натрия в фосфатно-солевом буфере pH 7,4 и центрифугированием в течение 5 мин при 3700 об/мин и комнатной температуре. Отбирали супернатант, оставляя в пробирке 100 мкл жидкости, добавляли ко всем пробам (за исключением пробы для анализа автофлуоресценции) вторичные антителами, конъюгированные с флуоресцентным красителем DyLight650, встряхивали и инкубировали при 4°C в течение 1,5 ч. Затем, к каждой пробе добавляли по 100 мкл специфического красителя ДНК Hoechst 33285 в концентрации 2,4 мкг/мл (конечная концентрация – 1,2 мкг/мл), после чего суспензии перемешивали интенсивным встряхиванием пробирок и далее инкубировали в течение 15 мин. После окончания инкубации клетки дважды промывали добавлением 2 мл раствора, содержащего 0,5%-й раствор BSA с 0,05%-й раствором азиды натрия в фосфатно-солевом буфере pH 7,4 и центрифугированием в течение 5 мин при 3700 об/мин и комнатной температуре, каждый раз отбирая супернатант и оставляя по 200 мкл жидкости.

Что касается одиночного и двойного иммунофлуоресцентного окрашивания, то существует только одно отличие – добавление антител. Так, при одиночной метке, во время ночной инкубации первичных антител происходит добавление в образец либо ER α , либо ER β , в то время как при двойной метке – одновременное, последовательное добавление первичных антител как к ER α , так и к ER β . На этапе добавления вторичных антител, в одиночной метке использовали одинаковые флуорохромы – DyLight 650, для двойной метки – неприменимо, поскольку происходит суммация в канале проточного цитометра флуоресценции клеток, экспрессирующие разные маркёры, и невозможно определить экспрессию каждого из белков. Поэтому вторичные антитела использовали конъюгированы с флуорохромами с максимально удаленными спектрами флуоресценции. В нашем исследовании использовали вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом DyLight 488 для детекции ER α , и с DyLight 650 – для ER β .

2.2.4 Метод проточной цитометрии

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитометре Navios ("Beckman Coulter", США). Для возбуждения флуоресценции использовали твёрдотельные диодные лазеры с длиной волны испускаемого света 405, 488 и 638 нм. Регистрацию сигнала флуоресценции красителей DyLight488, DyLight650 и Hoechst 33258 проводили в каналах FL-1, FL-6 и FL-9, соответственно. Использовали средний показатель скорости при подсчёте анализируемых клеток; число анализируемых событий – 2000 и 5000 – для одиночной и двойной метки, соответственно.

Для исключения из анализа разрушенных клеток, эритроцитов, а также когломератов использовали следующие ограничения. Во-первых, как сказано выше, суспензии опухолевых клеток окрашивали с помощью ДНК-красителя Hoechst 33258, что позволяло гейтировать клетки в образце, исключая из анализа клеточные конгломераты и эритроциты. Во-вторых, устанавливалась значения дискриминатора по параметру малоугловое светорассеяние (forwardscatter). Данный показатель характеризует диаметр исследуемой клетки. Установка значения дискриминатора равное 20, позволяло исключить из анализа разрушенные клетки.

Анализ полученных данных проводили в программе FlowJo 10.0.8., рассчитывая два параметра: уровень и интенсивность экспрессии маркёра.

Уровень экспрессии – это количество клеток, экспрессирующих маркёр, выраженное в процентах. Рассчитывался при сравнении экспериментального образца с контролем (инкубация одноклеточной суспензии только с вторичными антителами). Данный параметр рассчитывали с помощью критерия Колмогорова–Смирнова («K-S max difference» в программе FlowJo), для этого рассчитывается показатель D_{\max} , отражающий максимальное значение модуля разности

двух распределений (%). В исследовании было показано, что данный показатель обладает не только математическим смыслом, но и отражает процент клеток, экспрессирующих исследуемый маркер [153]. Необходимо отметить, что погрешность измерения проточного цитометра около 5%, поэтому при анализе образцов ткани серозного рака яичников, опухоль считали ER α или ER β -отрицательной, при уровне экспрессии маркера < 5%.

Следующий изучаем параметр – интенсивность экспрессии маркера. Данная величина вычисляется рассчитывается как отношение среднего геометрического интенсивности флуоресценции в опытном образце (инкубация одноклеточной суспензии с первичными и вторичными антителами) к контролю (инкубация только с вторичными антителами), выраженная в условных единицах. Данный показатель имеет также биологический смысл, он отражается среднее количество исследуемого маркера на клетку.

Для двойного иммунофлуоресцентного окрашивания также использовали построение точечных диаграмм распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции с помощью программы WinMDI 2.9. Данный метод позволяет визуализировать флуоресценцию клеток в двух каналах проточного цитометра, то есть одновременно получать информацию об экспрессии сразу нескольких маркеров в одной и той же клетки. В нашей работе мы использовали данный метод для оценки возможности одновременной коэкспрессии ER α и ER β не только в опухолевом образце, но и в каждой отдельной клетке этого образца.

В нашем исследовании в качестве референсного позитивного контроля на постоянной основе использовали культуру клеток MCF-7 для проверки активности первичных антител к ER α и к ER β (Рисунок 4).

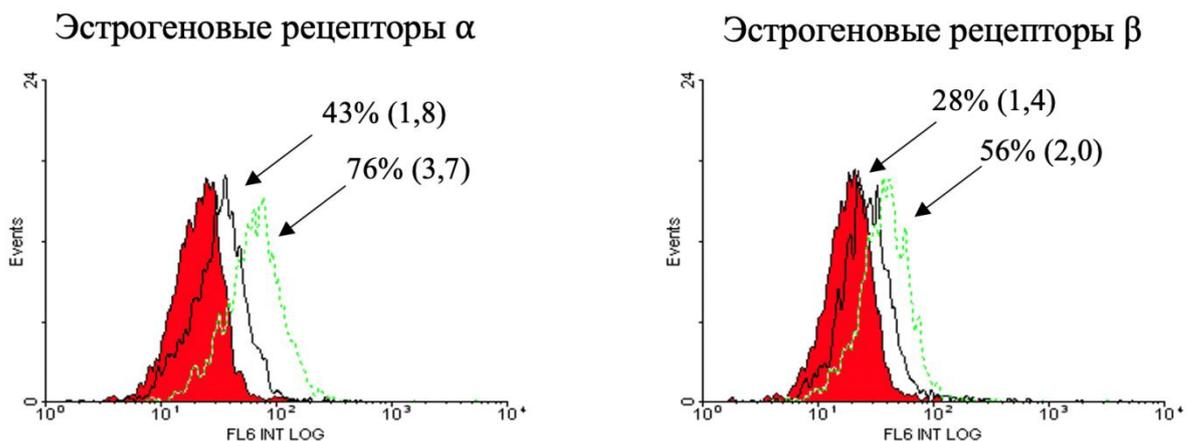


Рисунок 4 – Типичные гистограммы распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции в культурах клеток рака молочной железы MCF-7, характеризующие экспрессию эстрогеновых рецепторов. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции (усл. ед.); по оси ординат – количество клеток. Красные гистограммы отражают интенсивность флуоресценции контроль суспензии клеток (инкубация только с вторичными

антителами); прозрачные гистограммы – экспериментальные клетки (инкубация с первичными и вторичными антителами). Первичные антитела использованы в двух концентрациях 1,5 мкл (черная линия) и 5,0 мкл (зеленая, пунктирная линия). Стрелками отмечен – уровень экспрессии маркера; в круглых скобках – средняя интенсивность экспрессии каждого из маркеров на клетку (усл. ед.).

Видно, что клеточная культура исследовалась в линейном диапазоне зависимости специфической флуоресценции клеток от концентрации специфических антител, так как показатели экспрессии (уровень и интенсивность) увеличивались при росте концентрации антител. Отметим, что в каждом эксперименте использовали две концентрации первичных антител – предплатовая и платовая области уровня экспрессии маркеров. Это необходимо не только выявления всех клеток, экспрессирующих ER α или ER β , но и для внутреннего контроля результатов для увеличения точности количественной оценки.

2.2.5 Статистический анализ данных

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакетов прикладных программ STATISTICA 12.0 (StatSoft, США), GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, США), IBM SPSS Statistics 22 (IBM, США). Первым этапом исследования количественных показателей экспрессии эстрогеновых рецепторов в ткани рака яичников являлось проверкой распределения на нормальность образцов опухолей по уровню и интенсивности маркеров с помощью критерия Шапиро–Уилка. Выборка считалась нормальной при $p > 0,05$.

При необходимости сравнения двух независимых выборок по количественным признакам использовался t-критерий Стьюдента. Условия применения данного критерия:

1. Сравнимые значения не коррелируют между собой.
2. Распределения признака в выборке является нормальным ($p > 0,05$).
3. Дисперсии критерия в выборках приблизительно равны. Данное условие проверялось с помощью критерия F-Фишера.
4. Наличие достаточного числа наблюдений в обеих сравниваемых группах (не меньше 10).

В случае наличия корреляции между признаками (например, уровнем и интенсивностью экспрессии маркеров) использовался t-критерий Стьюдента для зависимых выборок. Данным метод применялся в случае:

1. Две выборки коррелируют между собой.
2. Распределение признака в выборке соответствует нормальному распределению

($p > 0,05$).

3. Наличие достаточного числа наблюдений в обеих сравниваемых группах (не меньше 10).

При сравнении трех и более связанных выборок, например, при проведении взаимосвязи экспрессии эстрогеновых рецепторов с клинико-морфологическими характеристиками заболевания, на первом этапе во всех группах использовался однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). В отличие от t-критерия Стьюдента, one-way ANOVA позволяет проанализировать средние значения трех и более групп. Данный метод позволяет только оценить наличие различий между группами, но не позволяет сказать, какие же группы отличаются между собой. Поэтому в случае обнаружения статистически значимых различий между тремя и более группами использовали Тест Тьюки для анализа, где же данные различия обнаружены.

Для оценки корреляции между интенсивностью и уровнем экспрессии исследуемых маркеров использовался коэффициент корреляции Пирсона (r-Пирсона), позволяющий исследовать взаимосвязь двух измеренных в метрических шкалах переменных одной и той же выборки. Данный метод позволяет определить, насколько сильно изменяется одна переменная при изменении другой. В Таблице 4 приведен анализ силы взаимосвязи между переменными.

Таблица 4 – Анализы силы связи между переменными методом коэффициента корреляции Пирсона [154]

Значение	Интерпретация
0 – 0,3	очень слабая
0,3 – 0,5	слабая
0,5 – 0,7	средняя
0,7 – 0,9	высокая
0,9 – 1,0	очень высокая

Метод можно использовать в случае выполнения следующих параметров:

1. Исследуемые переменные должны иметь нормальное распределение.
2. Исследуемые переменные должны измеряться в метрических шкалах.
3. Количество значений исследуемых переменных должно быть одинаковым.

Анализ безрецидивной выживаемости пациентов проводился методом Каплана–Мейера. Для одно-, двух- и пятилетней выживаемости указывался 95%-ный доверительный интервал. Медиана наблюдения (median follow-up period) вычислялась методом оценки Каплана–Мейера потенциального периода наблюдения (Kaplan-Meier estimate of potential follow-up; КМ-РФ). Данный метод, также называемый обратной функцией Каплана–Мейера, рекомендуется к

применению рядом экспертов, так как адекватно отражает динамику выбытия пациентов в течение всего периода наблюдения [103].

Визуальное представление безрецидивной выживаемости разных групп больных называется кривой Каплана-Мейера, и она показывает, какова вероятность события (в нашем случае, рецидива болезни) в определенный интервал времени. У пациенток, у которых на момент выбывания из исследования или на момент завершения исследования не возникло рецидива, считались «цензурированными». Логранковый критерий (log-rank) является наиболее распространенным методом проверки статистически значимых различий кривых выживаемости. Проверка log-rank вычисляет хи-квадрат для каждого времени события (в нашем случае, рецидива болезни) для каждой группы и суммирует результаты. Суммированные результаты для каждой группы добавляются для получения окончательного хи-квадрат для сравнения всей кривой каждой группы. Данный критерий необходим для проверки нулевой гипотезы о том, что кривые безрецидивной выживаемости одинаковы для всех групп, иными словами, для проверки гипотезы о том, что нет различий между группами по вероятности события (в нашем случае, рецидива болезни) в любой момент времени.

Тест log-rank, как и любой другой тест нулевой гипотезы, указывает, имеются ли статистически значимые различия в выживаемости между группами, но не указывает, насколько они разные. Один из способов показать разницу - указать выживаемость в каждой группе в сопоставимые моменты времени. Другой способ – сравнить наблюдаемые и ожидаемые числа в каждой группе (регрессионная модель Кокса). Если выживаемость одинакова в двух группах, то количество наблюдаемых событий будет пропорционально ожидаемым числам и будет одинаковым в каждой группе. Для этого рассчитывается коэффициент соотношения рисков. Если отношение рисков >1 , это указывает на то, что выживаемость в группе А короче, чем в группе В, и если оно <1 , наоборот, это означает, что группа А с большей вероятностью имеет более продолжительный период наступления события, чем группа В.

Более того, в трансляционных исследованиях зачастую необходимо сравнить вклад нескольких факторов (ковариаторы) в продолжительность безрецидивного периода. Для этой цели также возможно применение регрессионной модели Кокса (Cox proportional hazards model). Таким образом, данный статистический метод на основании соотношения рисков возникновения рецидива заболевания в зависимости от разных ковариаторов позволяет определить независимую предиктивную значимость того или иного маркера.

Еще один статистический метод, используемый в данном исследовании – метод ROC (Receiver Operator Characteristic) – анализ позволяет оценить «пригодность» маркера для использования в качестве предиктора рецидива болезни в течение определенного срока

наблюдения. Метод заключается в построение кривой селективности (доля истинно положительных результатов) к 1-специфичности (доля ложноположительных результатов), в свою очередь площадь под кривой (area under curve, AUC) показывает качество модели, то есть предсказательную способность маркера (Таблица 5).

Более того, метод позволяет найти порог (cut off) – уровень экспрессии маркера, при котором соотношение селективности к 1-специфичности будет наиболее приемлемой.

Таблица 5 – Экспертная шкала оценки площадь под кривой (AUC) в ROC-анализе [154]

Площадь AUC	Качество модели
0,9 – 1,0	Отличное
0,8 – 0,9	Очень хорошее
0,7 – 0,8	Хорошее
0,6 – 0,7	Среднее
0,5 – 0,6	Неудовлетворительное

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Характеристика группы больных, включенных в исследование

Исследование проведено на 74 хирургических биопсийных образцах больных раком яичников, проходивших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина с 2009 по 2016 гг. Клинико-морфологические характеристики заболевания представлены в Таблице 6. Информация получена из амбулаторных карт, а также из электронной госпитальной информационной системы ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Таблица 6 – Клинико-морфологические характеристики заболевания пациенток, включенных в исследование (n=74)

Показатель	Значения
Возраст , медиана (годы) [min; max]	53 [26;77]
Показатель	Количество пациенток (%)
Стадия заболевания:	
– I	6 (8,1%)
– II	9 (12,1%)
– III	48 (64,9%)
– IV	11 (14,9%)
Гистологический вариант аденокарциномы:	
– серозная	74 (100,0%)
Степень злокачественности (grade):	
– высокая (high grade)	62 (83,7%)
– низкая (low grade)	12 (16,3%)
Объем первичной циторедуктивной операции:	
– оптимальная	15 (20,3%)
– неоптимальная	59 (79,7%)
Химиотерапии:	
– неoadъювантная	0 (0,0%)
– стандартная адъювантная, включающая препараты платины и таксанов	74 (100,0%)
Количество курсов адъювантной химиотерапии:	
– 4	3 (4,1%)
– 6	65 (87,8%)
– 7	3 (4,1%)
– 8	3 (4,1%)
Ответ на химиотерапию:	
– платиночувствительные*	56 (75,6%)
– платинорезистентные *	18 (24,3%)

*Согласно клиническим рекомендациям по диагностике и лечению больных раком яичников: платиночувствительный рецидив – длительность бесплатинового интервала

превышает 6 месяцев; платинорезистентный рецидив – длительность бесплатинового интервала составляет менее 6 месяцев [5].

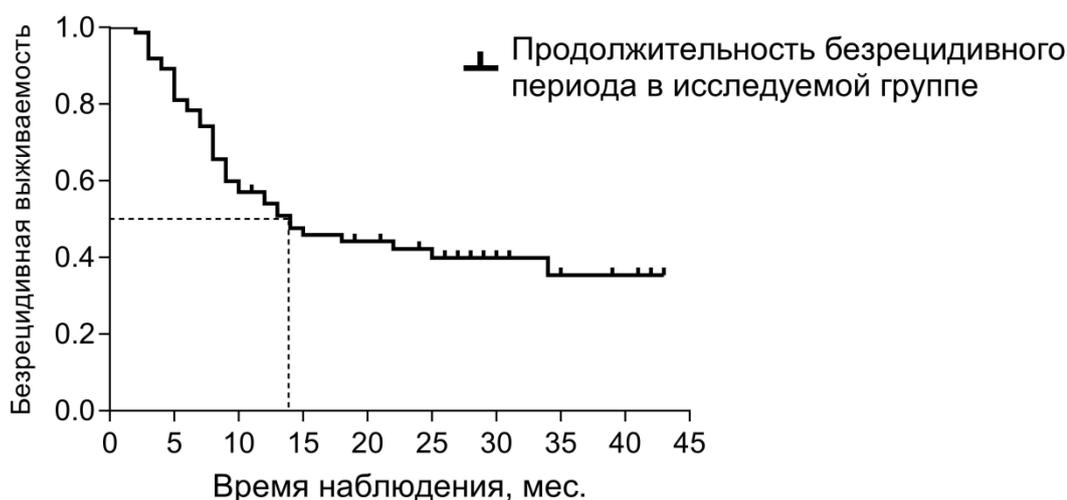
Согласно данным, представленным в Таблице 6, медиана возраста больных составила 53 года, причем только в 13 случаях (17,6%) возраст был меньше 45 лет, что согласуется с литературными данными о том, что большинство (>80%) случаев рака яичников диагностируется у женщин старше 50 лет [79]. Необходимо отметить, что все включенные в исследование пациентки (n=74) были с гистологически верифицированным серозным подтипом рака яичников. В подавляющем большинстве случаев у больных наблюдался распространенный опухолевый процесс (III-IV стадии) – 59 (79,7%), из них с высокой и низкой степенью злокачественности оказались 83,7% и 16,3% случаев, соответственно.

Что касается химиотерапии, все пациентки прошли первую стандартную линию адъювантной химиотерапии препаратами платины и таксанов. Резистентность к лечению отмечена в 24,3% случаев – рецидив болезни диагностирован менее чем через 6 мес. после завершения первой линии химиотерапии. Детальное изучение лечения пациенток показало, что 3 больных (4,1%) получили только 4 курса первой стандартной линии химиотерапии, 3 (4,1%) – 7 курсов, и 3 (4,1%) – 8 курсов. Остальные больные (87,8%) получили 6 курсов стандартной химиотерапии. Это наблюдение в дальнейшем поможет точнее охарактеризовать эстрогеновые рецепторы как возможные предиктивные маркеры ответа на химиотерапию.

При анализе безрецидивной выживаемости больных раком яичников после завершения первой линии химиотерапии препаратами платины и таксанов медиана продолжительности наблюдения составила 27 мес. (максимальный срок наблюдения – 43 мес.).

Согласно нашим данным, медиана продолжительности безрецидивного периода больных в группе составила 14,0 мес. (Рисунок 5). Однолетняя выживаемость составила 54,1%, двухлетняя – 42,2%, трехлетняя – 35,4%. Эти данные практически полностью согласуются с результатами диссертационной работой Тюляндиной А.С. для пациенток с раком яичников, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» в период с 2006 по 2017 гг. [155].

Единственное, в нашем исследовании получилась меньшая медиана продолжительности жизни – 14 vs 18 мес. (Рисунок 5), что может объясняться бóльшим числом пациенток, включенных в данное исследование, с неоптимальным объемом циторедукции – 79,7% vs 41,1%, соответственно, в работе А. С. Тюляндиной [155].



Все пациентки (n=74)				
Месяцы наблюдения	12	24	36	Медиана, мес.
Число больных	40	31	26	14,0

Рисунок 5 – Общая кривая безрецидивной выживаемости всех включенных в исследование пациенток с раком яичников. По оси абсцисс – время наблюдения (мес.), по оси ординат – доля пациенток с учетом цензурирования (%). Пунктирной линией отмечена медиана продолжительности безрецидивного периода после завершения первой линии химиотерапии препаратами платины и таксанов, до которого возврата болезни не отмечено у 50% больных. В таблице приведены данные по динамике диагностирования рецидива заболевания

3.2 Экспрессия эстрогеновых рецепторов в ткани рака яичников

Оценка экспрессии эстрогеновых рецепторов в ткани рака яичников проводилась по двум показателям. Во-первых, уровень экспрессии маркера – количество клеток, экспрессирующих маркер, выраженное в процентах. Во-вторых, интенсивность экспрессии исследуемого маркера – среднее количество маркера, экспрессируемого в расчёте на клетку, рассчитывается в условных единицах как отношение среднего геометрического интенсивности флуоресценции в опытном образце к контролю (инкубация клеток только с вторичными антителами).

На Рисунке 6 представлены данные, характеризующие экспрессию и коэкспрессию ER α и ER β в опухолевой ткани больных серозным раком яичников. Образцы опухолей были ранжированы по уровню экспрессии ER β от минимального до максимального значения (серые

квадраты). Черными треугольниками обозначены показатели уровня коэкспрессии ER α в той же опухоли.

Первое, что необходимо отметить, – во всех случаях в ткани серозного рака яичников выявлена коэкспрессия ER α и ER β . Обращают на себя внимание значительные различия между опухолями разных больных по уровню каждого маркера, то есть молекулярная гетерогенность ткани серозного рака яичников по количественному показателю экспрессии ER α и ER β .

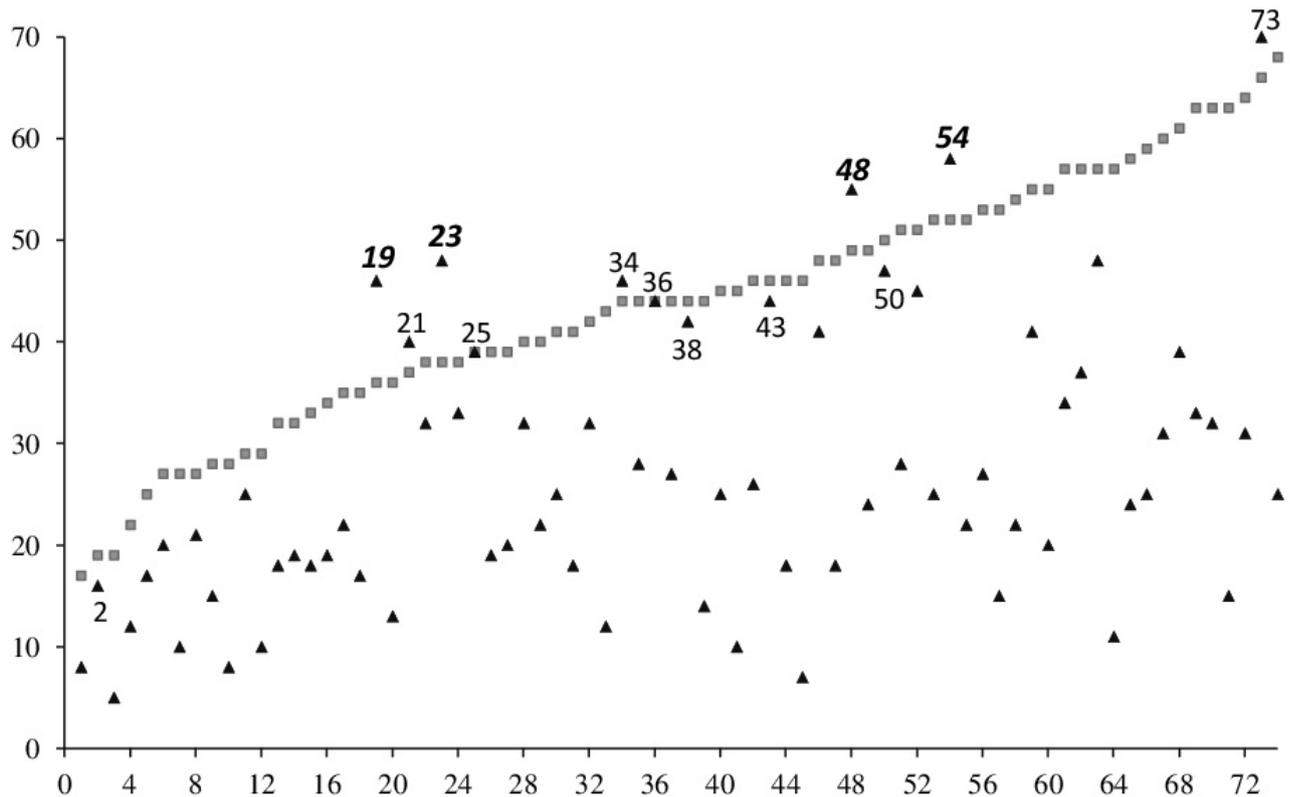


Рисунок 6 – Характеристика уровня экспрессии и коэкспрессии ER α и ER β в опухолевой ткани больных серозным раком яичников. По оси абсцисс – номера образцов опухолей, включенных в анализ (ранжированы от минимального до максимального значения уровня экспрессии ER β). По оси ординат – уровень экспрессии ER α и ER β (%). Серые квадраты – уровень экспрессии ER β , черные треугольники – ER α . Цифры на рисунки – номера образцов опухолей: полужирный шрифт, *курсив* – уровень экспрессии ER α , превышающий показателей для ER β ; остальные – показатели уровни экспрессии обоих маркеров практически идентичны.

Наглядно показано, что только в 4 из 74 исследованных образцов (около 5% случаев), уровень экспрессии ER α существенно выше уровня экспрессии ER β (на Рисунке 2 эти значения обозначены цифрами 19, 23, 48 и 54). Также можно видеть, что в 9 из 74 исследованных образцов опухолей (около 10% случаев) уровень экспрессии ER α практически идентичен показателю ER β (на Рисунке 2 – 2, 21, 25, 34, 36, 38, 43, 50, 73). В подавляющем же большинстве

случаев (в 61 из 74 исследованных опухолей – в 82%) уровень экспрессии ER β значительно превысил показатель для ER α .

Данные, представленные в Таблице 7, отражают количественные показатели уровня экспрессии ER α и ER β в ткани серозного рака яичников. Видно, что средние значения практически не отличаются от медианы, при этом среднее арифметическое значение уровня экспрессии (26,8% vs 43,9%) и медианы показателя (25,0% vs 44,0%) ER β более чем в 1,5 раза превышает таковые для ER α ($p < 0,001$). Эти цифры отражают наглядно видное на Рисунке 6 превышение уровня экспрессии ER β по сравнению с ER α в подавляющем числе исследованных образцов серозного рака яичников.

О молекулярной гетерогенности исследованной когорты опухолей по уровню ER α и ER β свидетельствуют также значительные различия между минимальными и максимальными значениями уровня экспрессии этих маркёров у разных больных: для ER α – 6% и 70%, для ER β – 17% и 68%.

Таблица 7 – Количественные показатели уровня экспрессии ER α и ER β в ткани серозного рака яичников

Подтип ER	Показатели уровня экспрессии маркёров (%)			ER α vs ER β p***	Нормальность распределения p****
	Минимальное/ максимальное	Среднее значение (M \pm SD)*	Медиана [Q1; Q3] **		
ER α	6/70	26,8 \pm 13,4	25,0 [18,0; 33,8]	<0,001	0,12
ER β	17/68	43,9 \pm 12,2	44,0 [36; 52,8]		0,78

*M \pm SD – среднее арифметическое значение \pm стандартное отклонение. ** Me [Q1; Q3] – медиана [нижний квартиль, верхний квартиль]. *** p – достоверность различий между показателями уровня экспрессии ER α и ER β , рассчитанная методом t-критерия Стьюдента. ****p – нормальность распределения рассчитана критерием Шапиро-Уилка.

Более того, на Рисунке 7 представлена диаграмма рассеяния показателей экспрессии ER α и ER β , используемая для демонстрации наличия или отсутствия корреляции между двумя переменными. Показано, что есть статистически значимая прямая корреляция ($p = 0,001$) между уровнем экспрессии маркёров, но коэффициент корреляции равен 0,44, что соответствует слабому характеру данной связи (см. Таблицу 4).

Еще один интересный факт удалось обнаружить при анализе данных об коэкспрессии эстрогеновых рецепторов в ткани рака яичников. В образце одной и той же опухоли суммарный показатель уровня экспрессии ER α и ER β может превышать 100% (например, образцы 54, 72 на

Рисунке б), что позволяет утвердительно ответить на вопрос о возможности внутриклеточной коэкспрессии ER α и ER β , то есть о коэкспрессии обоих маркёров в одних и тех же клетках исследованной опухоли. Это заключение было подтверждено в прямых экспериментах при двойном иммунофлуоресцентном окрашивании ER α и ER β в ткани рака яичников с высокой экспрессией обоих рецепторов.

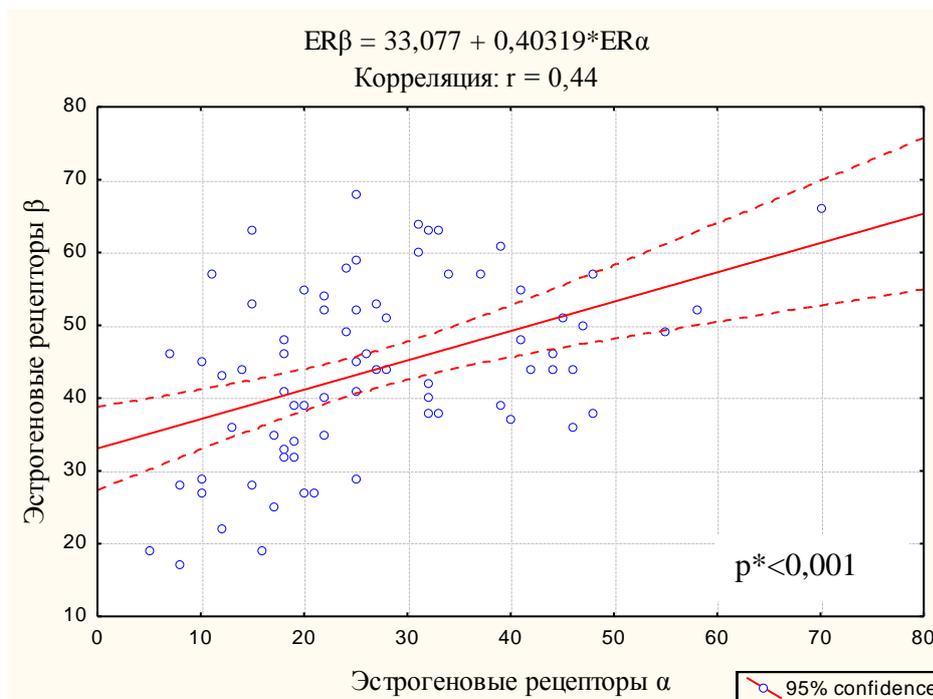


Рисунок 7 – Диаграмма рассеяния показателей уровня экспрессии ER α и ER β в образцах ткани рак яичников. *р – достоверность корреляции двух показателей, рассчитанная с использованием таблицы критических значений корреляции Пирсона

На Рисунке 8 приведены два примера точечных диаграмм распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции, детектируемой в каналах FL-6 и FL-1 на проточном цитометре. На обеих диаграммах под №1 представлена автофлуоресценция клеток рака яичников. Видно, что при расстановке границ квадрантов в анализ включается 97–98% клеток.

Контрольное окрашивание только вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем, представлено на диаграммах под №2. Данные гистограмм свидетельствуют о практически полном отсутствии неспецифического окрашивания при инкубации с вторичными антителами.

После инкубации клеток с первичными антителами в обеих опухолях выявлен высокий уровень экспрессии как ER α (40% и 45%, диаграммы под №3), так и ER β (87% и 43%, диаграммы под №4).

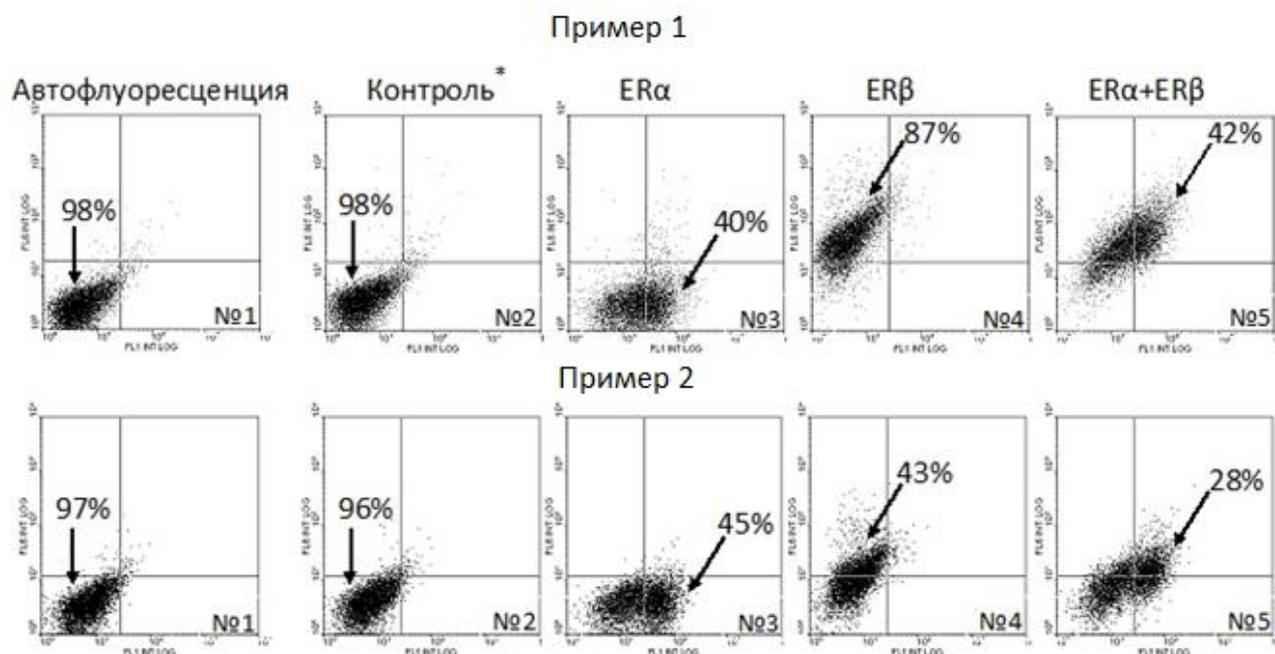


Рисунок 8 – Примеры двойного иммунофлуоресцентного окрашивания клеток рака яичников специфическими антителами к ER α и ER β . По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции в канале FL-1 – для ER α . По оси ординат – интенсивность флуоресценции в канале FL-6 – для ER β . Представлены точечные диаграммы распределения клеток в образцах двух опухолей (образцы 4 и 5) по интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре: №1 – автофлуоресценция (левый нижний квадрант); №2* – инкубация с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем (контроль, левый нижний квадрант); №3 – клетки, экспрессирующие ER α (правый нижний квадрант); №4 – клетки, экспрессирующие ER β (левый верхний квадрант); №5 – клетки, коэкспрессирующие ER α и ER β (правый верхний квадрант)

Данные, представленные на диаграммах под №5, демонстрируют результаты специфического двойного окрашивания клеток рака яичников антителами как к ER α , так и к ER β . Видно, что в обеих опухолях выявляются клетки, коэкспрессирующие эти маркеры (правые верхние квадранты). В первом случае количество таких клеток в опухолевом узле составило 42%, во втором – 28%. Обращает внимание тот факт, что в первом образце во всех клетках с экспрессией ER α выявлена и коэкспрессия ER β , тогда как во втором – только около половины клеток, экспрессирующих ER α (28% из 45%), коэкспрессировали и ER β . В обоих случаях в исследованных опухолях выявлены клетки с экспрессией только ER β (левые верхние квадранты на диаграммах под №5).

Таким образом, при одиночном иммунофлуоресцентном окрашивании в ткани рака яичников выявлена экспрессия эстрогеновых рецепторов разных типов – ER α и ER β .

Количественные показатели уровня экспрессии ER β оказались выше по сравнению с ER α , при этом во всех образцах опухолей отмечена коэкспрессия обоих маркёров. При двойном иммунофлуоресцентном окрашивании клеток рака яичников выявлена коэкспрессия ER α и ER β не только в разных, но и в одних и тех же клетках новообразования.

Далее перейдем к описанию результатов оценки интенсивности экспрессии ER α и ER β .

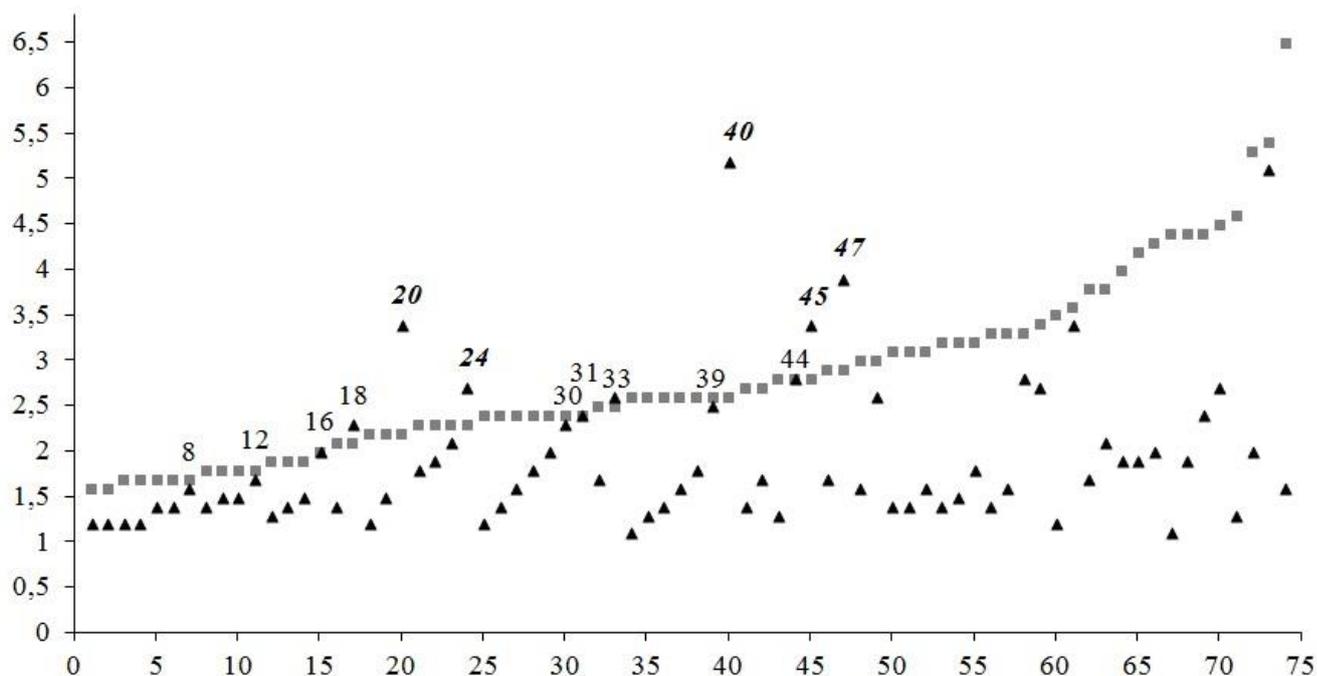


Рисунок 9 – Характеристика интенсивности экспрессии ER α и ER β в опухолевой ткани больных серозным раком яичников. По оси абсцисс – номера образцов опухолей, включенных в анализ (ранжированы от минимального до максимального значения уровня экспрессии ER β). По оси ординат – интенсивность экспрессии ER α и ER β , усл. ед. Серые квадраты – интенсивность экспрессии ER β , черные треугольники – ER α . Цифры на рисунки – номера образцов опухолей: полужирный шрифт, *курсив* – интенсивность экспрессии ER α , превышающий показателей для ER β ; остальные – показатели интенсивности экспрессии обоих маркёров практически идентичны

В целом, наблюдаемая картина оказалась похожей, в сравнении с уровнем экспрессии ER α и ER β . На Рисунке 9 представлена характеристика образцов опухолей по интенсивности экспрессии маркёров, которые ранжированы по уровню экспрессии ER β от минимального до максимального значения (серые квадраты), а черными треугольниками обозначены показатели уровня коэкспрессии ER α в той же опухоли. Как и в случае с уровнем экспрессии маркёров, в преобладающем большинстве случаев интенсивность экспрессии ER β в образцах выше, чем ER α (60 из 74 образцов, 81,0%), в нескольких случаях интенсивность экспрессии ER α и ER β

была практически одинаковой (образцы 8, 12, 16, 18, 30, 31, 33, 39, 44 на Рисунке 9). И только в 5 случаях из 74 (в 6,8%) интенсивность экспрессии ER α была выше по сравнению с ER β .

В Таблице 8 приведены сводные данные количественных показателей уровня экспрессии ER α и ER β в ткани серозного рака яичников. Как и следовало из Рисунка 9, средние показатели интенсивности экспрессии выше у ER β , чем у ER α – 2,9 vs 1,9 (p<0,001).

Более того, как и в случае с уровнем экспрессии данных маркёров, наблюдалась гетерогенность показателей интенсивности экспрессии, о чем свидетельствуют значительные (около 4 раз) различия между минимальными и максимальными значениями интенсивности экспрессии этих маркёров у разных больных: для ER α – 1,2 и 5,2 усл.ед, для ER β – 1,6 и 6,5 усл.ед.

Таблица 8 – Количественные показатели интенсивности экспрессии ER α и ER β в ткани серозного рака яичников

Подтип ER	Показатели интенсивности экспрессии маркёров, усл.ед.			ER α vs ER β p***	Нормальность распределения p****
	min/max	Среднее значение (M \pm SD)*	Медиана [Q1; Q3] **		
ER α	1,2/5,2	1,9 \pm 0,8	1,7 [1,4; 2,2]	<0,001	0,08
ER β	1,6/6,5	2,9 \pm 1,0	2,6 [2,2; 3,3]		0,34

*M \pm SD – среднее арифметическое значение \pm стандартное отклонение. ** Me [Q1; Q3] – медиана [нижний квартиль, верхний квартиль]. ***p – достоверность различий между показателями уровня экспрессии ER α и ER β , рассчитанная методом t-критерия Стьюдента. ****p – нормальность распределения рассчитана критерием Шапиро-Уилка.

Что касается корреляции показателей интенсивности двух маркёров, то результаты оценки представлены на Рисунке 10. Показано, что существует слабая прямая, статистически значимая взаимосвязь между интенсивностью экспрессии ER α и ER β , при этом коэффициент вариации составил 0,22 (см. Таблицу 4, p=0,03).

Более того, безусловно, важно провести корреляцию между разными показателями экспрессии эстрогеновых рецепторов, то есть между уровнем и интенсивностью. Как и следовало ожидать, исходя из полученных распределений образцов по уровню и интенсивности экспрессии маркёров (см. Рисунок 6 и 9), корреляция была выявлена. Результаты продемонстрированы на Рисунках 11 и 12.

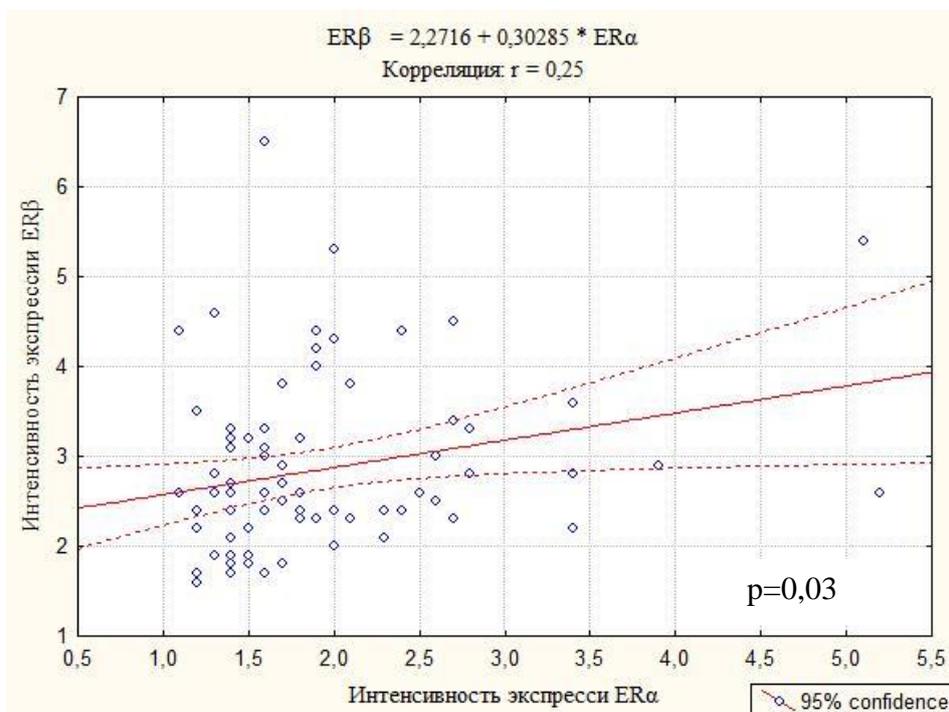


Рисунок 10 – Диаграмма рассеяния показателей интенсивности экспрессии $ER\alpha$ и $ER\beta$ в образцах ткани рак яичников. * p – достоверность корреляции двух показателей, рассчитанная с использованием таблицы критических значений корреляции Пирсона

Видно, что в случае с $ER\alpha$, интенсивность и уровень экспрессии имеют очень сильную прямую корреляцию, так как коэффициент корреляции больше 0,9 (см. Таблицу 4, $p < 0,0001$). Почти та же ситуация наблюдалась и в отношении корреляции интенсивности и уровня экспрессии $ER\beta$, так как рассчитанный коэффициент корреляции 0,88 характеризует сильную взаимосвязь (см. Таблицу 4, $p < 0,0001$).

Таким образом, анализ интенсивности экспрессии $ER\alpha$ и $ER\beta$ в образцах серозного рака яичников показал, что, как и в случае с уровнем экспрессии маркёров, количественные показатели $ER\beta$ оказались выше по сравнению с $ER\alpha$. Более того, найдена прямая сильная корреляция интенсивности и уровня экспрессии маркёров.

Для завершения данного раздела исследования необходимо ввести понятия высокий и низкий показатель экспрессии маркёра. Это необходимо для дальнейшей оценки предиктивной значимости экспрессии эстрогеновых рецепторов в прогнозе эффективности химиотерапии, включающей препараты платины и таксанов, у пациенток с серозным раком яичников.

Поскольку распределение опухолей по показателям уровня и интенсивности экспрессии $ER\alpha$ и $ER\beta$ было нормальным (см. Таблицы 7 и 8), образцы опухолей разделили на группы с высоким и низким уровнем/интенсивности маркёров по медиане показателей. Для уровня экспрессии $ER\alpha$ и $ER\beta$ – это значения 25% и 44%, соответственно, а для интенсивности – 1,7 и 2,6 усл.ед. Таким образом, опухоли с показателем экспрессии маркёра меньше медианы,

составили группу низкой экспрессии, а больше или равным медианы — высокой экспрессии $ER\alpha$ и $ER\beta$, соответственно.

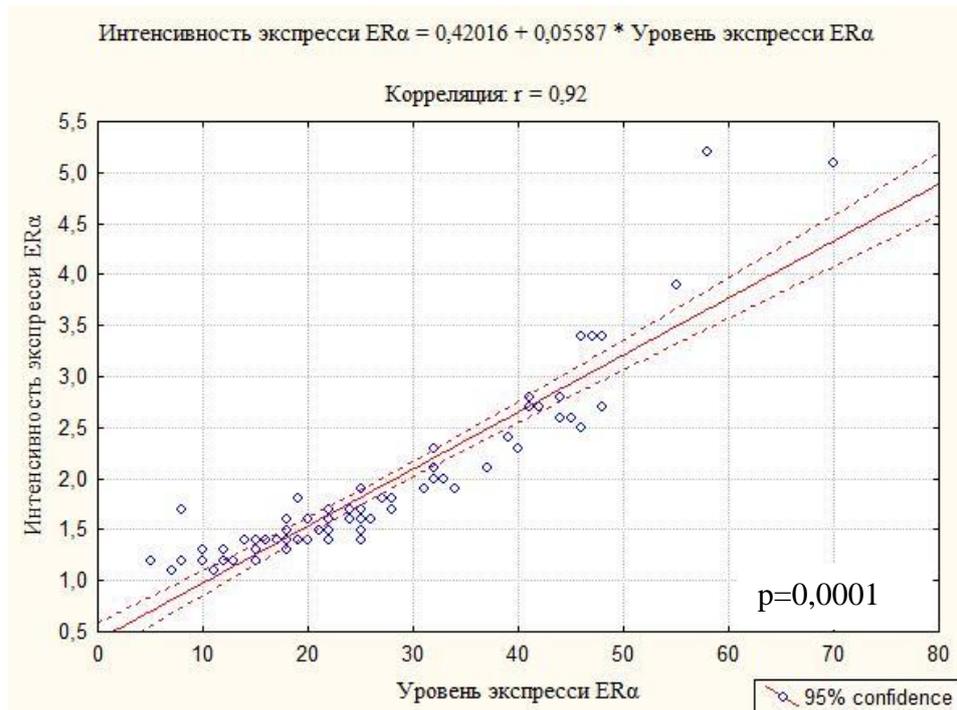


Рисунок 11 – Диаграмма рассеяния показателей интенсивности и уровня экспрессии $ER\alpha$ в образцах ткани рака яичников. * p – достоверность корреляции двух показателей, рассчитанная с использованием таблицы критических значений корреляции Пирсона.

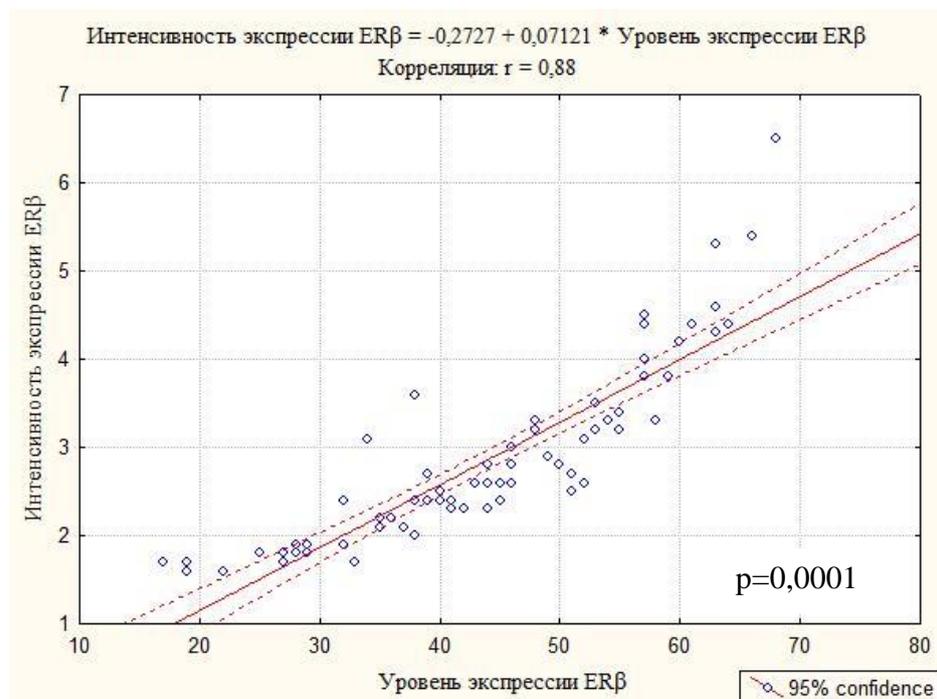


Рисунок 12 – Диаграмма рассеяния показателей интенсивности и уровня экспрессии $ER\beta$ в образцах ткани рака яичников. * p – достоверность корреляции двух показателей, рассчитанная с использованием таблицы критических значений корреляции Пирсона

На Рисунке 13 приведены несколько примеров парных гистограммы распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции клеток при иммунофлуоресцентном окрашивании эстрогеновых рецепторов обоих типов в одном и том же образце ткани рака яичников с разными показателями экспрессии маркёров.

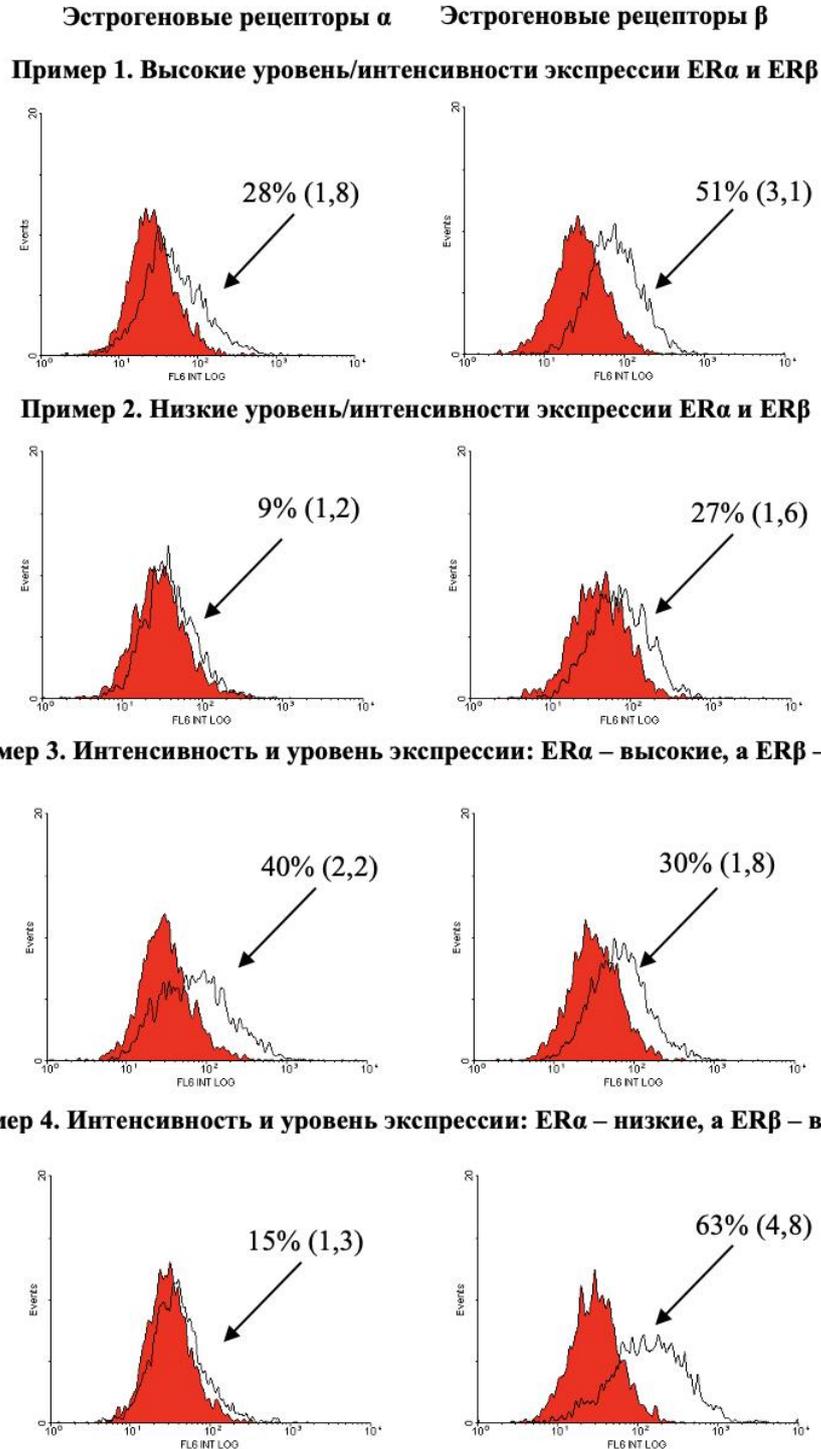


Рисунок 13 – Примеры гистограмм распределения клеток в зависимости от интенсивности клеточной флуоресценции при иммунофлуоресцентном окрашивании. По осям абсцисс – интенсивность специфической флуоресценции (усл. ед.), по осям ординат – количество клеток; красные гистограммы – после инкубации с вторичными антителами,

конъюгированными с флуоресцентным красителем (контроль), прозрачные – после инкубации с антителами к эстрогеновым рецепторам; цифры на гистограммах – уровень экспрессии маркера (%), интенсивность окрашивания указана в скобках.

Примеры подобраны таким образом, что и уровень, и интенсивность экспрессии маркера попадали в одну группу, то есть оба показателя будут либо с низким, либо с высоким показателем. Так, пример 1 и 2 демонстрирует образцы опухолей, в котором показатели экспрессии обоих маркеров либо высокие (пример 1), либо низкие (пример 2), то есть для данных показателей значения выше и ниже медианы как для ER α , так и ER β . В примерах 3 и 4 представлены примеры образцов, в которых показатели экспрессии маркеров отличаются. Так, в примере 3, клетки обладают низким уровнем и интенсивностью экспрессии ER β , но высокими значениями обоих показателей экспрессии ER α . В примере 4 наблюдается противоположная картина.

Итак, в данном разделе были изложены результаты иммунофлуоресцентного окрашивания в ткани рака яичников эстрогеновых рецепторы двух типов – ER α и ER β .

Показано, что у всех больных, включенных в исследование, в ткани серозного рака яичников экспрессируются оба маркера, однако показатели экспрессии для ER β значительно выше по сравнению с ER α как в случае с уровнем, так и с интенсивностью экспрессии – более чем в 1,5 и 4 раза, соответственно. Принимая во внимание, что эстрогеновые рецепторы являются мишенью антиэстрогенов, полученные результаты указывают на возможную эффективность гормональной терапии у всех или, по крайней мере, у большинства больных раком яичников с высоким уровнем и интенсивностью их экспрессии. При этом «главной» мишенью, по-видимому, могут являться ER β , показатели экспрессии которых до настоящего момента рутинно в клинической практике не исследуются.

3.3 Связь экспрессии эстрогеновых рецепторов с клиничко-морфологическими характеристиками заболевания пациенток с раком яичников

В Таблицах 9 и 10 приведены результаты оценки связи показателей экспрессии эстрогеновых рецепторов с клиничко-морфологическими характеристиками заболевания.

Поскольку исследованная группа пациенток была унифицирована по гистологическому типу опухоли – серозный рак яичников, корреляция проведена только по следующим характеристикам: возраст, стадия заболевания, степень злокачественности опухоли.

Как видно из данных, представленных в Таблицах 9 и 10, взаимосвязи уровня или интенсивности экспрессии ни ER α , ни ER β с изученными клиничко-морфологическими характеристиками заболевания (возраст, стадия заболевания, степень злокачественности опухоли) не выявлено, даже на уровне тенденции к такой взаимосвязи ($p > 0,05$).

Таблица 9 – Связь уровня экспрессии ER α и ER β в опухоли с клинико-морфологическими характеристиками заболевания

Показатель	n	Средний уровень экспрессии маркера, %			
		ER α	p*	ER β	p*
Возраст, годы					
≤ 50	31	25,5±12,2	0,87	42,2±12,9	0,67
> 50	43	27,8±14,3		45,1±11,6	
Стадия заболевания					
I	6	36,2±23,0	0,79	50,0±9,4	0,57
II	9	27,3±15,4		43,2±12,5	
III	48	26,3±12,1		43,1±12,0	
IV	11	24,0±10,7		44,3±14,4	
Степень злокачественности					
Высокая	62	27,6±13,6	0,27	43,7±12,1	0,83
Низкая	12	22,9±12,1		44,7±13,0	

p* – достоверность различий между показателями уровня экспрессии маркеров и клинико-морфологическими характеристиками заболевания, рассчитанная методом t-критерия Стьюдента (для показателей: возраст и степень злокачественности) и ANOVA one-way (для показателя стадия заболевания). n – количество больных.

Таблица 10 – Связь интенсивности экспрессии ER α и ER β в опухоли с клинико-морфологическими характеристиками заболевания

Показатель	n	Средняя интенсивность экспрессии маркера, %			
		ER α	p*	ER β	p*
Возраст, годы					
≤ 50	31	1,9±0,5	0,1	2,7±0,15	0,13
> 50	43	2,0±0,7		3,0±0,16	
Стадия заболевания					
I	6	2,8±1,8	0,08	3,1±1,2	0,93
II	9	2,0±0,8		2,8±1,0	
III	48	1,8±1,4		2,8±1,0	
IV	11	1,7±1,1		2,9±1,0	
Степень злокачественности					
Высокая	62	2,0±0,1	0,44	2,9±0,1	0,87
Низкая	12	1,8±0,2		2,8±0,2	

p* – достоверность различий между показателями уровня экспрессии маркеров и

клинико-морфологическими характеристиками заболевания, рассчитанная методом t-критерий Стьюдента (для показателей: возраст и степень злокачественности) и ANOVA one-way (для показателя стадия заболевания). n – количество больных.

3.4 Оценка клинической значимости показателей экспрессии ER α и ER β на унифицированной когорте больных

Признано, что первый этап оценки клинической значимости маркёров необходимо проводить на максимально однородной по клиническим характеристикам когорте пациентов, это позволяет уменьшить «шум» гетерогенности больных, и повысить вероятность выявления предиктивной или прогностической значимости исследуемых маркёров [114].

В нашем случае, нам удалось выделить следующую унифицированную когорту больных (n=31). Это пациентки с серозном раком яичников высокой степени злокачественности, с III стадией заболевания, с неоптимальной циторедукцией, получившие 6 курсов стандартной химиотерапии препаратами платины и таксанов.

В медицинской статистике для оценки влияния признака на время, за которое произойдет определенный исход, используется метод Каплана-Майера. Используя этот статистический подход, мы смогли выяснить, влияет ли уровень и/или интенсивность экспрессии эстрогеновых рецепторов на продолжительность безрецидивного периода течения рака яичников после завершения химиотерапии с включением препаратов платины и таксанов и таким образом оценить предиктивную значимость маркёров.

Начнем с оценки уровня экспрессии эстрогеновых рецепторов в образцах серозного рака яичников.

Данные, представленные на Рисунке 14 и в Таблице 11 показывают, что к 43 мес. наблюдения не обнаружено статистически значимой разницы между продолжительностью безрецидивного периода болезни в группах с высоким и низким уровнем экспрессии ER α в опухоли. Медиана продолжительности безрецидивного периода была практически одинаковой – 10 vs 8 мес. ($p > 0,31$), более того, отсутствовала разница в частоте рецидивирования болезни – 66,7% vs 75,0%. Риск рецидива болезни в 1,6 раза был выше в группе с низким уровнем экспрессии ER α в опухоли. Статистической значимости это отличие также не достигло (95% CI 0,7 – 3,8).

Однако детально анализируя кривые Каплана-Майера, можно заметить, что за исключением двух больных, у которых диагностирован ранний рецидив болезни на 3 мес. после завершения химиотерапии, расхождение кривых отмечается на всех сроках наблюдения, что указывает на тенденцию к более благоприятному течению заболевания в группе с высоким уровнем экспрессии ER α в опухоли по сравнению с низким значением этого показателя. В

данном случае различия не достигли статистической значимости, возможно, из-за малого объема выборки. В частности, это подтверждают данные о частоте рецидивирования на ранних сроках наблюдения. Видно, что после 6 мес. в группах с высоким и низким уровнем экспрессии ER α в опухоли из исследования выбыли – 13,3% и 37,5%, а после 12 мес. – 50,0% и 75,0%, соответственно.

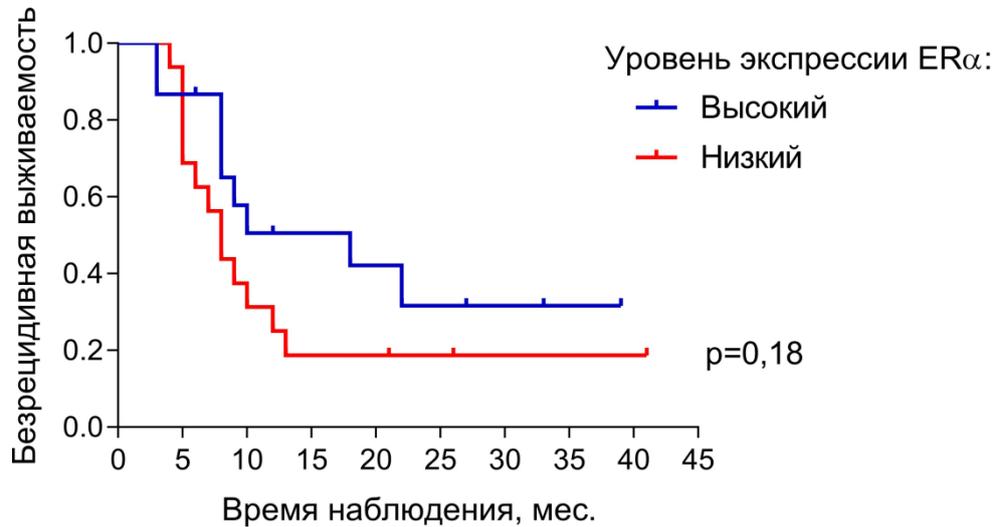


Рисунок 14 – Кривые Каплана-Майера, характеризующие продолжительность безрецидивного периода у больных серозным раком яичников с разным уровнем экспрессии ER α в опухоли (унифицированная когорта больных). * p – достоверность различий между показателями продолжительности безрецидивного периода при разных уровнях экспрессии ER α в опухоли, рассчитанная методом log-rank (Mantel-Cox) test.

Таблица 11 – Характеристика кривых Каплана-Майера, представленных на рисунке 14

Уровень экспрессии ER α	Медиана ПБП* (мес.)	Частота рецидивирования (%) на разные сроки наблюдения (мес.)			Hazard ratio** [95% CI 0,7 – 3,8]
		6	12	43	
Высокий	10	13,3	50,0	66,7	1,6
Низкий	8	37,5	75,0	75,0	

ПБП* – продолжительность безрецидивного периода, мес. Hazard ratio (низкий/высокий)** – соотношение рисков возврата заболевания в группе с низким уровнем экспрессии маркера относительно группы с высоким уровнем; в квадратный скобках указан 95% доверительный интервал.

Результаты оценки клинической значимости уровня экспрессии ERβ в опухоли на унифицированной когорте пациенток с серозным раком яичников представлены на Рисунке 15 и в Таблице 12. Видно, что больные с высоким уровнем экспрессии ERβ в опухоли имели более благоприятное течение заболевания после завершения первой линии платиносодержащей химиотерапии, чем с низким показателем данного маркера.

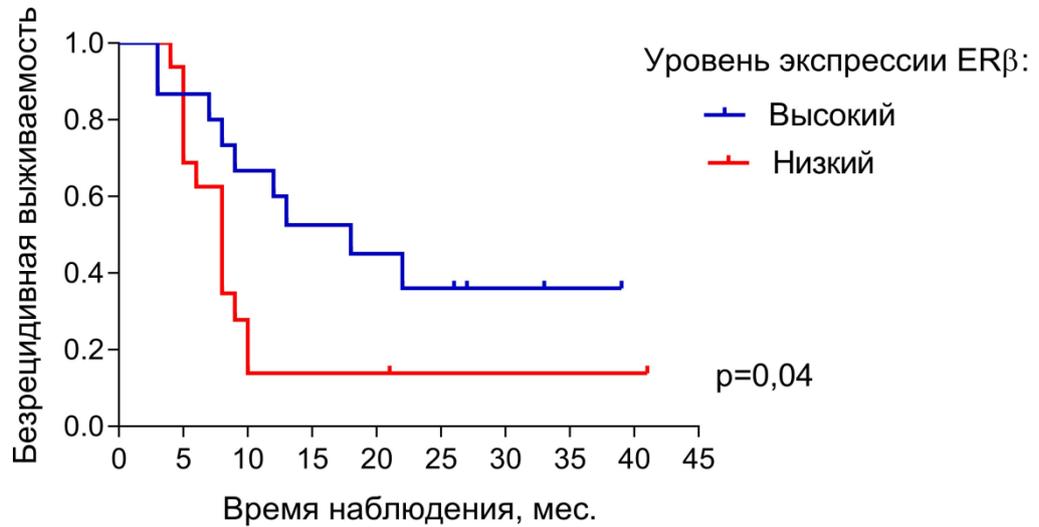


Рисунок 15 – Кривые Каплана-Майера, характеризующие продолжительность безрецидивного периода у больных серозным раком яичников с разным уровнем экспрессии ERβ в опухоли (унифицированная когорта больных). *р – достоверность различий между показателями продолжительности безрецидивного периода при разных уровнях экспрессии ERβ в опухоли, рассчитанная методом log-rank (Mantel-Cox) test.

Таблица 12 – Характеристика кривых Каплана-Майера, представленных на рисунке 15

Уровень экспрессии ERβ	Медиана ПБП* (мес.)	Частота рецидивирования (%) на разные сроки наблюдения (мес.)			Hazard ratio** [95% CI 1,5 – 6,6]
		6	12	43	
Высокий	18	13,3	40,0	60,0	2,6
Низкий	8	37,5	81,3	81,3	

ПБП* – продолжительность безрецидивного периода, мес. Hazard ratio (низкий/высокий)** – соотношение рисков возврата заболевания в группе с низким уровнем экспрессии маркера относительно группы с высоким уровнем; в квадратный скобках указан 95% доверительный интервал.

К 43 мес. наблюдения медиана безрецидивной выживаемости составила 18 и 8 мес. в группе с высоким по сравнению с низким уровнем ER β в опухоли ($p < 0,04$). Отмечена меньшая частота рецидивирования болезни в группе с высоким уровнем экспрессии маркера – 60,0% vs 81,3%. Такая же закономерность выявлена и на ранних сроках наблюдения к 6 мес. – 13,3% vs 37,5%, а к 12 мес. – 40,0% vs 81,3%, соответственно.

Более того, соотношение рисков оказалось равным 2,6 (95% CI 1,5 – 6,6). Это означает, что в группе пациенток с высоким уровнем экспрессии ER β в опухоли риск возврата болезни более чем в два с половиной раза меньше, чем в группе с низкой экспрессией этого маркера.

Далее, перейдем к оценке предиктивной значимости интенсивности экспрессии ER α и ER β в опухолевых клетках для прогноза эффективности первой линии химиотерапии препаратами платины и таксанов на унифицированной когорте больных серозным раком яичников. Мы наблюдали схожую с уровнем экспрессии ER α картину.

Так, в случае с интенсивностью экспрессии ER α в опухоли, выявленные различия между группами сравнения не достигли статистической значимости (Рисунок 16, Таблица 13).

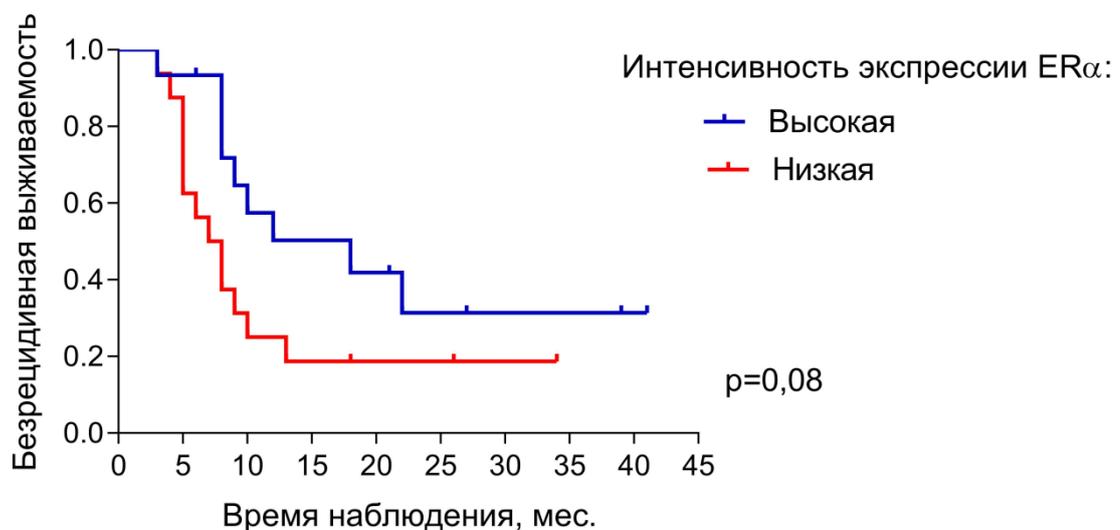


Рисунок 16 – Кривые Каплана-Майера, характеризующие продолжительность безрецидивного периода у больных серозным раком яичников с разной интенсивностью экспрессии ER α в опухоли (унифицированная когорта больных). * p – достоверность различий между показателями продолжительности безрецидивного периода при разных интенсивностях экспрессии ER α в опухоли, рассчитанная методом log-rank (Mantel-Cox) test.

Хотя медиана продолжительности безрецидивного периода в группе с высокой интенсивностью маркера, по сравнению с низкой, была в 2,4 раза выше – 18 и 7,5 мес., соответственно ($p=0,08$), а частота рецидивирования в полтора раза ниже – 60,0% vs 81,3%,

соответственно. Более того, равное 2,5 соотношение рисков возврата болезни, практически достигло статистической значимой значимости (95% CI 1,0 – 6,2).

Важно заметить, что проверка различий в продолжительности безрецидивного периода в группах с разной интенсивностью ER α методом Gehan-Breslow-Wilcoxon, в котором вес рецидива заболевания выше на начальных этапах наблюдения, статистически значимые различия были обнаружены ($p=0,03$). Более того, сильно отличается и частота рецидивирования в группах с разным уровнем интенсивности ER α в опухоли. Так, после 6 мес. наблюдения количество пациенток с рецидивом болезни в группе с высокой интенсивностью маркера в более чем в 6 раз меньше по сравнению с низкой интенсивностью – 6,7% vs 43,8%. Хотя после 12 мес. эта разница сократилась до 1,6 раза – 46,7% vs 75,0%, соответственно.

Таблица 13 – Характеристика кривых Каплана-Майера, представленных на рис. 16

Интенсивность экспрессии ER α	Медиана ПБП* (мес.)	Частота рецидивирования (%) на разные сроки наблюдения (мес.)			Hazard ratio**
		6	12	43	
Высокая	18	6,7	46,7	60,0	2,5
Низкая	7,5	43,8	75,0	81,3	[95% CI 1,0 – 6,2]

ПБП* – продолжительность безрецидивного периода, мес. Hazard ratio (низкая/высокая)** – соотношение рисков возврата заболевания в группе с низкой интенсивностью экспрессии маркера относительно группы с высокой интенсивностью; в квадратный скобках указан 95% доверительный интервал.

Перечисленные факты поддерживают наше предположение, что отсутствие статистической значимости описанных выше различий между группами с высоким и низким уровнем экспрессии ER α в опухоли может быть связано с малым размером выборки.

По интенсивности экспрессии ER β , как и в случае с ER α , выявленные различия между группами сравнения в унифицированной когорте пациенток также не достигли статистической значимости (Рисунок 17, Таблица 14). Медианы продолжительности безрецидивного периода в группах с высокой и низкой интенсивностью экспрессии ER β в опухоли составили 13 и 8 мес., соответственно ($p=0,08$), а количество рецидивов на 43 мес. наблюдения меньше в полтора раза – 56,3% vs 86,7%. Такое же соотношения показателя в эти группах сравнения после 12 мес. Соотношение рисков возврата болезни практически достигло статистической значимой разницы и составило 2,2 (95% CI 0,9 – 5,4).

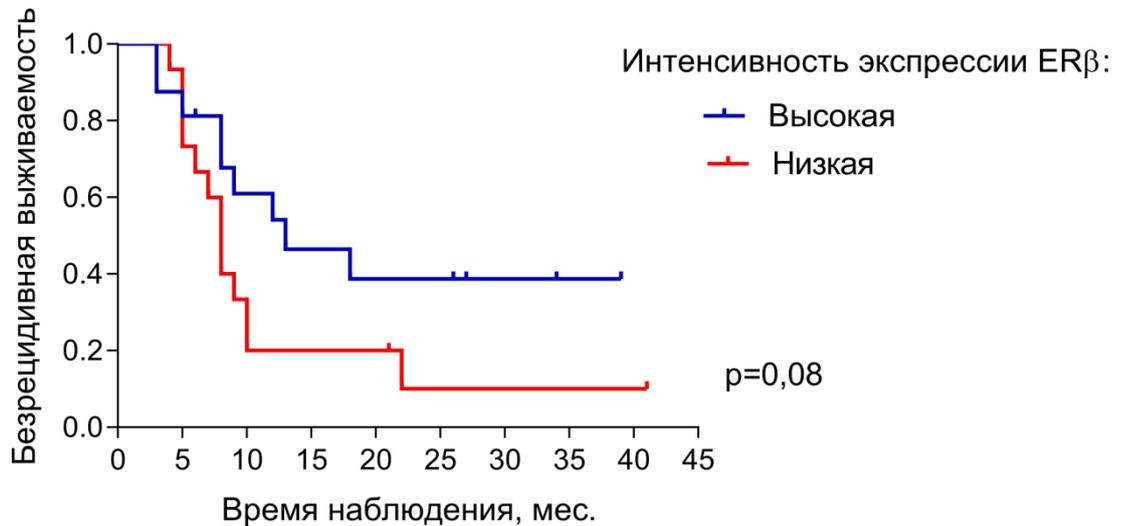


Рисунок 17 – Кривые Каплана-Майера, характеризующие продолжительность безрецидивного периода у больных серозным раком яичников с разной интенсивностью экспрессии ERβ в опухоли (унифицированная когорта больных). *p – достоверность различий между показателями продолжительности безрецидивного периода при разных интенсивностях экспрессии ERβ в опухоли, рассчитанная методом log-rank (Mantel-Cox) test.

Таблица 14 – Характеристика кривых Каплана-Майера, представленных на рис. 17

Интенсивность экспрессии ERβ	Медиана ПБП* (мес.)	Частота рецидивирования (%) на разные сроки наблюдения (мес.)			Hazard ratio** [95% CI 0,9 – 5,4]
		6	12	43	
Высокая	13	25,0	43,8	53,3	2,2
Низкая	8	26,7	73,3	86,7	

ПБП* – продолжительность безрецидивного периода, мес. Hazard ratio** (низкая/высокая) – соотношение рисков возврата заболевания в группе с низкой интенсивностью экспрессии маркера относительно группы с высокой интенсивностью; в квадратный скобках указан 95% доверительный интервал.

При этом, как и в случае с интенсивностью экспрессии ERα (Рисунок 16), наблюдается отчетливая тенденция к расхождению кривых продолжительности безрецидивной выживаемости. Так, несмотря на то, что частота рецидивирования после 6 мес. наблюдения в разных группах по интенсивности экспрессии ERβ была практически идентичной (25,0% vs 26,7%), после 12 мес. количество рецидивов в группе с высокой интенсивностью экспрессии маркера в опухоли по сравнению с низкой было меньше в 1,7 раза (43,8% vs 73,3%).

Таким образом, оценка клинической значимости показателей экспрессии ER α и ER β на унифицированной когорте больных (III стадия серозного рака яичников высокой степени злокачественности, неоптимальная циторедукция, 6 курсов стандартной химиотерапии препаратами платины и таксанов) показала, что уровень экспрессии ER β имеет предиктивную значимость в прогнозе эффективности химиотерапии препаратами платины и таксанов, причем высокий уровень экспрессии является благоприятным маркером.

Что касается высокого уровня экспрессии ER α , выявлена четкая тенденция к возможности прогнозирования более благоприятного течения болезни после завершения химиотерапии препаратами платины и таксанов. Аналогично, на уровне тенденции продемонстрирована предиктивная значимость интенсивности экспрессии как ER α , так и ER β . По нашему мнению, одной из причин отсутствия статистически значимых различий между группами сравнения может быть недостаточное количество пациенток в унифицированной по клиническим характеристикам группе, включенной в настоящее исследование.

В то же время, статистически значимая разница в продолжительности безрецидивного периода и риске возврата болезни даже между небольшими группами больных с разным уровнем экспрессии ER β указывает на высокую предиктивную ценность этого молекулярного маркера и необходимость его дальнейшего изучения, в частности, оценки его независимой предиктивной значимости.

3.5 Оценка клинической значимости показателей экспрессии ER α и ER β на общей когорте больных

Задачей этого раздела работы явилось проверка сформулированного выше представления о предиктивной значимости показателей экспрессии ER α и ER β в ткани рака яичников. Как и в предыдущем разделе, мы сравнили группы с низкой и высокой экспрессией ER α или ER β в опухоли, проведя деление по медиане показателя. Соответственно, при оценке предиктивной значимости уровня экспрессии маркеров в опухоли для ER α – это значения $<25\%$ и $\geq 25\%$, для ER β – $<44\%$ и $\geq 44\%$. При аналогичном исследовании интенсивности экспрессии маркеров в опухолевых клетках в группы сравнения с низкой и высокой интенсивностью включали опухоли с медианой показателя $<1,7$ и $\geq 1,7$ для ER α и $<2,6$ и $\geq 2,6$ усл. ед. – для ER β . Ниже представлены полученные результаты.

Результаты оценки предиктивной значимости уровня экспрессии ER α приведены на Рисунке 18 и в Таблице 15. Видно, что у пациенток с низким уровнем экспрессии ER α продолжительность безрецидивного периода меньше, по сравнению с группой с высоким уровнем данного маркера.

Так, к 43 мес. наблюдения в группах с высоким по сравнению с низким уровнем

экспрессии ER α в исследовании продолжили участие в 1,6 раза больше пациенток – 20 (52,6%) и 12 (33,3%), соответственно ($p < 0,04$). Более того, в группах с разным уровнем экспрессии ER α различалась частота возврата болезни на все сроки наблюдения (Таблица 15). Так, количество рецидивов в группе пациенток с высоким уровнем экспрессии ER α на 6 мес. наблюдения было в 1,5 раза ниже, чем в группе с низким уровнем (18,4% vs 27,8%), к 12 мес. – в 1,7 раза (34,9% vs 59,8%), а к 43 мес. – 47,4% vs 66,7%, т.е. в 1,4 раза ниже.

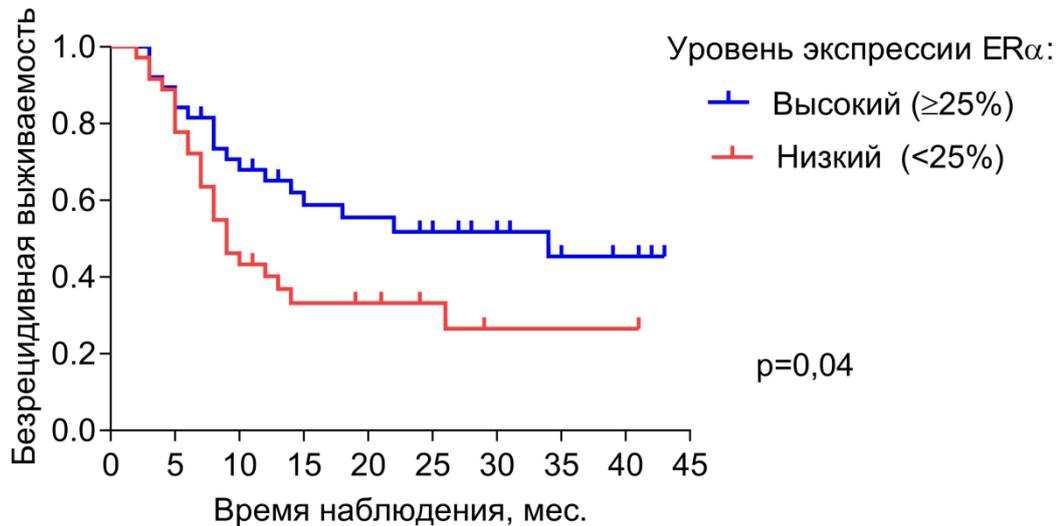


Рисунок 18 – Кривые Каплана-Майера, характеризующие продолжительность безрецидивного периода у больных серозным раком яичников с разным уровнем экспрессии ER α в опухоли. * p – достоверность различий между показателями продолжительности безрецидивного периода при разных уровнях экспрессии ER α в опухоли, рассчитанная методом log-rank (Mantel-Cox) test.

Таблица 15 – Характеристика кривых Каплана-Майера, представленных на рис. 18

Уровень экспрессии ER α	Медиана ПБП* (мес.)	Частота рецидивирования (%) на разные сроки наблюдения (мес.)			Hazard ratio** [95% CI 1,0 – 3,7]
		6	12	43	
Высокий	34	18,4	34,9	47,4	1,9 [95% CI 1,0 – 3,7]
Низкий	9	27,8	59,8	66,7	

ПБП* – продолжительность безрецидивного периода, мес. Hazard ratio (низкий/высокий)** – соотношение рисков возврата заболевания в группе с низким уровнем экспрессии маркера относительно группы с высоким уровнем; в квадратный скобках указан 95% доверительный интервал.

Медиана продолжительности безрецидивного течения болезни в группах с низким и высоким уровнем экспрессии ER α была почти в 4 раза выше и составила 34 и 9 мес., соответственно. При этом соотношение рисков возврата болезни (hazard ratio) в группе с высокой в сравнении с низкой экспрессией ER α в опухоли оказалось почти в 2 раза выше – 1,9 (95% CI 1,0 – 3,7). Как видно, все выявленные различия статистически значимы.

Теперь, интересно сравнить эти данные с результатами, полученными для интенсивности экспрессии ER α (Рисунок 19, Таблица 16). Наблюдалась схожая картина. Так, высокая интенсивность экспрессии ER α является благоприятным предиктивным маркёром – у пациенток в данной группе отмечена бóльшая продолжительность безрецидивного периода, чем в группе с низкой интенсивностью экспрессии ER α – 25 vs 9 мес. (p=0.02). При этом, соотношение рисков возврата болезни было таким же, как в случае с уровнем экспрессии – 1,9 (95% CI 1,0 – 3,5).

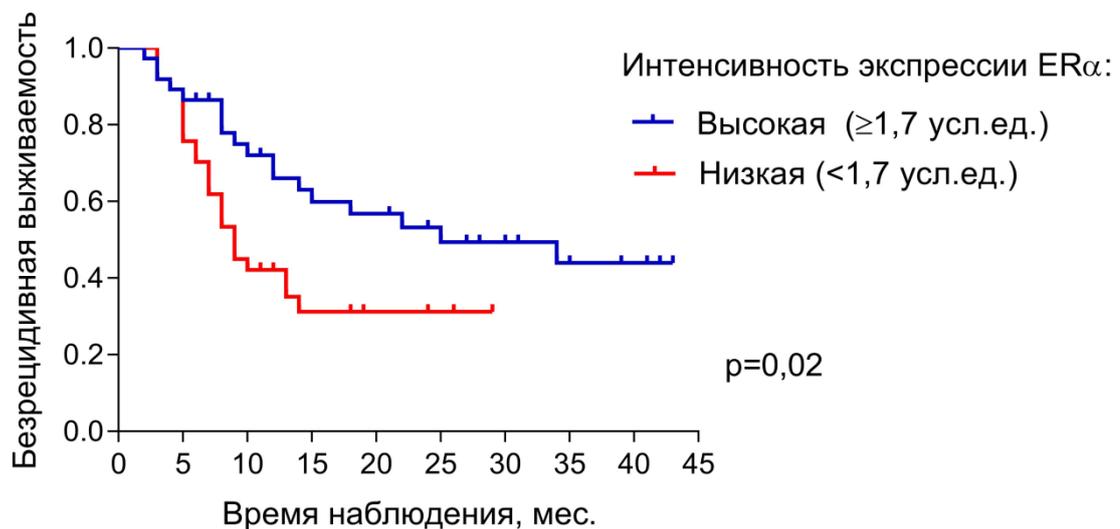


Рисунок 19 – Кривые Каплана-Майера, характеризующие продолжительность безрецидивного периода у больных серозным раком яичников с разной интенсивностью экспрессии ER α в опухоли. *p – достоверность различий между показателями продолжительности безрецидивного периода при разных уровнях экспрессии ER α в опухоли, рассчитанная методом log-rank (Mantel-Cox) test.

Более того, на разных сроках наблюдения между группами отмечены различия и в частоте возврата болезни (Таблица 16). К 6 мес. наблюдения в группе с высокой интенсивностью экспрессии маркёра в опухоли по сравнению с низкой экспрессией ER α частота рецидивирования была в 2,2 раза ниже – 13,6% vs 29,8%; к 12 мес. эта разница составила 1,7 раза (33,9% vs 57,8%).

Таким образом, и для интенсивности, и для уровня экспрессии ER α удалось показать, статистически значимую разницу в продолжительности безрецидивного периода в группах с низким и высоким уровнем этих показателей экспрессии маркёра.

Таблица 16 – Характеристика кривых Каплана-Майера, представленных на рис. 19

Интенсивность экспрессии ER α	Медиана ПБП* (мес.)	Частота рецидивирования (%) на разные сроки наблюдения (мес.)			Hazard ratio**
		6	12	43	
Высокая	25	13,6	33,9	48,6	1,9
Низкая	9	29,8	57,8	64,9	[95% CI 1,0 – 3,5]

ПБП* – продолжительность безрецидивного периода, мес. Hazard ratio (низкая/высокая)** – соотношение рисков возврата заболевания в группе с низкой интенсивностью экспрессии маркёра относительно группы с высокой интенсивностью; в квадратный скобках указан 95% доверительный интервал.

Перейдем к анализу зависимости продолжительности безрецидивного периода течения болезни у пациенток с разным уровнем экспрессии ER β (Рисунок 20, Таблица 17).

Медиана продолжительности безрецидивного периода у пациенток в группе с высоким уровнем экспрессии ER β в опухоли была почти в 4 раза выше, по сравнению с низким уровнем экспрессии маркёра – 34 vs 9 мес., соответственно ($p=0,02$). Соотношение рисков возврата болезни оказалось равным 2,2, то есть в группе пациенток с низким уровнем экспрессии ER β в опухоли риск возврата болезни более чем в два раза выше, чем в группе с высоким уровнем данного маркёра. Выявленная разница между группами сравнения статистически значима (95% CI 1,2 – 4,2).

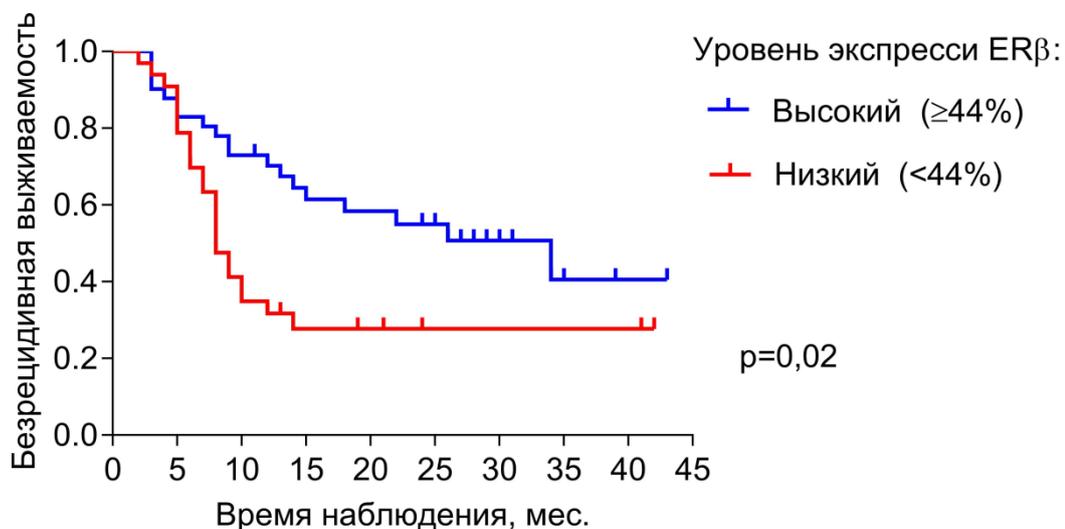


Рисунок 20 – Кривые Каплана-Майера, характеризующие продолжительность

безрецидивного периода у больных серозным раком яичников с разным уровнем экспрессии ER β в опухоли. *p – достоверность различий между показателями продолжительности безрецидивного периода при разных уровнях экспрессии ER α в опухоли, рассчитанная методом log-rank (Mantel-Cox) test

Таблица 17 – Характеристика кривых Каплана-Майера, представленных на рис. 20

Уровень экспрессии ER β	Медиана ПБП* (мес.)	Частота рецидивирования (%) на разные сроки наблюдения (мес.)			Hazard ratio** [95% CI 1,2 – 4,2]
		6	12	43	
Высокий	34	17,0	34,9	46,3	2,2
Низкий	9	30,3	68,4	69,7	

ПБП* – продолжительность безрецидивного периода, мес. Hazard ratio (низкий/высокий)** – соотношение рисков возврата заболевания в группе с низким уровнем экспрессии маркера относительно группы с высоким уровнем; в квадратный скобках указан 95% доверительный интервал.

Что касается частоты рецидивирования в группах с разным уровнем экспрессии ER β , то и в этом случае на разных сроках наблюдения между группами сравнения выявлена разница (Таблица 17). Так, к 6 и 12 мес. наблюдения в группе с высоким уровнем экспрессии маркера в опухоли по сравнению с низкой экспрессией ER β количество рецидивов заболевания было почти в два раза меньше, соответственно – 17,0% vs 30,3% и 34,9% vs 68,4%. К концу наблюдения (43 мес.) разница между группами сохранилась и составила 1,5 раз – 46,3% vs 69,7%.

Далее, мы проанализировали данные, связанные с интенсивностью экспрессии ER β и продолжительностью безрецидивного периода болезни (Рисунок 21, Таблица 18). Показано, что медиана продолжительности безрецидивного течения болезни в 2,8 раза превышает показатель в группе с высокой по сравнению с низкой интенсивностью экспрессии маркера в опухоли – 25 и 9 мес. (p=0,05). При этом соотношение рисков возврата болезни составило 1,9, то есть риск развития рецидива заболевания в течение срока наблюдения в группе с высокой интенсивностью экспрессии ER β почти в 2 раза ниже, чем в группе с низкой интенсивностью экспрессии маркера в опухоли. Выявленная разница между группами сравнения статистически значима (95% CI 1,0 – 3,5).

Интересно отметить, что частота рецидивирования после 6 мес. наблюдения, как и в случае с исследованием интенсивности экспрессии ER β в унифицированной группе больных (Рисунок 17, Таблица 14), была практически идентичной в группах сравнения в общей когорте

пациенток, включенных в исследование (21,5% vs 25,0%). Однако к 12 мес. отмечена разница в количестве рецидивов болезни в группах с высокой и низкой интенсивностью экспрессии ERβ в 1,8 раза – 54,% vs 80,0%. К концу наблюдения (43 мес.) разница в частоте рецидивирования в группе с высокой и низкой интенсивностью экспрессии ERβ в опухоли составила 1,5 раза – 54,0% и 80,0%.

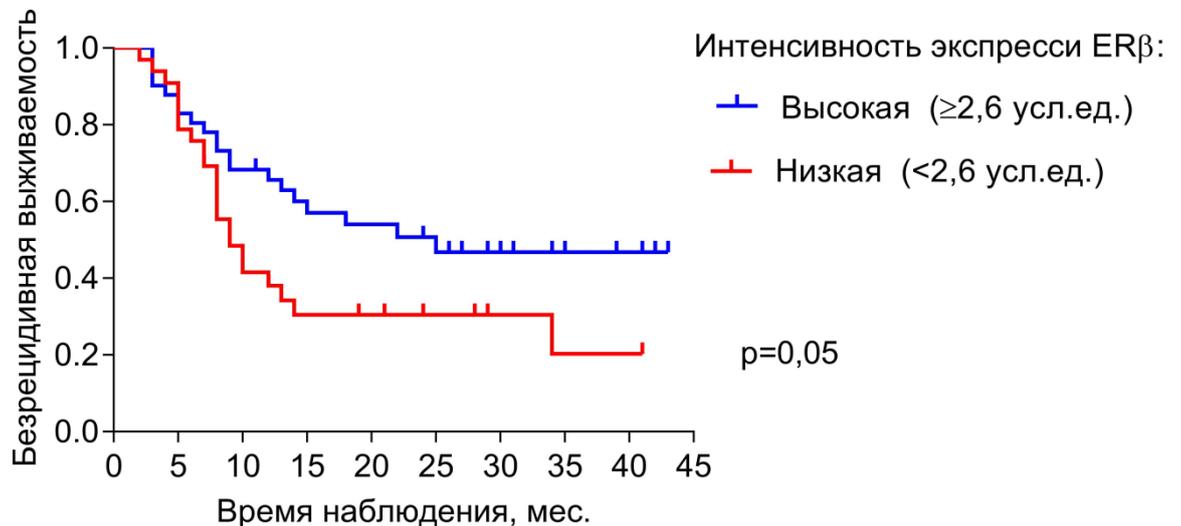


Рисунок 21 – Кривые Каплана-Майера, характеризующие продолжительность безрецидивного периода у больных серозным раком яичников с разной интенсивностью экспрессии ERβ в опухоли. *р – достоверность различий между показателями продолжительности безрецидивного периода при разных уровнях экспрессии ERα в опухоли, рассчитанная методом log-rank (Mantel-Cox) test.

Таблица 18 – Характеристика кривых Каплана-Майера, представленных на рис. 21

Интенсивность экспрессии ERβ	Медиана ПБП* (мес.)	Частота рецидивирования (%) на разные сроки наблюдения (мес.)			Hazard ratio** [95% CI 1,0 – 3,5]
		6	12	43	
Высокая	25	21,5	34,3	54,0	1,9
Низкая	9	25,0	62,0	80,0	

ПБП* – продолжительность безрецидивного периода, мес. Hazard ratio (низкая/высокая)** – соотношение рисков возврата заболевания в группе с низкой интенсивностью экспрессии маркера относительно группы с высокой интенсивностью; в квадратный скобках указан 95% доверительный интервал.

Итак, однофакторный статистический анализ полученных результатов с использованием

метода Каплана-Майера на общей когорте больных раком яичников, включенных в исследование, подтвердил заключение о клинической значимости количественных показателей уровня и интенсивности экспрессии ER β , сделанное по результатам исследования унифицированной когорты пациенток. При этом на общей когорте пациенток удалось продемонстрировать статистически значимую клиническую ценность и количественных показателей экспрессии в опухоли ER α . В целом, показано, что высокий уровень и интенсивность экспрессии в ткани рака яичников эстрогеновых рецепторов разных типов – ER α и ER β , являются благоприятным предиктивным маркером эффективности первой линии химиотерапии рака яичников препаратами платины и таксанов.

3.6 ROC-анализ для анализа значимости ER α и ER β в прогнозе выявления рецидива

И еще один метод статистического анализа показателей уровня экспрессии в опухоли ER α и ER β был применен для оценки предиктивной значимости этих маркеров опухоли – ROC-анализ. В отличие от метода Каплана-Майера, с помощью которого можно установить клиническую значимость уровня экспрессии маркера для прогноза продолжительности безрецидивного периода, ROC-анализ позволяет выявить информативность маркера в предсказании самого факта возврата болезни за определенный срок наблюдения. В нашем случае срок наблюдения составил 12 мес., так как больные, пережившие этот период после завершения химиотерапии без рецидива болезни, считаются чувствительными к препаратам платины и таксанов.

На Рисунке 22 представлена ROC-кривая для уровня экспрессии ER α . Видно, что фиолетовая (верхняя) кривая, характеризующая качество данной модели (предсказательная способность маркера), проходит близко к зеленой линии – к модели отсутствия прогностической силы. Сравнение их площадей под кривой (AUC) – 0,663 vs 0,5, соответственно ($p=0,02$), говорит, что уровень экспрессии ER α обладает средней чувствительностью (Таблица 5) в прогнозе возникновения рецидива у больных раком яичников в течение 12 мес. после завершения химиотерапии препаратами платины и таксанов.

Оптимальным пороговым значением уровня экспрессии ER α (Приложение 1), при котором достаточно высокая чувствительность (доля истинно положительных результатов), но при этом низкая «1-специфичность» (доля ложно положительных результатов), оказался уровень экспрессии ER α равный 25%, при котором чувствительность – 0,732, «1-специфичность» – 0,406.

Заметим, что именно данный порог (25%) деления был выбран, исходя из медианы уровня экспрессии, именно это деление пациенток с высоким и низким уровнем экспрессии ER α использовано для сравнения показателей продолжительности безрецидивной жизни

методом Каплана-Майера, и именно при этом пороге деления показана предиктивная значимость уровня экспрессии ER α как маркёра эффективности химиотерапии препаратами платины и таксанов у пациенток с серозным раком яичников.

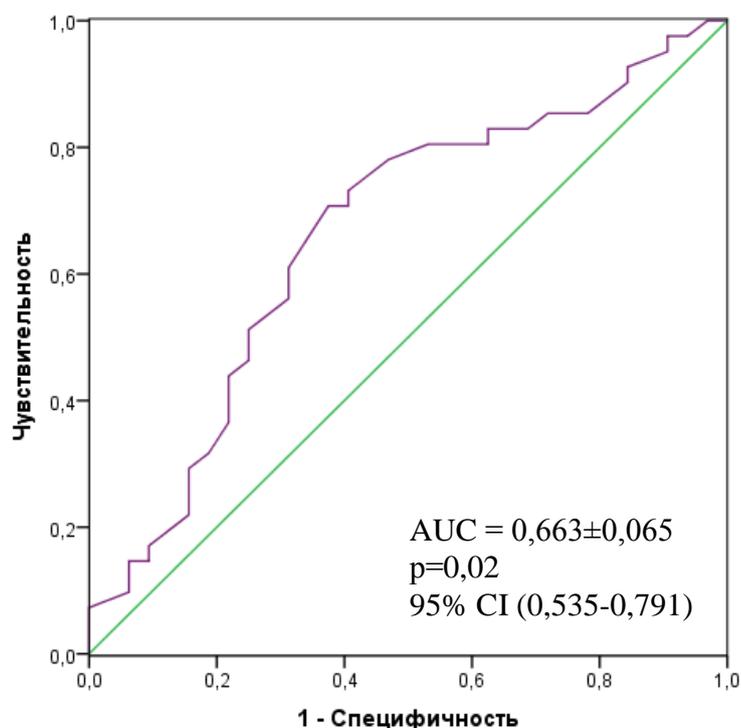


Рисунок 22 – ROC-кривая. Использование уровня экспрессии ER α в опухоли рака яичников как предиктора возникновения рецидива у пациенток после первой линии химиотерапии. Фиолетовая кривая ограничивает площадь под кривой (AUC), показывая прогностическую силу модели; зеленая линия характеризует гипотетическую модель с отсутствием прогностической силы: AUC=0,5.

Теперь рассмотрим результаты оценки экспрессии ER β как предиктора возникновения рецидива (Рисунок 23). Исходя из Таблицы 5, данная модель обладает уже хорошей предиктивной силой, так как площадь под кривой равна 0,706, что статистически значимо отличается от гипотетической модели ($p < 0,005$). При выборе порога уровня экспрессии ER β (Приложение 2) оптимальным пороговым значением уровня экспрессии ER β явился показатель 44%, при этом ниже данного уровня – повышенный риск возникновения рецидива, а равное или выше 44% — сниженный риск. Этот порог, как и в случае с ER α , совпадает с выбранным ранее делением группы на высокий и низкий уровень маркёра по медиане уровня экспрессии ER β , равной 44%.

Для данного порога характерны следующие параметры (Приложение 2). Чувствительность составляет 0,743, то есть данным методом рецидив рака яичников в течение

первых 12 мес. правил составляет 0,367, то есть в 36,7% случаев предсказание возврата болезни может быть ложноположительным.

Таким образом, в данной главе доказана правомерность использования медианы уровня экспрессии как ER α , так и ER β в качестве порогового значения деления на группы с высоким и низким уровнем экспрессии маркёров. Поскольку, согласно ROC-анализу, именно значения 25% и 44% для ER α и ER β , соответственно, обладают лучшими показателями доли истинно положительных и ложно положительных результатов в прогнозе эффективности химиотерапии препаратами платины и таксанов у пациенток с серозным раком яичников.

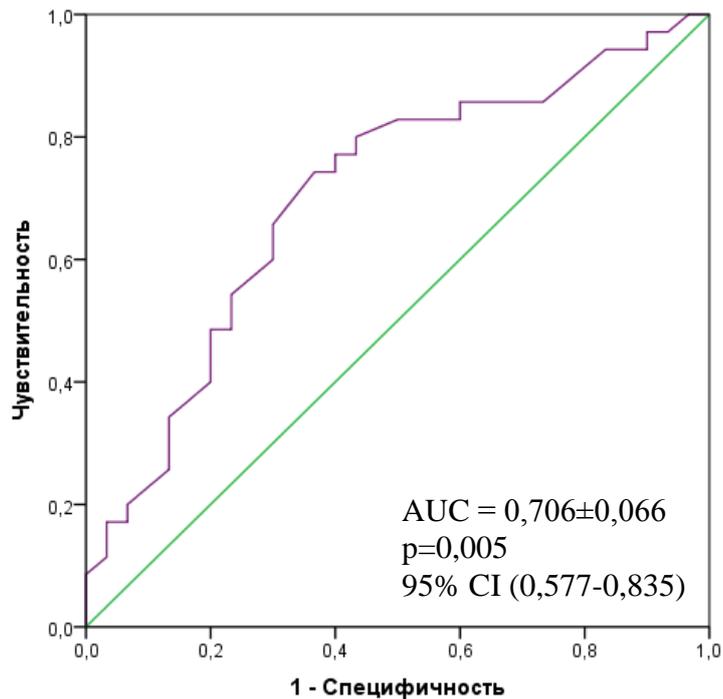


Рисунок 23 – ROC-кривая. Использование уровня экспрессии ER β в ткани рака яичников как предиктора рецидива болезни у пациенток после первой линии химиотерапии. Фиолетовая кривая ограничивает площадь под кривой (AUC), показывая прогностическую силу модели; зеленая линия характеризует гипотетическую модель с отсутствием прогностической силы – AUC=0,5.

3.7 Оценка предиктивной значимости коэкспрессии ER α и ER β в опухоли в прогнозе эффективности препаратов платины и таксанов

Одной из основных задач трансляционных молекулярных исследований является оценка клинической ценности выявленных опухолевых маркёров. В нашей работе – это оценка предиктивной значимости экспрессии в опухоли в качестве предикторов эффекта первой стандартной линии химиотерапии рака яичников препаратами платины и таксанов ER α и ER β .

Данный раздел работы посвящен ответу на вопрос: экспрессия одного типа рецепторов или коэкспрессия как ER α и ER β являются наиболее надёжным показателем ответа на проведенное лечение?

Для этого, исходя из количественных показателей коэкспрессии ER α и ER β в ткани рака яичников, все пациентки, включенные в исследование, были разделены на четыре группы. Первая – высокая экспрессия обоих маркёров; вторая – сочетание высокого и низкого уровня ER α и ER β , и четвертая группа – низкая экспрессия обоих маркёров. Напомним, что для деления на группы с высокой и низкой экспрессией маркёра использована медиана уровня экспрессии маркёра в опухоли: для ER α – 25%, для ER β – 44%.

Как и ожидалось (Рисунок 24), лучшая безрецидивная выживаемость после завершения первой линии химиотерапии препаратами платины и таксанов отмечена при высокой экспрессии обоих маркёров в опухоли. В этой группе медиана продолжительности безрецидивного периода была в 4 раза выше ($p=0,007$), чем при низкой экспрессии обоих маркёров и составила 34 и 8 мес., соответственно (Таблица 19).

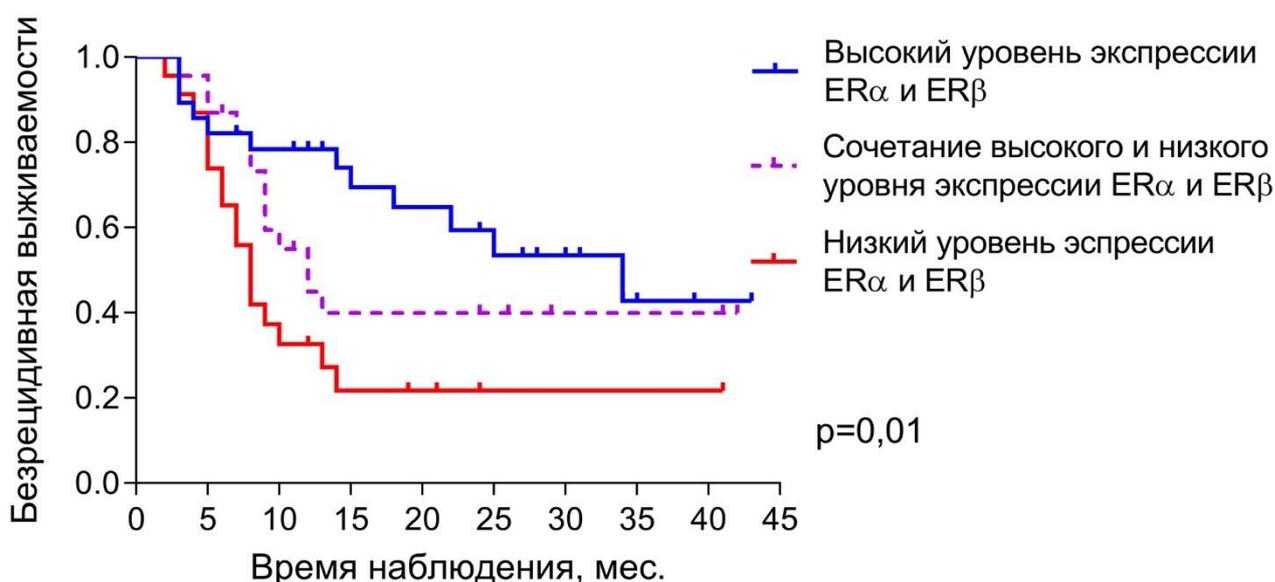


Рисунок 24 – Кривые Каплана-Майера, характеризующие продолжительность безрецидивного периода больных раком яичников при анализе коэкспрессии ER α и ER β в опухоли. * p – достоверность различий между показателями продолжительности безрецидивного периода при коэкспрессии ER α и ER β , рассчитанная методом log-rank (Mantel-Cox) test.

Данные представлены на Рисунке 24 и в Таблице 19 показывают также, что медиана продолжительности безрецидивного периода в группе с низким уровнем экспрессии хотя бы одного из маркёров была почти в 3 раза меньше по сравнению с высоким уровнем экспрессии

обоих маркёров (12 мес. vs 34 мес.). При сравнении медианы продолжительности безрецидивного периода в этой группе с показателем в группе с низким уровнем экспрессии в опухоли как ER α , так и ER β разница была составила более 4 раз: 34 мес. vs 8 мес.

Таблица 19 – Характеристика кривых Каплана-Майера, представленных на рис. 24

ER α и ER β	Медиана ПБП*, мес.	Частота рецидивирования (%) на 43 мес. наблюдения
Высокий уровень ER α и ER β	34	42,9
Сочетание высокого и низкого уровня экспрессии ER α и ER β	12	56,5
Низкий уровень ER α и ER β	8	73,9

ПБП* – продолжительность безрецидивного периода.

Полученные данные, указывают на высокую клинической значимость одновременной оценки экспрессии двух маркёров в прогнозе эффективности первой линии стандартной химиотерапии препаратами платины и таксанов. Это наблюдение подтверждено при сравнении соотношений рисков развития рецидива болезни в группах с высоким и низким уровнем: 1 – ER α ; 2 – ER β ; 3 – ER α +ER β .

Результаты представлены на Рисунке 25. Красный и зеленый столбцы, соответственно, – соотношение рисков рецидива болезни (hazard ratio) у пациенток с низким vs с высоким уровнем экспрессии ER α или ER β в опухоли. Фиолетовый столбец (ER α +ER β) – соотношение рисков рецидива болезни у больных с низким уровнем экспрессии и ER α , и ER β относительно пациенток с высоким уровнем коэкспрессии обоих маркёров.

Видно, что риск развития рецидива болезни у пациенток с низким уровнем экспрессии ER α или ER β в опухоли относительно высокого уровня одного из маркёров одинаков и соотношением рисков возврата болезни в этих группах составило 1,9 и 2,0. В то же время риск рецидива болезни у пациенток с низким уровнем коэкспрессии ER α +ER β в 3,2 раза превысил показатель в группе с высоким уровнем двух маркёров. Важно, что исходя из 95% доверительного интервала для соотношений рисков рецидива болезни для всех изученных групп сравнения, различия статически значимы.

Таким образом, соотношение рисков рецидива в группе с коэкспрессией ER α +ER β более чем в полтора раза превышает данный показатель в группах с оценкой только одного из эстрогеновых рецепторов –3,2 vs 1,9-2,0. Это говорит о том, что количественная оценка в опухоли двух маркёров позволяет точнее предсказать возникновение рецидива заболевания.

Этот главный вывод позволяет рекомендовать введение в клиническую практику оценку обоих рецепторов в ткани рака яичников, так как это позволит более точно

эффективность первой линии химиотерапии. Конкретно, при выявлении в опухоли низкого уровня экспрессии как ER α , так и ER β следует иметь ввиду возможность изначальной резистентности опухоли к препаратами платины и таксанов.

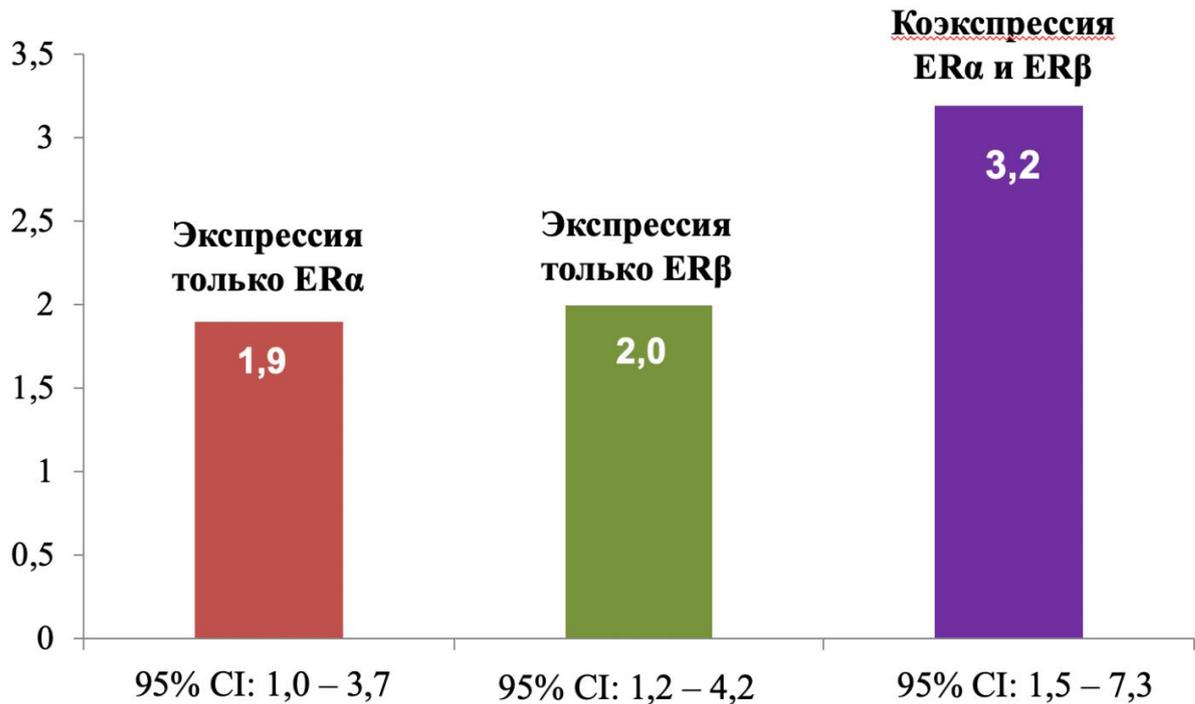


Рисунок 25 – Соотношение рисков (hazard ratio) рецидива заболевания в разных группах экспрессии эстрогеновых рецепторов. По оси ординат: hazard ratio – соотношение рисков возврата заболевания в группе с низким уровнем экспрессии маркера относительно группы с высоким уровнем. По оси абсцисс: красные и зеленые столбцы – одиночная экспрессия эстрогеновых рецепторов, фиолетовый – коэкспрессия ER α +ER β . В последнюю группу включены пациентки с высоким или низким уровнем экспрессии в опухоли двух маркеров. Под столбцами указан 95% доверительный интервал (95% CI) для hazard ratio

3.8 Анализ независимости предиктивной значимости ER α и ER β

Заключительным этапом нашей работы явилась оценка независимости предиктивной значимости уровня и интенсивности экспрессии ER α и ER β при сравнении с клиническими характеристиками агрессивности течения серозного рака яичника – стадия заболевания, степень злокачественности опухоли и объем циторедукции. Подобную оценку проводят, используя различные методы многофакторного анализа. В частности, в данном случае адекватным является использование метода Cox–регрессии, который позволяет цензурировать зависимую переменную (в нашем случае – продолжительность безрецидивного периода болезни после завершения первой линии химиотерапии препаратами платины и таксанов).

Перед проведением многофакторного анализа в группе пациенток, включенных в

настоящее исследование, была оценена предиктивная значимость параметров (стадия заболевания, степень злокачественности опухоли и объем циторедукции) в однофакторном анализе при построении кривых Каплана-Майера (Рисунки 26, 27, 28).

Данные, представленные на графиках, характеризующих продолжительность безрецидивного периода течения болезни в зависимости от стадии заболевания (Рисунок 26, Таблица 20) и объема циторедукции (Рисунок 27, Таблица 21), подтвердили статистически значимость предиктивной ценности этих клинических показателей.

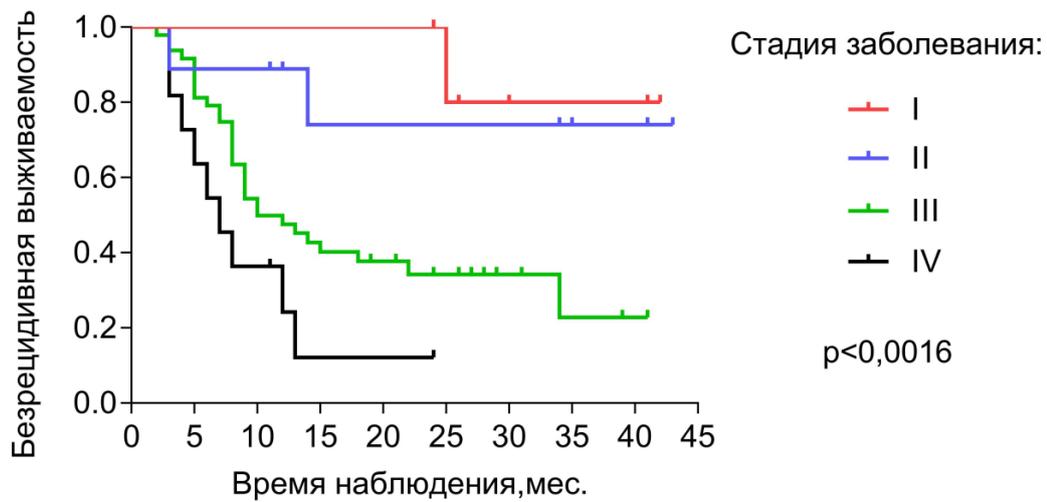


Рисунок 26 – Кривые Каплана-Майера, характеризующие продолжительность безрецидивного периода у больных раком яичников с разной стадией заболевания. * p – достоверность различий между показателями продолжительности безрецидивного периода на разных уровнях экспрессии ER β , рассчитанная методом log-rank (Mantel-Cox) test.

Таблица 20 – Характеристика кривых Каплана-Майера, представленных на рис. 26

Стадия заболевания	Медиана ПБП* (мес.)	Частота рецидивирования (%) на 43 мес. наблюдения
I	н/д	1 из 6 (16,7%)
II	н/д	2 из 9 (22,2%)
III	10	30 из 48 (62,5%)
IV	7	9 из 11 (81,8%)

ПБП* – продолжительность безрецидивного периода, мес.

Безрецидивная выживаемость у пациенток с I и II стадией была выше, чем у пациенток с III и IV стадией болезни (Рисунок 26). Медиана продолжительности безрецидивного периода при I и II стадиях болезни не достигнута в течение 43 мес. наблюдения, в то время как при III и

IV стадии болезни данный показатель составил 10 и 8 мес. соответственно, то есть в 4-5 раз выше. (Таблица 20). Более того, частота рецидивирования к концу наблюдения (43 мес.) значительно отличалась между пациентками с разными стадиями заболевания: 16,7% и 22,2% при I и II vs 62,5% и 80,9% при III и IV стадиях заболевания.

Результаты оценки влияния объема циторедукции на продолжительность безрецидивного периода у пациенток с серозном раком яичников представлены на Рисунке 27 и в Таблице 21. Видно, что медиана продолжительности безрецидивного периода в группе с оптимальной циторедукцией не была достигнута к концу срока наблюдения (43 мес.), в то время как у пациенток с неоптимальной циторедукцией данный показатель составил только 9 мес. ($p=0,0006$).

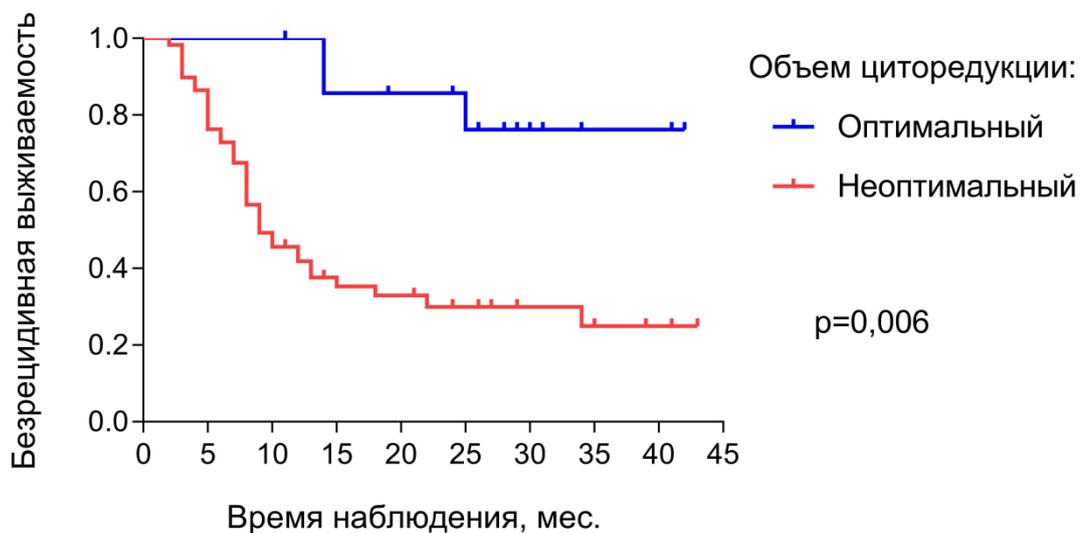


Рисунок 27 – Кривые Каплана-Майера, характеризующие продолжительность безрецидивного периода у больных раком яичников с разным объемом циторедукции. * p – достоверность различий между показателями продолжительности безрецидивного периода на разных уровнях экспрессии ER β , рассчитанная методом log-rank (Mantel-Cox) test

Таблица 21 – Характеристика кривых Каплана-Майера, представленных на рис. 29

Объем циторедукции	Медиана ПБП* (мес.)	Частота рецидивирования (%) на 43 мес. наблюдения	Hazard ratio**
Оптимальный	не достигнута	20,0	3,3 [95% CI 1,6 – 6,6]
Неоптимальный	9	66,1	

ПБП* – продолжительность безрецидивного периода, мес. Hazard ratio** – соотношение рисков возврата заболевания в группе с неоптимальным относительно оптимального объема; в квадратных скобках указан 95% доверительный интервал.

Более того, риск возврата болезни в группе с оптимальным хирургическим вмешательством был более чем в 3 раза ниже по сравнению с неоптимальной циторедукцией (HR=3,3; 95% CI 1,6–6,6). Что касается разницы в частоте рецидивирования, то на 43 мес. наблюдения она различалась в 3,3 раза – 20,0% vs 66,1%, соответственно, при оптимальной и неоптимальной циторедукции.

При сравнении групп пациенток с разной степенью злокачественности опухоли статистически значимых различий обнаружено не было (Рисунок 28, Таблица 22). Однако на рисунке 30 отчетливо прослеживается тенденция: при высокой степени злокачественности медиана продолжительности безрецидивного периода составила 13 мес., а при низкой степени – медиана не достигнута в течение всего срока наблюдения (43 мес.).

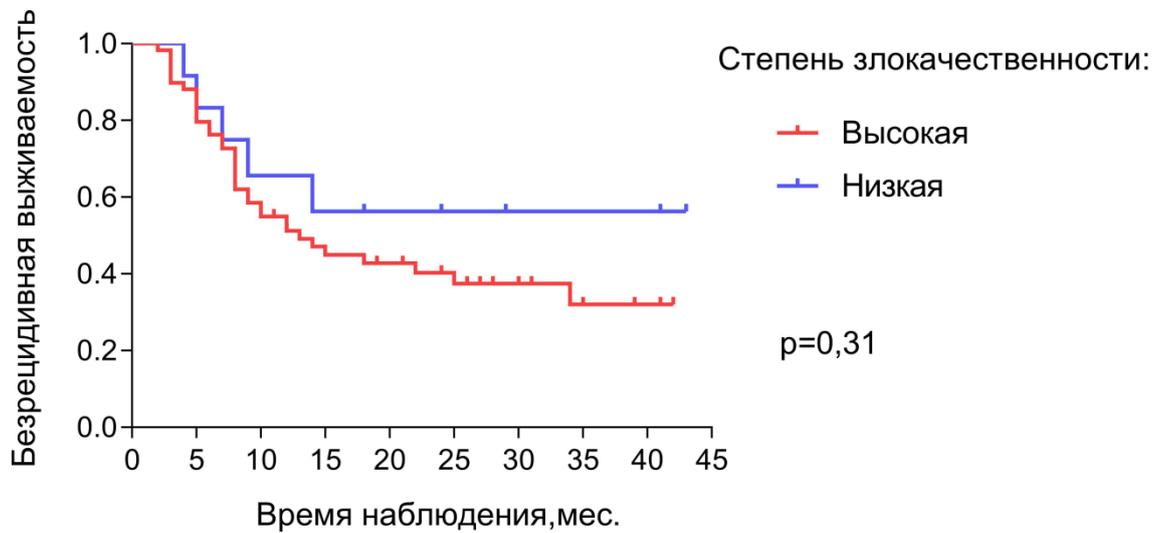


Рисунок 28 – Кривые Каплана-Майера, характеризующие продолжительность безрецидивного периода у больных раком яичников с разной степенью злокачественности опухоли. *p – достоверность различий между показателями продолжительности безрецидивного периода на разных уровнях экспрессии ERβ, рассчитанная методом log-rank (Mantel-Cox) test

Таблица 22 – Характеристика кривых Каплана-Майера, представленных на рис. 30

Степень злокачественности	Медиана ПБП* (мес.)	Количество рецидивов	Hazard ratio**
Высокая	13	35 из 59 (59,3%)	1,5 [95% CI 0,7 – 3,4]
Низкая	н/д	5 из 12 (41,7%)	

ПБП* – продолжительность безрецидивного периода, мес. Hazard ratio (высокая/низкая)** – соотношение рисков возврата заболевания в группе с высокой степенью

злокачественности серозного рака яичников относительно группы с низкой степенью; в квадратных скобках указан 95% доверительный интервал.

Более того, при сравнении групп пациенток с низкой и высокой степенью злокачественности опухоли частота рецидивирования оказалась почти 1,5 меньше в первой по сравнению со второй группой – 41,7% vs 59,3%, соответственно. Возможной причиной отсутствия статистической значимости выявленных отличий между разными клинически значимыми показателями агрессивности течения болезни в этих группах сравнения явилось недостаточное количество больных в группе с низкой степенью злокачественности серозного рака яичников и/или субъективизм оценки степени дифференцировки опухоли при лабораторной диагностике. Поэтому многофакторный анализ проведен как с включением, так и без включения в ряд оценочных характеристик степени злокачественности опухоли

Таблица 23 – Многофакторный анализ методом Cox-регрессии независимой предиктивной значимости уровня экспрессии ER α в ткани рака яичников

Параметры	HR [95% CI]*	p**
Стадия заболевания	1,9 [1,1; 3,4]	0,03
Степень циторедукции	3,3 [0,9; 11,5]	0,06
Уровень экспрессии ER α	1,6 [0,8; 2,9]	0,18
Степень злокачественности	1,2[0,5; 3,2]	0,7
Параметры	HR [95% CI]*	p**
Стадия заболевания	1,8 [1,0; 3,2]	0,03
Степень циторедукции	3,4 [0,99; 12,0]	0,06
Уровень экспрессии ER α	1,6 [0,8; 3,0]	0,15

Hazard ratio* – соотношение рисков возврата заболевания; в квадратный скобках указан 95% доверительный; p** – достоверность различий между показателями продолжительности безрецидивного периода, рассчитанная методом Cox-регрессии.

Для оценки независимости предиктивной значимости количественных показателей уровня экспрессии в ткани рака яичников ER α и ER β проведён многофакторный статистический анализ с использованием метода Cox-регрессии.

В Таблице 23 представлены результаты оценки независимой предиктивной значимости уровня экспрессии ER α . Из полученных данных видно, что независимая предиктивная значимость выявлена для одного параметра – стадии заболевания, причем как с включением, так и без включения в ряд оценочных характеристик степени злокачественности опухоли (в обоих случаях p=0,03). То есть независимой предиктивной значимости для уровня экспрессии

ER α выявить не удалось ($p=0,18$ и $p=0,15$).

Перейдем к описанию результатов многофакторного анализа для оценки независимости предиктивной значимости интенсивности экспрессии ER α (Таблица 24). Как и в случае с уровнем экспрессии ER α , удалось выявить независимую предиктивную значимость только для стадии заболевания ($p<0,05$). Обнаружить независимую предиктивную значимости интенсивности экспрессии ER α не удалось ($p>0,05$).

Таблица 24 – Многофакторный анализ методом Cox-регрессии независимой предиктивной значимости интенсивности экспрессии ER α в ткани рака яичников

Параметры	HR [95% CI]*	p**
Стадия заболевания	1,8 [1,1; 3,1]	0,04
Степень циторедукции	3,3 [0,9; 11,5]	0,06
Интенсивность экспрессии ER α	1,6 [0,8; 2,9]	0,12
Степень злокачественности	1,2 [0,5; 3,2]	0,7
Параметры	HR [95% CI]*	p**
Стадия заболевания	1,8 [1,0; 3,2]	0,04
Степень циторедукции	3,3 [0,98; 11,8]	0,05
Интенсивность экспрессии ER α	1,5 [0,8; 3,0]	0,11

Hazard ratio* – соотношение рисков возврата заболевания; в квадратный скобках указан 95% доверительный; p** – достоверность различий между показателями продолжительности безрецидивного периода, рассчитанная методом Cox-регрессии.

Что касается экспрессии ER β , результаты представлены в Таблицах 25 и 26. В Таблице 25 представлены результаты Cox-регрессии для оценки независимой предиктивной значимости уровня экспрессии ER β . Из полученных данных видно, что независимая предиктивная значимость выявлена для двух параметров – стадии заболевания и уровня экспрессии ER β , причем как с включением, так и без включения в ряд оценочных характеристик степени злокачественности опухоли. Обращает внимание тот факт, что достоверность прогностической значимости уровня экспрессии ER β даже выше по сравнению со стадией заболевания ($p=0,014$, HR=1,8 vs $p=0,033$, HR=2,3 и $p=0,045$, HR=1,7 vs $p=0,013$, HR=2,3).

Что касается интенсивности экспрессии ER β , результаты представлены в таблице 26. Видно, что независимость предиктивной значимости обнаружена для стадии заболевания при проведении многофакторного анализа как с учетом и без учета степени дифференцировки опухоли ($p=0,05$ и $p=0,022$, соответственно). В тоже время, в отличие от показателя уровня ER β , независимость предиктивной значимости для показателя интенсивности экспрессии маркера обнаружить не удалось ($p>0,05$).

Таблица 25 – Многофакторный анализ методом Cox-регрессии независимой предиктивной значимости уровня экспрессии ER β в ткани рака яичников

Параметры	HR [95% CI]*	p**
Стадия заболевания	1,8 [1,1; 3,1]	0,03
Степень циторедукции	3,1 [0,86; 11,0]	0,08
Уровень экспрессии ER β	2,3 [1,2; 4,6]	0,01
Степень злокачественности	1,0 [0,4; 2,7]	0,99
Параметры	HR [95% CI]*	p**
Стадия заболевания	1,7 [1,0; 2,9]	0,05
Степень циторедукции	3,2 [0,9; 11,5]	0,07
Уровень экспрессии ER β	2,3 [1,2;4,4]	0,01

Hazard ratio* – соотношение рисков возврата заболевания; в квадратный скобках указан 95% доверительный; p** – достоверность различий между показателями продолжительности безрецидивного периода, рассчитанная методом Cox-регрессии.

Таким образом, при многофакторном анализе методом Cox-регрессии показано, что уровень экспрессии ER β , но не ER α , обладает независимой предиктивной значимостью в прогнозе эффективности первой линии химиотерапии с включением препаратов платины и таксанов по продолжительности безрецидивного течения рака яичников после завершения этого лечения.

Таблица 26 – Многофакторный анализ методом Cox-регрессии независимой предиктивной значимости интенсивности экспрессии ER β в ткани рака яичников

Параметры	HR [95% CI]*	p**
Стадия заболевания	1,7 [1,0; 3,0]	0,05
Степень циторедукции	1,3 [0,059; 3,3]	0,46
Интенсивность экспрессии ER β	1,2 [0,49; 3,0]	0,70
Степень злокачественности	0,7 [0,2; 1,8]	0,47
Параметры	HR [95% CI]*	p**
Стадия заболевания	1,9 [1,1; 3,0]	0,022
Степень циторедукции	3,3 [0,97; 11,6]	0,06
Интенсивность экспрессии ER β	1,2 [0,7;2,2]	0,55

Hazard ratio* – соотношение рисков возврата заболевания; в квадратный скобках указан 95% доверительный; p** – достоверность различий между показателями продолжительности

безрецидивного периода, рассчитанная методом Соx-регрессии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы часто «разочаровывающие» результаты использования современных таргетных препаратов при лечении злокачественных новообразований вновь стимулировали исследования предиктивных молекулярных маркёров эффективности классических цитостатиков. Применительно к раку яичников, актуальна проблема персонализации лечения препаратами платины и таксанов, которые являются стандартом первой линии химиотерапии, которая показана как адъювантная опция при IA и IB стадиях, и как лечебная – при IC-IV стадиях [5].

Основанием для настоящего исследования послужили две группы фактов. В фундаментальных исследованиях показано, что цитотоксический эффект многих противоопухолевых препаратов, в том числе препаратов платины и таксанов, обусловлен действием на быстро пролиферирующие клетки [156,157]. В клинических исследованиях показано, что эффективность химиотерапии рака яичников, включающая препараты платины и таксанов, обратно коррелирует с пролиферативной активностью опухоли [158,159].

С другой стороны, в фундаментальных исследованиях описано участие ER α и ER β в реализации пролиферативных стимулов, регулирующих рост нормальных и опухолевых клеток [160,161]. А в клинических исследованиях установлено, что применение гормональной заместительной терапии является фактором риска развития рака яичников [100,162]. Сопоставив эти данные, мы предположили возможный вклад ER α и ER β в эффективность платиносодержащей химиотерапии, что сделало необходимым точную количественную характеристику их экспрессии в опухолевой ткани.

Проведение данного исследования стимулировало и возродившийся в последние годы интерес к гормональному лечению рака яичников. В клинических исследованиях антиэстрогена тамоксифена и ингибиторов ароматазы при лечении распространённого рака яичников показано, что эффективность гормональной терапии практически идентична стандартной химиотерапии, при этом значительно менее токсична [4]. И хотя очевидно, что мишенью гормонотерапии являются эстрогеновые рецепторы – ER α и ER β , однако вопрос об уровне их экспрессии в ткани рака яичников остается не изученным, во всяком случае, количественно, что необходимо.

Таким образом, исследование эстрогеновых рецепторов в ткани рака яичников интересно и важно с двух сторон – как предикторов эффективности не только антиэстрогенов, но и классических цитостатиков.

В обоих случаях принципиально важно не только выявить наличие в опухоли исследуемого маркёра-мишени, но и количественно оценить уровень его экспрессии в

исследуемом новообразовании, а также оценить средний показатель интенсивности экспрессии в опухолевой клетке. На это указывает огромное число исследований [163]. И эту задачу мы в своей работе решили, так как использовали иммунофлуоресцентный метод анализа, ассоциированный с проточной цитометрией, которая полностью исключает субъективизм полуколичественного иммуногистохимического исследования (ИГХ), рутинно используемый в клинической практике.

Более того, используемый в данной работе метод обладает и другими преимуществами по сравнению с ИГХ. Во-первых, на стадии преаналитической пробоподготовки исключены агрессивные этапы дегидратации, обратного гидратирования ткани и ревитализации маркера. Во-вторых, минимизирована возможность искажения результатов из-за гетерогенности опухоли путем включения в анализ большого числа исследуемых клеток – 2-10 тыс., полученных из большого по размеру хирургического образца опухоли – до 2 и более см в диаметре. И наконец, немаловажно, что результат молекулярной диагностики может быть получен в течение 48 час после получения хирургического образца опухоли.

Первый факт, который был отмечен в нашей работе – во всех случаях в опухолевой ткани выявляется экспрессия как ER α , так и ER β . При этом, благодаря применению метода двойного иммунофлуоресцентного окрашивания в работе была выявлена важная биологическая характеристика внутриклеточного молекулярного статуса эстрогеновых рецепторов разных типов. Удалось продемонстрировать, что ER α и ER β экспрессируются не только в разных клетках опухолевого узла, но и коэкспрессируются в одних и тех же клетках новообразования.

При анализе включенных в исследование опухолей отмечены значительные различия между разными образцами не только по уровню экспрессии маркеров в опухоли, но и по интенсивности экспрессии каждого маркера в опухолевых клетках, то есть в работе продемонстрирована молекулярная гетерогенность ткани рака яичников по количественным показателям экспрессии ER α и ER β у разных больных.

О молекулярной гетерогенности исследованной выборки опухолей по уровню экспрессии ER α и ER β свидетельствовали также значительные различия между минимальными и максимальными значениями уровней экспрессии этих маркеров у разных больных: для ER α – 5% и 70%, для ER β – 17% и 68%, соответственно. При этом гетерогенность опухолей по уровню экспрессии ER α была выше в сравнении с ER β , так как коэффициент вариации составил 51% и 28% соответственно.

Более того необходимо отметить, что количественные показатели как уровня, так и интенсивности экспрессии ER β оказались выше по сравнению с ER α . В целом по группе экспрессия ER β более чем в 1,5 раза превысила данный показатель для ER α . При этом

обнаружена слабая прямая корреляционная связь между показателями экспрессии для ER α и ER β , а также сильная корреляция между интенсивностью и уровнем экспрессии каждого из маркёров.

Обсуждая полученные в этом разделе работы результаты следует упомянуть о том, что расширение показаний к применению антиэстрогенов – это один из трендов современной клинической онкологии. В частности, первый таргетный препарат тамоксифен, который на протяжении более 40 лет является золотым стандартом адъювантной терапии рака молочной железы, в 2018 году введен в стандарты терапии рака яичников в рекомендациях Европейского общества гинекологической онкологии и Российского общества клинической онкологии [5,79].

При этом следует подчеркнуть, что в отличие от рака молочной железы, где четко обозначена мишень тамоксифена – эстрогеновые рецепторы альфа (ER α), для рака яичников мишень этого антиэстрогена не определена и препарат рекомендован для лечения больных раком яичников низкой степени злокачественности без предварительного отбора пациенток [5].

Полученные результаты указывают на то, что в ткани рака яичников мишенью антиэстрогенов могут являться рецепторы другого типа – ER β , которые экспрессируются в ткани рака яичников более интенсивно по сравнению с ER α , также участвуют в важнейших этапах клеточного сигналинга [164] и контролируют пролиферативную активность клеток [165]. В целом, это является прямым указанием на необходимость расширения фундаментальных исследований роли ER β , которые с большой вероятностью могут являться «главной» мишенью реализации эффектов антиэстрогенов при гормональной терапии рака яичников. До настоящего момента рутинно в клинической практике этот важнейший опухолевый маркёр не исследуется.

Еще одним важным результатом этого раздела работы явилось точное определение медианы уровня и интенсивности экспрессии ER α и ER β , которая в клинических исследованиях рассматривается как возможная граница деления на низкую и высокую экспрессию маркёра. Для уровня экспрессии ER β этот порог составил 44%, для ER α – 25%, а в случае с интенсивностью экспрессии маркёров, соответственно – 2,6 и 1,7. Именно эти показатели и были использованы во всех дальнейших рассмотренных.

Переходя к обсуждению полученных результатов в свете их возможной клинической значимости в прогнозе эффективности первой линии стандартной химиотерапии рака яичников препаратами платины и таксанов необходимо отметить следующее.

Этот раздел работы был разделен на два этапа. Прежде всего, была проведена оценка клинической значимости показателей экспрессии ER α и ER β на унифицированной когорте больных, которую составили пациентки с серозным раком яичников высокой степени злокачественности, с III стадией заболевания, с неоптимальной циторедукцией, получившие 6

курсов стандартной химиотерапии препаратами платины и таксанов. Это важный этап оценки предиктивной или прогностической значимости любого маркера, поскольку позволяет проверить гипотезу о значимости фактора, убирая весь «шум» гетерогенности выборки [114].

Результаты показали, что уровень экспрессии ER β имеет предиктивную значимость в прогнозе эффективности химиотерапии препаратами платины и таксанов, причем высокий уровень экспрессии является благоприятным предиктивным маркером. Для ER α выявлена четкая тенденция к возможности прогнозирования более благоприятного течения болезни после завершения химиотерапии препаратами платины и таксанов при высоком уровне экспрессии маркера. Аналогично, на уровне тенденции продемонстрирована и предиктивная значимость интенсивности экспрессии как ER α , так и ER β . По нашему мнению, одной из причин не достигнутой статистической значимости различий между группами сравнения могла быть малочисленность унифицированной по клиническим характеристикам группы (n=31), включенной в настоящее исследование. Поэтому на втором этапе оценка предиктивной значимости показателей экспрессии ER α и ER β была проведена на общей группе пациенток с верифицированным диагнозом рака яичников (n=74), не стандартизованных по разным характеристикам болезни.

Прежде всего, надо отметить, что не выявлено взаимосвязи показателей экспрессии ER α и ER β с клинико-морфологическими характеристиками заболевания (возраст, стадия, степень злокачественности опухоли) в группе пациенток, включенных в исследование.

В то же время, однофакторный статистический анализ полученных результатов с использованием метода Каплана-Майера на общей когорте больных раком яичников, включенных в исследование, подтвердил заключение о клинической значимости количественных показателей уровня и интенсивности экспрессии ER β , сделанное по результатам исследования унифицированной когорты пациенток. При этом на общей когорте пациенток удалось продемонстрировать статистически значимую клиническую ценность и количественных показателей экспрессии в опухоли ER α . В целом, показано, что высокий уровень и интенсивность экспрессии в ткани рака яичников эстрогеновых рецепторов разных типов – α и β , являются благоприятным предиктивным маркером эффективности первой линии химиотерапии рака яичников препаратами платины и таксанов.

Важно отметить, что правомерность использования медианы уровня экспрессии как ER α , так и ER β в качестве порогового значения деления на группы с высоким и низким уровнем экспрессии маркеров была проверена с помощью ROC-анализа. Доказано, что именно значения медианы 25% и 44% для ER α и ER β , соответственно, обладают лучшими показателями доли истинно положительных и ложно положительных результатов в прогнозе эффективности химиотерапии препаратами платины и таксанов у пациенток с серозным раком яичников.

Имея в виду трансляционную направленность проведенного исследования, в работе был поставлен вопрос: экспрессия одного типа рецепторов или коэкспрессия как ER α и ER β являются наиболее надёжным показателем ответа на проведенное лечение?

Ответ на этот вопрос был получен при сравнении соотношений рисков развития рецидива болезни в группах с высоким и низким уровнем экспрессии маркера(ов): только ER α , только ER β и одновременно ER α +ER β . Прежде всего, была подтверждена описанная выше предиктивная значимость уровня экспрессии ER α и ER β в прогнозе эффективности первой линии стандартной химиотерапии рака яичников препаратами платины и таксанов. И при этом установлена бóльшая клиническая ценность одновременной оценки экспрессии двух маркеров – и ER α , и ER β : риск рецидива болезни у пациенток с низким уровнем коэкспрессии ER α +ER β в 3,2 раза превысил показатель в группе с высоким уровнем экспрессии двух маркеров. Важно, что исходя из 95% доверительного интервала, для соотношений рисков рецидива болезни для всех изученных групп сравнения, различия статически значимы.

На основании полученных результатов мы считаем возможным рекомендовать введение в клиническую практику оценку обоих рецепторов в ткани рака яичников, так как это позволит более точно прогнозировать эффективность первой линии химиотерапии. Конкретно, при выявлении в опухоли низкого уровня экспрессии как ER α , так и ER β следует иметь ввиду возможность изначальной резистентности опухоли к препаратам платины и таксанов.

И заключительным разделом нашего исследования явилась оценка независимости клинической значимости эстрогеновых рецепторов как маркеров эффективности химиотерапии препаратами платины и таксанов. Исследование проведено с помощью многофакторного анализа Соx-регрессии, в сравнении с клинически значимыми характеристиками агрессивности течения рака яичника – стадия заболевания, степень злокачественности опухоли и объём циторедукции. Показано, что уровень экспрессии ER β , но ER α обладает независимой предиктивной значимостью в прогнозе эффективности первой линии химиотерапии с включением препаратов платины и таксанов по показателю продолжительности безрецидивного течения рака яичников после завершения этого этапа лечения.

Что же касается вопроса, почему низкий уровень экспрессии ER β прогнозирует резистентность рака яичников к платиносодержащей терапии? Полученные данные согласуются к результатам экспериментальных исследований, в которых показано, что ER β участвуют в регуляции клеточных сигнальных путей, ответственных за ответ на повреждения ДНК [92,145,147]. Так, одним из механизмов действия ER β , может быть активация белка-опухолевого супрессора p53 [145]. Учитывая, что p53 является основным регулятором ответа на различные повреждения ДНК [146], повышенная активность p53 в клетках, экспрессирующих ER β , может являться одной из причин активации апоптоза в ответ на воздействие цисплатина.

Это лишь одно из возможных объяснений выявленного феномена. Участие эстрогенов и их мишеней – в частности, ER α и ER β , в жизнедеятельности не только клетки, но и организма в целом, невероятно многообразно. Как, впрочем и эффекты антиэстрогенов, которые не перестают удивлять [166–168]. Но это тема других очень интересных фундаментальных исследований.

ВЫВОДЫ

1. Ткань рака яичников характеризуется экспрессией эстрогеновых рецепторов разных типов – ER α и ER β , с выраженными различиями у разных больных как по уровню экспрессии в опухоли, так и по интенсивности экспрессии в каждой опухолевой клетке.
2. ER α и ER β коэкспрессируются не только в разных клетках рака яичников, но и в одних и тех же клетках злокачественного новообразования.
3. Главной потенциальной мишенью гормональной терапии рака яичников могут являться ER β , уровень и интенсивность экспрессии которых более чем в полтора раза превышает данные показатели для ER α .
4. Уровень и интенсивность экспрессии как ER α , так и ER β не коррелирует с клинически значимыми показателями – возраст пациентки, стадия болезни, степень злокачественности опухоли.
5. Высокий уровень экспрессии в опухоли как ER α ($\geq 25\%$), так и ER β ($\geq 44\%$) является благоприятным предиктивным маркёром эффективности первой линии химиотерапии рака яичников с включением препаратов платины и таксанов.
6. Высокая интенсивность экспрессии в опухолевых клетках как ER α ($\geq 1,7$ усл.ед.), так и ER β ($\geq 2,6$ усл.ед.) является благоприятным предиктивным маркёром эффективности первой линии химиотерапии рака яичников с включением препаратов платины и таксанов.
7. Наибольшая предиктивная информативность отмечена при выявлении в ткани рака яичников низкого уровня экспрессии обоих маркёров: риск развития рецидива увеличивается более чем в 3 раза по сравнению с низким уровнем экспрессии одного из маркёров.
8. В многофакторном анализе доказана независимая значимость уровня экспрессии ER β как предиктора эффективности первой линии химиотерапии серозного рака яичников препаратами платины и таксанов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПБП – продолжительность безрецидивного периода.

E2 – эстрадиол

ER α – эстрогеновые рецепторы альфа

ER β – эстрогеновые рецепторы бета.

ERE – эстроген-чувствительных элементов (estrogen response element)

DBD – ДНК-связывающем доменом

LBD – лиганд-связывающий домен

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Battista, M.J. Ki-67 as an independent prognostic factor in an unselected cohort of patients with ovarian cancer: Results of an explorative, retrospective study / M.J. Battista, N. Mantai, I. Sicking et al // *Oncol. Rep.* — 2014. — Vol.31.— N 5. — P. 2213-2219.
2. Kucukgoz Gulec, U. Prognostic importance of survivin, Ki-67, and topoisomerase II α in ovarian carcinoma / U. Kucukgoz Gulec, D. Gumurdulu, A.B. Guzel et al // *Arch. Gynecol. Obstet.* — 2014. — Vol.289. — N 2. — P. 393-398.
3. Bossard, C. Potential Role of Estrogen Receptor Beta as a Tumor Suppressor of Epithelial Ovarian Cancer / C. Bossard, M. Busson, D. Vindrieux et al// *PLoS One.* — 2012. — Vol.7 — N 9. — P. e44787.
4. Lindemann, K. Chemotherapy vs tamoxifen in platinum-resistant ovarian cancer: a phase III, randomised, multicentre trial (Ovaresist) / K. Lindemann, E. Gibbs, E. Åvall-Lundqvist et al// *Br J Cancer.* — 2017. — Vol.116 — N 4. — P. 455-463.
5. Тюляндин, С.А. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака яичников, первичного рака брюшины и рака маточных труб. Злокачественные опухоли : Практические рекомендации RUSSCO / С.А. Тюляндин, Л.А. Коломиец, К.Ю. Морхов и др// 2019. — Т 9. — С. 164—176.
6. Tata, J.R. One hundred years of hormones / J.R. Tata // *EMBO Rep.* 2005. — Vol.6. — N 6. — P. 490-496.
7. White, M.A. Thermochromism in Commercial Products / M.A. White, M. LeBlanc // *J. Chem. Educ.* — 1999. — Vol.76. — N 9. — P. 1201-1205.
8. Jensen, E.V. Estrogen action: A historic perspective on the implications of considering alternative approaches / E.V. Jensen, H.I. Jacobson, A.A. Walf, C.A. Frye // *Physiol. Behav.* — 2010. — Vol.99. — N 2. — P. 151-162.
9. Kuiper, G.G. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary / G.G. Kuiper, E. Enmark, M. Peltö-Huikko et al // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1996. — Vol.93. — N 12. — P. 5925-5930.
10. Haldosén, L.-A. Estrogen receptor beta in breast cancer /L.-A. Haldosén, C. Zhao, K. Dahlman-Wright// *Mol. Cell. Endocrinol.* — 2014. — Vol.382.— N 1. — P. 665-672.
11. Evans, R.M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily /R.M. Evans// *Science.* — 1988. — Vol.240. — N 4854. — P. 889-895.
12. Ponglikitmongkol, M. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene /M. Ponglikitmongkol, S. Green, P. Chambon// *EMBO J.* — 1988. — Vol.7. — N 11. — P. 3385-3388.
13. Sand, P. Untangling the human estrogen receptor gene structure /P. Sand, C. Luckhaus, K. Schlurmann et al// *J. Neural Transm.* — 2002. — Vol.109(5—6). — P. 567-583.

14. Yaşar, P. Molecular mechanism of estrogen—estrogen receptor signaling /P. Yaşar, G. Ayaz, S.D. User et al// *Reproductive Medicine and Biology*. — 2017. — Vol.16. — N 1. — P. 4-20.
15. Dauvois, S. The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling /S. Dauvois, R. White, M.G. Parker// *J. Cell Sci*. —1993. — Vol.106. — N 4. — P. 1377-1388.
16. Yi, P. Structure of a Biologically Active Estrogen Receptor-Coactivator Complex on DNA /P. Yi, Z. Wang, Q. Feng et al// *Mol. Cell*. — 2015. — Vol.57. — N 6. — P. 1047-1058.
17. Muyan, M. Modulation of estrogen response element-driven gene expressions and cellular proliferation with polar directions by designer transcription regulators /M. Muyan, G. Güpür, P. Yaşar et al// *PLoS One*. — 2015. — Vol.10. — N 8.
18. Razandi, M. Plasma Membrane Estrogen Receptors Exist and Functions as Dimers /M. Razandi, A. Pedram, I. Merchenthaler et al// *Mol. Endocrinol*. — 2004. — Vol.18. — N 12. — P. 2854-2865.
19. Klinge, C.M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements /C.M. Klinge// *Nucleic Acids Res*. — 2001. — Vol.29. — N 14. — P. 2905-2919.
20. Pedram, A. Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells /A. Pedram, M. Razandi, D.C. Wallace, E.R. Levin// *Mol. Biol. Cell*. — 2006. — Vol.17. — N 5. — P. 2125-2137.
21. Bai, Y. Isoform-Selective Interactions between Estrogen Receptors and Steroid Receptor Coactivators Promoted by Estradiol and ErbB-2 Signaling in Living Cells /Y. Bai, V. Giguère// *Mol. Endocrinol*. — 2003. — Vol.17. — N 4. — P. 589-599.
22. Kushner, P.J. Estrogen receptor pathways to AP-1 /P.J. Kushner, D.A. Agard, G.L. Greene et al// *J Steroid Biochem Mol Biol*. — 2000. — Vol.74. — N 5. — P. 311-317.
23. Björnström, L. Mutations in the estrogen receptor DNA-binding domain discriminate between the classical mechanism of action and cross-talk with Stat5b and activating protein 1 (AP-1) /L. Björnström, M. Sjöberg// *J. Biol. Chem*. — 2002. — Vol.277. — N 50. — P. 48479-48483.
24. Cheung, E. Altered pharmacology and distinct coactivator usage for estrogen receptor-dependent transcription through activating protein-1 /E. Cheung, M.L. Acevedo, P.A. Cole, W.L. Kraus// *Proc. Natl. Acad. Sci*. — 2005. — Vol.102. — N 3. — P. 559-564.
25. Hall, J.M. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling /J.M. Hall, J.F. Couse, K.S. Korach// *J Biol Chem*. — 2001. — Vol.276. — N 40. — P. 36869-36872.
26. Schwabe, J.W. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: How receptors discriminate between their response elements /J.W. Schwabe, L. Chapman, J.T. Finch, D. Rhodes// *Cell*. — 1993. — Vol.75. — N 3. — P. 567-578.
27. Kumar, V. Functional domains of the human estrogen receptor /V. Kumar, S. Green, G.

Stack et al// Cell. — 1987. — Vol.51. — P. 941-951.

28. Green, S. The N-terminal DNA-binding “zinc finger” of the oestrogen and glucocorticoid receptors determines target gene specificity /S. Green, V. Kumar, I. Theulaz et al// EMBO J. — 1988. — Vol.7. — N 10. — P. 3037-3044.

29. Acconcia, F. S-palmitoylation modulates human estrogen receptor- α functions /F. Acconcia, P. Ascenzi, G. Fabozzi et al// Biochem. Biophys. Res. Commun. — 2004. — Vol.316. — N 3. — P. 878-883.

30. Zeitoun, K. Stimulation of aromatase P450 promoter (II) activity in endometriosis and its inhibition in endometrium are regulated by competitive binding of steroidogenic factor-1 and chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor to the same cis-acting elem /K. Zeitoun, K. Takayama, M.D. Michael, S.E. Bulun// Mol. Endocrinol. — 1999. — Vol. 13. — N 2. — P. 239-253.

31. Levin, E.R. Plasma membrane estrogen receptors /E.R. Levin// Trends Endocrinol. Metab. — 2009. — Vol. 20. — N 10. — P. 477-482.

32. Marino, M. Membrane association of estrogen receptor α and β influences 17 β -estradiol-mediated cancer cell proliferation /M. Marino, P. Ascenzi// Steroids. — 2008. — Vol. 73. — N 9-10. — P. 853-858.

33. Galluzzo, P. Role of ER β palmitoylation in the inhibition of human colon cancer cell proliferation /P. Galluzzo, F. Caiazza, S. Moreno et al// Endocr Relat Cancer. — 2007. — Vol. 14. — N 1. — P. 153-167.

34. Galluzzo, P. The nutritional flavanone naringenin triggers antiestrogenic effects by regulating estrogen receptor alpha-palmitoylation /P. Galluzzo, P. Ascenzi, P. Bulzomi et al// Endocrinology. — 2008. — Vol.149. — N 5. — P. 2567—2575.

35. Kumar, P. Direct interactions with G α i and G $\beta\gamma$ mediate nongenomic signaling by estrogen receptor α /P. Kumar, Q. Wu, K.L. Chambliss et al// Mol Endocrinol. — 2007. — Vol. 21. — N 6. — P. 1370—1380.

36. Sanchez, A.M. Estrogen receptor-alpha promotes breast cancer cell motility and invasion via focal adhesion kinase and N-WASP /A.M. Sanchez, M.I. Flamini, C. Baldacci et al// Mol Endocrinol. — 2010. — Vol. 24. — N 11. — P. 2114—2125.

37. Adlanmerini, M. Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor α in vivo reveals tissue-specific roles for membrane versus nuclear actions /M. Adlanmerini, R. Solinhac, A. Abot et al// Proc Natl Acad Sci U S A. — 2014. — Vol. 111. — N 2. — P. E283-E290.

38. Simpkins, J.W. Estrogen actions on mitochondria--physiological and pathological implications /J.W. Simpkins, S.H. Yang, S.N. Sarkar et al// Mol Cell Endocrinol. — 2008. — Vol. 290. — N 1-2. — P. 51-59.

39. Thomas, C. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy /C. Thomas,

J.Å. Gustafsson// *Nat Rev Cancer*. — 2011. — Vol. 11. — N 8. — P. 597-608.

40. Chen, J.Q. Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications /J.Q. Chen, P.R. Cammarata, C.P. Baines et al// *Biochim Biophys Acta*. — 2009. — Vol. 1793. — N 10. — P. 1540-1570.

41. Mak, P. ERbeta impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1alpha and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading /P. Mak, I. Leav, B. Pursell et al// *Cancer Cell*. — 2010. — Vol. 17. — N 4. — P. 319-332.

42. Yang, S.H. Mitochondrial localization of estrogen receptor beta. /S.H. Yang, R. Liu, E.J. Perez et al// *Proc Natl Acad Sci U S A*. — 2004. — Vol. 101. — N 12. — P. 4130-4135.

43. Monje, P. Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta isoforms in rabbit uterus and ovary /P. Monje, R. Boland// *J Cell Biochem*. — 2001. — Vol. 82. — N 3. — P. 467-479.

44. Fader, A.N. Primary cytoreductive surgery and adjuvant hormonal monotherapy in women with advanced low-grade serous ovarian carcinoma: Reducing overtreatment without compromising survival? /A.N. Fader, J. Bergstrom, A. Jernigan et al// *Gynecol Oncol*. — 2017. — Vol. 147. — N 1. — P. 85-91.

45. Chen, J.Q. Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to human mitochondrial DNA estrogen response elements /J.Q. Chen, M. Eshete, W.L. Alworth et al// *J Cell Biochem*. — 2004. — Vol. 93. — N 2. — P. 358-373.

46. Yoshidome, K. Estrogen promotes mammary tumor development in C3(1)/SV40 large T-antigen transgenic mice: paradoxical loss of estrogen receptoralpha expression during tumor progression /K. Yoshidome, M.A. Shibata, C. Couldrey et al// *Cancer Res*. — 2000. — Vol. 60. — N 24. — P. 6901-6910.

47. Miermont, A.M. Role of ERalpha in the differential response of Stat5a loss in susceptibility to mammary preneoplasia and DMBA-induced carcinogenesis /A.M. Miermont, A.R. Parrish, P.A. Furth// *Carcinogenesis*. — 2010. — Vol. 31. — N 6. — P. 1124-1131.

48. Risbridger, G. Evidence that epithelial and mesenchymal estrogen receptor-alpha mediates effects of estrogen on prostatic epithelium /G. Risbridger, H. Wang, P. Young et al// *Dev Biol*. — 2001. — Vol. 229. — N 2. — P. 432-442.

49. Dubik, D. Mechanism of estrogen activation of c-myc oncogene expression /D. Dubik, R.P. Shiu// *Oncogene*. — 1992. — Vol. 7. — N 8. — P. 1587-1594.

50. Castro-Rivera, E. Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements /E. Castro-Rivera, I. Samudio, S. Safe// *J Biol Chem*. — 2001. — Vol. 276. — N 33. — P. 30853-30861.

51. List, H.J. Ribozyme targeting demonstrates that the nuclear receptor coactivator AIB1 is a rate-limiting factor for estrogen-dependent growth of human MCF-7 breast cancer cells /H.J. List, K.J. Lauritsen, R. Reiter et al// *J Biol Chem.* — 2001. — Vol. 276. — N 26. — P. 23763-23768.
52. Planas-Silva, M.D. AIB1 enhances estrogen-dependent induction of cyclin D1 expression /M.D. Planas-Silva, Y. Shang, J.L. Donaher et al// *Cancer Res.* — 2001. — Vol. 61. — N 10. — P. 3858-3862.
53. Levin, E.R. Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor /E.R. Levin// *Mol Endocrinol.* — 2003. — Vol. 17. — N 3. — P. 309-317.
54. Driggers, P.H. Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling /P.H. Driggers, J.H. Segars// *Trends Endocrinol Metab.* — 2002. — Vol. 13. — N 10. — P. 422-427.
55. Voutsadakis, I.A. Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Regulation of EMT Factors by Steroid Nuclear Receptors in Breast Cancer: A Review and in Silico Investigation /I.A. Voutsadakis// *J Clin Med.* — 2016. — Vol. 5. — N 1. — P. 11.
56. Förster, C. Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium /C. Förster, S. Mäkela, A. Wärrri et al// *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2002. — Vol. 99. — N 24. — P. 15578-15583.
57. Hartman, J. Current concepts and significance of estrogen receptor β in prostate cancer /J. Hartman, A. Ström, J.Å. Gustafsson// *Steroids.* — 2012. — Vol. 77. — N 12. — P. 1262-1266.
58. Imamov, O. Estrogen receptor beta regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate /O. Imamov, A. Morani, G.J. Shim et al// *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2004. — Vol. 101. — N 25. — P. 9375-9380.
59. Weihua, Z. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate /Z. Weihua, S. Makela, L.C. Andersson et al// *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2001. — Vol. 98. — N 11. — P. 6330-6335.
60. Hamilton, K.J. Estrogen hormone physiology: reproductive findings from estrogen receptor mutant mice /K.J. Hamilton, Y. Arao, K.S Korach// *Reprod Biol.* — 2014. — Vol. 14. — N 1. — P. 3-8.
61. Antal, M.C. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant /M.C. Antal, A. Krust, P. Chambon et al// *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2008. — Vol.105. — N 7. — P. 2433-2438.
62. Williams, C. A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells /C. Williams, K. Edvardsson, S.A. Lewandowski et al// *Oncogene.* — 2008. — Vol.27. — N 7. — P. 1019-1032.
63. Lindberg, M.K. Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription,

supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice /M.K. Lindberg, S. Movérare, S. Skrtic et al// *Mol Endocrinol.* — 2003. — Vol.17. — N 2. — P. 203-208.

64. Lin, C.Y. Inhibitory effects of estrogen receptor beta on specific hormone-responsive gene expression and association with disease outcome in primary breast cancer /C.Y. Lin, A. Ström, S. Li Kong et al// *Breast Cancer Res.* — 2007. — Vol.9. — N 2. — P. R25.

65. Ström, A. Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D /A. Ström, J. Hartman, J.S. Foster et al// *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2004. — Vol.101. — N 6. — P. 1566-1571.

66. Nakajima, Y. Estrogen regulates tumor growth through a nonclassical pathway that includes the transcription factors ER β and KLF5 /Y. Nakajima, K. Akaogi, T. Suzuki et al// *Sci Signal.* — 2011. — Vol.4. — N 168. — P. ra22.

67. Hartman, J. Tumor repressive functions of estrogen receptor beta in SW480 colon cancer cells /J. Hartman, K. Edvardsson, K. Lindberg et al// *Cancer Res.* — 2009. — Vol.69. — N 15. — P. 6100-6106.

68. Thomas, C.G. Estrogen receptor beta decreases survival of p53-defective cancer cells after DNA damage by impairing G₂/M checkpoint signaling /C.G. Thomas, A. Strom, K. Lindberg et al// *Breast Cancer Res Treat.* — 2011. — Vol.127. — N 2. — P. 417-427.

69. Hartman, J. Estrogen receptor beta inhibits angiogenesis and growth of T47D breast cancer xenografts /J. Hartman, K. Lindberg, A. Morani et al// *Cancer Res.* — 2006. — Vol.66. — N 23. — P. 11207-11213.

70. Sapino, A. Estrogen- and tamoxifen-induced rearrangement of cytoskeletal and adhesion structures in breast cancer MCF-7 cells /A. Sapino, F. Pietribiasi, G. Bussolati et al// *Cancer Res.* — 1986. — Vol.46. — N 5. — P. 2526-2531.

71. DePasquale, J.A. 17-beta-Estradiol induced alterations of cell-matrix and intercellular adhesions in a human mammary carcinoma cell line /J.A. DePasquale, W.A. Samsonoff, J.F. Gierthy// *J Cell Sci.* — 1994. — Vol.107. — N Pt 5. — P. 1241-1254.

72. Förster, C. Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium /C. Förster, S. Mäkela, A. Wärrri et al// *Proc Natl Acad Sci USA* — 2002. — Vol.99. — N 24. — P. 15578-15583.

73. Zheng, W. Variation of ER status between primary and metastatic breast cancer and relationship to p53 expression /W. Zheng, J. Lu, J. Zheng Hu et al// *Steroids.* — 2001. — Vol.66. — N 12. — P. 905-910.

74. Harrell, J. Estrogen receptor positive breast cancer metastasis: Altered hormonal sensitivity and tumor aggressiveness in lymphatic vessels and lymph nodes /J. Harrell, W. Dye, D. Allred et al// *Cancer Res.* — 2006. — Vol.66. — N 18. — P. 9308-9315.

75. Wang, J. Identification of estrogen-responsive genes involved in breast cancer metastases to the bone /J. Wang, J. Jarrett, C.-C. Huang et al// Clin Exp Metastasis. — 2007. — Vol.24. — N 6. — P. 411-422.
76. Banka, C. Estrogen induces lung metastasis through a host compartment-specific response /C. Banka, C. Lund, M. Nguyen et al// Cancer Res. — 2006. — Vol.66. — N 7. — P. 3667-3672.
77. Saha, R. Role of Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer Metastasis /R. Saha, R. Vadlamudi// Int J Breast Cancer. — 2012. — Vol.2012. — P. 1-8.
78. Lindberg, K. Expression of estrogen receptor β increases integrin $\alpha 1$ and integrin $\beta 1$ levels and enhances adhesion of breast cancer cells /K. Lindberg, A. Ström, J. G. Lock et al// J Cell Physiol. — 2010. — Vol.222. — N 1. — P. 156-167.
79. Blagden, S. Harnessing pandemonium: the clinical implications of tumor heterogeneity in ovarian cancer// Front Oncol. — 2015. — Vol.5. — N 149. — P. 1-6.
80. Meinhold-Heerlein, I. The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications /I. Meinhold-Heerlein, E.C. Kohn// Arch Gynecol Obstet. — 2016. — Vol.293. — N 4. — P. 695-700.
81. McCluggage, W. Morphological subtypes of ovarian carcinoma: A review with emphasis on new developments and pathogenesis //Pathology. — 2011. — Vol.43. — N 5. — P. 420-432.
82. Kurman, R. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer - Shifting the paradigm /R. Kurman, I. Shih// Human Pathology. — 2011. — Vol.42. — N 7. — P. 918-931.
83. Kurman, R. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma //Ann Oncol. — 2013. — Vol.24. — N 10. — P. X16-X21.
84. Kurman, R. The dualistic model of ovarian carcinogenesis revisited, revised, and expanded /R. Kurman, I. Shih// Am J Pathol. — 2016. — Vol.186. — N 4. — P. 733-747.
85. Ross, J. Comprehensive genomic profiling of epithelial ovarian cancer by next generation sequencing-based diagnostic assay reveals new routes to targeted therapies /J. Ross, S. Ali, K. Wang et al// Gynecol Oncol. — 2013. — Vol.130. — N 3. — P. 554-559.
86. Cancer, T. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma /G. Atlas// Nature. — 2011. — Vol.474. — N 7353. — P. 609-615.
87. Mungenast, F. Estrogen biosynthesis and action in ovarian cancer /F. Mungenast, T. Thalhammer// Front Endocrinol (Lausanne). — 2014. — P.5 (NOV).
88. Gilks, C. Ovarian carcinoma pathology and genetics: recent advances /C. Gilks, J. Prat// Hum Pathol Elsevier Inc. — 2009. — Vol.40. — N 9. — P. 1213-1223.

89. Kessler, M. The molecular fingerprint of high grade serous ovarian cancer reflects its fallopian tube origin /M. Kessler, C. Fotopoulou, T. Meyer// *International Journal of Molecular Sciences*. — 2013. — Vol.14. — N 4. — P. 6571-6596.
90. Prat, J. Ovarian carcinomas: Five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features // *Virchows Archiv*. — 2012. — Vol.460. — N 3. — P. 237-249.
91. Alsop, K. BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: A report from the Australian ovarian cancer study group /K. Alsop, S. Fereday, C. Meldrum et al// *J Clin Oncol*. — 2012. — Vol.30. — N 21. — P. 2654-2663.
92. Koshiyama, M. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: Type I and type II /M. Koshiyama, N. Matsumura, I. Konishi// *BioMed Research International*. — 2014. — Vol.2014.
93. Crispens, M. Response and survival in patients with progressive or recurrent serous ovarian tumors of low malignant potential /M. Crispens, D. Bodurka, M. Deavers et al// *Obstet Gynecol*. — 2002. — Vol.99. — N 1. — P. 3-10.
94. Singer, G. Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma /G. Singer, R. Kurman, H. Chang et al// *Am J Pathol*. — 2002. — Vol.160. — N 4. — P. 1223-1228.
95. Folkerd, E. Influence of Sex Hormones on Cancer Progression. /E. Folkerd, M. Dowsett// *J Clin Oncol*. — 2010. — Vol.28. — N 26. — P. 4038-44.
96. Whiteman, D. Timing of Pregnancy and the Risk of Epithelial Ovarian Cancer /D. Whiteman, V. Siskind, D. Purdie et al// *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. — 2003. — Vol.12. — N 1. — P. 42-46.
97. Titus-Ernstoff, L. Breast-feeding the last born child and risk of ovarian cancer /L. Titus-Ernstoff, J. Rees, K. Terry et al// *Cancer Causes Control*. — 2010. — Vol.21. — N 2. — P. 201-207.
98. Jordan, S. Breast-feeding and risk of epithelial ovarian cancer /S. Jordan, K. Cushing-Haugen, K. Wicklund et al// *Cancer Causes Control*. — 2012. — Vol.23. — N 6. — P. 919-927.
99. Narod, S. Oral contraceptives and the risk of hereditary ovarian cancer. Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group /S. Narod, H. Risch, R. Moslehi et al// *N Engl J Med*. — 1998. — Vol.339. — N 7. — P. 424-428.
100. Choi, J. Gonadotropins and ovarian cancer /J. Choi, A. Wong, H. Huang et al// *Endocrine Reviews*. — 2007. — Vol.28. — N 4. — P. 440-461.
101. Li, D. Postoperative hormone replacement therapy for epithelial ovarian cancer patients: A systematic review and meta-analysis /D. Li, C. Ding, L. Qiu// *Gynecol Oncol*. — 2015. — Vol.139. — N 2. — P. 355-362.
102. Group, C. Menopausal hormone use and ovarian cancer risk: individual participant

meta-analysis of 52 epidemiological studies// *Lancet*. — 2015. — Vol.6736. — N 14. — P. 1835-1842.

103. Widschwendter, M. The sex hormone system in carriers of BRCA1 / 2 mutations : a case-control study /M. Widschwendter, A. Rosenthal, S. Philpott et al// *Lancet Oncol*. — 2013. — Vol.14. — N 12. — P. 1226-1232.

104. Kim, J. Baseline E(2) levels are higher in BRCA2 mutation carriers: a potential target for prevention?/J. Kim, K. Oktay// *Cancer Causes Control*. — 2013. — Vol.24. — N 3. — P. 421-426.

105. Modugno, F. Hormone response in ovarian cancer: Time to reconsider as a clinical target? /F. Modugno, R. Laskey, A. Smith et al// *Endocrine-Related Cancer*. — 2012. — Vol.19. — N 6. — P. 255-279.

106. Chan, K. Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation. /K. Chan, N. Wei, S. Liu et al// *Obstet Gynecol*. — 2008. — Vol.111. — N 1. — P. 144-151.

107. Lee, P. Expression of progesterone receptor is a favorable prognostic marker in ovarian cancer /P. Lee, D. Rosen, C. Zhu et al// *Gynecol Oncol*. — 2005. — Vol.96. — N 3. — P. 671-677.

108. Halon, A. Estrogen receptor alpha expression in ovarian cancer predicts longer overall survival /A. Halon, V. Materna, M. Drag-Zalesinska et al// *Pathol Oncol Res*. — 2011. — Vol.17. — N 3. — P. 511-518.

109. Beral, V. Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. /V. Beral, D. Bull, J. Green et al// *Lancet*. — 2007. — Vol.369. — N 9574. — P. 1703-1710.

110. Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer /S.-M. Ho//*Reprod Biol Endocrinol*. — 2003. — Vol.1. — P. 73.

111. Hua, K. Estrogen and progesterone regulate metastasis through the PI3K/AKT pathway in human ovarian cancer /K. Hua, W. Feng, Q. Cao et al// *Int J Oncol*. — 2008. — Vol.33. — N 5. — P. 959-967.

112. Laviolette, L.A. 17 β -Estradiol Accelerates Tumor Onset and Decreases Survival in a Transgenic Mouse Model of Ovarian Cancer /L.A. Laviolette, K. Garson, E.A. Macdonald et al// *Endocrinology*. — 2010. — Vol.151. — N 3. — P. 929-938.

113. Zhu, J. Re-expression of estrogen receptor β inhibits the proliferation and migration of ovarian clear cell adenocarcinoma cells /J. Zhu, K. Hua, H. Sun et al// *Oncol. Rep*. — 2011. — Vol.26. — N 6. — P. 1497-1503.

114. Schüler-Toprak, S. Effect of estrogen receptor β agonists on proliferation and gene expression of ovarian cancer cells /S. Schüler-Toprak, C. Moehle, M. Skrzypczak et al// *BMC Cancer*. — 2017. — 17. — N 1. — P. 319.

115. Modugno, F. Hormone response in ovarian cancer: Time to reconsider as a clinical target? /F. Modugno, R. Laskey, A.L. Smith et al// *Endocrine-Related Cancer*. — 2012. — Vol.19. — N 6. —

P. R255-R279.

116. Chan, K.K.L. Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation /K.K.L. Chan, N. Wei, S.S. Liu et al// *Obstet. Gynecol.* — 2008. — Vol.111. — N 1. — P. 144-151.

117. Chan, K.K.L. Differential expression of estrogen receptor subtypes and variants in ovarian cancer : effects on cell invasion , proliferation and prognosis /K.K.L. Chan, M.K.Y. Siu, Y. Jiang et al//*BMC Cancer.* — 2017. — Vol.606. — P. 1-11.

118. De Stefano, I. Cytoplasmic expression of estrogen receptor beta (ER β) predicts poor clinical outcome in advanced serous ovarian cancer /I. De Stefano, G.F. Zannoni, M.G. Prisco et al// *Gynecol. Oncol.* — 2011. — Vol.122. — N 3. — P. 573-579.

119. Schüler-toprak, S. Estrogen receptor β is associated with expression of cancer associated genes and survival in ovarian cancer /S. Schüler-toprak, F. Weber, M. Skrzypczak et al//*BMC Cancer.* — 2018. — P. 1-9.

120. Ajani, M.A. Hormone-receptor expression status of epithelial ovarian cancer in Ibadan, South-western Nigeria /M.A. Ajani, A. Salami, O.A. Awolude et al// *Pan Afr. Med. J.* — 2017. — Vol.27. — P. 259.

121. Shafir, A.L. The association between reproductive and hormonal factors and ovarian cancer by estrogen- α and progesterone receptor status /A.L. Shafir, M.S. Rice, M. Gupta et al// *Gynecol. Oncol.* — 2016. — Vol.143. — N 3. — P. 628-635.

122. Jönsson, J.-M. Sex Steroid Hormone Receptor Expression Affects Ovarian Cancer Survival /J.-M. Jönsson, N.S. Arildsen, S. Malander et al// *Transl. Oncol.* — 2015. — Vol.8. — N 5. — P. 424-433.

123. Lenhard, M. Steroid hormone receptor expression in ovarian cancer : progesterone receptor B as prognostic marker for patient survival /M. Lenhard, L. Tereza, S. Heublein et al// *BMC Cancer.* — 2012. — P. 553.

124. Chen, S. The positivity of estrogen receptor and progesterone receptor may not be associated with metastasis and recurrence in epithelial ovarian cancer /S. Chen, X. Dai, Y. Gao et al// *Sci. Rep. Springer US.* — 2017. — Vol.7. — P. 1-7.

125. de Toledo, M.C.S. Analysis of the contribution of immunologically-detectable HER2, steroid receptors and of the “triple-negative” tumor status to disease-free and overall survival of women with epithelial ovarian cancer /M.C.S. de Toledo, L.O. Sarian, L.F. Sallum et al// *Acta Histochem. Germany.* — 2014. — Vol.116. — N 3. — P. 440-447.

126. Ciucci, A. Prognostic significance of the estrogen receptor beta (ER β) isoforms ER β 1, ER β 2, and ER β 5 in advanced serous ovarian cancer /A. Ciucci, G.F. Zannoni, D. Travaglia et al// *Gynecol. Oncol. United States.* — 2014. — Vol.132. — N 2. — P. 351-359.

127. Burges, A. Prognostic significance of estrogen receptor alpha and beta expression in

human serous carcinomas of the ovary /A. Burges, A. Brüning, C. Dannemann et al// Arch. Gynecol. Obstet. Germany. — 2010. — 281. — Vol. 3. — P. 511-517.

128. Demir, L. Hormone receptor, HER2/NEU and EGFR expression in ovarian carcinoma--is here a prognostic phenotype? /L. Demir, S. Yigit, C. Sadullahoglu et al// Asian Pac. J. Cancer Prev. — 2014. — Vol.15. — N 22. — P. 9739-9745.

129. Matsuo, K. Estrogen receptor expression and increased risk of lymphovascular space invasion in high-grade serous ovarian carcinoma /K. Matsuo, T.B. Sheridan, S. Mabuchi et al// Gynecol. Oncol. — 2014. — Vol.133. — N 3. — P. 473-479.

130. Shen, F. Hormone receptors expression in ovarian cancer taking into account menopausal status: a retrospective study in Chinese population /F. Shen, X. Zhang, Y. Zhang et al// Oncotarget. — 2017. — Vol.8. — N 48. — P. 84019-84027.

131. Ciucci, A. Prognostic significance of the estrogen receptor beta (ER β) isoforms ER β 1 , ER β 2 , and ER β 5 in advanced serous ovarian cancer /A. Ciucci, G.F. Zannoni, D. Travaglia et al// Gynecol. Oncol. — 2014. — Vol.132. — P. 351-359.

132. Feng, Z. A clinically applicable molecular classification for high-grade serous ovarian cancer based on hormone receptor expression /Z. Feng, H. Wen, R. Bi et al// Sci. Rep. — 2016. — Vol.6. — P. 25408.

133. Sieh, W. Hormone-receptor expression and ovarian cancer survival: an Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study /W. Sein, M. Köbel, T.A. Longacre et al// Lancet. Oncol. — 2013. — Vol.14. — N 9. — P. 853-862.

134. Aust, S. The prognostic value of estrogen receptor beta and proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1 (PELP1) expression in ovarian cancer /S. Aust, P. Horak, D. Pils et al// BMC Cancer. — 2013. — Vol.13. — P. 115.

135. van Kruchten, M. Hormone receptors as a marker of poor survival in epithelial ovarian cancer /M. van Kruchten, P. van der Marel, L. de Munck et al// Gynecol. Oncol. — 2015. — Vol.138. — N 3. — P. 634-639.

136. Llauro Fernandez, M. Hormone receptor expression and outcomes in low-grade serous ovarian carcinoma /M. Llauro Fernandez , A. Dawson, H. Kim et al// Gynecol. Oncol. — 2020. — Vol.157. — N 1. — P. 12-20.

137. Sehouli, J. Prognostic significance of Ki-67 levels and hormone receptor expression in low-grade serous ovarian carcinoma: an investigation of the Tumor Bank Ovarian Cancer Network /J. Sehouli, E.I. Braicu, R. Richter et al// Hum. Pathol. — 2019. — Vol.85. — P. 299-308.

138. Halon, A. Estrogen receptor alpha expression in ovarian cancer predicts longer overall survival /A. Halon, V. Materna, M. Drag-Zalesinska et al// Pathol. Oncol. Res. — 2011. — Vol.17. — N 3. — P. 511-518.

139. Halon, A. Loss of estrogen receptor beta expression correlates with shorter overall survival and lack of clinical response to chemotherapy in ovarian cancer patients /A. Halon, E. Nowak-Markwitz, A. Maciejczyk et al// *Anticancer Res.* — 2011. — Vol.31. — N 2. — P. 711-718.
140. Williams, C. Tamoxifen for relapse of ovarian cancer /C. Williams,I. Simera, A. Bryant// *Cochrane Database of Systematic Reviews.* — 2010. — Vol.3.
141. Perez-Gracia, J.L. Tamoxifen therapy for ovarian cancer in the adjuvant and advanced settings: systematic review of the literature and implications for future research /J.L. Perez-Gracia, E.M. Carrasco// *Gynecol Oncol.* — 2002. — Vol.84. — N 2. — P. 201-209.
142. Hatch, K.D. Responsiveness of patients with advanced ovarian carcinoma to tamoxifen: A Gynecologic Oncology Group study of second-line therapy in 105 patients /K.D. Hatch, J.B. Beecham, J.A. Blessing, W.T. Creasman// *Cancer.* — 1991. — Vol.68. — N 2. — P. 269-271.
143. Bowman, A. CA125 response is associated with estrogen receptor expression in a phase II trial of letrozole in ovarian cancer: Identification of an endocrine-sensitive subgroup /A. Bowman, H. Gabra, S.P. Langdon et al// *Clin. Cancer Res.* — 2002. — Vol.8. — N 7. — P. 2233-2239.
144. Colombo, N. ESMO-ESGO consensus conference recommendations on ovarian cancer: pathology and molecular biology, early and advanced stages, borderline tumours and recurrent disease /N. Colombo, C. Sessa, A. du Bois et al// *Ann. Oncol.* — 2019. — Vol.30. — N 5. — P. 672-705.
145. Bado, I. ER β alters the chemosensitivity of luminal breast cancer cells by regulating p53 function /I. Bado, E. Pham, B. Soibam et al// *Oncotarget.* — 2018. — Vol.9. — N 32. — P. 22509-22522.
146. Siddik, Z.H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance /Z.H. Siddik// *Oncogene.* — 2003. — Vol.22. — N 47. — P. 7265-7279.
147. Lee, M.-T. Estrogen receptor β isoform 5 confers sensitivity of breast cancer cell lines to chemotherapeutic agent-induced apoptosis through interaction with Bcl2L12 /M.-T. Lee, S.-M. Ho, P. Trapore et al// *Neoplasia.* — 2013. — Vol.15. — N 11. — P. 1262-1271.
148. Liu, J. Therapeutic utility of natural estrogen receptor beta agonists on ovarian cancer /J. Liu, S. Viswanadhapalli, L. Garcia et al// *Oncotarget.* — 2017. — Vol.8. — N 30. — P. 50002-50014.
149. Nowak-Markwitz, E. Influence of tamoxifen on cisplatin-sensitivity and estrogen receptors expression in ovarian carcinoma cell lines /E. Nowak-Markwitz, A. Maciejczyk, M. Pudelko et al// *Ginekol. Pol.* — 2010. — Vol.81. — N 3. — P. 183-187.
150. Matsumura, S. Activation of estrogen receptor α by estradiol and cisplatin induces platinum-resistance in ovarian cancer cells /S. Matsumura, T. Ohta, K. Yamanouchi et al// *Cancer Biol. Ther.* — 2017. — Vol.18. — N 9. — P. 730-739.
151. Pons, D.G. The presence of Estrogen Receptor β modulates the response of breast cancer cells to therapeutic agents /D.G. Pons, M. Torrens-Mas, M. Nadal-Sarrano et al// *Int. J. Biochem. Cell*

Biol. — 2015. — Vol. 66. — P. 85-94.

152. Богуш, Т.А. Количественное иммунофлуоресцентное определение экспрессии Pgr в солидных опухолях человека с использованием метода проточной цитофлуориметрии /Т.А. Богуш, М.В. Тихомиров, Е.А. Дудко и др// Вестник Московского университета. — 2012. — Т. 53. — № 3. С. 207-215.

153. Ault, K.A. Detection of small numbers of monoclonal B lymphocytes in the blood of patients with lymphoma /K.A. Ault// N. Engl. J. Med. — 1979. — 300. — N 25. — P. 1401-1405.

154. Литвин, А.А. Использование данных доказательной медицины в клинической практике (сообщение 3 — диагностические исследования) /А.А. Литвин, А.Л. Калинин, Н.М. Тризна// Проблемы здоровья и экологии. — 2006. — Т. 19. — С. 471-474.

155. Тюляндина А.С. Клинические и биологические основы выбора рациональной терапии распространенного рака яичников / ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России. Москва, 2019 — С. 259-270.

156. Valeriote, F. Proliferation-dependent cytotoxicity of anticancer agents: a review /F. Valeriote, L. van Putten// Cancer Res. — 1975. — Vol.35. — N 10. — P. 2619-2630.

158. Mitchison, T.J. The proliferation rate paradox in antimetabolic chemotherapy /T.J. Mitchison// Mol. Biol. Cell. — 2012. — Vol.23. — N 1. — P. 1-6.

159. Chen, M. The prognostic value of Ki67 in ovarian high-grade serous carcinoma: an 11-year cohort study of Chinese patients /M. Chen, S. Yao, Q. Cao et al// Oncotarget. — 2017. — Vol.8. — N 64. — P. 107877-107885.

160. Bachmayr-Heyda, A. Prognostic impact of tumor infiltrating CD8+ T cells in association with cell proliferation in ovarian cancer patients--a study of the OVCAD consortium /A. Bachmayr-Heyda, S. Aust, G. Heinze et al// BMC Cancer. — 2013. — Vol.13. — P. 422.

161. Nash, J.D. Estrogen and anti-estrogen effects on the growth of human epithelial ovarian cancer in vitro /J.D. Nash, R.F. Ozols, J.F. Smyth, T.C. Hamilton// Obstet. Gynecol. — 1989. — Vol.73. — N 6. — P. 1009-1016.

162. Deroo, B.J., Korach K.S. Estrogen receptors and human disease /B.J. Deroo, K.S. Korach// J. Clin. Invest. — 2006. — Vol.116. — N 3. — P. 561-570.

163. Gharwan, H. The role of reproductive hormones in epithelial ovarian carcinogenesis /H. Gharwan, K.P. Bunch, C.M. Annunziata// Endocr. Relat. Cancer. — 2015. — Vol.22. — N 6. — P. R339-63.

164. Gown, A.M. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer /A.M. Gown// Mod. Pathol. — 2008. — Vol.21. — N 2. — P. S8-S15.

165. Jia, M., Dahlman-Wright K., Gustafsson J.-Å. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease /M. Jia, K. Dahlman-Wright, J.-Å. Gustafsson// Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.

— 2015. — Vol.29. — N 4. — P. 557-568.

166. Treeck, O. Knockdown of estrogen receptor β increases proliferation and affects the transcriptome of endometrial adenocarcinoma cells /O. Treeck, E. Diepolder, M. Skrzypczak et al// BMC Cancer. — 2019. — Vol.19. — N 1. — P. 745.

167. Богущ, Т.А. Молекулярные мишени тамоксифена, отличные от эстрогеновых рецепторов /Т.А. Богущ, Дудко Е.А., Богущ Е.А. и др.//Антибиотики и Химиотерапия. — 2012. — Vol.57. — N 1-2. — С. 50-58.

168. Bogush, T.A. Tamoxifen never ceases to amaze: new findings on non-estrogen receptor molecular targets and mediated effects /Т.А. Bogush, В.В. Polezhaev, I.A. Mamichev, et al// Cancer Invest. — 2018. — Vol. 36. — N 4. — P. 211—220.

169. Богущ, Т.А. Новые данные о молекулярных мишенях тамоксифена, отличных от рецепторов эстрогенов, и их клиническая значимость /Т.А. Богущ, Б.Б. Полежаев, Е.А. Дудко и др.// Антибиотики и химиотерапия. — 2016. — Т.61 . — № 3-4. — С. 41-49.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1 – Изменения показателей селективности и 1-специфичности ROC-кривой при разных уровнях экспрессии ER α

Уровень экспрессии ER α , %	Чувствительность	1-Специфичность
6	1,000	1,000
7	1,000	,969
8	,976	,938
9	,976	,906
11	,951	,906
12	,927	,844
13	,902	,844
14	,878	,813
15	,854	,781
16	,854	,750
17	,854	,719
18	,829	,688
19	,829	,625
20	,805	,625
21	,805	,531
22	,780	,469
23	,756	,438
25	,732	,406
26	,707	,406
27	,707	,375
28	,610	,313
30	,561	,313
32	,512	,250
33	,463	,250
34	,439	,219
36	,415	,219
38	,366	,219
40	,317	,188
41	,293	,156
42	,268	,156
43	,220	,156
45	,171	,094
46	,146	,094
47	,146	,063
48	,122	,063
52	,098	,063
57	,073	,000
64	,049	,000
66	,024	,000
71	,000	,000

Приложение 2 – Изменения показателей селективности и 1-специфичности ROC-кривой при разных уровнях экспрессии ER β

Уровень экспрессии ER β , %	Чувствительность	1-Специфичность
16	1,000	1,000
18	1,000	,967
21	,971	,933
24	,971	,900
26	,943	,900
28	,943	,833
29	,914	,800
31	,886	,767
33	,857	,733
34	,857	,700
35	,857	,667
36	,857	,633
37	,857	,600
38	,829	,600
39	,829	,500
40	,800	,433
41	,771	,433
42	,771	,400
43	,743	,400
44	,743	,367
45	,657	,300
46	,600	,300
47	,543	,233
49	,486	,233
50	,486	,200
51	,457	,200
52	,400	,200
53	,371	,167
54	,343	,133
55	,314	,133
56	,257	,133
58	,200	,067
59	,171	,067
60	,171	,033
61	,143	,033
62	,114	,033
64	,086	,000
65	,057	,000
67	,029	,000
69	,000	,000