

*На правах рукописи*

**БАШАРИНА АННА АЛЕКСАНДРОВНА**

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

14.01.12 – Онкология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович)

**Научные руководители:**

доктор биологических наук, профессор

**Богуш Татьяна Анатольевна**

доктор медицинских наук, профессор

**Тюляндин Сергей Алексеевич**

**Официальные оппоненты:**

**Высоцкая Ирина Викторовна**, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры онкологии лечебного факультета федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет)

**Гривцова Людмила Юрьевна**, доктор биологических наук, заведующая отделом лабораторной медицины и лабораторией клинической иммунологии Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», г. Москва

Защита состоится «1» апреля 2021 года в 13-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115478, г. Москва, Каширское шоссе, д.23).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115478, г. Москва Каширское шоссе, д.24) и на сайте [www.ronc.ru](http://www.ronc.ru)

Автореферат разослан «.....» .....2021 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

**Кадагидзе Заира Григорьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

В последние годы разочаровывающие результаты применения таргетных препаратов вновь стимулировали исследование предиктивных маркёров эффективности широко используемых классических цитостатиков. В частности, для рака 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 платиносодержащей химиотерапии могут являться показатели экспрессии в ткани рака яичников эстрогеновых рецепторов (ER) разных типов – ER $\alpha$  и ER $\beta$ . С одной стороны, в клинических исследованиях показано, что эффективность платиносодержащей химиотерапии рака яичников коррелирует с пролиферативной активностью опухоли (M.J. Battista, 2014; U. Kucukgoz Gulec, 2014). С другой стороны, в фундаментальных исследованиях описано участие ER $\alpha$  и ER $\beta$  (в ряде работ – диаметрально противоположное) в реализации пролиферативных стимулов, регулирующих рост нормальных и опухолевых клеток (Bossard C., 2012). Сопоставив эти данные, мы и предположили возможный вклад ER $\alpha$  и/или ER $\beta$  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 $\alpha$  и ER $\beta$  в качестве объекта настоящего исследования послужил возродившийся в последние годы интерес к антиэстрогенам при лечении опухолей разных локализаций, 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 (Lindemann K., 2017). Более того, в клинических рекомендациях Российского общества клинической онкологии антиэстроген тамоксифен рекомендован как дополнительная опция при лечении рака яичников низкой степени злокачественности (Тюляндин С.А., 2019). Однако вопрос о предиктивных маркёрах 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 $\alpha$ ? ER $\beta$ ? или коэкспрессия ER $\alpha$  и ER $\beta$ ? Мы считаем, что ответ на этот вопрос необходим для включения антиэстрогенов в практику терапии рака яичников и только количественная характеристика показателей экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  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 $\alpha$  и ER $\beta$  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 $\alpha$  и ER $\beta$ , 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 флуоресценции и т.д.

2. Используя разработанный методический подход, провести количественную оценку уровня и интенсивности экспрессии в ткани рака яичников ER $\alpha$  и ER $\beta$  (суммарно в хирургических биопсийных образцах опухоли не менее 70 больных).

3. Оценить ассоциативную связь между выявленными показателями экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$ .

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

5. Методом однофакторного анализа оценить корреляцию количественных показателей экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  с клиничко-морфологическими характеристиками заболевания.

6. В группе больных, унифицированных по клиничко-значимым характеристикам заболевания, и в общей когорте пациенток оценить методом однофакторного анализа корреляцию количественных показателей экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  с продолжительностью безрецидивного периода болезни после завершения первой линии химиотерапии препаратами платины и таксанов.

7. Методом многофакторного анализа оценить независимость клиничко-значимости количественных показателей экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  как предикторов

эффективности первой линии химиотерапии препаратами платины и таксанов.

8. Сформулировать заключение о клинической значимости количественных показателей экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  в ткани рака яичников в прогнозе эффективности химиотерапии препаратами платины и таксанов и определить перспективы новой опции лечения рака яичников – антиэстрогеновой терапии.

#### **Методы и методология исследования**

В работе использован разработанный и запатентованный коллективом лаборатории иммунофлуоресцентный метод, ассоциированный с проточной цитометрией, для изучения маркёров солидных опухолей человека (Т.А. Богуш, 2012). Данный метод обладает рядом преимуществ по сравнению с рутинно используемым в клинической практике иммуногистохимическим исследованием. При полном исключении субъективизма в оценке результатов и значительного «смягчения» процедуры пробоподготовки метод позволяет количественно исследовать экспрессию интересующего белка в большой популяции опухолевых клеток, что в значительной степени решает проблему гетерогенности опухоли.

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

Статистическая обработка результатов проведена с использованием пакетов прикладных программ STATISTICA 12.0 и GraphPad Prism 6.0, SPSS 22.0.

Для выявления предиктивной значимости ER $\alpha$  и ER $\beta$  в качестве маркёров эффективности первой линии химиотерапии препаратами платины и таксанов прослежена безрецидивная выживаемость 74 больных раком яичников. Разделение больных на группы сравнения проведено по уровню и интенсивности экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$ . Анализ безрецидивной выживаемости пациенток с разным уровнем и интенсивностью экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  проведён методом Каплана–Майера, регрессионной Cox-модели, построением ROC-кривых.

#### **Научная новизна**

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

Впервые на большом клиническом материале строго количественно

охарактеризованы показатели экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  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 $\alpha$  и ER $\beta$  с клинико-морфологическими характеристиками болезни и объемом хирургического циторедуктивного вмешательства.

На большом клиническом материале проведена оценка корреляции количественных показателей экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  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 $\alpha$  и/или ER $\beta$  как предиктивных маркёров эффективности данной терапии.

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

Результаты количественной оценки показателей частоты, уровня и интенсивности экспрессии и коэкспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  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 $\alpha$  и ER $\beta$ , 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 $\alpha$  и ER $\beta$ , которые вносят существенный

вклад в реализацию механизмом резистентности к цитостатикам и другим повреждающим воздействиям.

Что касается возможности выявления предиктивной значимости количественных показателей экспрессии ER $\alpha$  и/или ER $\beta$  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 проведённого 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 $\alpha$  и ER $\beta$  явятся необходимым аргументом для включения антиэстрогенов в клиническую практику терапии рака яичников.

#### **Личный вклад автора**

Автором лично проведен анализ научной литературы по теме диссертации. Автор принимал непосредственное участие в постановке целей и задач настоящего исследования, их экспериментальной реализации, анализе и обобщении данных, изложении полученных результатов в виде научных публикаций.

#### **Соответствие диссертации паспорту**

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – Онкология, конкретно пункту 2 «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)».

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Ткань рака яичников характеризуется экспрессией эстрогеновых рецепторов разных типов – ER $\alpha$  и ER $\beta$ .
2. ER $\alpha$  и ER $\beta$  могут коэкспрессироваться в одних и тех же клетках опухоли.
3. ER $\beta$  – главная потенциальная мишень гормональной терапии рака яичников.
4. Клинические прогностические характеристики рака яичников (возраст пациентки, стадия болезни, степень злокачественности опухоли) не коррелируют с показателями экспрессии как ER $\alpha$ , так и ER $\beta$ .
5. Благоприятным предиктивным маркёром эффективности первой линии химиотерапии рака яичников с включением препаратов платины и таксанов является

высокий уровень экспрессии в опухоли как ER $\alpha$ , так и ER $\beta$ .

6. Благоприятным предиктивным маркером эффективности первой линии химиотерапии рака яичников с включением препаратов платины и таксанов является высокая интенсивность экспрессии в опухолевых клетках как ER $\alpha$ , так и ER $\beta$ .

7. Низкий уровень коэкспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  – наиболее информативный неблагоприятный предиктивный маркер.

8. ER $\beta$  – независимый предиктор эффективности первой линии химиотерапии серозного рака яичников препаратами платины и таксанов.

### **Внедрение результатов исследования**

Разработанная методика иммунофлуоресцентного окрашивания, ассоциированного с проточной цитометрией, используется в группе молекулярных маркеров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей для оценки экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  в солидных новообразованиях.

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 конференция "Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы достижения, перспективы", 2018; Международной научной конференции «Ломоносов», 2018; Конгресс молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины», 2018; Национальный конгресс «Онкология репродуктивных органов», 2018; IV Всероссийской конференции по молекулярной онкологии, 2018; 6th Asia Pacific Congress of Interventional Oncology, 2019; Международной научной конференции «Ломоносов», 2020.

### **Апробация**

Апробация диссертации состоялась 9 октября 2020 года на совместной научной конференции лабораторий и отделений НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, НИИ канцерогенеза, НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 25 печатных работ, из них 17 – в отечественных и зарубежных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

### **Объем и структура работы**

Диссертация написана в традиционном стиле, состоит из введения, обзора литературы, описание материалов и методов исследования, результатов собственных

экспериментов, заключения, выводов. Работа изложена на 101 странице компьютерного текста, включает 26 таблиц, 28 рисунка, 2 приложения и 169 ссылки на литературные источники, из них – 6 отечественных и 163 зарубежных.

## **СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Исследованы образцы рака яичников, полученные во время хирургической первичной циторедукции 74 пациенток, оперированных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2009 по 2016 гг.

В работе использован разработанный и запатентованный коллективом лабораторией иммунофлуоресцентный метод, ассоциированный с проточной цитометрией, для изучения маркёров солидных новообразований (Т.А. Богуш, 2012). Данный метод обладает рядом преимуществ по сравнению с рутинно используемым иммуногистохимическим исследованием. При исключении субъективизма в оценке результатов и «смягчения» пробоподготовки метод позволяет количественно исследовать экспрессию интересующего белка в большой популяции опухолевых клеток, что в значительной степени решает проблему гетерогенности опухоли.

#### **Получение одноклеточных суспензий из хирургических биопсийных образцов**

Образец опухоли до 2 см в диаметре измельчали острыми ножницами и инкубировали в растворе Версена при 37°C 30 мин. Полученную «кашицу» шестикратным аккуратным движением пестика гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе, фильтровали через фильтр с диаметром пор 40 мкм, центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин. Осадок ресуспендировали в растворе фосфатного буфера и при встряхивании в течение 2 мин фиксировали формальдегидом в конечной концентрации 4%.

#### **Имунофлуоресцентное окрашивание ER $\alpha$ и ER $\beta$ и проточная цитометрия**

Инкубацию клеток (200 тыс. клеток/мл.) с первичными антителами к ER $\alpha$  (клон SP1, Abcam) или к ER $\beta$  (клон 14c8, Abcam) в конечном разведении 1:80 и 1:200, соответственно, проводили в темноте при 4°C в течение 16-20 ч (ночь). Вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом DyLight650 (ab98729 или ab98510, Abcam) в конечном разведении 1:1000, добавляли после отмывки клеток 2 мл 0,5% раствора бычьего сывороточного альбумина и инкубировали в течение 1,5 ч. Для выведения из анализа дебриса и эритроцитов клетки инкубировали 15 мин с красителем ДНК Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) в концентрации 1,2 мкг/мл.

При двойном иммунофлуоресцентном окрашивании проводили одновременно ночную инкубацию клеток с первичными антителами к ER $\alpha$  и к ER $\beta$ . Для детекции ER $\alpha$  и ER $\beta$  клетки инкубировали 1,5 ч с вторичными антителами, конъюгированными с

флуорохромом DyLight 488 (ab96899, 1:120) и DyLight 650 (ab98510, 1:1000), соответственно.

Измерение флуоресценции проведено на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter). Регистрация сигнала флуоресценции красителей DyLight488, DyLight650 и Hoechst 33258 проведена в каналах FL-1, FL-6 и FL-9, соответственно.

### Статистический анализ данных

Анализ данных проведен с использованием критерия Шапиро–Уилка, t-критерия Стьюдента, one-way ANOVA, ROC-анализа и коэффициента корреляции Пирсона. Для анализа выживаемости пациенток использован метод Каплана–Майера (тест log-rank) и регрессионная модель Кокса. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Расчеты проведены в программах STATISTICA 12.0; GraphPad Prism 6.0; IBM SPSS Statistics 22; FlowJo 10.0.8. и WinMDI 2.9.

### Результаты исследования

#### Экспрессия эстрогеновых рецепторов (ER) в ткани рака яичников

Исследование проведено на хирургических образцах рака яичников 74 пациенток с гистологически верифицированным серозным подтипом рака яичников, получивших стандартную первую линию химиотерапии препаратами платины и таксанов (Таблица 1). В большинстве случаев (около 80% и более) у больных диагностирована III и IV стадии заболевания, высокая степень злокачественности, выполнена неоптимальная циторедукция и проведено 6 курсов химиотерапии.

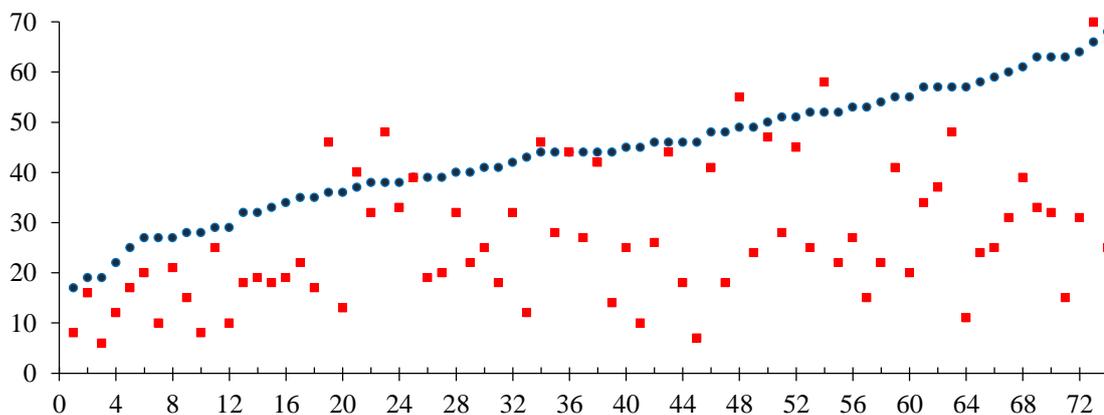
Таблица 1 – Клинико-морфологические характеристики заболевания пациенток, включенных в исследование, с гистологически верифицированным серозным подтипом рака яичников (средний возраст: 53 года, n=74)

Показатель		Количество пациентов (%)
Стадия заболевания	I - II	15 (20,2%)
	III - IV	59 (79,8%)
Степень злокачественности	низкая	12 (16,3%)
	высокая	62 (83,7%)
Объем циторедукции	оптимальная	15 (20,2%)
	неоптимальная	59 (79,8%)
Количество курсов химиотерапии	4, 7 или 8	9 (12,3%)
	6	65 (87,8%)

Оценка экспрессии ER в ткани рака яичников проведена по двум показателям. Уровень экспрессии маркера – количество клеток, экспрессирующих маркер (в %). Интенсивность экспрессии ER – количество маркера, экспрессируемого в клетке:

отношение средней интенсивности флуоресценции клеток в опыте к контролю – инкубация клеток только с вторичными антителами.

На рисунке 1 представлены данные, характеризующие экспрессию и коэкспрессию ER $\alpha$  и ER $\beta$  в опухолевой ткани больных серозным раком яичников. Образцы опухолей ранжированы по уровню экспрессии ER $\beta$  от минимального до максимального значения (синие круги). Красные квадраты – показатели уровня ER $\alpha$  в той же опухоли.



**Рисунок 1** – Характеристика уровня экспрессии и коэкспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  в опухолевой ткани больных раком яичников. По оси абсцисс – номера образцов, ранжированные от минимального до максимального уровня экспрессии ER $\beta$ . По оси ординат – уровень экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$ , %: синие круги – ER $\beta$ , красные квадраты – ER $\alpha$

Видно, во всех случаях в опухолевой ткани выявлена коэкспрессия ER $\alpha$  и ER $\beta$ , при этом отмечены различия между больными, то есть молекулярная гетерогенность ткани рака яичников по уровню экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$ . В подавляющем большинстве случаев (в 61 из 74 исследованных опухолей – в 82%) уровень экспрессии ER $\beta$  значительно превысил показатель для ER $\alpha$ . И только в 13 случаях (около 18%), уровень экспрессии ER $\alpha$  оказался выше или практически идентичен показателю для ER $\beta$ .

Данные, представленные в таблице 2, подтверждают описанный феномен: среднее значение и медиана уровня экспрессии ER $\beta$  более чем в 1,5 раза превышают значения для ER $\alpha$  ( $p < 0,001$ ). А о молекулярной гетерогенности исследованной когорты опухолей по уровню ER $\alpha$  и ER $\beta$  свидетельствуют значительные различия между минимальными и максимальными значениями уровня экспрессии этих маркёров у разных больных: для ER $\alpha$  – 6% и 70%, для ER $\beta$  – 17% и 68%.

Интересный факт обнаружен при анализе данных о коэкспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$ . Оказалось, что одной и той же опухоли суммарный показатель уровня экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  может превышать 100%, что позволяет утвердительно ответить на вопрос о возможности внутриклеточной коэкспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$ , то есть о коэкспрессии обоих

маркёров в одних и тех же клетках исследованной опухоли. Это заключение подтверждено в экспериментах при двойном иммунофлуоресцентном окрашивании ER $\alpha$  и ER $\beta$  (Рисунок 2). После инкубации клеток с первичными антителами в обеих опухолях выявлен высокий уровень экспрессии как ER $\alpha$  (40% и 45%, диаграммы под №3 на Рисунке 2), так и ER $\beta$  (87% и 43%, диаграммы под №4 на Рисунке 2).

**Таблица 2** – Количественные показатели уровня экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  в ткани серозного рака яичников

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

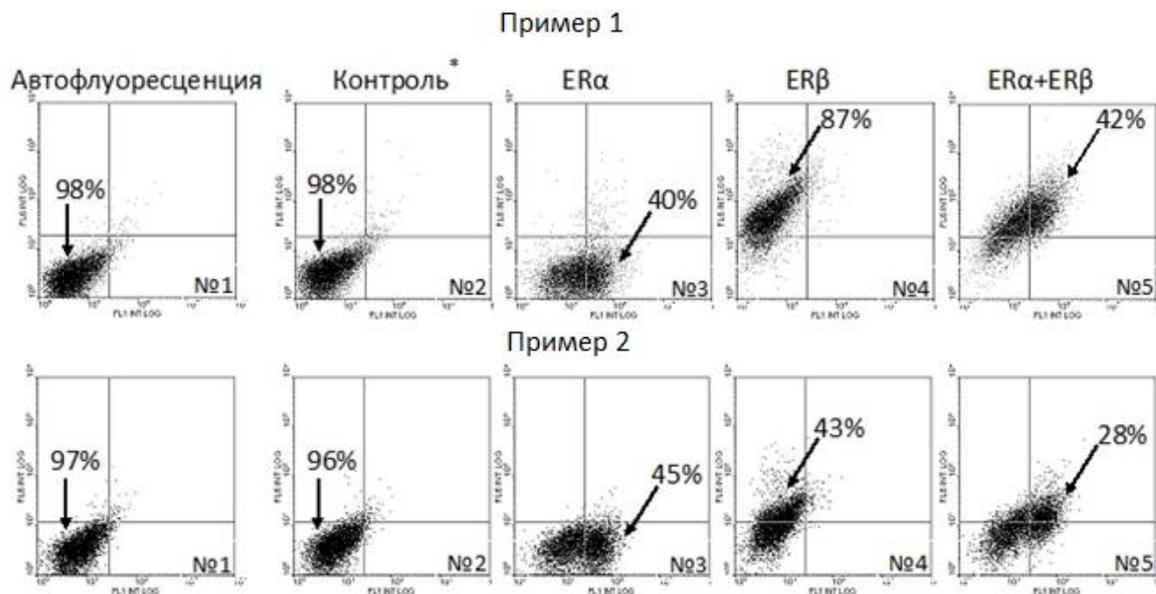
\*M $\pm$ SD – среднее арифметическое значение  $\pm$  стандартное отклонение. \*\* [Q1; Q3] – [нижний квартиль; верхний квартиль]. \*\*\* p – достоверность различий между показателями уровня экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$ , рассчитанная методом t-критерия Стьюдента. \*\*\*\*p – нормальность распределения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

На диаграммах под №5 (Рисунок 2) представлены результаты двойного окрашивания клеток рака яичников антителами как к ER $\alpha$ , так и к ER $\beta$ . В обеих опухолях выявлены клетки, коэкспрессирующие эти маркёры (правые верхние квадранты). Обращает внимание тот факт, что в первом образце во всех клетках с экспрессией ER $\alpha$  выявлена и коэкспрессия ER $\beta$ , тогда как во втором – только около половины клеток, экспрессирующих ER $\alpha$  (28% из 45%), коэкспрессировали и ER $\beta$ , при этом в обоих случаях выявлены клетки с экспрессией только ER $\beta$  (левые верхние квадранты на диаграммах под №5 на Рисунке 2).

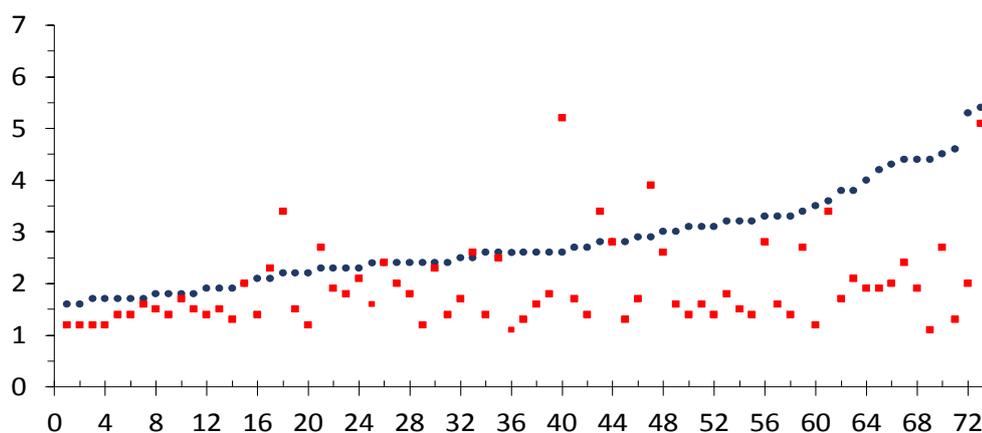
Таким образом, при одиночном иммунофлуоресцентном окрашивании в ткани рака яичников выявлена экспрессия ER разных типов – ER $\alpha$  и ER $\beta$ . Количественные показатели уровня экспрессии ER $\beta$  оказались выше по сравнению с ER $\alpha$ , при этом во всех образцах опухолей отмечена коэкспрессия обоих маркёров. При двойном иммунофлуоресцентном окрашивании клеток рака яичников выявлена коэкспрессия ER $\alpha$  и ER $\beta$  не только в разных, но и в одних и тех же клетках новообразования.

Результаты оценки интенсивности экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  приведены на Рисунке 3. Образцы опухолей были ранжированы по интенсивности экспрессии ER $\beta$  от минимального до максимального значения (синие круги). Красные квадраты – показатели уровня ER $\alpha$  в той же опухоли. Как и в случае с уровнем экспрессии маркёров (Рисунок 1),

в преобладающем большинстве случаев (81,0%), интенсивность экспрессии ER $\beta$  в образцах выше, чем ER $\alpha$ . И только в 14 случаях (менее 20%), интенсивность экспрессии ER $\alpha$  была выше или практически идентичной, показателя ER $\beta$ .



**Рисунок 2** – Примеры двойного иммунофлуоресцентного окрашивания клеток рака яичников антителами к ER $\alpha$  и ER $\beta$ . По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции ER $\alpha$ ; по оси ординат – ER $\beta$ . Представлены точечные диаграммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитометре: №1 – автофлуоресценция (левый нижний квадрант); №2\* – инкубация с вторичными антителами (контроль, левый нижний квадрант); №3 и №4 – клетки, экспрессирующие ER $\alpha$  или ER $\beta$  (правый нижний и левый верхний квадранты, соответственно); №5 – клетки, коэкспрессирующие ER $\alpha$  и ER $\beta$  (правый верхний квадрант)



**Рисунок 3** – Характеристика интенсивности экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  в ткани рака яичников. По оси абсцисс – номера образцов опухолей, ранжированные от минимальной до максимальной интенсивности экспрессии ER $\beta$ . По оси ординат – интенсивность экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$ , усл. ед.: синие круги – ER $\beta$ , красные квадраты – ER $\alpha$

Данные, представленные в таблице 3, подтверждают описанный феномен: среднее значение и медиана интенсивности экспрессии ER $\beta$  в полтора раза превышают значения для ER $\alpha$  ( $p < 0,001$ ). А о молекулярной гетерогенности исследованной когорты опухолей по интенсивности экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  свидетельствуют различия (около 4 раз) между минимальными и максимальными значениями показателя маркёров у разных больных: для ER $\alpha$  – 1,2 и 5,2 усл.ед, для ER $\beta$  – 1,6 и 6,5 усл.ед.

**Таблица 3** – Количественные показатели интенсивности экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  в ткани серозного рака яичников

Подтип ER	Показатели интенсивности экспрессии маркёров, усл.ед.			ER $\alpha$ vs ER $\beta$ p****	Нормальность распределения p*****
	min/max	Среднее значение (M $\pm$ SD)*	Медиана [Q1; Q3] **		
ER $\alpha$	1,2/5,2	1,9 $\pm$ 0,8	1,7 [1,4; 2,2]	<0,001	0,08
ER $\beta$	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. \*\* [Q1; Q3] – [нижний квартиль; верхний квартиль]. \*\*\*\*p – достоверность различий между показателями уровня экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$ , рассчитанная методом t-критерия Стьюдента. \*\*\*\*\*p – нормальность распределения рассчитана критерием Шапиро-Уилка.

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 $\alpha$ .

Для перехода к следующему разделу исследования необходимо ввести понятия высокий и низкий показатель экспрессии маркёра. Поскольку распределение опухолей по показателям уровня и интенсивности экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  было нормальным (Таблицы 2 и 3), 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. Опухоли с показателем экспрессии маркёра меньше медианы, составили группу низкой экспрессии, а больше или равным медианы — высокой экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$ . Правомерность использования медианы показателей экспрессии как ER $\alpha$ , так и ER $\beta$  в качестве порогового значения деления на группы с высоким и низким уровнем экспрессии маркёров доказана нами при проведении ROC-анализа.

**Связь экспрессии эстрогеновых рецепторов с клинико-морфологическими характеристиками заболевания пациенток с раком яичников**

В таблицах 4 и 5 приведены результаты оценки связи показателей экспрессии эстрогеновых рецепторов с клинико-морфологическими характеристиками заболевания. Как видно из представленных данных, не выявлено взаимосвязи уровня или интенсивности экспрессии ни ER $\alpha$ , ни ER $\beta$  с возрастом, стадией заболевания и степенью злокачественности опухоли, даже на уровне тенденции ( $p > 0,05$ ).

**Таблица 4** – Связь уровня экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  в опухоли с клинико-морфологическими характеристиками заболевания

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

\*n – количество больных; p\*\* – достоверность различий между показателями уровня экспрессии маркеров и клинико-морфологическими характеристиками заболевания, рассчитанная методом t-критерия Стьюдента или ANOVA one-way.

**Таблица 5** – Связь интенсивности экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  в опухоли с клинико-морфологическими характеристиками заболевания

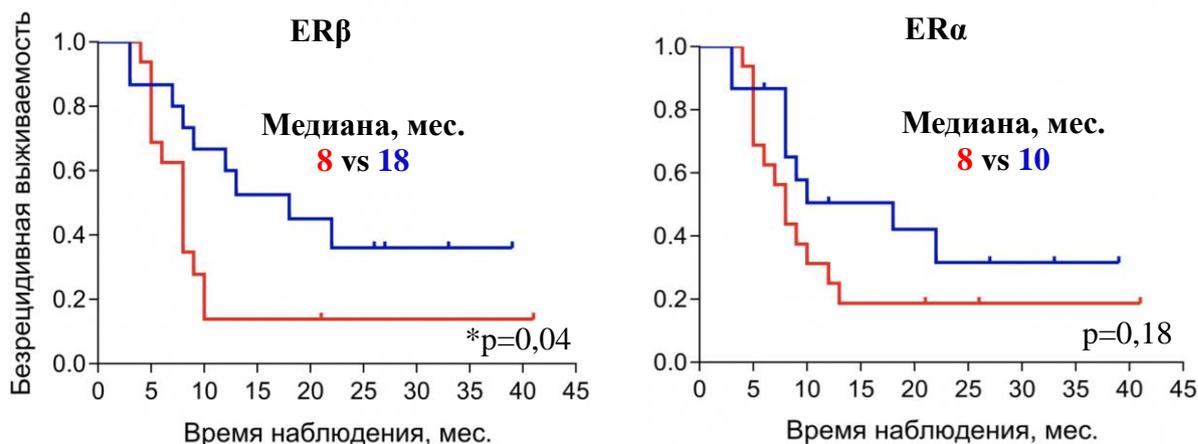
Показатель		n*	Средняя интенсивность экспрессии маркера, усл.ед.			
			ER $\alpha$	p**	ER $\beta$	p**
Возраст, годы	$\leq 50$	31	1,9 $\pm$ 0,5	0,1	42,2 $\pm$ 12,9	0,67
	$> 50$	43	2,0 $\pm$ 0,7		45,1 $\pm$ 11,6	
Стадия заболевания	I	6	2,8 $\pm$ 1,8	0,08	3,1 $\pm$ 1,2	0,93
	II	9	2,0 $\pm$ 0,8		2,8 $\pm$ 1,0	
	III	48	1,8 $\pm$ 1,4		2,8 $\pm$ 1,0	
	IV	11	1,7 $\pm$ 1,1		2,9 $\pm$ 1,0	
Степень злокачественности	Высокая	62	2,0 $\pm$ 0,1	0,44	2,9 $\pm$ 0,1	0,87
	Низкая	12	1,8 $\pm$ 0,2		2,8 $\pm$ 0,2	

n\* – количество больных; p\*\* – достоверность различий между показателями интенсивности экспрессии маркеров и клинико-морфологическими характеристиками заболевания, рассчитанная методом t-критерия Стьюдента или ANOVA one-way.

### Оценка клинической значимости показателей экспрессии ER $\alpha$ и ER $\beta$ на унифицированной когорте больных

Признано, что первый этап клинической оценки опухолевых маркёров необходимо проводить на максимально однородной по характеристикам когорте пациентов. Это позволяет уменьшить «шум» гетерогенности показателей, и повысить вероятность выявления их предиктивной или прогностической значимости (Sargent D., 2002). В нашем случае такую группу составили пациентки (n=31) с III стадией серозного рака яичников высокой степени злокачественности, с неоптимальной циторедукцией, получившие 6 курсов стандартной химиотерапии препаратами платины и таксанов.

Результаты оценки клинической значимости уровня экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  в опухоли представлены на рисунке 4. Видно, что медиана продолжительности безрецидивной выживаемости в группе с высоким по сравнению с низким уровнем ER $\beta$  более чем в 2 раза выше – 18 и 8 мес., соответственно (p=0,04). Более того, риск возврата болезни в группе пациенток с высоким уровнем экспрессии ER $\beta$  более чем в 2,5 раза ниже, чем в группе с низкой экспрессией этого маркёра (p<0,05).



Соотношение рисков возврата болезни:

2,6\* [95% CI 1,5 – 6,2]

Соотношение рисков возврата болезни:

1,6 [95% CI 0,7 – 3,8]

**Рисунок 4** – Безрецидивное течение рака яичников при высоком (синяя кривая) и низком (красная кривая) уровне экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  в опухоли (n=31). \* – различия достигли статической значимости p<0,05

Что касается ER $\alpha$ , то медианы продолжительности безрецидивного периода в группах с высоким и низким уровнем экспрессии ER $\alpha$  были одинаковыми – 10 vs 8 мес., соответственно. Однако можно заметить, что расхождение кривых отмечается на всех сроках наблюдения, начиная с 5 мес., что указывает на тенденцию к более благоприятному течению заболевания в группе с высоким уровнем экспрессии в опухоли

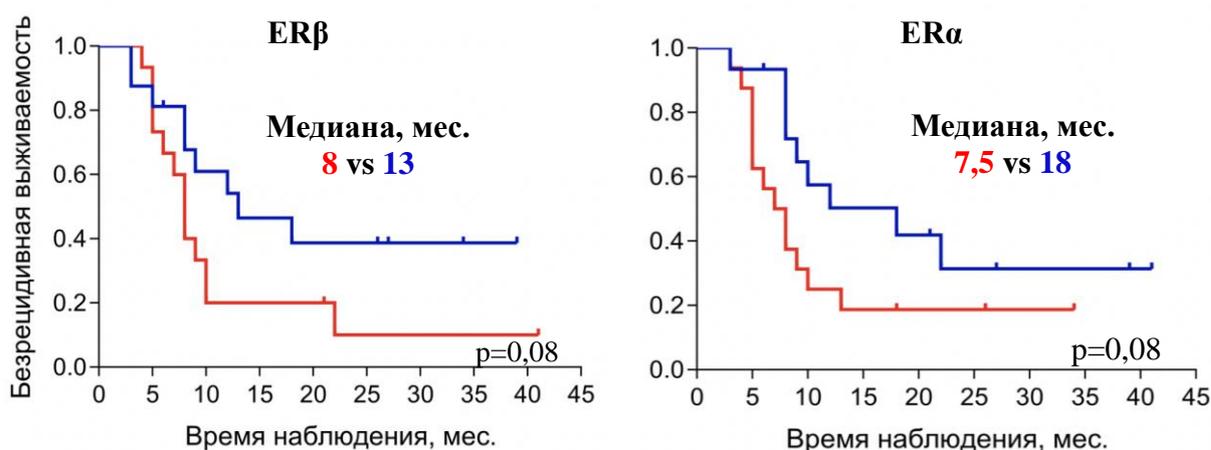
ER $\alpha$  по сравнению с низким значением этого показателя. Более того, риск возврата болезни в группе пациенток с высоким уровнем экспрессии ER $\alpha$  более чем в полтора раза ниже, чем в группе с низкой экспрессией этого маркера. Однако статических значимых различий достигнуто не было.

Таким образом, выявлена благоприятная предиктивная значимость высокого уровня экспрессии ER $\beta$  (статистически значимая) и ER $\alpha$  (на уровне тенденции).

Для показателя интенсивности экспрессии маркеров предиктивная значимость показана на уровне тенденции и для ER $\beta$ , и для ER $\alpha$  (Рисунок 5).

Тем не менее, медиана продолжительности безрецидивного периода в группе с высокой интенсивностью экспрессии ER $\beta$  была более чем в полтора раза выше, чем в группе с низкой – 13 и 8 мес., соответственно, а соотношение рисков возврата болезни, практически достигшее статистической значимой разницы, составило 2,2. Для ER $\alpha$  медиана продолжительности безрецидивного периода в группе с высокой интенсивностью маркера, по сравнению с низкой, была также в 2,4 раза выше – 18 и 7,5 мес., соответственно, при этом соотношение рисков возврата болезни равно 2,5, практически достигло статистической значимости.

Таким образом, аналогично уровню экспрессии ER $\alpha$ , четкая тенденции к благоприятной предиктивной значимости продемонстрирована для высокой интенсивности экспрессии как ER $\alpha$ , так и ER $\beta$ . 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.



Соотношение рисков возврата болезни:

2,2 [95% CI 0,9 – 5,4]

Соотношение рисков возврата болезни:

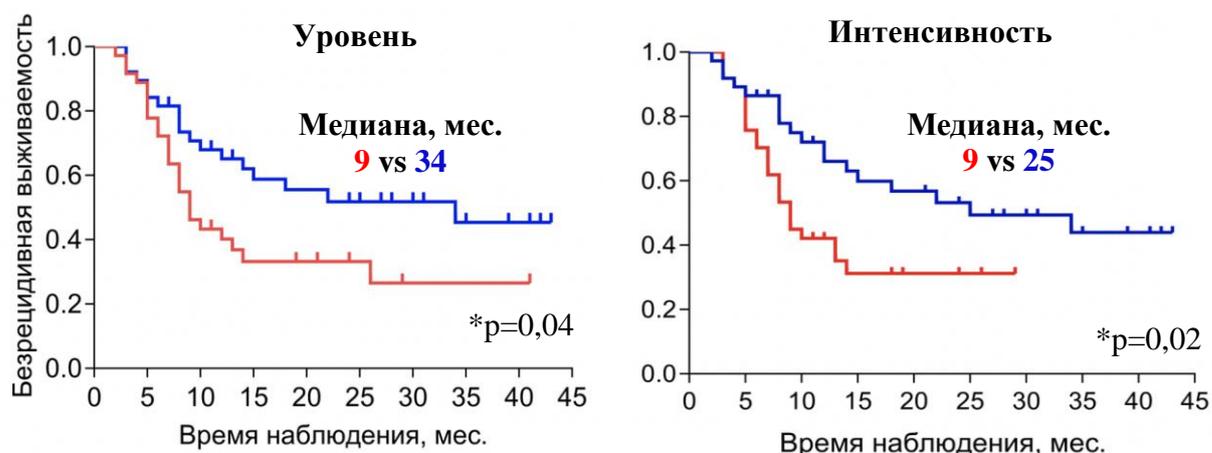
2,5 [95% CI 1,0 – 6,2]

**Рисунок 5** – Безрецидивное течение рака яичников при высокой (синяя кривая) и низкой (красная кривая) интенсивности экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  в опухоли (n=31)

## Оценка клинической значимости показателей экспрессии ER $\alpha$ и ER $\beta$ на общей когорте больных

Задачей этого раздела явилась проверка сформулированного выше представления о предиктивной значимости показателей экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  в ткани рака яичников на всей когорте больных. Как и в предыдущем разделе, мы сравнили группы с низкой и высокой экспрессией ER $\alpha$  или ER $\beta$  в опухоли, проведя деление по медиане показателя.

Видно (Рисунок 6), что у пациенток с низким уровнем экспрессии ER $\alpha$  медиана продолжительности безрецидивного периода в 4 раза меньше, по сравнению с группой с высоким уровнем данного маркера – 9 и 34 мес., соответственно ( $p=0,04$ ). Статистически значимая разница выявлена и при сравнении групп с разной интенсивностью экспрессии ER $\alpha$ . Медиана продолжительности безрецидивного периода у больных с низкой интенсивностью экспрессии ER $\alpha$  оказалась почти в 3 раза ниже по сравнению с высокой интенсивностью экспрессии маркера – 9 и 25 мес., соответственно ( $p=0,02$ ). Более того, риск возврата болезни в группах с низким показателем, как уровня, так и интенсивности экспрессии маркера в сравнении с высокими значениями, оказался почти в 2 раза выше (в обоих случаях  $p<0,05$ ).



Соотношение рисков возврата болезни:

1,9\* [95% CI 1,0 – 3,7]

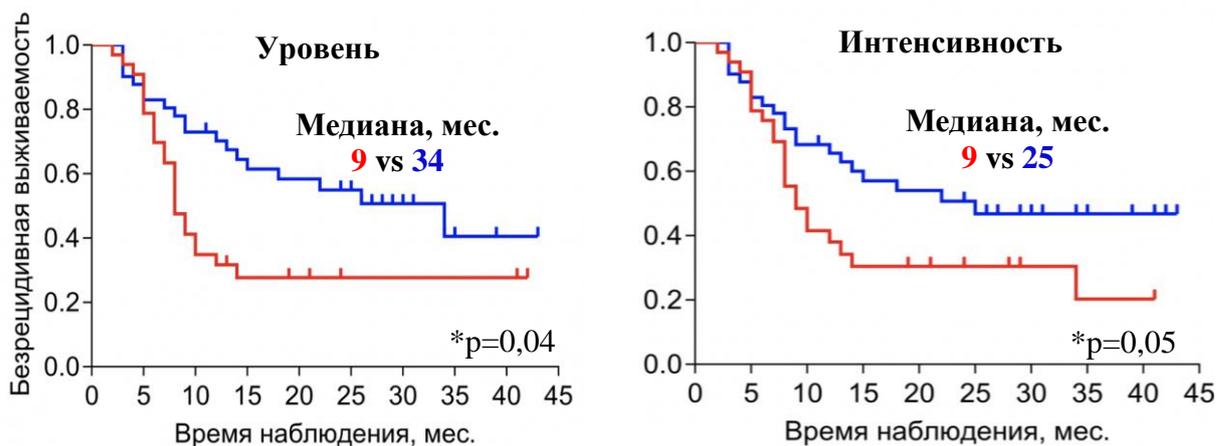
Соотношение рисков возврата болезни:

2,0\* [95% CI 1,2 – 4,2]

**Рисунок 6** – Безрецидивное течение рака яичников при высоких (синяя кривая) и низких (красная кривая) показателях экспрессии ER $\alpha$  ( $n=74$ ). \* – различия достигли статической значимости  $p<0,05$

Результаты аналогичной оценки предиктивной значимости показателей экспрессии ER $\beta$  представлены на рисунке 7. Медиана продолжительности безрецидивного периода у пациенток в группе с высоким уровнем экспрессии ER $\beta$  была почти в 4 раза выше по сравнению с низким уровнем маркера – 34 vs 9 мес., соответственно ( $p=0,04$ ).

Статистически значимая разница выявлена и при сравнении групп с разной интенсивностью экспрессии ERβ. Медиана продолжительности безрецидивного периода у пациенток в группе с высокой интенсивностью экспрессии ERβ оказалась почти в 3 раза выше, по сравнению с низкой интенсивностью экспрессии маркера – 9 и 25 мес., соответственно (p=0,05). Как и в случае с ERα, риск возврата болезни оказался в 2 раза выше в группе пациенток с низким показателем, как уровня, так интенсивности экспрессии ERβ в сравнении с высокими значениями (в обоих случаях, p<0,05).



Соотношение рисков возврата болезни:

2,0\* [95% CI 1,2 – 4,2]

Соотношение рисков возврата болезни:

1,9\* [95% CI 1,1 – 3,5]

**Рисунок 7** – Безрецидивное течение рака яичников при высоких (синяя кривая) и низких (красная кривая) показателях экспрессии ERβ (n=74). \* – различия достигли статической значимости p<0,05

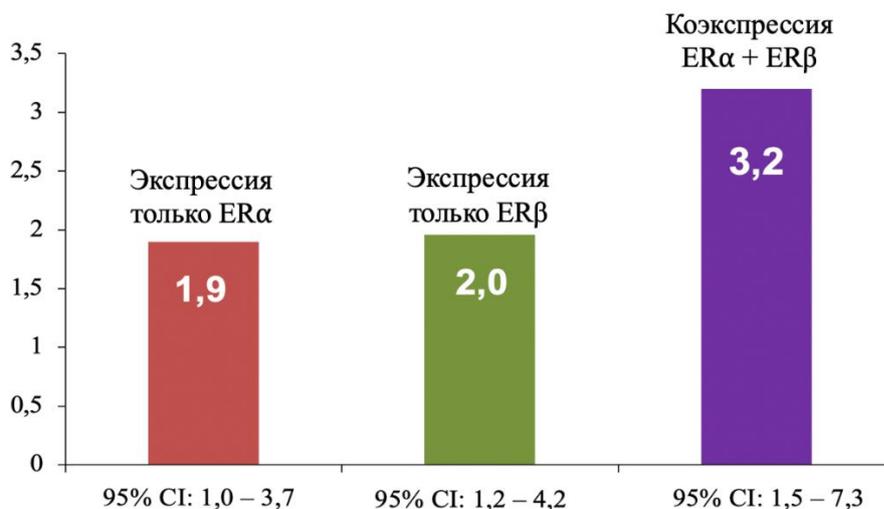
Итак, при анализе общей когорты пациенток (n=74), включенных в исследование, для интенсивности, и для уровня экспрессии как ERα, так и ERβ выявлена предиктивная значимость этих маркеров в прогнозе эффективности химиотерапии препаратами платины и таксанов, причем высокая экспрессия эстрогеновых рецепторов в опухоли является благоприятным показателем.

### Оценка предиктивной значимости коэкспрессии ERα и ERβ в опухоли в прогнозе эффективности препаратов платины и таксанов

Данный раздел посвящен ответу на вопрос: Экспрессия одного типа рецепторов или коэкспрессия ERα и ERβ являются наиболее надёжным предиктором эффективности проведенного лечения?

Для этого проведено сравнение соотношения рисков рецидива болезни в группах с низким vs высоким уровнем маркеров (Рисунок 8). Первая и вторая – соотношение

рисков рецидив болезни в группах с низким vs высоким уровнем только ER $\alpha$  или только ER $\beta$ , соответственно. Третья – соотношение рисков рецидива болезни в группах с низким vs высоким уровнем коэкспрессии одновременно двух маркёров (ER $\alpha$ +ER $\beta$ ).



**Рисунок 8** – Соотношение рисков рецидива рака яичников (hazard ratio) при разном уровне экспрессии и коэкспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  в опухоли. По оси ординат: hazard ratio – соотношение рисков рецидива болезни в группах с низким vs высоким уровнем маркёров. На оси абсцисс: красный и зеленый столбцы – одиночная экспрессия ER $\alpha$  или ER $\beta$ , соответственно; фиолетовый – низкая vs высокая коэкспрессия одновременно двух маркёров (ER $\alpha$ +ER $\beta$ ). 95% CI – 95% доверительный интервал для hazard ratio

Видно, что риск развития рецидива болезни при низком уровне экспрессии только ER $\alpha$  или только ER $\beta$  vs группы с высоким уровнем одного из маркёров одинаков – 1,9 и 2,0 (соответственно, красный и зеленый столбцы). В то же время риск возврата болезни у пациенток с низким уровнем коэкспрессии одновременно двух маркёров в 3,2 раза превысил данный показатель в группе с высоким уровнем ER $\alpha$ +ER $\beta$  в опухоли (фиолетовый столбец).

Таким образом, при исследовании в опухоли одновременно коэкспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  соотношение рисков рецидива болезни более чем в полтора раза выше, чем при определении только одного из типов эстрогеновых рецепторов. Это говорит о том, что количественная оценка в опухоли двух маркёров позволяет точнее предсказать возникновение рецидива заболевания.

Этот важный вывод позволяет рекомендовать оценку в ткани рака яичников обоих рецепторов, так как это сделать более точным прогнозирование рецидив болезни. Конкретно, при выявлении в опухоли низкого уровня экспрессии одновременно и ER $\alpha$ , и ER $\beta$  следует помнить о возможности изначальной резистентности опухоли к препаратам

платины и таксанов.

### Анализ независимости предиктивной значимости ER $\alpha$ и ER $\beta$

На заключительном этапе работы проведена оценка независимости предиктивной значимости показателей экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  методом многофакторного анализа регрессионной модели Кокса при сравнении с клинически значимыми характеристиками болезни – стадия заболевания, степень злокачественности опухоли и объем циторедукции.

Данные, представленные в таблице 6 показывают, что независимая предиктивная значимость выявлена только для двух параметров – стадии заболевания ( $p=0,03$ ) и уровня экспрессии ER $\beta$  в опухоли ( $p=0,01$ ). Для интенсивности экспрессии ER $\beta$ , а также для уровня и интенсивности экспрессии ER $\alpha$  независимость предиктивной значимости выявить не удалось ( $p>0,05$ ).

**Таблица 6** – Оценка независимости предиктивной значимости ER $\alpha$  и ER $\beta$  (регрессионный анализ Кокс)

Параметры	HR [95% ДИ]	p
Стадия заболевания	1,8 [1,1; 3,1]	0,03*
Степень злокачественности	1,0 [0,4; 2,7]	0,99
Объем циторедукции	3,1 [0,86; 11,0]	0,08
Уровень экспрессии ER $\beta$	2,3 [1,2; 4,6]	0,01*
Интенсивность экспрессии ER $\beta$	1,2 [0,49; 3,0]	0,70
Уровень экспрессии ER $\alpha$	1,6 [0,8; 2,9]	0,18
Интенсивность экспрессии ER $\alpha$	1,6 [0,8; 2,9]	0,12

\* – различия достигли статической значимости  $p<0,05$

Таким образом, при многофакторном анализе методом Соx-регрессии показано, что уровень экспрессии ER $\beta$ , но не ER $\alpha$ , обладает независимой предиктивной значимостью в прогнозе эффективности первой линии химиотерапии с включением препаратов платины и таксанов, которую оценивали по показ продолжительности безрецидивного течения рака яичников после завершения этого лечения.

### ВЫВОДЫ

1. Ткань рака яичников характеризуется экспрессией эстрогеновых рецепторов разных типов – ER $\alpha$  и ER $\beta$ , с выраженными различиями у разных больных как по уровню экспрессии в опухоли, так и по интенсивности экспрессии в каждой опухолевой клетке.
2. ER $\alpha$  и ER $\beta$  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 $\beta$ , уровень и интенсивность экспрессии которых более чем в полтора раза превышает данные показатели для ER $\alpha$ .

4. Уровень и интенсивность экспрессии как ER $\alpha$ , так и ER $\beta$  не коррелирует с клинически значимыми показателями – возраст пациентки, стадия болезни, степень злокачественности опухоли.

5. Высокий уровень экспрессии в опухоли как ER $\alpha$  ( $\geq 25\%$ ), так и ER $\beta$  ( $\geq 44\%$ ) 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 $\alpha$  ( $\geq 1,7$  усл.ед.), так и ER $\beta$  ( $\geq 2,6$  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 $\beta$  как предиктора эффективности первой линии химиотерапии серозного рака яичников препаратами платины и таксанов.

#### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Дудко, Е.А. Коэкспрессия эстрогеновых рецепторов  $\alpha$  и  $\beta$  в клетках рака яичников как потенциальный предиктивный маркер чувствительности к гормонотерапии. / Е.А. Дудко, Т.А. Богуш, **А.А. Башарина**, Е.А. Богуш, А.С. Тюляндина, С.А. Тюляндин // Злокачественные опухоли. — 2016. — № 4, S1. — С.252 - 253.

2. Богуш, Т.А. Коэкспрессия эстрогеновых рецепторов  $\alpha$  и  $\beta$  в ткани серозного рака яичников. / Т.А. Богуш, **А.А. Башарина**, Е.А. Богуш, А.С. Тюляндина, С.А. Тюляндин, М.М. Давыдов // Российский биотерапевтический журнал. — 2017. — Т.16, № 4. — С.34-37.

3. Богуш, Т.А. Количественная оценка коэкспрессии эстрогеновых рецепторов  $\alpha$  и  $\beta$  в клетках серозного рака яичников. / Т.А. Богуш, Е.А. Дудко, **А.А. Башарина** О.М. Рябинина, В.Т. Заркуа, Ю.Б. Дьякова, А.С. Тюляндина, С.А. Тюляндин // Российский биотерапевтический журнал. — 2017. — Т. 16, № 1. — С.33 - 34.

4. Bogush, T.A. Flow cytometric analysis of the ERCC1, marker of DNA damage reparation, in the tumor specimens embedded into paraffin blocks. / Т.А. Bogush, Е.А. Dudko,

A.N. Grishanina, **A.A. Basharina**, V.T. Zarkua, E.A. Bogush, B.E. Polotsky, S.A. Tjulandin, M.M. Davydov, M.I. Davydov // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. — 2017. — V.472. — P.9.-11.

5. Bogush, T.A. Estrogen receptors alpha and beta in ovarian cancer: expression level and prognosis. / T.A. Bogush, **A.A. Basharina**, E.A. Bogush, O.M. Ryabinina, A.S. Tjulandina, S.A. Tjulandin // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. — 2018. — V.482. — P. 249-251.

6. Богуш, Т.А. Коэкспрессии эстрогеновых рецепторов  $\alpha$  и  $\beta$  в ткани и клетках серозного рака яичников. / Т.А. Богуш, **А.А. Башарина**, Е.А. Богуш, В.Т. Заркуа, А.С. Тюляндина, С.А. Тюляндин // *Российский биотерапевтический журнал*. — 2018. — Т.17. — С. 6 - 7.

7. **Башарина, А.А.** Уровень экспрессии эстрогеновых рецепторов альфа и бета в ткани рака яичников прогнозирует эффективность химиотерапии препаратами платины и таксанов. / **А.А. Башарина**, Т.А. Богуш, О.М. Рябинина, Е.А. Богуш, А.С. Тюляндина, С.А. Тюляндин // *Злокачественные опухоли*. — 2018. — Т. 8. — № 3, S1. — С. 245-246.

8. **Башарина, А.А.** Эстрогеновые рецепторы бета в ткани рака яичников как предикторы эффективности химиотерапии препаратами платины и таксанов. / **А.А. Башарина**, Т.А. Богуш, А.С. Тюляндина, А.Н. Гришанина, Е.А. Богуш, Н.О. Вихлянцева, С.А. Тюляндин // *Успехи молекулярной онкологии*. — 2018 — Т. 5, № 4. — С. 107.

9. Богуш, Т.А. Эстрогеновые рецепторы как предикторы эффективности химиотерапии рака яичников с включением препаратов платины и таксанов. / Т.А. Богуш, **А.А. Башарина**, Е.А. Богуш, Н.О. Вихлянцева, Г.Ю. Чемерис, К.И. Жордания, А.С. Тюляндина, С.А. Тюляндин // *Онкогинекология*. — 2019. — № 1. — С. 4-9.

10. **Basharina, A.** Prognostic value of estrogen receptor beta tumor expression in non-small cell lung cancer patients after radical surgery. / **A. Basharina**, T. Bogush, E. Bogush, A. Grishanina, O. Ryabinina, N. Vichlzantseva, S. Kolomiytsev, B. Polotsky // *Journal of Thoracic Oncology*. — 2019. — V. 14, N. 10 (supplement). — P. S429.

11. Bogush, T.A. Immunofluorescence analysis of the vimentin expression in epithelial cells. / T.A. Bogush, S.A. Kaliuzhny, **A.A. Basharina**, A.N. Grishanina, Yu.B. Dyakova, E.A. Bogush, V.Yu. Kirsanov, M.M. Davydov // *Moscow University Chemistry Bulletin*. — 2019. — V.74, N. 6. — P. 290-295.

12. Bogush, T.A. Coexpression of vimentin and cytokeratins in human melanoma cell lines. / T.A. Bogush, S.A. Kaliuzhny, **A.A. Basharina**, E.A. Bogush, V.Yu. Kirsanov, V.S. Kosorukov, O.S. Burova, M.M. Davydov, M.A. Baryshnikova // *Moscow University Chemistry Bulletin*. — 2019. — V.74, N. 6. — P. 296-299.

13. **Башарина, А.А.** Сходимость и временная стабильность количественной оценки

экспрессии белка  $\beta$ III-тубулина в ткани солидных опухолей. / **А.А. Башарина**, Т.А. Богущ, Е.А. Рукавишникова, Е.А. Богущ, С.А. Калюжный, Н.О. Вихлянцева, В.С. Косоруков // Российский биотерапевтический журнал. — 2020. — Т. 19, № 3. — С. 52-56.

14. Bogush, T.A. Comparative immunofluorescent analysis of estrogen receptor beta expression in ovarian and breast cancer cell lines. / Т.А. Bogush, **А.А. Basharina**, O.S. Burova, E.A. Bogush, V.Yu. Kirsanov, A.M. Scherbakov, V.A. Syuvatkin, O.M. Ryabinina, M.A. Baryshnikova, V.S. Kosorukov // Moscow University Chemistry Bulletin. — 2020. — V.75, N. 5. — P. 274-279.

15. Bogush, T.A. Immunofluorescent assay of *de novo* vimentin expression in ovarian cancer tissues: surgical specimens compared to paraffin embedded tissue blocks. / Т.А. Bogush, **А.А. Basharina**, E.A. Bogush, A.N. Grishanina, D.M. Sakaeva, V.Yu. Kirsanov, M.M. Davydov, V.S. Kosorukov // Moscow University Chemistry Bulletin. — 2020. — V.75, N. 5. — P. 274 - 279.

16. Bogush, T.A. A new approach to epithelial-mesenchymal transition diagnostics in epithelial tumors: double immunofluorescent staining and flow cytometry. / Т.А. Bogush, **А.А. Basharina**, В.К. Eliseeva, S.A. Kaliuzhny, E.A. Bogush, V.Yu. Kirsanov, M.M. Davydov, V.S. Kosorukov // BioTechniques – 2020. — V. 75, N.5 — P. 274 - 279.

17. **Башарина, А.А.** Валидация метода проточной цитометрии при иммунофлуоресцентном исследовании белковых маркёров в ткани солидных новообразований. / **А.А. Башарина**, Е.А. Рукавишникова, Е.А. Богущ, Н.О. Вихлянцева, А.Б. Равчеева, С.Д. Коломийцев, Т.А. Богущ // Злокачественные опухоли. — 2020. — Т. 10, № 4S1. — С. 117.