

## КОЭКСПРЕССИЯ ЭСТРОГЕНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ АЛЬФА И БЕТА В ТКАНИ СЕРОЗНОГО РАКА ЯИЧНИКОВ

Т.А. Богущ<sup>1</sup>, А.А. Башарина<sup>1,2</sup>, Е.А. Богущ<sup>1</sup>, А.С. Тюляндина<sup>1</sup>, С.А. Тюляндин<sup>1</sup>, М.М. Давыдов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, ул. Ленинские Горы, 1

**Контакты:** Анна Александровна Башарина labmedchem@mail.ru

**Введение.** В последние годы возродился интерес к гормональному лечению рака яичников, в связи с чем возник ряд фундаментальных вопросов, связанных с экспрессией в опухолях этой локализации эстрогеновых рецепторов (estrogen receptors, ER) альфа и бета (ERα и ERβ).

**Цель исследования** — ответить на вопросы, каковы частота и уровень экспрессии ERα и ERβ в ткани рака яичников и возможна ли коэкспрессия ERα и ERβ в разных и/или в одних и тех же клетках новообразования.

**Материалы и методы.** Проведена сравнительная количественная оценка частоты и уровня экспрессии ERα и ERβ в ткани рака яичников (суммарно 20 образцов) с использованием иммунофлуоресцентного метода и проточной цитофлуориметрии, включая разработанный авторами метод двойного флуоресцентного окрашивания.

**Результаты.** Экспрессия ERβ выявлена во всех образцах рака яичников, при этом встречались как ERα<sup>+</sup>-, так и ERα<sup>-</sup>-опухоли. В большинстве (69 %) ERα<sup>+</sup>-опухолей наблюдался низкий (<40 %) уровень экспрессии ERα. Более того, при исследовании опухолей с высоким уровнем экспрессии как ERα, так и ERβ выявлена коэкспрессия данных маркеров в одних и тех же клетках исследованных опухолей.

**Заключение.** В ткани рака яичников ER разных типов — ERα и ERβ — могут экспрессироваться в разных опухолевых клетках, а также коэкспрессироваться как в разных, так и в одних и тех же клетках новообразования.

**Ключевые слова:** рак яичников, эстрогеновые рецепторы альфа, эстрогеновые рецепторы бета, проточная цитофлуориметрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-34-37

### COEXPRESSION OF ESTROGEN RECEPTORS ALPHA AND BETA IN SEROUS OVARIAN CANCER

T.A. Bogush<sup>1</sup>, A.A. Basharina<sup>1,2</sup>, E.A. Bogush<sup>1</sup>, A.S. Tyulyandina<sup>1</sup>, S.A. Tyulyandin<sup>1</sup>, M.M. Davydov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology;  
24 Kashyrskoe Sh., Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

**Background.** In recent years, interest in hormonal treatment of ovarian cancer has revived and a number of fundamental questions associated with the expression in these tumors of different types of estrogen receptors (ER) — ERα and ERβ — have arisen.

**Objective:** to answer the questions, what is the frequency and level of expression of ERα and ERβ in the tissue of ovarian cancer and is it possible co-expression of ERα and ERβ in different and/or in the same tumor cells.

**Materials and methods.** A comparative quantitative assessment of the frequency and level of expression of ERα and ERβ in the tissue of ovarian cancer (a total of 20 samples) was carried out using the immunofluorescence method and flow cytometry, including the method of double fluorescent staining developed by the authors.

**Results.** ERβ expression was found in all ovarian cancer samples, but there are both ERα<sup>+</sup> and ERα<sup>-</sup> tumors. In most ERα<sup>+</sup> tumors (69 % of cases), a low (<40 %) level of ERα expression was observed. Moreover, in the study of tumors with a high level of expression of both ERα and ERβ, co-expression of the markers in the same cells of the examined tumors was revealed.

**Conclusions.** In the ovarian cancer tissue, different types of ER — ERα and ERβ — can be expressed in different tumor cells, as well as co-expressed both in different and in the same tumor cells.

**Key words:** ovarian cancer, estrogen receptors α, estrogen receptors β, flow cytometry

#### Введение

В последние годы возродился интерес к гормональному лечению рака яичников. В клинических исследо-

ваниях тамоксифена [1] и ингибиторов ароматазы [2] при лечении распространенного рака яичников показано, что гормональная терапия практически идентич-

на по эффективности стандартной химиотерапии, но при этом значительно менее токсична. Однако вопрос о предиктивных маркерах ответа на гормональную терапию рака яичников до настоящего времени остается нерешенным.

Оценка экспрессии классических рецепторов эстрогенов (estrogen receptors, ER) альфа — ER $\alpha$  с целью предсказания эффективности тамоксифена или ингибиторов ароматазы не позволила выявить группу больных, у которых отмечается ответ на лечение [3]. Что касается ER бета (ER $\beta$ ), их роль в качестве предиктивного маркера не изучена. Более того, в экспериментальных исследованиях *in vitro* показано, что трансфекция ER $\beta$  в опухолевые клетки, экспрессирующие ER $\alpha$ , приводит к подавлению пролиферации. На уровне клеточного цикла это сопровождается уменьшением числа клеток в S-фазе и увеличением — в фазах G2 и M [4]. Однако в другой работе показано, что в культурах клеток, конститутивно экспрессирующих ER $\alpha$  и ER $\beta$ , антипролиферативные свойства ER $\beta$  не реализуются, а антиэстроген тамоксифен проявляет свой эффект независимо от экспрессии ER $\beta$  [5].

**Цель настоящего исследования** — ответить на вопросы, каковы частота и уровень экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  в ткани рака яичников и возможна ли коэкспрессия ER $\alpha$  и ER $\beta$  в разных и/или одних и тех же клетках новообразования. Это принципиально важные фундаментальные вопросы, ответы на которые позволят в дальнейшем более точно оценить клиническую значимость экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  в ткани рака яичников.

### Материалы и методы

Работа проведена на опухолевых клетках серозного рака яичников, полученных из 20 хирургических биопсийных образцов опухолей. Показатели экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$  оценивали с помощью количественного иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией, разработанного и запатентованного в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [6]. В исследовании использовали первичные моноклональные антитела, специфичные к ER $\alpha$  (клон SP1, ab6660) и к ER $\beta$  (клон 14C8, ab288). Для экспериментов с одиночным окрашиванием ER $\alpha$  и ER $\beta$  использовали вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем DyLight650 (ab98729 и ab98510 соответственно). При двойном иммунофлуоресцентном окрашивании рецепторов в одних и тех же клетках для выявления ER $\alpha$  использовали вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем DyLight488 (ab98729). Все антитела были производства фирмы Abcam (Великобритания).

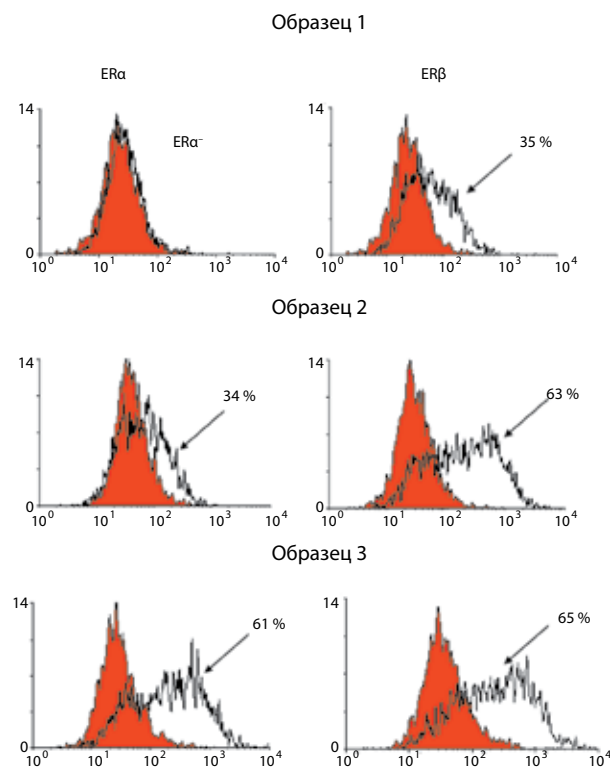
Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Для возбуждения флуоресценции использовали твердотельные диодные лазеры с длиной волны испускаемого света 488 и 638 нм. Регистрацию сигнала флуоресценции красителей DyLight488 и DyLight650 проводили в каналах FL-1 и FL-6 соответственно. Точечные диаграммы распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре получали с помощью программы WinMDI 2.9 (The Scripps Research Institute, США). Число специфически флуоресцирующих клеток рассчитывали с помощью теста Колмогорова—Смирнова, включенного в программу FlowJo 10.0.8 (FlowJo LLC, США).

### Результаты

Для ответа на вопрос, существует ли коэкспрессия ER $\alpha$  и ER $\beta$  в разных клетках ткани одного опухолевого узла, количественные показатели экспрессии рецепторов исследованы в 20 хирургических образцах серозного рака яичников. Согласно принятым в настоящее время правилам, в клинических исследованиях низкий и высокий уровни экспрессии молекулярного маркера определяют относительно медианы показателя, выявленной при исследовании определенной группы опухолей. В нашем случае эта граница составила 40 %, при этом низким считали уровень экспрессии <40 % клеток, экспрессирующих рецептор, а высоким —  $\geq 40$  % клеток.

На рис. 1 представлены примеры гистограмм распределения клеток рака яичников в зависимости от интенсивности флуоресценции клеток после иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к ER $\alpha$  и ER $\beta$ . Видно, что ткань рака яичников характеризуется гетерогенностью экспрессии обоих рецепторов. Другими словами, в исследованной группе больных встречаются опухоли как с низким, так и с высоким уровнем экспрессии ER $\alpha$  и ER $\beta$ .

В исследованной группе образцов рака яичников во всех случаях выявлена в разной степени выраженная экспрессия ER $\beta$ . Примеры, представленные на рис. 1, демонстрируют опухоли с уровнями экспрессии ER $\beta$  35 % (образец 1) и более 60 % (образцы 2, 3). Что касается ER $\alpha$ , то наряду с аналогичными показателями экспрессии маркера, представленными на рис. 1, выявлены и ER $\alpha$ -опухоли. Важно отметить, что опухоли без экспрессии ER $\alpha$  и с уровнем экспрессии этого маркера <40 % встречались почти в 2 раза чаще по сравнению со случаями низкой экспрессии ER $\beta$ : 16 против 9 опухолей из исследованных соответственно. Это свидетельствует о том, что ведущей эстрогеновой мишенью в ткани рака яичников являются ER $\beta$ .



**Рис. 1.** Примеры гистограмм распределения клеток в зависимости от интенсивности клеточной флуоресценции при иммунофлуоресцентном окрашивании. По осям абсцисс — интенсивность специфической флуоресценции (усл. ед.), по осям ординат — число специфически флуоресцирующих клеток; красные гистограммы — после инкубации с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем (контроль), прозрачные диаграммы — после инкубации с антителами к ERα (левый столбец) или ERβ (правый столбец); цифры на гистограммах — уровень экспрессии маркера (%) в разных опухолях (указан стрелками), ERα<sup>-</sup> — отсутствие экспрессии рецептора в образце 1

Выявление в одном и том же образце опухоли как ERα, так и ERβ с очевидностью свидетельствует о возможности коэкспрессии этих маркеров в ткани одной опухоли (см. рис. 1, образцы 2 и 3). С другой стороны, тот факт, что в образце одной и той же опухоли суммарный показатель уровней экспрессии ERα и ERβ может превышать 100 % (см. рис. 1, образец 3), позволяет утвердительно ответить на вопрос о возможности внутриклеточной коэкспрессии ERα и ERβ, т. е. о коэкспрессии обоих маркеров в одних и тех же клетках исследованной опухоли. Это заключение было подтверждено при двойном иммунофлуоресцентном окрашивании ERα и ERβ в клетках из 4 образцов рака яичников с высокой экспрессией обоих рецепторов.

На рис. 2 приведены точечные диаграммы распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции, детектируемой в каналах FL-6 и FL-1 на проточном цитофлуориметре. На диаграммах под № 1 представлена автофлуоресценция клеток

рака яичников. Видно, что при расстановке границ регионов в анализ включаются 97–98 % клеток. Контрольное окрашивание только вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем, показано на диаграммах под № 2. Данные гистограмм свидетельствуют о практически полном отсутствии неспецифического окрашивания. При этом в обеих опухолях выявлен высокий уровень экспрессии как ERα (40 и 45 %, диаграммы под № 3), так и ERβ (87 и 43 %, диаграммы под № 4).

Данные, представленные на рис. 2 на диаграммах под № 5, демонстрируют результаты специфического двойного окрашивания клеток рака яичников антителами к ERα и ERβ. Видно, что в обеих опухолях выявляются клетки, коэкспрессирующие эти маркеры (правые верхние квадранты). В 1-м случае число таких клеток в опухолевом узле составило 42 %, во 2-м — 28 %. Обращает на себя внимание тот факт, что в 1-м образце во всех клетках с экспрессией ERα выявлена и коэкспрессия ERβ, тогда как во 2-м образце только около половины клеток, экспрессирующих ERα, коэкспрессировали и ERβ. В обоих случаях в исследованных опухолях выявлены клетки с экспрессией только ERβ (левые верхние квадранты на диаграммах под № 5).

Таким образом, при стандартном иммунофлуоресцентном исследовании, ассоциированном с проточной цитофлуориметрией, в ткани рака яичников выявлена экспрессия ER разных типов — ERα и ERβ. Количественные показатели частоты и уровня экспрессии ERβ оказались выше по сравнению с ERα, при этом в большинстве опухолей отмечена коэкспрессия обоих маркеров. При двойном иммунофлуоресцентном окрашивании клеток рака яичников выявлена коэкспрессия ERα и ERβ не только в разных, но и в одних и тех же клетках новообразования.

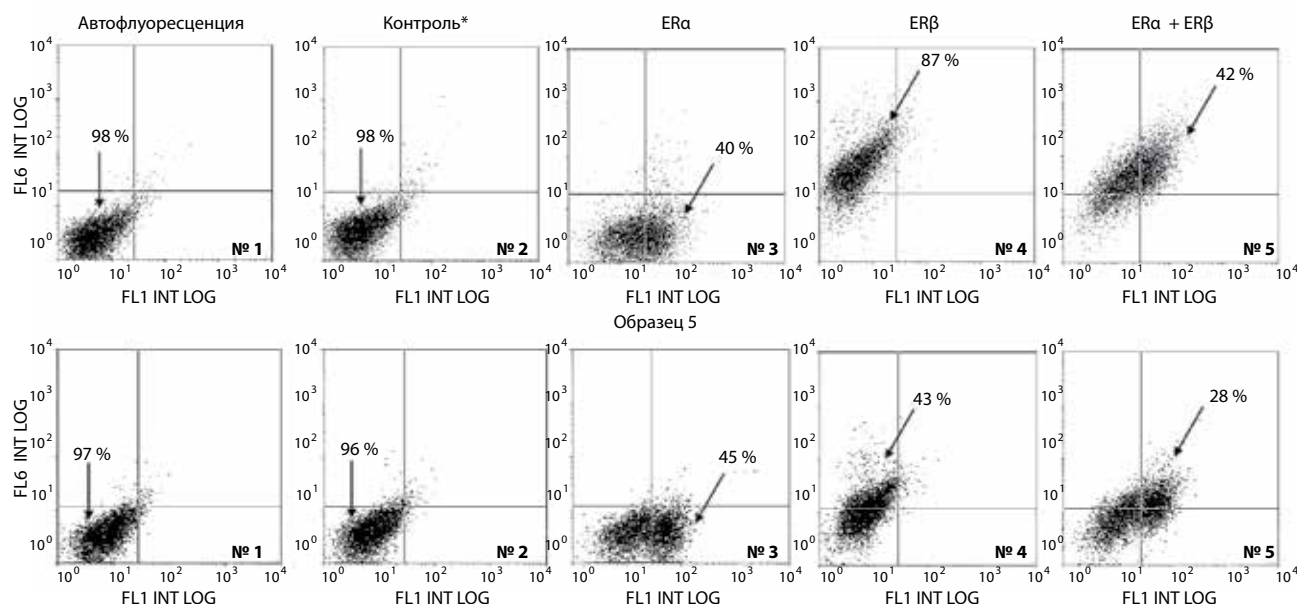
### Выводы

С помощью количественного иммунофлуоресцентного метода с использованием проточной цитофлуориметрии охарактеризована экспрессия ER разных типов в ткани рака яичников. Показано, что основной потенциальной мишенью гормональной терапии опухолей этой локализации, в отличие от рака молочной железы, могут являться ERβ, частота и уровень экспрессии которых существенно превышают показатели для ERα.

Исследование выявило внутриопухолевую гетерогенность экспрессии ERα и ERβ и продемонстрировало, что маркеры могут экспрессироваться в разных опухолевых клетках и коэкспрессироваться как в разных, так и в одних и тех же клетках злокачественного новообразования.

Учитывая данные литературы о разной (возможно, диаметрально противоположной) роли ERα

Образец 4



**Рис. 2.** Примеры двойного иммунофлуоресцентного окрашивания клеток рака яичников специфическими антителами к ERα и ERβ. По оси абсцисс — интенсивность флуоресценции в канале FL-1 для ERα, по оси ординат — интенсивность флуоресценции в канале FL-6 для ERβ. Представлены точечные диаграммы распределения клеток в образцах 2 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 ERα (правый нижний квадрант); № 4 — клетки, экспрессирующие ERβ (левый верхний квадрант); № 5 — клетки, коэкспрессирующие ERα и ERβ (правый верхний квадрант)

и ERβ в реализации стимулирующих и ингибирующих воздействий на клетки пролиферативных регуляторов опухолевого роста, можно предположить, что, наряду с безусловной важностью выявления

одиночной экспрессии в опухолевых клетках одного или другого типа ER, уровень коэкспрессии ERα и ERβ в клетке может нести самостоятельную прогностическую информацию.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 15-04-06 991-а и № 16-34-01 049-мол-а).*

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lindemann K., Gibbs E., Avall-Lundqvist E. et al. Chemotherapy versus tamoxifen in platinum-resistant ovarian cancer: a phase III, randomized multicenter trial (Ovaresist). *Br J Cancer* 2017;116(4):455–63. DOI: 10.1038/bjc.2016.435. PMID: 28118323.
2. Stasenko M., Plegue M., Sciallis A.P., McLean K. Clinical response to antiestrogen therapy in platinum-resistant ovarian cancer patients and the role of tumor estrogen receptor expression status. *Int J Gynecol Cancer* 2015;25(2):222–8. DOI: 10.1097/IGC.0000000000000334. PMID: 25500503.
3. Langdon S.P., Gourley C., Gabra H., Stanley B. Endocrine therapy in epithelial ovarian cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2017;17(2):109–17. DOI: 10.1080/14737140.2017.1272414. PMID: 27967255.
4. Bossard C., Busson M., Vindrieux D., Gaudin F. et al. Potential role of estrogen receptor beta as a tumor suppressor of epithelial ovarian cancer. *PLoS One* 2012;7(9):e44787. DOI: 10.1371/journal.pone.0044787. PMID: 22970307.
5. Jonsson P., Katchy A., Williams C. Support of a bi-faceted role of estrogen receptor beta (ERβ) in ERα-positive breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2014;21(2):143–60. DOI: 10.1530/ERC-13-0444. PMID: 24192230.
6. Богуш Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А. и др. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов бета в солидных опухолях человека. *Вестник Московского университета, серия 2 «Химия»* 2011;52(4):305–12.