

На правах рукописи

КОЗЛОВ
Вадим Викторович

**РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ
РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

03.01.04 – биохимия
14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2014

Работа выполнена в ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ и ФГБУ «НИИ молекулярной биологии и биофизики» СО РАМН

Научные руководители:

д.б.н., профессор **Гуляева Людмила Фёдоровна**
д.м.н., профессор **Войцицкий Владимир Евгеньевич**

Официальные оппоненты:

Сенников Сергей Витальевич, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярной иммунологии «НИИ клинической иммунологии» СО РАМН

Магарилл Юрий Абрамович, к.м.н., доцент, заведующий курсом онкологии ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ

Ведущая организация:

ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ

Защита состоится « » декабря 2014 г. в _____ часов
на заседании диссертационного совета Д 001.034.01 на базе ФГБУ «НИИ биохимии»
СО РАМН по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ биохимии» СО РАМН и на сайте <http://www.niibch.ru/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2014г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.б.н.

Русских Г.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Рак молочной железы (РМЖ) по-прежнему остается одной из наиболее часто встречающихся онкопатологий во многих странах мира, включая Россию. По данным статистики, в 2012 году в РФ заболеваемость РМЖ составила 76,74 на 100 тыс. населения. В свою очередь, смертность составила 29,81 на 100 тыс. (Каприн и др., 2014).

Несмотря на достигнутый прогресс в понимании механизмов канцерогенеза молочной железы, ранняя диагностика РМЖ, а также эффективное лечение остаются до конца не решенными проблемами этого заболевания. Поэтому дальнейшее исследование патологических механизмов, лежащих в основе развития рака молочной железы, выяснение их молекулярных маркеров для ранней диагностики и эффективного лечения, по-прежнему актуально (Имянитов и др., 2010; Suba, 2014).

Исследования в области современной биохимии и онкологии открывают новые возможности для диагностики и лечения рака молочной железы, основанные на молекулярной характеристике каждой опухоли. Сложность исследования и интерпретация данных одновременного анализа многих прогностических факторов затрудняют широкое внедрение в практику полученных результатов (Zhang, Yu, 2011; Clark et al., 2014). В то же время, задачей онкологов является определение набора наиболее значимых, дополняющих друг друга показателей, которые позволили бы при минимально возможной сложности обследования обеспечить максимальную эффективность лечения каждого больного (Глушкова, 2010; Lonning, 2010; Lang et al., 2014).

В настоящее время диагностика РМЖ, а также выбор адекватной тактики лечения определяется с учетом основных клинико-биохимических параметров: возраст больной, менструальный статус, размер опухоли, состояние регионарных лимфатических узлов, уровень рецепторов стероидных гормонов ER, PR, рецептора HER2/neu, маркера пролиферации Ki-67 (Чен и др., 2009; Gucalp et al., 2014). Наибольшее значение среди них имеют такие факторы, как поражение лимфатических узлов, рецепторный и HER2/neu-статусы опухоли, играющие ключевую роль в диагностике, лечении и прогнозе заболевания (Goldhirsch et al.,

2011; Hammond et al., 2011). Так, экспрессия эстрогенового рецептора ER α , прогестеронового рецептора PR в опухоли свидетельствует о ее гормонозависимой природе, что определяет применение тамоксифена или других модуляторов эстрогенового рецептора (Albain et al., 2009; Hashmi et al., 2014; Yang et al., 2014). В качестве эффективных антиэстрогеновых препаратов у женщин с РМЖ в постменопаузе используются ингибиторы ароматазы (Семиглазов и др., 2008; Bulun et al., 2012; Van Asten et al., 2014). Амплификация гена HER/2neu, встречающаяся примерно в трети опухолей молочной железы, является показателем для применения герцептина, антител против этого рецептора или других ингибиторов (Ганьшина, Зейналова, 2008; Li et al., 2013; Schroeder et al., 2014).

В последнее время широко применяется неоадьювантная или предоперационная терапия (химиотерапия, гормональная терапия, лучевая терапия), как стандарт в лечении женщин с РМЖ (Семиглазов и др., 2012; Doval et al., 2013). Однако малоизученным остается вопрос, как меняется рецепторный статус опухоли после проведенной неоадьювантной химиотерапии. Изучение этого вопроса позволит найти более эффективные подходы к гормональному лечению конкретной пациентки с учетом измененного рецепторного статуса и определить прогноз эффективности этой терапии (Colleoni, 2011; Zhang et al., 2014).

В последние годы ведутся также активные исследования по поиску новых маркеров рака молочной железы. Недавнее открытие нового класса малых некодирующих РНК (микроРНК) открыло перспективы дальнейшего исследования биомаркеров РМЖ. Будучи прямо вовлеченными в регуляцию многих клеточных процессов, включая развитие, дифференцировку, пролиферацию, апоптоз и метаболизм клетки, микроРНК (miR) могут выступать в качестве биомаркеров РМЖ (Farazi et al., 2011; Min et al., 2014; Zhong et al., 2014).

Однако несмотря на достигнутый прогресс в диагностике РМЖ с применением современных методов биохимии и генетики, своевременная диагностика РМЖ у пациентов с предопухолевыми заболеваниями молочной железы, на сегодняшний день, остаётся затрудненной (Кушлинский и др., 2005; Zervoudis et al., 2014). Персонализированное лечение больных РМЖ, основанное на знании фенотипа опухоли, с применением химиопрепаратов нового поколения, таргетных и

гормональных препаратов, позволило существенно повысить выживаемость больных (Chopra, 2014). Тем не менее, некоторые проблемы лечения больных РМЖ остаются не решенными, особенно это касается больных с тройным негативным статусом опухоли (Abramson et al., 2014). Поэтому актуальной проблемой остается поиск новых маркеров в дополнение к существующим для улучшения диагностики и лечения больных РМЖ.

Цель и задачи исследования - исследовать роль традиционных маркеров ($ER\alpha$, PR, Ki67) и новых маркеров ($ER\beta$, CYP19, KRT 18 и микроРНК) в диагностике и лечении рака молочной железы.

В соответствии с целями были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ экспрессии ER и PR в злокачественных опухолях, определенных с помощью ОТ-ПЦР и иммуногистохимического анализа.
2. Определить экспрессию генов стероидных рецепторов $ER\alpha$, $ER\beta$, PR, ароматазы (CYP 19) в злокачественных опухолях молочной железы пациентов, получавших различное лечение.
3. Определить уровень экспрессии гена *KRT18* в тканях рака молочной железы и сопоставить данные со стадией процесса и показателем пролиферации Ki67.
4. Измерить экспрессию онкогенных miRs (miR-21,-221,-222,-155) и онкосупрессорную miR-205 в доброкачественных и злокачественных опухолях молочной железы. Оценить взаимосвязь профиля экспрессии miRs с рецепторным статусом опухоли.
5. Изучить общую и безрецидивную 3-х летнюю выживаемость больных в сопоставлении с уровнем экспрессии генов $ER\alpha$, $ER\beta$, PR, *KRT18*.

Научная новизна работы

В работе впервые проведено определение miRs (miR-21,-221,-222,-155,-205) в доброкачественных и злокачественных опухолях. Было показано повышение уровня экспрессии онкогенной miR-21 и miR-155 в 10 и 20 раз соответственно в опухолевой ткани по сравнению с условно нормальной тканью у той же пациентки. В доброкачественных опухолях молочной железы таких изменений не выявлено.

Уровень экспрессии онкосупрессорной miR-205 уменьшался в опухолевой ткани в пределах 15-20 раз по отношению к условно нормальной ткани у той же пациентки. В образцах доброкачественных опухолей молочной железы наблюдалось увеличение экспрессии miR-205 в 10 раз. Эти результаты позволяют рассматривать данные miRs как потенциальные маркеры злокачественной трансформации. Впервые определена взаимосвязь профиля экспрессии miRs с рецепторным статусом опухоли. Наряду с определением традиционных маркеров *ERα*, *PR*, *Ki67* впервые исследованы новые маркеры *ERβ*, *CYP19*, *KRT18* в злокачественных опухолях молочной железы пациентов, получавших неоадьювантную химиотерапию (НАХТ) и не получавших лечение. Впервые для злокачественных опухолей молочной железы проведен сравнительный анализ экспрессии ER и PR, определенных с помощью ОТ-ПЦР и иммуногистохимического анализа. Показано, что данные ОТ-ПЦР совпадают с результатами иммуногистохимического анализа для ER в 86,5 %, для PR – 61, 5 % случаев. Впервые показано, что экспрессия гена *ERβ* не менялась в опухолях с фенотипом ER⁻PR⁻HER⁻ в исследуемых группах, тогда как в опухолях с фенотипом ER⁺PR⁺HER⁻ лишь у больных с НАХТ наблюдалось увеличение экспрессии гена *ERβ* на 25%. В работе впервые определен уровень экспрессии гена *KRT18* в тканях рака молочной железы и сопоставлен со стадией процесса и показателем пролиферации *Ki67*, что позволило рассмотреть его как новый маркер пролиферативной активности. Впервые проведен анализ общей и безрецидивной 3-х летней выживаемости больных в сопоставлении с уровнем экспрессии генов *ERα*, *ERβ*, *PR*, *KRT18*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты важны как для фундаментальной науки, так и клинической онкологии. Выявление изменений в экспрессии новых маркеров (miRs, KRT 18) делают их перспективными в изучении механизмов канцерогенеза молочной железы. Полученные результаты важны также для диагностики и лечения рака молочной железы. Измерение экспрессии miRs (miR-21,-221,-222,-155,-205) в опухолях молочной железы может использоваться для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей молочной железы, а также в качестве кандидатных маркеров злокачественной опухолевой

трансформации. Результаты молекулярной характеристики рака молочной железы с определением экспрессии генов *ERα*, *ERβ*, *PR*, *CYP19*, *KRT18*, как маркеров, важны для дальнейшей тактики лечения пациентов. Гены *CYP19* и *ERα*, экспрессия которых варьирует в разных типах злокачественных опухолей можно рассматривать как молекулярные маркеры для разработки индивидуальных подходов в лечении, использовать ингибиторы ароматазы или селективные эстрогеновые модуляторы для выявленных фенотипов: *CYP 19⁺ERα⁺*, *CYP 19⁺ERα⁻*, *CYP 19⁻ERα⁺*, *CYP 19⁻ERα⁻*.

Молекулярная характеристика опухолей молочной железы по исследуемым маркерам может быть использована для персонализированного подхода к лечению больных РМЖ.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Экспрессия генов стероидных рецепторов *ERα*, *ERβ*, *PR*, ароматазы (*CYP 19*), определяющих фенотип опухоли, варьирует в разных подтипах опухолей. В злокачественных опухолях молочной железы выявляются фенотипы *ER⁺CYP19⁺*; *ER⁺CYP19⁻*, *ER⁻CYP19⁺ER⁻CYP19⁻* с разным статусом *HER2/neu*, что важно для определения тактики лечения РМЖ. Экспрессия гена *ERβ* не менялась в опухолях с фенотипом *ER⁻PR⁻HER⁻* в исследуемых группах, тогда как в опухолях с фенотипом *ER⁺PR⁺HER⁻* только у больных с НАХТ наблюдалось увеличение экспрессии гена *ERβ* на 25%. Доля фенотипа *ERα⁺/ERβ⁻* преобладала в исследуемых группах больных.
2. Экспрессия гена *KRT 18*, маркера пролиферации опухоли, увеличивается в злокачественных опухолях молочной железы, она возрастает с ростом стадии опухолевого процесса, коррелирует с экспрессией *Ki67* и экспрессией *ERα* и *PR*.
3. В злокачественных опухолях молочной железы существенно увеличена экспрессия онкогенных *miRs*(*miR-21,-221,-222,-155*) и снижена экспрессия онкосупрессорной *miR-205*. В доброкачественных опухолях профиль экспрессии данных *miRs* не меняется. Согласно анализу *insilico* *miR-21,-221,-222* регулируют экспрессию *ER*, *miR-155,-221* и *-222* – *PR*, а *miR-21,-205* – *CYP19*. Исследуемые *miRs* не могут взаимодействовать с мРНК *KRT18* и *HER2/neu*.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 7 работ, из них четыре статьи, из списка журналов, рекомендованных ВАК, 1 тезис на Всероссийских и 2 на международных конференциях.

Апробация работы

Результаты работы были представлены и обсуждены на X-й Всероссийской научной конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, Россия, 22-23 марта 2011), EMBOConferenceSeries, NUCLEARRECEPTORS From Molecular Mechanism to Health&Disease (16–20 September, 2011, Sitges, Barcelona, Spain), на XI Всероссийской конференции молодых ученых «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Москва, Россия, 18 ноября 2011), на научно-практической конференции «Современные подходы диагностики и лечения рака молочной железы», проведенной в Новосибирском областном онкологическом диспансере (Новосибирск, 2012), на Международной конференции ХРОМОСОМА 2012 (Новосибирск, Россия, 2–7 сентября, 2012).

Личный вклад автора

При выполнении работы автор лично: принимал участие в обследовании и отборе пациентов для исследования. У большинства пациентов автор самостоятельно выполнял оперативные вмешательства, выполнял забор операционного материала и биопсийных образцов, участвовал в их криоконсервации и транспортировке. Автор участвовал в постановке молекулярно-генетических экспериментов, создал базу клинических данных, провел научную интерпретацию полученных результатов, также опубликовал основные научные статьи.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 146 страницах машинописного текста, состоит из 7 разделов: введение, обзор литературы, материалов и методов, результатов исследования, обсуждение результатов, выводов, практические рекомендации, а так же списка цитируемой литературы. Список цитируемой литературы содержит 26 отечественных и 193 зарубежных источников. Работа проиллюстрирована 21 таблицами, 28 рисунками, 1 схемой.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинические образцы. Для выполнения исследования были взяты образцы операционного материала опухолей молочной железы от 174 больной. Из них с диагнозом рак молочной железы было 149 пациенток, с диагнозом фиброаденома молочной железы – 25 пациенток. Все пациентки находились на лечении в торакальном отделении ГБУЗ НСО Новосибирского областного онкологического диспансера и маммологическом отделении МБУЗ ГКБ № 1 (г. Новосибирск) с 2010 по 2012 гг. Диагноз был поставлен на основании данных гистологического и цитологического анализа. Преобладающим гистологическим типом опухолей молочной железы являлся протоковый инфильтрирующий рак (составил более 90 %) второй степени злокачественности. Рецепторный статус злокачественных опухолей МЖ устанавливался иммуногистохимическим определением рецепторов ER, PR, HER2/neu и Ki67. Для определения уровня экспрессии генов молекулярных маркеров использовали опухолевую ткань молочной железы, удаленную в ходе стандартного хирургического вмешательства по поводу РМЖ (радикальная мастэктомия, радикальная резекция с подмышечной лимфаденэктомией, тунорэктомия). В качестве контроля (условно нормальная ткань молочной железы) считалась ткань молочной железы из наименее изменённых, удалённых от опухолевого узла участков молочной железы одной и той же пациентки.

Определение молекулярных маркеров было проведено в следующих группах больных:

В 1-ой группе исследовались образцы опухолевой ткани 93-х пациенток с диагнозом рака молочной железы стадии T1-3N0-1M0, в возрасте 35–74 года, не получавших неоадьювантную полихимиотерапию (НАХТ) и неоадьювантную лучевую терапию (НАЛТ).

Во 2-ой группе исследовались образцы опухолевой ткани 56-ти пациенток с диагнозом рак молочной железы стадии T1-4N0-1M0-1 в возрасте от 34 до 78 лет (средний возраст $56 \pm 10,4$ года). Из них 43 больных, получавших химиотерапию (2-4 курса по схеме «FAC» или «CAF») или лучевую терапию (n=13) в неоадьювантном режиме.

3-ю группу составляли больные с диагнозом фиброаденома (доброкачественная опухоль молочной железы), в образцах опухолей которых была измерена экспрессия miR (n=25).

Методы исследования. Выделение РНК из опухолевой ткани проводили с использованием набора RNeasy® PlusMiniKit (Qiagen) в соответствии с рекомендациями производителя. Для получения кДНК проводили реакцию обратной транскрипции РНК. Продукты реакции обратной транскрипции использовали для мультиплексной ПЦР. Для определения уровня экспрессии генов *ERα*, *ERβ*, *CYP19*, *PGR*, *KRT18* проводили ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени с использованием Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (2x) на амплификаторе IQ5 (Bio-RadLaboratories). Относительное количество кДНК генов *ERα*, *ERβ*, *CYP19*, *PGR*, *KRT18* в образцах рассчитывалось из уравнения, полученного при построении калибровочной кривой. Каждый образец анализировался в двойном повторе, для последующего анализа рассчитывалось среднее арифметическое значение. Для нормализации образцов по концентрации использовался «нормировочный коэффициент», рассчитанный как среднее арифметическое значение относительного количества кДНК генов *RPL32*, *b-actin*, *Pol-II*.

Для определения уровня экспрессии miR-21,-221,-222,-155,-205 использовали суммарную клеточную РНК, выделенную по стандартному протоколу. В качестве внутреннего контроля использовали малую РНК U6, которая стабильно экспрессируется как в норме, так и в опухоли. Изменение уровня количества miR в опытном образце по отношению к контрольному вычисляли по формуле: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, где $\Delta\Delta Ct = (Ct_{miR} - Ct_{U6})_{\text{опытный обр.}} - (Ct_{miR} - Ct_{U6})_{\text{контр. обр.}}$.

Определение экспрессии ER, PR, HER2/neu и Ki67 в образцах злокачественных опухолей молочной железы проводилось по стандартной методике с использованием иммуногистохимического метода.

Статистическая обработка данных. Обработку данных экспрессии генов *ERα*, *ERβ*, *PR*, *CYP19*, *KRT* вели с помощью программы STATISTICA 6.0. Соответствие распределения значений экспрессии генов *ERα*, *ERβ*, *PR*, *CYP19* и *KRT* в группах нормальному распределению оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для оценки достоверности различий между выборками использовался критерий ².

Выживаемость оценивалась по методу Kaplan-Meier с расчетом доверительного интервала (95% ДИ) по формуле $P \pm 1,96 * \sqrt{P(1-P)/N}$, где P – доля выживших, N – число наблюдений. Достоверность различий показателей выживаемости в группах оценивали с помощью Log-rank-критерия и Gehan's Wilcoxon теста.

Для сравнения результатов экспрессии рецепторов, полученных с помощью ОТ-ПЦР и иммуногистохимическим анализа вычисляли процент совпадения (ПС) по формуле:

$$\sum_{i=1}^n \frac{C(V_i, W_i)}{n} \times 100 = 86,5 \%$$

n=149, где C – функция от 2-х аргументов, определенная следующим образом:

$C(V_i, W_i) = 1$, если $V_i = W_i$ и $C(V_i, W_i) = 0$, если $V_i \neq W_i$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярная характеристика злокачественных опухолей молочной железы, включающая определение экспрессии стероидных рецепторов, тирозин-киназных рецепторов, маркеров пролиферации является сегодня стандартным подходом для диагностики, лечения и прогноза РМЖ.

Рецепторный статус опухолей молочной железы

Важной характеристикой злокачественных опухолей молочной железы является оценка рецепторного статуса, куда входит определение ER α , PR, HER2/neu и Ki-67. Эти показатели определялись в клинике с помощью методов иммуногистохимического анализа (ИГХ). В табл. 1 представлены обобщающие данные по экспрессии рецепторов в исследуемых опухолях молочной железы. В результате было выявлено 77 % гормонозависимых опухолей, 23 % гормононезависимых опухолей и 37 % позитивных по рецептору HER/2neu, что соответствует данным отечественной и мировой литературы (Завьялова и др, 2013; Yang et al., 2011; Zhang et al., 2014).

Таблица 1. Распределение злокачественных опухолей молочной железы по подтипам (n=149)

Фенотип опухоли	Количество больных (%)
Люминальный тип А (ER α ⁺ , PR ⁺ , HER2/neu ⁻ , Ki-67<14%)	18
Люминальный тип В (ER α ⁺ , PR ⁺ , HER2/neu ⁻ , Ki-67>14%)	33
Люминальный тип В (ER α ⁺ , PR ⁺ , HER2/neu ⁺ , Ki-67 любой)	26
ER α ⁻ , PR ⁻ , HER2/neu ⁺ , Ki-67 высокий	11
ER α ⁻ , PR ⁻ , HER2/neu ⁻ , Ki-67 высокий	12

Для поиска новых маркеров РМЖ, в дополнение к определяемым в клинической практике, мы использовали полуколичественный метод ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени. Следует отметить, что при проведении иммуногистохимического анализа экспрессии ER дифференцировать его подтипы (ER α и ER β) не представляется возможным. ОТ-ПЦР позволяет это делать, однако определение рецепторов по уровню мРНК не всегда может отражать содержание белка. В связи с этим одной из задач исследования было провести сравнительный анализ результатов, полученных методами ИГХ и ОТ-ПЦР. Для расчета процента совпадений результатов данных методов была проведена математическая обработка.

Было показано, что совпадение результатов для ER α ИГХ и ОТ-ПЦР регистрируется в 85,9 % случаев. Расхождение результатов в оставшихся 14,1% случаев может быть связано с недостаточной специфичностью метода ИГХ, при котором определяется суммарное содержание всех видов эстрогеновых рецепторов. Тем не менее, в большинстве случаев ОТ-ПЦР показал совпадение с ИГХ. Данные результаты говорят также в пользу транскрипционного механизма увеличения содержания белкового продукта гена *ER*, тогда уровень увеличения мРНК может отражать изменение уровня белка. Большой процент несовпадения результатов (39,5 %) для PR могут свидетельствовать о более сложном механизме регуляции экспрессии данного рецептора.

Таким образом, несмотря на широкое внедрение в клиническую практику иммунохимических методов гистологического анализа РМЖ, остаются проблемы точности такого анализа, связанные с получением ложно-положительных или ложноотрицательных результатов (Ali et al., 2011). Так, при сравнении рецепторного статуса РМЖ методом ИГХ в биопсийных и операционных образцах некоторые исследователи показывают 26,5 % ложноотрицательных и 6,8 % ложноположительных результатов (Seferina et al., 2012). Важно отметить, что предлагаемый нами методический подход позволяет дискриминировать ER α и ER β , которые трудно различимы при использовании иммуногистохимического анализа, который, по последним данным, может пропускать до 10% ER α ⁺ опухолей по сравнению с методом определения уровня мРНК (Iwamoto et al., 2012; Du et al., 2013).

Определение экспрессии рецепторов ER α , ER β и PR в злокачественных опухолях молочной железы

Наряду с ИГХ определением ER и PR, в нашем исследовании было проведено отдельное определение подтипов ER (ER α и ER β) в комбинации с PR, определенных методом ОТ-ПЦР. Такой подход позволяет провести более детальное типирование гормонозависимого ER α ⁺ и гормононезависимого ER α ⁻ фенотипов опухолей. Данные представлены в табл. 2.

Таблица 2. Фенотипы гормонозависимого ER α ⁺ и гормононезависимого ER α ⁻ РМЖ в комбинации с PR

Рецепторный статус опухоли	Больные с диагнозом РМЖ n=149	
	Количество больных	%
ER α ⁺ /PR ⁺	48	32
ER α ⁺ /PR ⁻	-	-
ER α ⁻ /PR ⁺	48	32
ER α ⁻ /PR ⁻	53	36

Из полученных результатов следует, что распределение фенотипов различно в исследуемых группах больных. Обращает на себя внимание отсутствие

фенотипа $ER\alpha^+/PGR^-$, что говорит о том, что функционирование $ER\alpha$ сопряжено с наличием PR. Тогда как остальные 3 фенотипа ($ER\alpha^+/PGR^+$, $ER\alpha^-/PGR^+$, $ER\alpha^-/PGR^-$) распределены равномерно.

Важной оценкой статуса опухоли молочной железы является соотношение рецепторов $ER\alpha$ и $ER\beta$. Гиперэкспрессия $ER\alpha$ в нормальной ткани увеличивает чувствительность к эстрогенам и, как следствие, увеличивает риск возникновения гормонозависимой опухоли. Показано, что пролиферативная активность и доля $ER\alpha$ -позитивных клеток выше в трансформированной ткани, чем в нормальной ткани молочной железы (Lietal, 2010). При этом доля $ER\beta$ в трансформированных тканях заметно снижена. На сегодняшний день одной из ведущих концепций в механизме развития рака молочной железы рассматривается дисбаланс в системе $ER\alpha/ER\beta$, где рецептор $ER\beta$ выполняет роль возможного онкосупрессора (Treeck et al., 2010; Leung et al., 2012). Показано, что в нормальной ткани данное соотношение равно примерно 1:8, т.е. в норме эпителиальные клетки молочной железы экспрессируют 7–10 % $ER\alpha$ и 80–85% $ER\beta$. В опухолевых клетках экспрессия $ER\alpha$ увеличивается в несколько раз, а содержание $ER\beta$ уменьшается, по сравнению с нормальной тканью. Причем степень снижения уровня экспрессии $ER\beta$ зависит от степени пролиферации и дифференцировки трансформированной ткани. Этот факт очень важен, так как эстрогеновый рецептор играет огромную роль в человеческом организме. Предполагается, что он участвует в регуляции следующих функций: антипролиферативное действие, регуляция апоптоза, контроль антиоксидантной генной экспрессии, регуляция иммунного ответа, формирование поведения (Paterni et al., 2014). В 1-ой группе больных не получавших НАХТ двойной позитивный эстроген-рецепторный статус $ER\alpha^+/ER\beta^+$ составляет 17%, в то время как фенотип $ER\alpha^+/ER\beta^-$ встречается гораздо чаще: в 55% случаев. $ER\alpha$ -отрицательные опухоли также распределились неравномерно относительно $ER\beta$: 8% и 20% для $ER\beta^+$ и $ER\beta^-$ соответственно.

Распределение больных по фенотипам $ER\alpha/ER\beta$ во 2-ой группе также было разнообразным. Обращает внимание увеличение $ER\beta$ -позитивных опухолей и снижение $ER\beta$ -негативных. Среднее значение относительного уровня мРНК в группе пациентов, получавших НАХТ составляло 0,42 у.е. \pm 0,15, в группе больных не

получавших терапию – $1,1 \text{ у.е.} \pm 0,36$ ($p < 0,05$). Показатели уровня экспрессии $ER\beta$ в обеих группах достоверно не различался, значения относительного уровня мРНК в 1-ой группе $0,47 \text{ у.е.} \pm 0,29$, во 2-ой группе $0,51 \text{ у.е.} \pm 0,38$.

В нашей работе мы также изучили уровень экспрессии $ER\beta$ в опухолях молочной железы в зависимости от фенотипа опухоли и типа лечения. Показано, что для эстроген-независимых опухолей экспрессия данного рецептора не зависела от типа применяемого лечения, тогда как в случае гормонозависимых опухолей в группе больных с НАХТ наблюдалось увеличение экспрессии $ER\beta$ на 25%. Таким образом, оценка опухолей по рецепторному статусу с позиции $ER\alpha/ER\beta$ может дополнить картину оценки агрессивности опухоли, степени ее злокачественности, прогнозу, ответа на НАХТ и оценки степени патоморфоза после проведенной НАХТ с целью выбора наиболее оптимального адъювантного лечения.

Определение экспрессии рецепторов $ER\alpha$ и ароматазы ($CYP19$) в злокачественных опухолях молочной железы

Одним из важных элементов патогенетического механизма развития гормонозависимого рака является образование эстрогенов из андрогенов *in situ*, катализируемое ароматазой. Поэтому в нашем исследовании была измерена экспрессия $CYP19$ в опухолях с различным гормональным статусом. Уровень экспрессии гена $CYP19$ в 61,3 % опухолей молочной железы был выше в 2,1 - 2,5 раз по сравнению с прилежащей нетрансформированной тканью ($p < 0,01$), тогда как у 38,7 % больных наблюдалось уменьшение экспрессии гена $CYP19$ в 2,6 – 3,4 раза. Этот факт может свидетельствовать о различном вкладе ароматазы в развитие опухолей молочной железы. В нашем исследовании доля «истинно позитивного» фенотипа $ER\alpha^+/CYP19^+$ в 1-ой группе больных составляла 25 %, тогда как фенотип $ER\alpha^+/CYP19^-$ превалировал среди других фенотипов по данным маркерам: его доля составляла 41%. Существование этих фенотипов указывает на тот факт, что усиление экспрессии ароматазы может коррелировать (фенотип $ER\alpha^+/CYP19^+$) или нет (фенотип $ER\alpha^+/CYP19^-$) с увеличением содержания $ER\alpha$. Такая ситуация также свидетельствует в пользу существования разных механизмов формирования гормонозависимой опухоли. Если в первом случае процесс зависит от продукции гормонов, то во 2-м случае налицо другие механизмы, например амплификация гена

ERα. В пользу этого предположения говорят данные о том, что до 23% злокачественных опухолей молочной железы имеют этот генетический дефект (Tomita et al., 2009). Выявление таких фенотипов также важно для тактики лечения, в частности выбора тамоксифена или ингибиторов ароматазы для женщин с РМЖ в постменопаузе. Так, установлено, что назначение тамоксифена и анастрозола вместе или отдельно одного тамоксифена зависит от уровня экспрессии ER (Bago-Horvath et al., 2011).

Распределение ER-негативных опухолей в комбинации с CYP19 составляло 13% и 21% для $ER\alpha^-/CYP19^+$ и $ER\alpha^-/CYP19^-$ соответственно. Выявленный нами фенотип опухоли $ER\alpha^-/CYP19^+$ в клинической практике чаще всего расценивается как гормоннезависимый по показателю $ER\alpha^-$, при этом у этой группы пациенток отвергается гормональное лечение (например, тамоксифеном). Тогда появление в этом фенотипе $CYP19^+$ может стать основанием для эффективного назначения ингибиторов ароматазы. Действительно, в последнее время рассматривается применение, например, новых селективных модуляторов AR для лечения таких больных (Narayanan et al., 2014). В пользу существования таких опухолей говорят недавно полученные результаты, которые показали повышение экспрессии ароматазы в MCF-10A раковых клетках молочной железы, не экспрессирующих $ER\alpha$ (Wang et al., 2013). Аналогичное распределение таких фенотипов получено для больных с НАХТ. Молекулярный анализ злокачественных опухолей молочной железы до и после НАХТ позволяет более эффективно оценить чувствительность к проводимому лечению, а также выбрать наиболее эффективную адъювантную терапию, что является частью индивидуализации лечения рака молочной железы с учетом молекулярных особенностей конкретной опухоли.

Экспрессия гена цитокератина 18 в злокачественных опухолях молочной железы

Наряду с определением экспрессии генов стероидных рецепторов нами была определена экспрессия гена цитокератина 18 (*KRT18*), маркера пролиферации опухоли у пациентов с эпителиально-клеточными карциномами. В рутинных исследованиях *KRT18* может использоваться для контроля терапии и наблюдения пациентов после лечения. Мы оценили уровень экспрессии этого маркера у 93-х больных РМЖ. В пользу его роли в пролиферативных процессах говорит тот факт,

что уровень экспрессии *KRT18* коррелировал, с одной стороны, с экспрессией Ki67, с другой стороны, – со стадией процесса. Так, экспрессия *KRT18* увеличивалась с 0,61 до 1,58 для 1-й и 4-й стадий соответственно. Аналогичные результаты были получены и для группы больных, получавших НАХТ. Более того, в опухолях таких больных было зарегистрировано достоверное снижение экспрессии *KRT18* по сравнению с прилежащей не трансформированной тканью. Этот факт согласуется с данными протеомного анализа, где этот белок также рассматривается как маркер эффективности химиотерапии при РМЖ (Leung et al., 2012). Экспрессия гена *KRT 18* является специфичной для эпителиальных клеток. По мере достижения pCR первичной опухоли с разрастанием соединительной ткани и формированием фиброзного компонента происходит уменьшение цитокератинов в опухолевом узле. Таким образом, экспрессия гена *KRT 18* может рассматриваться как потенциальный маркер положительного ответа на проводимую НАХТ и использоваться для оценки степени агрессивности опухоли.

Мы также оценили экспрессию гена *KRT18* в ER⁺ и ER⁻ опухолях молочной железы. Оказалось, что в группе больных РМЖ практически все гормонозависимые опухоли экспрессировали этот маркер, тогда как в ER-негативных опухолях, напротив, его экспрессия была низкой. Такая взаимосвязь была выявлена нами впервые. Можно предположить, что *KRT18* играет важную роль в процессах эпителиально-мезенхимальной транзиции (ЭМТ) РМЖ. В пользу этого предположения говорят недавно полученные результаты о вовлечении *KRT18* в этот процесс. Так, снижение экспрессии *KRT8/18* во время ЭМТ связывают с процессами метастазирования (Fortier et al., 2013). Недавно показана также роль этого маркера в процессах метастазирования РМЖ. Содержание *KRT8/18* коррелирует с менее инвазивным фенотипом опухоли, что важно для определения прогноза (Iyer et al., 2013).

Исследование экспрессии miRs в злокачественных и доброкачественных опухолях молочной железы

Открытие малых некодирующих регуляторных miRs в последнее десятилетие связывают с развитием злокачественных опухолей, в том числе и развитием злокачественных опухолей молочной железы. Поэтому определение профиля

онкогенных и онкосупрессорных miRs в доброкачественных и злокачественных опухолях молочной железы является актуальной проблемой. Для проведения ПЦР необходима модификация miR или ее кДНК. В работе был разработан оригинальный подход: на стадии обратной транскрипции к miR присоединялся специфичный к ней олигонуклеотидный праймер. Праймер содержал два комплементарных участка, которые создавали «шпильку». Обратная транскриптаза использовала его 3'-конец, как затравку и синтезировала кДНК по матрице miR. Итогом реакции ПЦР являлось образование фрагмента длиной 60 – 70 нуклеотидов, который может быть ограничен праймерами. В настоящем исследовании в качестве референтного гена использовалась мяРНКU₆.

Для анализа профиля экспрессии онкогенных miR-21,-221,-222,-155 и онкосупрессорной miR-205 использовали описанный выше подход с помощью ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени. Эти маркеры определялись в злокачественных (n=30) и доброкачественных (n=25) опухолях молочной железы в сравнении с условно нормальной тканью молочной железы. Участие этих miRs в канцерогенезе молочной железы считается доказанным (Iorio et al., 2011). Результаты исследования представлены в таблице 3.

Таблица 3. Экспрессия miRs в опухолях молочной железы

Больные	n	Изменение по сравнению с нетрансформированной условно - нормальной тканью (разы)				
		miR-21	miR-155	miR-221	miR-222	miR-205
РМЖ	30	↑10*	↑20	↑15	↑15	↓15-20
ФА МЖ	25	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑10

*↑- увеличение; ↓ снижение; ↑↓ - экспрессия не меняется.

Как следует из полученных данных (табл. 3), выбранные нами miRs по-разному экспрессировались в тканях злокачественных опухолей и фиброаденоме молочной железы (ФА МЖ). Обращает на себя внимание существенное увеличение экспрессии miR-21 (в 10 раз), miR-155 (в 20 раз) в образцах РМЖ, тогда как в тканях ФА МЖ этого не наблюдалось. Аналогичные эффекты наблюдались и для miR-221 (увеличение в 15 раз) и -222 (увеличение в 10 раз) при отсутствии такого эффекта в

тканях ФА МЖ. Полученные результаты хорошо согласуются с концепцией канцерогенеза с позиций данных miRs: они все выполняют функцию онкогенов, снижая экспрессию раковых супрессорных генов (Esquela-Kerscher et al., 2006). Так, ранее было установлено, что miR-21 переэкспрессирована в карциноме МЖ, поддерживая, таким образом, выживаемость раковых клеток через ингибирование онкосупрессоров PTEN, PDCD4 and TPM1 (Yan et al., 2008). В свою очередь, miR-221 и miR-222, стимулируя пролиферацию и развитие опухоли, ингибирует онкосупрессор p27Kip (Piva et al., 2013). Наши результаты также подтвердили полученные ранее данные о повышении экспрессии miR-155, негативного регулятора онкосупрессора p53, в трансформированных клетках МЖ (Zhang et al., 2013). Напротив, экспрессия miR-205, обладающей онкосупрессорным действием (Krutovskikh et al., 2010), была существенно (в пределах 15-20 раз) снижена в тканях РМЖ, тогда как в ФА МЖ она понижалась в пределах 10 раз. Эти результаты также согласуются с другими исследованиями, показавшими усиление инвазии трансформированных клеток МЖ, для которых характерен низкий уровень экспрессии этой miR (Wu et al., 2009).

Следующим этапом исследования было определение экспрессии выбранных нами miRs в опухолях молочной железы пациентов, получавших полихимиотерапию или лучевую терапию в неoadьювантном режиме.

Как и в случае больных 1-й группы, в опухолях таких пациентов регистрировалось заметное усиление экспрессии онкогенных miRs. В исследуемых группах пациенток с РМЖ были найдены различия в уровне экспрессии онкогенной miR-21, который повышался в 2 раза после НАХТ, и снижался почти в 3 раза после НАЛТ. Ранее было показано, что повышение экспрессии данной miR ассоциировано с неблагоприятным развитием злокачественного новообразования (Chan et al., 2005). Учитывая этот факт можно заключить, что в исследуемой группе больных НАЛТ выглядит более эффективной, чем НАХТ. Существенных изменений в уровнях экспрессии miR-155 в зависимости от лечения выявлено не было. Аналогичные результаты получены для miR-221 и miR-222. В отличие от этих микроРНК miR-205 отвечала на лечение: в образцах рака молочной железы после НАТ ее экспрессия значительно снижалась, особенно для НАЛТ. Позитивное влияние ПХТ на

экспрессию онкогенных miRs в трансформированных клетках МЖ отмечается и в недавно проведенных исследованиях (Yao et al., 2014).

Важным показателем роли miRs в регуляции уровня мРНК является поиск генов-мишеней, вовлеченных в канцерогенез, в том числе молочной железы. Для этой цели мы провели биоинформатический анализ исследуемых miRs и их потенциальных мишеней, куда мы включили исследуемые нами гены, определяющие фенотип опухоли молочной железы. Для этой цели мы использовали базы данных MirTarBase, DIANA tarbase, Targetscan. Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4. Анализ взаимодействий miRs и их потенциальных мишеней, выполненный с помощью метода *in silico*

	Мишени для микроРНК					
	ER α	ER β	PR	CYP19	KRT18	Her2/neu
Длина 3'-UTR (нуклеотиды)	4307	500	9492	2751	59	618
МикроРНК						
miR-21	++			++		
miR-155	+		++			
miR-221	++		++	+		
miR-222	++	+	++	+		
miR-205	+		+	++		

Примечание: (++) – строгое доказательство, (+) – менее строгое доказательство, что микроРНК взаимодействует с 3'UTR мРНК-мишени.

Как видно из таблицы 4, miR-21, -221, -222 могут регулировать экспрессию ER с большей степенью вероятности, тогда как miR-155, -221 и -222 могут регулировать PR, а miR-21 и -205 – CYP19. Исследуемые микроРНК не могут взаимодействовать с мРНК KRT18 и HER2/neu, что может быть связано с тем, что они содержат короткий 3'UTR участок, особенно KRT18. Одним из объяснений этому явлению может быть также иной механизм регуляции данных рецепторов. Так, сегодня доказано, что

причиной увеличения содержания рецептора HER2/neu является амплификация его гена (Iqbal, Iqbal, 2014).

Оценка общей и безрецидивной выживаемости больных РМЖ в зависимости от экспрессии молекулярных маркеров в опухоли

Основным критерием эффективности проводимого лечения при любых злокачественных опухолях является оценка общей и безрецидивной выживаемости. В нашей работе мы изучили общую и безрецидивную 3-х летнюю выживаемость у 46-ти пациенток и сопоставили с уровнем экспрессии генов *ERα*, *ERβ*, *PR*, *KRT18*. Из 46 пациенток 22 получали НАХТ, остальные 24 не получали предоперационного лечения. Общая и безрецидивная выживаемость оценивались по методу Каплана-Мейера. Результаты оценки показали, что безрецидивная выживаемость равна общей выживаемости, так как с рецидивом выжило только 3 пациентки до конца исследования (38 мес., 40 мес., и 41 мес.), что не повлияло на 3-х летнюю (36 мес.) выживаемость. В результате исследования возможной взаимосвязи уровня экспрессии генов *ERα*, *ERβ*, *PR*, *KRT18* и выживаемостью больных РМЖ было установлено, что общая и безрецидивная выживаемость не зависела от уровня исследуемых молекулярных маркеров. Следует заметить, что на данном этапе исследования полученные результаты не полностью отражают зависимость выживаемости больных с РМЖ от исследуемых нами молекулярных маркеров. Для полной картины оценки взаимосвязи выживаемости и экспрессии исследуемых маркеров необходимо увеличение как выборки больных, так и времени оценки выживаемости (до 5 лет – 10 лет), что планируется выполнять в продолжение данной работы. Тем не менее, с нашей точки зрения, исследуемые маркеры могут являться потенциальными предикторами ответа на проводимое лечение, а, следовательно, и значимыми в прогнозе выживаемости.

ВЫВОДЫ

1. Применяемый метод определения экспрессии стероидных рецепторов ER и PR в опухолях молочной железы с помощью ОТ-ПЦР совпадает с результатами иммуногистохимического анализа в 85,9 % и 61,5 % случаев соответственно.
2. Выявлены различные фенотипы опухолей ER⁺ и ER⁻ в комбинации с экспрессией маркеров *ERβ*, *PR*, *CYP19*, что важно для персонализированного

лечения рака молочной железы, как в адьювантом, так и неоадьювантом режимах.

3. Уровень экспрессии *KRT18* в злокачественных опухолях молочной железы коррелирует с экспрессией маркера пролиферации *Ki67* и со стадией процесса. В 91 % образцов опухолей с ER-позитивным статусом экспрессия *KRT18* была высокой, тогда как в ER-негативных повышение его экспрессии регистрируется в 20 % случаев.
4. Экспрессия онкогенных микроРНК *miR-21*, *-155* в злокачественных опухолях молочной железы увеличивается в среднем в 10 ($p=0.001$) и 20 раз ($p=0.003$) соответственно, аналогичные изменения получены для *miR-221*, *-222*, тогда как экспрессия онкосупрессорной *miR-205* снижается в 15-20 раз ($p=0.005$) в сравнении с прилежащей условно-нормальной тканью. В доброкачественных опухолях молочной железы экспрессия исследуемых *miRs* не меняется.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При формировании стратегии адьювантного лечения рака молочной железы (химиотерапия, гормонотерапия) необходимо учитывать экспрессию генов *ER α* , *ER β* , *CYP19* в опухоли.
2. Для оценки «молекулярного портрета» рака молочной железы целесообразно определять экспрессию генов *ER α* , *ER β* , *PR*, *CYP19*, *KRT18* до начала НАХТ и после лечения методом ОТ-ПЦР.
3. С целью дифференциальной диагностики рака молочной железы и доброкачественных заболеваний может быть использован метод определения экспрессии онкогенных *miR-21*, *-155* и онкосупрессорной *miR-205*.
4. Для повышения эффективности лечения больных РМЖ использовать алгоритм персонализированного подхода с определением новых молекулярных маркеров опухоли *KRT18*, *miR-21*, *-221*, *-222*, *-155*, *-205* в дополнение к определению рецепторного статуса опухоли по экспрессии ER, PR и HER2/neu.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Козлов В.В., Зонова И.А., Филиппенко М.Л., Войцицкий В.Е., Гуляева Л.Ф. Молекулярно-генетическая характеристика РМЖ// Российский Биотерапевтический Журнал. – 2011. – Том 10. – №1. – С. 33.
2. L.Gulyaeva., I.Zonova.,U.Boyarskich., V.Kozlov., V.Voizizkiy. Expression of steroid receptors ER α , ER β , and PR in breast tumors after neoadjuvant chemotherapy therapy // EMBO Conference on Nuclear Receptors. – Sitges, Barcelona, Spain, – 16-20 Sept 2011. – P51.
3. Козлов В.В., Войцицкий В.Е., Гуляева Л.Ф. Экспрессия стероидных рецепторов и ароматазы в злокачественных опухолях молочной железы после неoadъювантной терапии //Материалы XI Всероссийской конференции молодых ученых «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» // Онкохирургия. – 2011. – Том 3. – №4. – С. 40-41.
4. Козлов В.В., Войцицкий В.Е., Зонова И.А., Боярских У.А., Гуляева Л.Ф. Молекулярная характеристика злокачественных опухолей молочной железы после неoadъювантной терапии // Вестник НГУ. – 2012. – Том 10, выпуск 2. – С.145-150.
5. Веряскина Ю.А., Козлов В.В., Фхмерова Л.Г., Буренкова Н.Н., Титов С.Е., Иванов М.К., Войцицкий В.Е., Сидоров С.В., Гуляева Л.Ф., Колесников Н.Н., Жимулев И.Ф. Изменение экспрессии и структурно-функциональная организация генов микроРНК, участвующих в онкогенезе молочной железы человека// Международная конференция ХРОМОСОМА 2012. – Новосибирск, Россия. – С.68-69.
6. Козлов В.В.,Войцицкий В.Е., Боярских У.А., Коростышевская А.М., Гуляева Л.Ф. Комплексная оценка эффективности неoadъювантной терапии при злокачественных опухолях молочной железы // Вестник НГУ. – 2012. – Том 10, выпуск 5. – С. 173-179.
7. Колесников Н.Н., Титов С.Е., Веряскина Ю.А., Карпинская Е.В., Шевченко С.П., Ахмерова Л.Г., Иванов М.К., Козлов В.В., Елисафенко Е.А., Гуляева Л.Ф., Жимулев И.Ф. МикроРНК, ЭВОЛЮЦИЯ И РАК // Цитология. – 2013. – Том 55. – №3. – С. 159-164.

Список сокращений

$ER\alpha$ – эстрогеновый рецептор α

$ER\alpha^+$ – повышенная экспрессия эстрогенового рецептора

$ER\alpha^-$ – сниженная экспрессия эстрогенового рецептора

$ER\beta$ – эстрогеновый рецептор β

$ER\beta^+$ – повышенная экспрессия эстрогенового рецептора

$ER\beta^-$ – сниженная экспрессия эстрогенового рецептора

CYP19 – цитохром P450 19-го семейства

$CYP19^+$ – повышенная экспрессия ароматазы

$CYP19^-$ – пониженная экспрессия ароматазы

PR – прогестероновый рецептор

PR^+ – повышенная экспрессия прогестеронового рецептора

PR^- – пониженная экспрессия прогестеронового рецептора

KRT18 – цитокератин 18

$KRT18^+$ – повышенная экспрессия цитокератина 18

$KRT18^-$ – пониженная экспрессия цитокератина 18

MIR – ген микроРНК

миРНК – микроРНК

РМЖ – рак молочной железы

НАХТ – неoadъювантная химиотерапия

НАЛТ – неoadъювантная лучевая терапия

НАТ – неoadъювантная терапия

мРНК – матричная РНК

ИГХ – иммуногистохимия

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РМЭ – радикальная мастэктомия

ФА МЖ – фиброаденома молочной железы

Благодарности

Автор благодарит:

Руководителя лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза ФГБУ «НИИ МББ» СО РАМН, д.б.н., профессора Гуляеву Людмилу Фёдоровну за огромную помощь в руководстве и организации научных исследований.

Главного врача ГБУЗ НСО НООД, главного онколога НСО, д.м.н., профессора Войцицкого Владимира Евгеньевича за организационную помощь в проведении клинических исследований.

Заведующего гинекологическим отделением ГБУЗ НСО НООД, д.м.н. профессора Красильникова Сергея Эдуардовича за ценные советы, большую моральную поддержку и организационно-методические рекомендации.

Ведущего научного сотрудника Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, д.б.н., профессора Колесникова Николая Николаевича за помощь в работе над совместными публикациями, консультаций по тематике исследования микроРНК.

Заведующего лабораторией фармакогеномики ФГБУН «ИХБиФМ» СО РАН, к.б.н. Филиппенко Максима Леонидовича за предоставленную возможность выполнить молекулярно-биологическую часть работы.

Сотрудницу лаборатории фармакогеномики ФГБУН ИХБиФМ СО РАН, с.н.с., к.б.н. Боярских Ульяну Александровну за помощь в выполнении молекулярного анализа образцов.

Сотрудникам лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза «НИИ МББ» СО РАМН Сергею Сергеевичу Нечкину и Семену Константиновичу Колмыкову за помощь в проведении биоинформатического анализа.