

Ассоциация экспрессии эстрогеновых рецепторов бета с показателем пролиферативной активности Ki-67 в ткани рака молочной железы

*Т. А. БОГУШ¹, П. Д. ПОЦЕЛУЕВА^{1,2}, А. М. ЩЕРБАКОВ¹, Е. А. БОГУШ³,
А. Б. РАВЧЕЕВА¹, Н. О. ВИХЛЯНЦЕВА¹, В. С. КОСОРУКОВ¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» МЗ РФ (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Association of the Estrogen Receptors Beta Expression with the Ki-67 Proliferative Index in Breast Cancer

*TATIANA A. BOGUSH¹, POLINA D. POTSELUEVA^{1,2}, ALEXANDER M. SCHERBAKOV¹,
ELENA A. BOGUSH³, ANNA B. RAVCHEEVA¹, NADEZHDA O. VIKHLYANTSEVA¹,
VYACHESLAV S. KOSORUKOV¹

¹ N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

² M. V. Lomonosov Moscow State University (Lomonosov MSU), Moscow, Russia

³ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow, Russia

Резюме

Актуальность. Эстрогеновые рецепторы бета (ERβ) являются важным биологическим регулятором и мишенью антиэстрогенов, однако, в отличие от эстрогеновых рецепторов альфа (ERα), их значимость в прогнозе и лечении рака молочной железы (РМЖ) остаётся неопределённой. **Цель исследования.** Выявление прогностической значимости ERβ при сравнительной оценке уровня и частоты встречаемости экспрессии ERβ в группах с благоприятным и неблагоприятным прогнозом РМЖ по показателю экспрессии маркера пролиферативной активности опухоли Ki-67. **Методы.** Проведена количественная оценка уровня экспрессии ERβ (% клеток, экспрессирующих маркер) в 68 хирургических образцах ткани РМЖ иммунофлуоресцентным методом с использованием проточной цитометрии. Использованы первичные антитела к ERβ (клон 14C8, ab288) и вторичные, конъюгированные с DyLight650 (ab98729). В тех же образцах иммуногистохимическим методом оценён уровень экспрессии Ki-67. **Результаты.** Экспрессия ERβ и Ki-67 в ткани РМЖ выявлена в 100% исследованных опухолей с высокой гетерогенностью показателя у разных больных. Статистический анализ групп благоприятного и неблагоприятного прогноза в соответствии с пролиферативной активностью опухоли (Ki-67 ≤ 20% и Ki-67 > 20%) показал прогностическую информативность деления опухолей по уровню экспрессии ERβ 50%. Ассоциативной связи между уровнем экспрессии Ki-67 и ERβ в одном и том же образце опухоли не обнаружено (коэффициент ранговой корреляции Спирмена $r = -0,16$; $p > 0,05$). В то же время высокая экспрессия ERβ ≥ 50% в 2,3 раза чаще выявлялась в прогностически благоприятной vs неблагоприятной по показателю Ki-67 группе — 41% vs 18%, $p = 0,02$. **Заключение.** Уровень экспрессии ERβ ≥ 50% в опухоли может рассматриваться как фактор благоприятного прогноза агрессивности течения РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы; эстрогеновые рецепторы бета (ERβ); Ki-67; проточная цитометрия; иммунофлуоресцентный анализ; прогноз

Для цитирования: Богущ Т. А., Поцелуева П. Д., Щербаков А. М., Богущ Е. А., Равчеева А. Б., Вихлянцев Н. О., Косоруков В. С. Ассоциация экспрессии эстрогеновых рецепторов бета с показателем пролиферативной активности Ki-67 в ткани рака молочной железы. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68: 3–4: 39–45. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-39-45>.

Abstract

Background. Estrogen receptors beta (ERβ) are an important biological regulator and target of antiestrogens, however, unlike estrogen receptors alpha (ERα), their significance in the prognosis and treatment of breast cancer remains unclear. **Purpose.** Evaluation of the ERβ prognostic value in the comparative assessment of frequency and level of the marker expression in groups with good and poor prognosis by Ki-67 proliferative index score in breast cancer. **Methods.** ERβ expression level (% of cells expressing the marker) in 68 breast tissue samples was quantified by immunofluorescence and flow cytometry. Primary antibodies to ERβ (clone 14C8, ab288) and secondary antibodies conjugated with DyLight650 (ab98729) were used. In the same samples, the Ki-67 expression level was assessed by the immunohistochemical method. **Results.** The ERβ and Ki-67 were detected in 100% breast tissue samples with high heterogeneity of the markers' expression in different

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: Каширское шоссе, д. 24,
НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина, г. Москва, Россия, 115478.
E-mail: tatbogush@mail.ru

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 24 Kashirskoye Shosse, N. N. Blokhin
Russian Cancer Research Center, Moscow, 115478 Russia.
E-mail: tatbogush@mail.ru

patients. Statistical analysis of good and poor prognosis in accordance with the Ki-67 proliferative index score (Ki-67 $\leq$ 20% and Ki-67 $>$ 20%) showed the prognostic value of the ER β expression level of 50%. There was no association between the Ki-67 and ER β expression levels in the same tumor sample (Spearman's rank correlation coefficient $R=-0,16$; $P>0,05$). At the same time, high expression of ER $\beta\geq 50\%$ was 2,3 times more frequently detected in the good vs poor prognostic group by Ki-67 — 41% vs 18%, $P=0,02$. **Conclusion.** The ER β expression level $\geq 50\%$ in the tumor can be considered as a factor of good prognosis of breast cancer.

Keywords: breast cancer; estrogen receptor beta (ER β); Ki-67; flow cytometry; immunofluorescence analysis, prognosis

For citation: Bogush T. A., Potselueva P. D., Scherbakov A. M., Bogush E. A., Ravcheeva A. B., Vikhlyantseva N. O., Kosorukov V. S. Association of the estrogen receptors beta expression with the Ki-67 proliferative index in breast cancer tissues. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 3–4: 39–45. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-3-4-39-45>.

Введение

В онкологической практике выбор индивидуальной лечебной тактики формируется, исходя из комплексной оценки признанных прогностических и предиктивных факторов. Так, среди обязательных гистопатологических параметров в ткани рака молочной железы в настоящее время выделяют маркёры ER α , PR, HER2 и Ki-67, исследуемые рутинно иммуногистохимическим методом [1, 2]. В 1996 году открыты ER β [3], которые также экспрессируются в клетках рака молочной железы, относятся к семейству стероидных рецепторов и активно изучаются с точки зрения прогностической значимости маркёра, а также потенциальной мишени гормонотерапии [4, 5]. Тем не менее, данные о биологической активности ER β остаются противоречивыми и требуют дальнейших исследований.

Роль ER β в патофизиологических механизмах злокачественных новообразований, несмотря на высокий уровень гомологии с ER α , обладающими пролиферативными эффектами, не идентична [6]. Весьма противоречивы данные об уровне экспрессии этого белка в различных тканях и его роли в регуляции пролиферации и химиотерапевтической устойчивости клеток [7]. Остаётся открытым вопрос о взаимосвязи ER β с клинически значимой характеристикой — с пролиферативной активностью рака молочной железы [8, 9]. В фундаментальных исследованиях доказано антипролиферативное действие ER β [7, 10–12], что говорит о важности установления клинической ценности маркёра и внедрения его оценки в клиническую практику.

Однако до настоящего времени результаты клинических исследований содержат противоречивые данные о прогностической значимости ER β [13]. Так, S. Mann и соавт. [14], впервые исследуя корреляцию экспрессии ER β в ткани рака молочной железы с агрессивностью течения болезни у пациенток, получающих адъювантное лечение тамоксифеном, обнаружили ассоциацию повышенного уровня экспрессии маркёра с лучшей безрецидивной и общей выживаемостью, что позднее подтверждено в ряде исследований [15–17]. В метаанализе 2016 г. обобщены

результаты по исследованию прогностической значимости высокого уровня экспрессии ER β , в том числе в зависимости от статуса ER α , и сделан вывод о связи показателя с лучшей безрецидивной и общей выживаемостью больных раком молочной железы на ранних стадиях заболевания [18].

В то же время показано, что высокий уровень экспрессии ER β является неблагоприятным прогностическим фактором у больных раком молочной железы [19–21]. В обзоре 2020 г., посвящённом оценке результатов работ по изучению клинической значимости ER β , упоминается также об отсутствии в большинстве исследований корреляции экспрессии данного маркёра с прогностически значимыми клинико-морфологическими характеристиками заболевания, такими как размер опухоли, инвазия в регионарные лимфатические узлы, лимфососудистая инвазия [22].

Важно, что в подавляющем большинстве исследований при полуколичественном определении уровня экспрессии ER β использован иммуногистохимический метод, в более редких случаях — ПЦР и иммуноблотт [13]. При этом результаты оценки экспрессии ER β в ткани рака молочной железы значительно варьируют в разных исследованиях — от 20 до 80% [22, 23].

В настоящем исследовании предпринята попытка оценить прогностическую значимость уровня ER β в ткани рака молочной железы в зависимости от пролиферативной активности опухоли, определяемой по уровню экспрессии белка Ki-67, который ассоциирован с агрессивностью болезни [24–26]. Необходимо отметить, что использование проточной цитометрии для оценки результатов иммунофлуоресцентного анализа позволяет с высокой точностью выявить не только факт экспрессии в опухоли исследуемого маркёра, но и определить пограничное значение между прогностически благоприятным и неблагоприятным уровнем экспрессии ER β в ткани рака молочной железы.

Материал и методы

Исследованы образцы рака молочной железы 68 пациенток, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» в период с 2003 по 2014 гг. Рутинно имму-

Таблица 1. Показатели уровня экспрессии ERβ и Ki-67 в образцах рака молочной железы

Table 1. ERβ and Ki-67 expression levels in breast cancer samples

Маркёры	Уровень экспрессии, %			
	M±SD ¹	Me [Q1; Q3] ²	Min ³	Max ⁴
ERβ	41,7±14,0	42,0 [27,3; 53,0]	15,0	74,0
Ki-67	29,2±23,4	19,0 [14,0; 40,0]	3,0	85,0

Примечание. ¹ M±SD — среднее арифметическое значение ± стандартное отклонение; ² Me [Q1; Q3] — медиана [нижний квартиль, верхний квартиль]; ³ Min — минимальное значение; ⁴ Max — максимальное значение.

Note. ¹ M±SD — mean ± standard deviation; ² Me [Q1; Q3] — median [lower quartile, upper quartile]; ³ Min — minimum value; ⁴ Max — the maximum value.

ногистохимическим методом образцы охарактеризованы по уровню экспрессии маркёра пролиферативной активности опухоли Ki-67. Согласно клиническим рекомендациям [2], группы благоприятного и неблагоприятного прогноза по уровню экспрессии Ki-67 составили образцы с уровнем маркёра ≤20% и >20%, соответственно.

Экспрессия ERβ оценена с помощью ранее разработанного метода количественной характеристики молекулярных белковых маркёров в ткани солидных опухолей — иммунофлуоресцентного анализа, ассоциированного с проточной цитометрией [27].

Кратко, в работе использованы первичные мышиные антитела к ERβ клона 14C8 (ab288, Abcam) в конечном разведении 1:1600 и вторичные антимышиные антитела, конъюгированные с красителем DyLight650 (ab98729, Abcam) в конечном разведении 1:1000. Одноклеточную суспензию (200 тыс. клеток/мл), приготовленную из солидной ткани по следующей методике [27], в объёме 100 мкл инкубировали с первичными антителами в течение ночи (15–20 ч) при 4°C. Далее, после отмывки клеток 20-кратным объёмом 0,5% раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA), добавляли вторичные антитела и инкубировали в течение 1,5 ч при 4°C. Для удаления из анализа разрушенных клеток, эритроцитов и конгломератов суспензию в течение 15 мин инкубировали с ДНК красителем Hoechst H33258 (Sigma-Aldrich), в концентрации 1,2 мкг/мл, после чего провели двукратную отмывку 20-кратным объёмом 0,5% раствором BSA.

Измерение флуоресценции клеток проводили на проточном цитометре Navios (Beckman Coulter). В работе оценивали уровень экспрессии ERβ — процентное число специфически флуоресцирующих клеток относительно контроля (инкубация клеток только с вторичными антителами), рассчитанный в программе FlowJo 10.0 (FlowJo, LLC) с помощью теста Колмогорова–Смирнова.

Для обработки полученных результатов использованы статистические методы, включенные в пакет программы GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad Software). Критерий Шапиро–Уилка применён для оценки характера распределения образцов по уровню экспрессии маркёров. Оценка ассоциативной связи между уровнем экспрессии Ki-67 и ERβ проведена с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена и критерия χ². Результаты статистического анализа считались значимыми при p≤0,05.

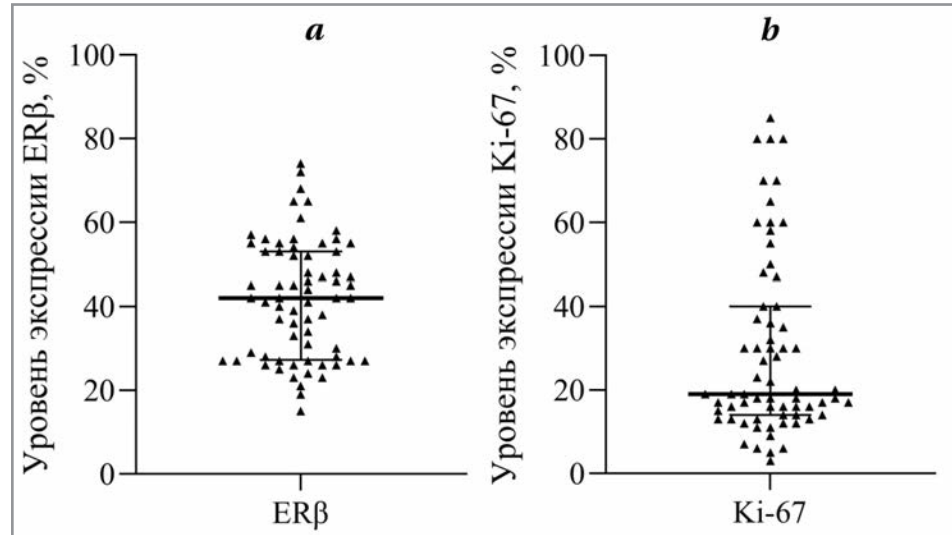


Рис. 1. Распределение образцов РМЖ по уровню экспрессии ERβ (a) и Ki-67 (b).

Примечание. По оси ординат обозначен уровень экспрессии маркёра в процентах. Центральная горизонтальная линия обозначает медиану показателя, две остальные — квартили показателей выше и ниже медианы.

Fig. 1. Distribution of breast cancer samples by the expression level of ERβ (a) and Ki-67 (b).

Note. The level of marker expression (%) is denoted along the ordinate axis. The central horizontal line denotes the median, and the others depict the lower quartile to upper quartile percentile data range.

Результаты и обсуждение

Результаты оценки в ткани РМЖ уровня экспрессии ERβ и Ki-67 представлены в табл. 1 и графически на рис. 1. Видно, что экспрессия ERβ выявлена в 100% исследованных опухолей с высокой гетерогенностью показателя у разных больных — от 15 до 74%. Выраженная гетерогенность опухолей отмечена и по экспрессии маркёра пролиферативной активности Ki-67 — от 3 до 85%, при этом ожидаемо маркёр также выявлен в 100% исследованных образцов РМЖ. Средние значения уровня экспрессии ERβ и Ki-67 составили 41,7±14,0% и 29,2±23,4%, медиана — 42 и 19%, соответственно.

Примеры реальных гистограмм распределения клеток по уровню флуоресценции, использованных для количественной оценки экспрессии ERβ, представлены на рис. 2. Гистограмма (a) демонстрирует вариант опухоли с экспрессией ERβ ниже, а гистограммы (b) и (c) — выше медианы значений показателя в исследованной группе опухолей.

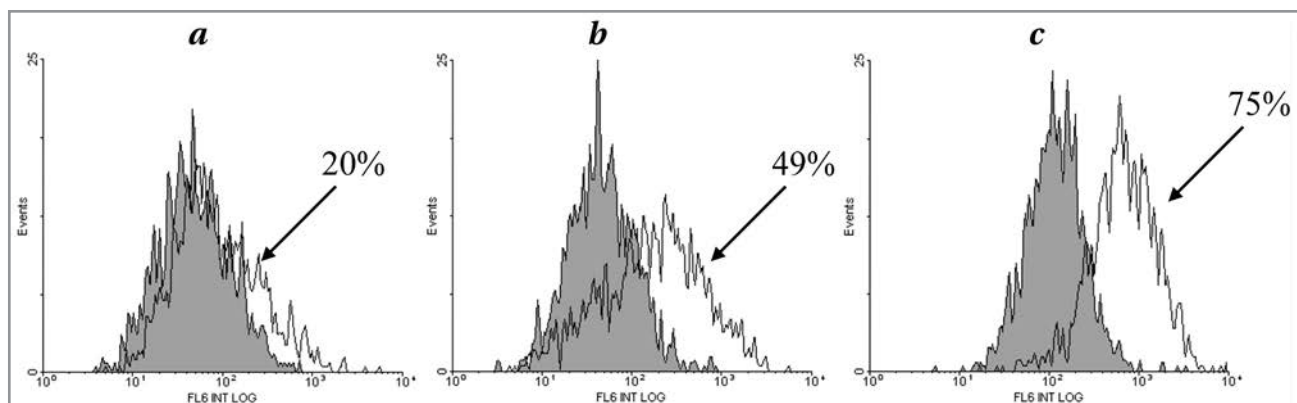


Рис. 2. Примеры гистограмм распределения клеток в зависимости от флуоресценции, использованных для количественной оценки уровня экспрессии ERβ в ткани рака молочной железы.

Примечание. *a* — экспрессия ERβ ниже медианы; *b* и *c* — экспрессия ERβ выше медианы.

Fig. 2. Examples of histograms of cell distribution depending on fluorescence used to quantify the ERβ expression level in breast cancer tissue.

Note. *a* — ERβ expression is lower the median; *b* и *c* — ERβ expression is upper the median.

Для выявления возможной связи между экспрессией в опухоли Ki-67 и ERβ проведён анализ коэкспрессии ERβ и Ki-67 в одном и том же образце рака молочной железы. Данные представлены на рис. 3.

Видно, что ассоциативной связи между исследованными маркерами нет. С учётом распределения уровня экспрессии Ki-67, не подчинявшегося закону нормального распределения (критерий Шапиро–Уилка, $p < 0,0001$), статистически значимая корреляция между ERβ и Ki-67 с применением коэффициента ранговой корреляции Спирмена, действительно, не обнаружена ($r = -0,16$; $p > 0,05$).

Для выявления прогностической значимости уровня экспрессии в опухоли ERβ сформированы подгруппы сравнения с благоприятным и неблагоприятным прогнозом течения болезни по показателю экспрессии в опухоли маркера пролиферативной активности Ki-67. На основании клинических рекомендаций [2] уровень экспрессии в опухоли Ki-67 $\leq 20\%$ является прогностически благоприятным показателем, тогда как экспрессия Ki-67 $> 20\%$ прогнозирует агрессивное течение болезни. В итоге, в подгруппы благоприятного (Ki-67 $\leq 20\%$) и неблагоприятного прогноза (Ki-67 $> 20\%$) вошли 39 и 29 пациентов, соответственно.

Деление на подгруппы с высокой и низкой экспрессией ERβ проведено в соответствии с общепринятой практикой, а именно, по значению показателя, близкого к медиане. В настоящем исследовании нахождение уровня экспрессии ERβ, который может быть прогностически информативным, проведено на основании оценки частоты встречаемости опухолей с разной экспрессией ERβ у больных с благоприятным и неблагоприятным прогнозом течения болезни при уровне

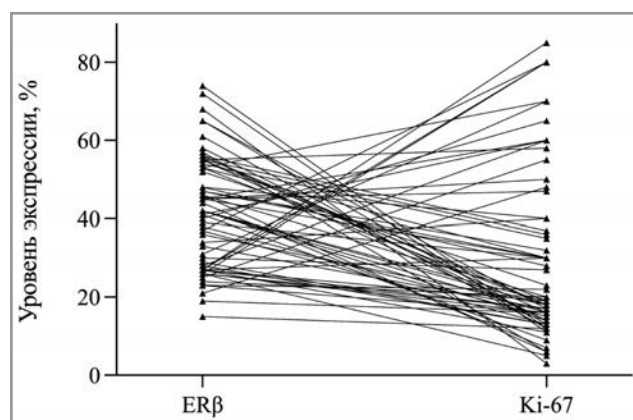


Рис. 3. Ассоциативная связь между уровнем экспрессии Ki-67 и ERβ, оцененная в одном и том же образце опухоли.

Fig. 3. Association between the Ki-67 and ERβ expression level evaluated in the same tumor sample.

ERβ в опухоли 40% и 50%. Полученные результаты представлены на рис. 4.

Не обнаружено различий между группами сравнения с высоким ($> 20\%$) и низким ($\leq 20\%$) показателем Ki-67 при границе деления опухолей на высоко- и низкоэкспрессирующие ERβ по уровню показателя 40% ($p = 0,8$).

Однако при использовании границы деления на группы с низким и высоким уровнем экспрессии ERβ показателя 50%, выявлены отличия в экспрессии ERβ между прогностически благоприятной и неблагоприятной группами — Ki-67 $\leq 20\%$ vs Ki-67 $> 20\%$, соответственно. Высокая экспрессия ERβ (выше 50%) в 1,4 раза чаще выявлялась в группе при экспрессии Ki-67 $> 20\%$ по сравнению с Ki-67 $\leq 20\%$ (82% vs 59%, $p = 0,02$).

Более выразительной была разница при сравнении частоты экспрессии ERβ $\geq 50\%$ в группах с разным уровнем экспрессии Ki-67. Высокая

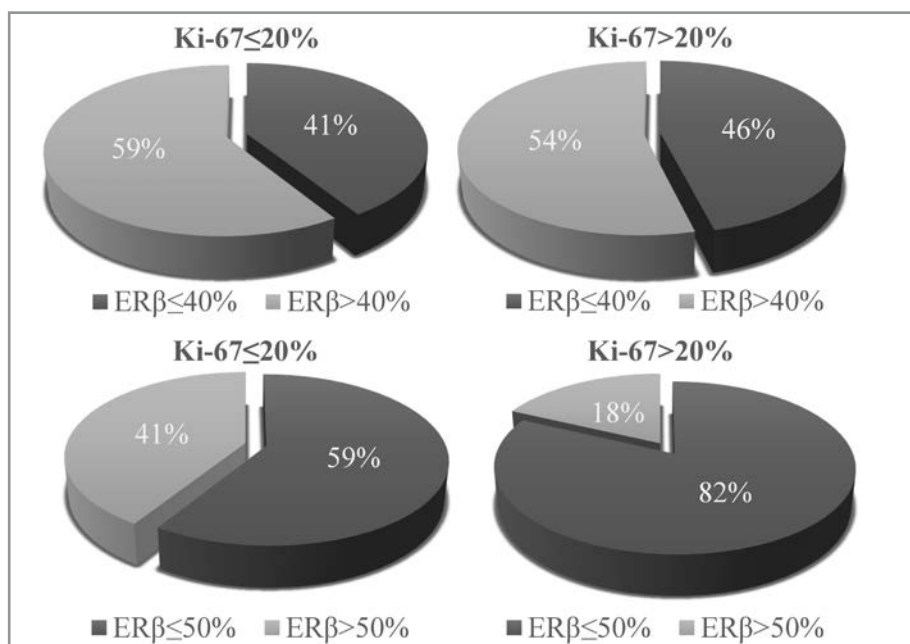


Рис. 4. Частота встречаемости разных уровней экспрессии ERβ в группах с разным уровнем Ki-67.

Примечание. Тёмные сегменты — опухоли с низкой экспрессией ERβ; светлые сегменты — опухоли с высокой экспрессией ERβ. Ki-67 ≤ 20% — благоприятный; Ki-67 > 20% — неблагоприятный прогноз РМЖ.

Fig. 4. Frequency of occurrence of different ERβ expression levels in groups with different Ki-67 percentage score.

Note. Dark and light segments — tumors with low and high ERβ expression respectively; Ki-67 ≤ 20% and > 20% — good and poor prognosis of breast cancer respectively.

экспрессия ERβ в 2,3 раза чаще выявлялась в прогностически благоприятной группе по показателю уровня экспрессии Ki-67, чем в неблагоприятной (41% vs 18%, $p=0,02$).

Заключение

Таким образом, при количественном иммунофлуоресцентном анализе с использованием проточной цитометрии экспрессия ERβ выявлена во всех исследованных образцах рака молочной железы, при этом у разных больных тканей опухоли значительно отличается как по уровню экспрессии ERβ, так и Ki-67.

Полученные результаты с высокой степенью статистической значимости показали, что прогностически информативной следует признать границу деления опухолей по уровню экспрессии ERβ, равному 50%. При этом опухоли с высоким уровнем экспрессии ERβ в 1,4 раза чаще встречались в группе с неблагоприятным по сравнению с благоприятным прогнозом течения болезни в соответствии с показателем экспрессии в опухоли маркера пролиферативной активности Ki-67. Противоположная зависимость выявлена в группе благоприятного прогноза с экспрессией Ki-67 < 20%: опухолей с показателем ERβ ≥ 50% ока-

залось в 2,3 раза больше. В совокупности, эти данные показывают, что уровень экспрессии ERβ ≥ 50% в опухоли может рассматриваться как фактор благоприятного прогноза агрессивности течения рака молочной железы.

При статистическом корреляционном анализе установлено, что в изучаемой выборке рака молочной железы отсутствует ассоциация между экспрессией ERβ и Ki-67, что может указывать на их независимую прогностическую значимость как опухолевых маркеров и на отсутствие общих механизмов регуляции.

Применённый в настоящем исследовании подход к оценке прогностической значимости экспрессии ERβ, основанный на сравнении частоты встречаемости высокого и низкого уровня показателя в группах благоприятного и неблагоприятного

прогноза в соответствии с пролиферативной активностью опухоли, оцененного на основании рутинно используемого молекулярного маркера Ki-67, может быть использован и при изучении опухолей других локализаций в случае значительной продолжительности жизни пациентов и невозможности точной оценки течения болезни для анализа выживаемости.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение о субсидии № 075-15-2021-1060 от 28.09.2021 года (сбор и подготовка для анализа образцов опухолей; создание клинической базы данных; оценка опухолевых маркеров; статистический анализ результатов; написание и оформление статьи), и в рамках НИР ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России 2023–2025 года, рег. № 1022040600453-9-3.2.21;3.4.2 (предоставление хирургических образцов опухолей и клиничко-морфологических данных о пациентах, включенных в исследование).

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов. Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике

Литература/References

1. Smolarz B., Nowak A.Z., Romanowicz H. Breast Cancer-Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers* (Basel). 2022; 14 (10): 2569. doi: 10.3390/cancers14102569.
2. Тюлядин С.А., Артамонова Е.В., Жукова Л.Г., Кислов Н.В., Королева И.А., Пароконная А.А. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака молочной железы. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO. 2022; 12 (3s2): 155–197. doi: <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2022-12-3s2-155-197>. [Tyulyandin S.A., Artamonova E.V., Zhukova L.G., Kislov N.V., Koroleva I.A., Parokonnaya A.A. i dr. Prakticheskie rekomendatsii po lekarstvennomu lecheniyu raka molochnoi zhelezy. Zlokachestvennye opukholi: Prakticheskie Rekomendatsii RUSSCO. 2022; 12 (3s2): 155–197. doi: <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2022-12-3s2-155-197>. (in Russian)]
3. Kuiper G., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J.A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93 (12): 5925–5930. doi: 10.1073/pnas.93.12.5925.
4. Božović A., Mandušić V., Todorović L., Krajnović M. Estrogen receptor beta: the promising biomarker and potential target in metastases. *Int J Mol Sci*. 2021; 22 (4): 1656. doi: 10.3390/ijms22041656.
5. Nilsson S., Mäkelä S., Treuter E., Tujague M., Thomsen J., Andersson G. et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*. 2001; 81 (4): 1535–1565. doi: 10.1152/physrev.2001.81.4.1535.
6. Heldring N., Pike A., Andersson S., Matthews J., Cheng G., Hartman J. et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*. 2007; 87 (3): 905–931. doi: 10.1152/physrev.00026.2006.
7. Warner M., Fan X., Strom A., Wu W., Gustafsson J.Å. 25 years of ERβ: a personal journey. *J Mol Endocrinol*. 2021; 68 (1): R1–R9. doi: 10.1530/JME-21-0121.
8. Udovicic-Gagula D., Ahmovic A., Bilalovic N., Doric M. Expression of Ki-67 and estrogen receptor beta in primary cutaneous melanoma as a potential indicator of regional lymph node positivity. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2019; 27 (1): 27–32. doi: 10.1097/PAL.0000000000000530.
9. Grover S.K., Agarwal S., Gupta S., Wadhwa N., Sharma N. Expression of estrogen receptor β and Ki 67 in benign & malignant human prostate lesions by immunohistochemistry. *Pathol Oncol Res*. 2015; 21 (3): 651–657. doi: 10.1007/s12253-014-9870-y.
10. Fujimura T., Takahashi S., Urano T., Ogawa S., Ouchi Y., Kitamura T. et al. Differential expression of estrogen receptor beta (ERbeta) and its C-terminal truncated splice variant ERbetacx as prognostic predictors in human prostatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 289 (3): 692–699. doi: 10.1006/bbrc.2001.6038.
11. Ström A., Hartman J., Foster J.S., Kietz S., Wimalasena J., Gustafsson J.A. Estrogen receptor beta inhibits 17β-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D [published correction appears in *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 23; 103 (21): 8298. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101 (6): 1566–1571. doi: 10.1073/pnas.0308319100.
12. Thomas C., Gustafsson J.Å. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11 (8): 597–608. doi: 10.1038/nrc3093.
13. Tan W., Li Q., Chen K., Su F., Song E., Gong C. Estrogen receptor beta as a prognostic factor in breast cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016; 7 (9): 10373–10385. doi: 10.18632/oncotarget.7219.

Информация об авторах

[#]Богущ Татьяна Анатольевна — д. б. н., профессор, руководитель группы молекулярного прогноза опухолей лаборатории молекулярно-генетической диагностики и персонализированной медицины НИИ ЭДИТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-7673-4284. ResearcherID: A-6522-2013. eLIBRARY SPIN-код: 4050-0061. Scopus Author ID: 7006161773

[#] — авторы внесли равный вклад в опубликованную статью.

и Хельсинкской декларации 1964 г. и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. У всех пациенток получено письменное информированное согласие.

14. Mann S., Laucirica R., Carlson N., Younes P.S., Ali N., Younes A. et al. Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer. *Hum Pathol*. 2001; 32 (1): 113–118. doi: 10.1053/hupa.2001.21506.
15. Nakopoulou L., Lazaris A.C., Panayotopoulou E.G., Giannopoulou I., Givalos N., Markaki S. et al. The favourable prognostic value of oestrogen receptor beta immunohistochemical expression in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2004; 57 (5): 523–528. doi: 10.1136/jcp.2003.008599.
16. Maehle B.O., Collett K., Tretli S., Akslen L.A., Grotmol T. Estrogen receptor beta — an independent prognostic marker in estrogen receptor alpha and progesterone receptor-positive breast cancer? *APMIS*. 2009; 117 (9): 644–650. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02510.x.
17. Zhang H., Zhang Z., Xuan L., Zheng S., Guo L., Zhan Q. et al. Evaluation of ER-α, ER-B1 and ER-B2 expression and correlation with clinicopathologic factors in invasive luminal subtype breast cancers. *Clin Transl Oncol*. 2012; 14 (3): 225–231. doi: 10.1007/s12094-012-0788-0.
18. Liu J., Guo H., Mao K., Zhang K., Deng H., Liu Q. Impact of estrogen receptor-β expression on breast cancer prognosis: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2016; 156 (1): 149–162. doi: 10.1007/s10549-016-3721-3.
19. Guo L., Zhu Q., Yilamu D., Jakulin A., Liu S., Liang T. Expression and prognostic value of estrogen receptor beta in breast cancer patients. *Internt J Clin Exp Med*. 2014; 7 (10): 3730–3736.
20. Guo L., Zhu Q., Aisimutuola M., Yilamu D., Liu S., Jakulin A. Expression and prognostic value of estrogen receptor β in patients with triple-negative and triple-positive breast cancer. *Experimental and therapeutic medicine*. 2015; 9 (6): 2147–2150. doi: 10.3892/etm.2015.2380.
21. Guo L., Zhang Y.U., Yilamu D., Liu S., Guo C. ERβ overexpression results in endocrine therapy resistance and poor prognosis in postmenopausal ERα-positive breast cancer patients. *Oncology letters*. 2016; 11 (2): 1531–1536. doi: 10.3892/ol.2016.4095.
22. Zhou Y., Liu X. The role of estrogen receptor beta in breast cancer. *Biomark Res*. 2020; 8 (39). doi: 10.1186/s40364-020-00223-2.
23. Hammond M.E., Hayes D. E., Dowsett M., Allred D.C., Hagerty K.L., Badve S. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010; 28 (21): 3543. *J Clin Oncol*. 2010; 28 (16): 2784–2795. doi: 10.1200/JCO.2009.25.6529.
24. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000; 182 (3): 311–322. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
25. de Azambuja E., Cardoso F., de Castro G., Jr Colozza M., Mano M.S., Durbecq V. et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007; 96 (10): 1504–1513. doi: 10.1038/sj.bjc.6603756.
26. Luporsi E., André F., Spyrtatos F., Martin P.M., Jacquemier J., Penault-Llorca F. et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 132 (3): 895–915. doi: 10.1007/s10549-011-1837-z.
27. Bogush T.A., Basharina A.A., Eliseeva B.K., Kaliuzhny S.A., Bogush E.A., Kirsanov V.Y. et al. A new approach to epithelial-mesenchymal transition diagnostics in epithelial tumors: double immunofluorescent staining and flow cytometry. *Biotechniques*. 2020; 69 (4): 257–263. doi: 10.2144/btn-2020-0024.

About the authors

[#]Tatiana A. Bogush — D. Sc. in Biology, Professor, Head of the Molecular Tumor Prognosis Group of the Laboratory of Molecular Genetic Diagnostics and Personalized Medicine, Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation. ORCID: 0000-0002-7673-4284. ResearcherID: A-6522-2013. eLIBRARY SPIN: 4050-0061. Scopus Author ID: 7006161773

[#] — contributed equally to this work.

**Поцелуева Полина Денисовна* — студентка факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова; лаборант-исследователь группы молекулярного прогноза опухолей лаборатории молекулярно-генетической диагностики и персонализированной медицины НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0003-3777-2920. ResearcherID: AAG-7679- 2022

Щербakov Александр Михайлович — к. б. н., старший научный сотрудник, исполняющий обязанности заведующего лаборатории онкопротеомики отдела экспериментальной биологии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-2974-9555. ResearcherID: F-4914-2013. Scopus Author ID: 7003636718

Богущ Елена Александровна — к. м. н., ассистент кафедры онкологии Института клинической медицины им. Н. В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-5601-3669. ResearcherID: K-8488-2018. Scopus Author ID: 57193509054

Равчеева Анна Борисовна — к. б. н., младший научный сотрудник группы молекулярного прогноза опухолей лаборатории молекулярно-генетической диагностики и персонализированной медицины НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0001-5969-0219. ResearcherID: R-9724-2019. Scopus Author ID: 7801332514

Вихлянцева Надежда Олеговна — младший научный сотрудник группы молекулярного прогноза опухолей лаборатории молекулярно-генетической диагностики и персонализированной медицины НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-1372-2980. ResearcherID: S-1111-2019. Scopus Author ID: 6504200920

Косоруков Вячеслав Станиславович — к. б. н., заведующий лабораторией трансгенных препаратов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: 0000-0002-8462-2178. ResearcherID: A-3901-2014. eLIBRARY SPIN-код: 3656-4029. Scopus Author ID: 6505962801

**Polina D. Potselueva* — Student of the Faculty of Fundamental Medicine of M. V. Lomonosov Moscow State University; Laboratory assistant-researcher of the molecular tumor Prognosis group of the Laboratory of Molecular Genetic Diagnostics and Personalized Medicine, Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors of the N. N. Blokhin National Research Institute of Oncology, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0003-3777-2920. ResearcherID: AAG-7679- 2022

Alexander M. Scherbakov — Ph. D. in Biology, Senior Researcher, Acting Head of the Oncoproteomics Laboratory of the Department of Experimental Tumor Biology, N.N. Blokhin National Research Institute of Oncology, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-2974-9555. ResearcherID: F-4914-2013. Scopus Author ID: 7003636718

Elena A. Bogush — Ph. D. in Medicine, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-5601-3669. ResearcherID: K-8488-2018. Scopus Author ID: 57193509054

Anna B. Ravcheeva — Ph. D. in Biology, Junior Researcher of the Molecular Tumor Prognosis Group of the Laboratory of Molecular Genetic Diagnostics and Personalized Medicine, Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors of the N.N. Blokhin National Research Institute of Oncology, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0001-5969-0219. ResearcherID: R-9724-2019. Scopus Author ID: 7801332514

Nadezhda O. Vikhlyantseva — Junior Researcher of the Molecular Tumor Prognosis Group of the Laboratory of Molecular Genetic Diagnostics and Personalized Medicine, Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors of the N.N. Blokhin National Research Institute of Oncology, Moscow, Russia. ORCID: 0000-0002-1372-2980. ResearcherID: S-1111-2019. Scopus Author ID: 6504200920

Vyacheslav S. Kosorukov — Ph. D. in Biology, Head of the Laboratory of transgenic Drugs, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation. ORCID: 0000-0002-8462-2178. ResearcherID: A-3901-2014. eLIBRARY SPIN: 3656-4029. Scopus Author ID: 6505962801

— авторы внесли равный вклад в опубликованную статью.

— contributed equally to this work.