

УДК 618.14-006.6

UDC 618.14-006.6

14.00.00 Медицинские науки

Medical sciences

**ТРАНСКРИПТОМНАЯ АКТИВНОСТЬ
ЭСТРОГЕН-РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ ПРИ
МАЛИГНИЗАЦИИ ТКАНЕЙ ТЕЛА МАТКИ**

**TRANSCRIPTOMIC ACTIVITY OF
ESTROGEN-REGULATORY GENES IN
MALIGNANCY UTERINE TISSUES**

Кит Олег Иванович
д.м.н., профессор, директор
РИНЦ SPIN-код: 1728-0329

Kit Oleg Ivanovich
Dr.Sci.Med., professor, director
RSCI SPIN code: 1728-0329

Водолажский Дмитрий Игоревич
к.б.н., руководитель лаборатории
РИНЦ SPIN-код: 6660-5361
e-mail: dvodolazhsky@gmail.com

Vodolazhsky Dmitriy Igorevich
Cand.Biol.Sci., Head of the Laboratory
RSCI SPIN code: 6660-5361
e-mail: dvodolazhsky@gmail.com

Кутилин Денис Сергеевич
к.б.н., старший научный сотрудник
РИНЦ SPIN-код: 8382-4460
e-mail: k.denees@yandex.ru

Kutilin Denis Sergeevich
Cand.Biol.Sci., Senior Researcher
RSCI SPIN code: 8382-4460
e-mail: k.denees@yandex.ru

Никитин Иван Сергеевич
Аспирант

Nikitin Ivan Sergeevich
postgraduate student

Моисеевко Татьяна Ивановна
д.м.н., ведущий научный сотрудник
РИНЦ SPIN-код: 6341-0549,

Moiseenko Tatyana Ivanovna
Dr.Sci.Med., leading researcher
RSCI SPIN-code: 6341-0549,

Франциянц Елена Михайловна
д.б.н., профессор
РИНЦ SPIN-код: 9427-9928
*ФГБУ "Ростовский научно-исследовательский
онкологический институт" Министерства
здравоохранения РФ, Россия, Ростов-на-Дону, ул.
14-я линия, 63*

Frantsiyants Elena Mihaylovna
Dr.Sci.Biol., professor
RSCI SPIN-code: 9427-9928
*Federal State Budgetary Institution "Rostov Cancer
Research Institute", of the Ministry of Health of the
Russian Federation, Russia, 344037, Rostov-on-Don,
str. 14-line 63*

Рак тела матки занимает шестое место по распространенности среди онкологических заболеваний у женщин в развитых странах. Ведущую роль в патогенезе данного заболевания играет гиперэстрогения эндогенного или экзогенного происхождения. Цель данного исследования заключалась в изучении экспрессии генетических локусов, ответственных за рецепцию и метаболизм эстрогенов, для расширения представлений о молекулярных механизмах малигнизации тканей тела матки. Методом Real-Time qPCR проведено сравнительное исследование относительной экспрессии генов (*CYP1A 1, CYP1A 2, CYP1B 1, CYP19A, ESR1, ESR2, GPER, STS, SULT1A и SULT1E1*) в опухолевых и условно здоровых тканях тела матки 27 пациенток Юга России в возрасте 38-72 лет с гистологически подтвержденным диагнозом рак тела матки. Установлено, что изменение транскрипционной активности исследованных генов в процессе малигнизации тканей тела матки зависит от возраста пациенток и стадии дифференцировки опухолевых клеток. В частности, обнаружено,

Uterine cancer is the sixth on prevalence of cancer among women in developed countries. Hyper-estrogen level by endogenous or exogenous origin plays the leading role in this disease pathogenesis. This study purpose was investigating the expression of genetic loci responsible for the estrogen reception and metabolism to better understanding of the molecular mechanisms of uterine tissues malignancy. We investigated the relative expression of genes (*CYP1A 1, CYP1A 2, CYP1B 1, CYP19A, ESR1, ESR2, GPER, STS, SULT1A and SULT1E1*) by real-time PCR in tumor and conditionally healthy uterine tissues of 27 female patients in Southern Russia aged 38-72 years with histologically confirmed diagnosis of uterine cancer. It is found that transcription activity of these genes during malignancy of uterine tissues depends of female patients age and the stage of tumor cells differentiation. It is found that malignancy change in the transcriptional activity of investigated genes in uterine tissue depends of patients age and stage of tumor cells differentiation. Particularly, it was found, that changes of gene transcription balance of enzymes that provide sulfation and hydrolysis of steroid sulfates

зависящее от возраста пациенток и степени дифференцировки опухолевых клеток, изменение транскрипционного баланса генов ферментов, обеспечивающих сульфатирование и гидролиз сульфатов стероидов. А так же показано падение экспрессии гена ядерного рецептора эстрогена *ESR1* по мере снижения уровня дифференцировки клеток опухолевых тканей

is depending of patient age and the degree of tumor cells differentiation. In addition, the sinking of gene expression of nuclear estrogen receptor *ESR1* as lowering cell differentiation of tumor tissues. We have also shown gene expression of nuclear estrogen receptor *ESR1* decline as lowering cell differentiation of tumor tissues

Ключевые слова: ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, РАК ТЕЛА МАТКИ, МЕТАБОЛИЗМ ЭСТРОГЕНОВ

Keywords: GENE EXPRESSION, UTERINE CANCER, ESTROGEN METABOLISM

Введение

По данным ВОЗ в 2014 году во всем мире было зафиксировано около 320 тысяч новых случаев рака тела матки, что ставит данную патологию на шестое место по распространенности среди онкологических заболеваний у женщин в развитых странах [1]. Ведущую роль в патогенезе данного заболевания играет гиперэстрогения эндогенного или экзогенного происхождения [2]. Эстрогены стимулируют пролиферацию клеток, индуцируя синтез факторов роста и их рецепторов, в том числе и эстрогеновый рецептор α типа (*ER α* или *ESR1*) [3]. Увеличение концентрации эстрогенов может приводить к гиперплазии тканей эндометрия, которая, несмотря на свою обратимость, способна прогрессировать в атипичский вариант, предрасположенный к перерождению в рак [4].

Ещё одним важным элементом патогенеза гормонозависимого рака является образование эстрогенов из андрогенов, катализируемое микросомальным, НАДФН-зависимым ферментом – цитохромом P450 19-го семейства (ароматазой). Ген, кодирующий цитохром P-450 ароматазу известен как *CYP19* (15q21.2) [5].

Эффект эстрогенов на клетку реализуется через их взаимодействие с рецепторами, которые, в свою очередь, активируют гены-мишени во многих тканях. Идентифицировано два вида эстрогеновых рецепторов - *ER: α* и *β* . Показано, что повышенная экспрессия *ER α* (*ESR1*) сопровождается процессами трансформации во многих тканях [6], тогда как *ER β* (*ESR2*)

играет ключевую роль в регуляции митотической активности, обеспечивая защиту от ER α -индуцированной гиперпролиферации [7]. Показано, что содержание ER α может измениться в ответ на повышение концентрации эстрогенов, что, в свою очередь, приводит к усилению пролиферации в тканях-мишенях [3]. Одним из механизмов этого процесса может быть увеличение активности ароматазы.

Метаболическая активация эстрадиола также является ключевым фактором в канцерогенезе эндометрия. Цитохромы P450 1A1 (*CYP1A1*) и P450 1B1 (*CYP1B1*) катализируют гидроксилирование 17-бета-эстрадиола (E2) в C-2 и C-4 положении соответственно. 4-гидрокси эстрогены (метаболиты *CYP1B1*) получили особое внимание из-за их важной роли в злокачественной трансформации различных органов, включая эндометрий, в котором *CYP1B1* показывает высокий уровень экспрессии[8].

Целью нашего исследования стало изучение изменения экспрессии генов ответственных за рецепцию эстрогенов и метаболизм стероидов: *CYP1A1*, *CYP1B1*, *CYP19A*, *ESR1*, *ESR2*, *GPER*, *STS* и *SULT1E1* при малигнизации тканей тела матки для расширения представлений о молекулярных механизмах этого процесса.

Материалы и методы исследования

Для исследования относительной экспрессии генов послужили опухолевые и условно здоровые ткани матки 27 пациенток Юга России в возрасте 38-72 лет с гистологически подтвержденным диагнозом рак тела матки, поступивших на лечение в РНИОИ ФГБУ МЗ РФ в 2014 - 2015 гг.

Фрагменты тканей гомогенизировали в жидком азоте и проводили экстракцию суммарной РНК по методу Р. Chomczynski и N. Sacchi [9]. Полученные препараты РНК обрабатывали ДНКазой («Синтол», Россия) для удаления следов геномной ДНК. Синтез кДНК проводили с использованием коммерческих наборов «Reverta-L» («Интерлабсервис», Россия).

Методом RT-qPCR проводили определение относительной экспрессии 8 генетических локусов, ответственных за рецепцию и метаболизм эстрогенов: *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP19A*, *ESR1*, *ESR2*, *GPER*, *STS* и *SULT1E1*. Дизайн праймеров для RT-qPCR осуществляли с использованием референтных последовательностей ДНК NCBI GenBank. В качестве референтного гена использовали ген *ACTB*.

RT-qPCR проводили в 25 мкл ПЦР-смеси, содержащей 12 нг кДНК, 0,25мМ dNTPs, 2,5 мМ MgCl₂, 1x ПЦР-буфер и 1 ед.акт. SynTaq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами («Синтол», Россия), краситель EVA-Green (×1) и по 400 нМ прямого и обратного праймеров для референтного гена (актина, *ACTB*) или гена-мишени. RT-qPCR проводили на термоциклере Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, USA). Относительную экспрессию генетического локуса (RE) рассчитывали по формуле $RE=2^{-\Delta\Delta C_t}$ [10].

Далее вычисляли медиану [11] RE_{оп} опухолевых образцов и медиану RE_к контрольных (условно нормальная ткань) для каждого генетического локуса и рассчитывали соотношение относительной экспрессии генов в опухолевой ткани по отношению к нормальной ткани: RE_{оп} / RE_к.

Статистический анализ выполняли с использованием прикладных пакетов программ Microsoft Excel 2013 и STATISTICA 8.0. Оценку различий проводили с использованием критерия Манна-Уитни [11] для порогового уровня статистической значимости $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенного исследования обнаружено статистически достоверное увеличение экспрессии гена *ESR1* на 124% ($p < 0,05$) в опухолевой ткани по сравнению с условно здоровой тканью тела матки у пациенток в возрасте от 38 до 72 лет, что подтверждает данные о связи гиперэкспрессии гена *ESR1* с процессами онкотрансформации клеток [6].

Достоверного изменения экспрессии других генетических локусов в данной выборке обследуемых (38 - 72 лет) не обнаружено (рис. 1.а).

В группе пациенток от 38 до 55 лет обнаружено достоверное увеличение экспрессии гена *SULT1E1* на 200% ($p < 0,005$), а в группе пациенток старше от 56 до 72 лет обнаруживается достоверное повышение экспрессии гена *ESR1* на 124% ($p < 0,005$) в опухолевой ткани по сравнению с условно здоровой тканью тела матки (рис. 1.б и 1.в).

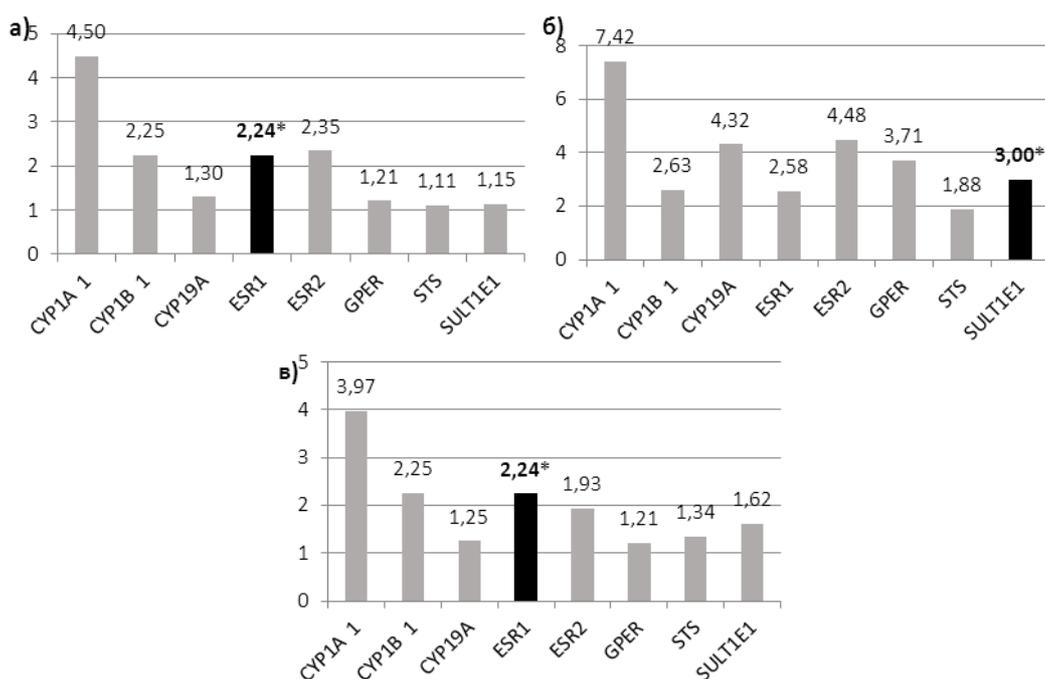


Рисунок 1. Сравнение экспрессии генов в опухолевой ткани матки относительно условно нормальной ткани матки пациенток с диагнозом рак тела матки: а) во всей выборке (возраст от 38 до 72 лет); б) в группе пациенток от 38 до 55 лет, в) в группе пациенток от 56 до 72 лет.

Следовательно, наблюдаемый эффект гиперэкспрессии гена *ESR1* в выборке пациенток возрастом 38-72 лет обеспечивается особенностями экспрессии данного гена у пациенток старше 55 лет (рис. 1в), что свидетельствует о важной роли повышенной транскрипционной активности гена *ESR1* в малигнизации тканей матки в постменопаузе и о возможности использования данного параметра в качестве биомаркера у возрастной группы пациенток старше 55 лет.

Дробление имеющейся выборки по стадиям дифференцировки клеток опухолей на G 1, 2 и 3 группы дало следующие результаты: у группы пациенток с аденокарциномой тела матки стадии G1 в возрасте 63-68 лет обнаружено достоверное ($p < 0,005$) увеличение экспрессии генов *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP19A*, *ESR1*, *ESR2*, *GPER*, *STS* и *SULT1E1* на 1820%, 420%, 737%, 198%, 174%, 54%, 746% и 412% соответственно в опухолевой ткани по сравнению с условно нормальной, у группы пациенток с аденокарциномой тела матки стадии G2 в возрасте 38-72 года отсутствовали достоверные различия в экспрессии исследованного паттерна генов опухолевой ткани по сравнению с условно нормальной, а у группы пациенток с аденокарциномой тела матки стадии G3 в возрасте 56-63 года наблюдалось достоверное ($p < 0,005$) увеличение экспрессии генов *CYP19A* на 72%, *ESR2* на 98%, *GPER* на 50%, *STS* на 130% и *SULT1E1* на 110% (рис. 2.а, г).

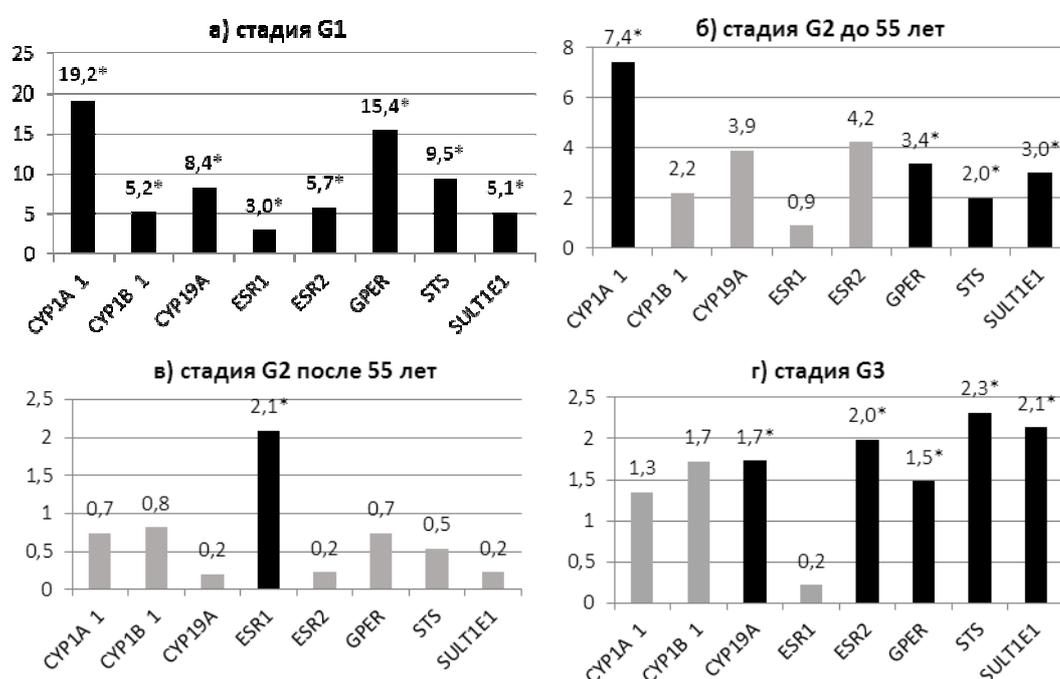


Рисунок 2. Сравнение экспрессии генов в опухолевой ткани матки относительно условно нормальной ткани матки у: а) пациенток с аденокарциномой матки стадии G1; б) пациенток с аденокарциномой матки стадии G2 до 55 лет, в) пациенток с аденокарциномой матки стадии G2 после 55 лет, г) пациенток с аденокарциномой матки стадии G3.

Следует отметить, что все пациентки с аденокарциномой тела матки стадии G1 были старше 55 лет, также как и пациентки с аденокарциномой тела матки стадии G3, у которых наблюдалась менее значительное по модулю увеличение экспрессии генов *CYP19A*, *ESR2*, *GPER*, *STS* и *SULT1E1* (рис. 2.г). Возрастной спектр пациенток группы с аденокарциномой тела матки стадии G2 охватывает более широкий диапазон, что отражается и в особенностях транскрипционного профиля исследованных генов. Так, ранжирование выборки пациенток с аденокарциномой тела матки стадии G2 (n=14) по возрастному критерию показало, что в группе пациенток от 38 до 55 лет наблюдается достоверное ($p < 0,05$) увеличение экспрессии генов *CYP11A1*, *GPER*, *STS* и *SULT1E1* на 640%, 240%, 100% и 200% соответственно, а в группе пациенток от 56 до 72 лет наблюдается достоверное увеличение экспрессии только гена *ESR1* на 110% ($p < 0,05$) в опухолевой ткани по сравнению с условно здоровой тканью тела матки (рис. 2.б и 3.в).

Таким образом, у группы пациенток с аденокарциномой тела матки стадии G1, G2 (до 55 лет) и G3 обнаружено увеличение транскрипционной активности генов ответственных за гидроксирование эстрадиола в С-2 и С-4 положении (*CYP11A1* и *CYP11B1*), образование эстрогенов из андрогенов (*CYP19A*), ответственных за регулирование уровня ядерных рецепторов эстрогенов (*SULT1E1* - гены сульфотрансферазы), *ESR1* и 2 и мембранных рецепторов эстрогенов (*GPER*), а также ответственных за преобразование стероидов в их активную форму (ген стероидной сульфатазы, *STS*).

Отличия экспрессии, описанных выше генов, в опухолевой ткани относительно нормальной ткани тела матки вписываются в теорию локального синтеза эстрогенов [12], согласно которой нарушение регуляции тканеспецифичного промотора гена ароматазы (увеличение экспрессии гена *CYP19A*) приводит к усилению активности фермента и повышению концентрации эстрогенов. Это совместно с увеличением

экспрессии генов *CYP1A1* и *CYP1B1*, и соответственно активностью кодируемых ими ферментов, приводит к метаболической активация эстрадиола (гидроксилированию) с образованием 2- и 4-гидрокси эстрогенов. В ответ на повышение концентрации эстрогенов меняется экспрессия *ESR1* и количество ядерных рецепторов ER α [3], а также повышается экспрессия гена мембранных рецепторов эстрогена (*GPER*) [13], что, в свою очередь, приводит к усилению пролиферации в тканях-мишенях. Данному эффекту должно препятствовать повышение экспрессии гена сульфотрансферазы *SULT1E1*, участвующего в инактивации эстрогенов в тканях-мишенях, путем их сульфатирования [14]. Но наблюдаемое в нашем исследовании повышение экспрессии гена стероидной сульфатазы (*STS*), осуществляющей гидролиз сульфатов ряда стероидов, преобразуя их в активную форму, является противодействующей силой, направленной на снижение эффекта от транскрипционной активности *SULT1E* [15]. В этой связи интересен тот факт, что на стадии G1 экспрессия гена стероидной сульфатазы *STS* в 1,9 раза превышает экспрессию гена сульфотрансферазы *SULT1E1*, на стадии G2 у пациенток старше 55 лет в 2,5 раза, на стадии G3 всего лишь в 1,1 раза. При этом у пациенток с аденокарциномой матки стадии G2 в возрасте до 55 лет экспрессия гена стероидной сульфатазы *STS* была в 1,5 раза ниже экспрессии гена сульфотрансферазы *SULT1E1*. Это подчеркивает как возрастные, так и зависимые от стадии дифференцировки опухолевых клеток особенности метаболизма стероидов в тканях тела матки.

Необходимо также отметить ещё один не мало важный факт, касающийся гиперактивации транскрипции гена *GPER* на стадии дифференцировки опухолевых клеток G1. На данной стадии экспрессия гена *GPER*, кодирующего мембранный рецептор эстрогенов, превышает в экспрессию генов ядерных рецепторов эстрогена *ESR1* и *ESR2* в 5 и 3 раза соответственно. На других стадиях этого эффекта не наблюдается

(превышает либо *ESR1*, либо *ESR2*), а каждая из этих стадий характеризуется своим определенным соотношением экспрессии генов ядерных и мембранных рецепторов эстрогена (табл. 1)

Таблица 1. Соотношение экспрессии генов рецепторов эстрогена.

Гены	стадия G1, после 55 лет	стадия G2, до 55 лет	стадия G2, после 55 лет	стадия G3, после 55 лет
ESR1/ESR2/ GPER	1/2/5	1/5/4	1/0,1/0,3	1/10/7,5

Заключение

Полученные данные выявили, что важную роль в процессе малигнизации тканей матки играют гены ответственные за гидроксилирование эстрадиола в С-2 положении (*CYP1A1*), образование эстрогенов из андрогенов (*CYP19A*), ответственные за регулирование уровня ядерных рецепторов эстрогенов *ESR1* и 2 и мембранных рецепторов эстрогенов (*GPER*), сульфатирование эстрагенов (*SULT1E1* - ген эстрогеновой сульфотрансферазы), а также ответственные за преобразование стероидов в их активную форму (ген стероидной сульфатазы, *STS*).

В ходе проведенных исследований установлено, что транскрипционная активность этих генов в процессе малигнизации тканей тела матки имеет выраженный возраст - ассоциированный характер, а также зависит от стадии развития онкологического процесса (степени дифференцировки клеток опухоли, G).

Так же, на основании полученных данных, можно сделать вывод о том, что:

1) до 55 лет в опухолевой ткани матки (стадии G2) сульфатирование преобладает над гидролизом сульфатов стероидов;

2) по мере снижения уровня дифференцировки клеток опухолевых тканей уменьшается степень преобладания гидролиза сульфатов стероидов над их сульфатированием;

3) после 55 лет по мере снижения уровня дифференцировки клеток опухолевых тканей уменьшается и экспрессия гена ядерного рецептора эстрогена *ESR1*.

Литература

1. World Cancer Report 2014. //International Agency for Research on Cancer.World Health Organization. – 2014. - Chapter 5.12. ISBN 978-92-832-0429-9.
2. Do we know what causes endometrial cancer? /Causes, Risk Factors, and Prevention TOPICS/American Cancer Society – 2015. - Режим доступа: <http://www.cancer.org/cancer/endometrialcancer/detailedguide/endometrial-uterine-cancer-what-causes>
3. Katzenellenbogen B.S. Estrogen Receptors: Bioactivities and Interactions with Cell Signaling Pathways / B.S. Katzenellenbogen // Biol. Reproduction. - 2001. - Vol. 54. - P. 287-293.
4. Human estrogen receptor β - gene structure, chromosomal localisation and expressionpattern/ Enmark E., Pelto-Huikko M., Grandien K. et al. // Clin. Endocrinol. Met. - 1997. - Vol. 82. - P. 4258-4265.
5. The role of aromatase and 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA expression in predicting the clinical outcome of human breast cancer. /Salhab M., Reed M.J., Al Sarakbi W., Jiang W.G., Mokbel K. // Breast Cancer Res Treat. - 2006. – Vol. 99(2) – P. 155-62.
6. Loss of ER β expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression / Bardin A., Boulle N., Lazennec G., Vignon F. // Endocrine-Related Cancer. - 2004. - Vol. 11. - P. 537-551.
7. Enmark E. Oestrogen receptors – an overview/ E. Enmark, J.A. Gustafsson // J. Intern. Med. - 1999. - Vol. 2. - P. 133-138.
8. CYP1B1 gene in endometrial cancer. / Sasaki M, Kaneuchi M, Fujimoto S, Tanaka Y, Dahiya R. / Mol Cell Endocrinol. -2003. - P.171-6.
9. Chomczynski P. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on /P. Chomczynski, N. Sacchi // Nat Protoc. – 2006. - Vol.1, N 2. - P.581-585.
10. Livak K.J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method/ Livak K.J., Schmittgen T.D. // Methods. - 2001. – Vol. 25. – P.402-408.
11. Гублер Е.В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях/ Гублер Е.В., Генкин А.А. – Л., 1973.
12. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters/ Bulun S., Sebastian S., Takayama K. et al. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. - 2003. - Vol. 86. - P. 219-224.
13. Filardo E.J. Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology./Filardo E.J., Thomas P. //Endocrinology. – 2012. – Vol.153(7). – P.2953-62.
14. Effect of estrogen sulfation by SULT1E1 and PAPSS on the development of estrogen-dependent cancers. / Xu Y., Liu X., Guo F., Ning Y., Zhi X., Wang X., Chen S., Yin L., Li X. // Cancer Sci. – 2012. – Vol. 103(6) – P.1000-9.

15. Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. /Reed M.J., Purohit A., Woo L.W., Newman S.P., Potter B.V. // *Endocr. Rev.* - 2005. – Vol.26 (2) – P.171–202.

References

1. World Cancer Report 2014. //International Agency for Research on Cancer.World Health Organization. – 2014. - Chapter 5.12. ISBN 978-92-832-0429-9.

2. Do we know what causes endometrial cancer? /Causes, Risk Factors, and Prevention TOPICS/American Cancer Society – 2015. - Rezhim dostupa: <http://www.cancer.org/cancer/endometrialcancer/detailedguide/endometrial-uterine-cancer-what-causes>

3. Katzenellenbogen B.S. Estrogen Receptors: Bioactivities and Interactions with Cell Signaling Pathways / B.S. Katzenellenbogen // *Biol. Reproduction.* - 2001. - Vol. 54. - P. 287-293.

4. Human estrogen receptor β - gene structure, chromosomal localisation and expressionpattern/ Enmark E., Pelto-Huikko M., Grandien K. et al. // *Clin. Endocrinol. Met.* - 1997. - Vol. 82. - P. 4258-4265.

5. The role of aromatase and 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA expression in predicting the clinical outcome of human breast cancer. /Salhab M., Reed M.J., Al Sarakbi W., Jiang W.G., Mokbel K. // *Breast Cancer Res Treat.* - 2006. – Vol. 99(2) – P. 155-62.

6. Loss of ER β expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression / Bardin A., Boulle N., Lazennec G., Vignon F. // *Endocrine-Related Cancer.* - 2004. - Vol. 11. - P. 537-551.

7. Enmark E. Oestrogen receptors – an overview/ E. Enmark, J.A. Gustafsson // *J. Intern. Med.* - 1999. - Vol. 2. - P. 133-138.

8. CYP1B1 gene in endometrial cancer. / Sasaki M, Kaneuchi M, Fujimoto S, Tanaka Y, Dahiya R. / *Mol Cell Endocrinol.* -2003. - P.171-6.

9. Chomczynski P. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on /P. Chomczynski, N. Sacchi // *Nat Protoc.* – 2006. - Vol.1, N 2. - P.581-585.

10. Livak K.J. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2-DDCT Method/ Livak K.J., Schmittgen T.D. // *Methods.* - 2001. – Vol. 25. – P.402-408.

11. Gubler E.V. Primenenie neparametricheskih kriteriev statistiki v mediko-biologicheskikh issledovaniyah/ Gubler E.V., Genkin A.A. – L., 1973.

12. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters/ Bulun S., Sebastian S., Takayama K. et al. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* - 2003. - Vol. 86. - P. 219-224.

13. Filardo E.J. Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology./Filardo E.J., Thomas P. //*Endocrinology.* – 2012. – Vol.153(7). – P.2953-62.

14. Effect of estrogen sulfation by SULT1E1 and PAPSS on the development of estrogen-dependent cancers. / Xu Y., Liu X., Guo F., Ning Y., Zhi X., Wang X., Chen S., Yin L., Li X. // *Cancer Sci.* – 2012. – Vol. 103(6) – P.1000-9.

15. Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. /Reed M.J., Purohit A., Woo L.W., Newman S.P., Potter B.V. // *Endocr. Rev.* - 2005. – Vol.26 (2) – P.171–202.