На правах рукописи

КАЛИНИНА

Татьяна Сергеевна

ЭФФЕКТЫ ПЕСТИЦИДОВ ДДТ И ЭНДОСУЛЬФАНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ ЭСТРОГЕНОВОГО РЕЦЕПТОРА В КЛЕТКАХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

1.5.4 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск

2022

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте молекулярной биологии и биофизики федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (НИИМББ ФИЦ ФТМ).

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор **Гуляева Людмила Федоровна**

Оффициальные оппоненты:

Миронова Надежда Львовна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук» (ИХБФМ СО РАН).

Щербаков Дмитрий Николаевич, кан-т биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела биоинженерии Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Ведущая организация:
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Защита состоится «____» _____ 2023 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.242.02 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (ФИЦ ФТМ) и на сайте https://frcftm.ru/

Автореферат разослан «__._» ___ 20___ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук Русских Галина Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

К настоящему времени известно около 1000 химических веществ, которые могут влиять на эндокринную систему человека (Schug *et al.*, 2016). Такие вещества получили название «эндокринные разрушители» (Colborn and Clement, 1992). Исследование механизмов их действия и оценка последствий их воздействия на людей затруднены, поскольку побочные эффекты проявляются через годы после воздействия эндокринных разрушителей, а у некоторых людей могут так и не проявиться (Yilmaz *et al.*, 2020). Одним из самых известных эндокринных разрушителей является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ), воздействие которого многие исследователи связывали с увеличением риска развития рака молочной железы (РМЖ) (Attaullah *et al.*, 2018; Cohn *et al.*, 2007; Mekonen *et al.*, 2021). После запрета ДДТ в сельском хозяйстве активно использовали эндосульфан, который обладает сходными с ДДТ свойствами. Как именно ДДТ, эндосульфан и подобные им соединения с гормон-подобным действием могут способствовать развитию рака, в настоящий момент недостаточно исследовано.

ДДТ и эндосульфан медленно деградируют в окружающей среде и накапливаются в тканях живых организмов, являясь, таким образом, «стойкими» токсинами (van den Berg, 2009; Jayaraj *et al.*, 2016). Широкое интенсивное использование ДДТ и эндосульфана в прошлом привело к мировому загрязнению, остатки этих соединений были обнаружены, в том числе, в Арктике (Carrizo *et al.*, 2017; Weber *et al.*, 2010). В исследованиях, проведённых в 2009-2012 годах в Мексике и в Хорватии, метаболиты ДДТ и эндосульфана обнаруживались в образцах крови и в грудном молоке человека, несмотря на прекращение использования этих пестицидов (Klinčić *et al.*, 2014; Ruiz-Suárez *et al.*, 2014). На данный момент допустимо применение ДДТ для борьбы с малярией. Кроме этого, ДДТ незаконно используется в большинстве развивающихся стран (Jayaraj *et al.*, 2016).

В канцерогенезе молочной железы значительную роль играют сигнальные пути эстрогенового рецептора (ER), который также является важным маркером при выборе тактики лечения РМЖ (Saha Roy *et al.*, 2012). ДДТ и эндосульфан обладают эстрогенными свойствами, поэтому изменение активности ER и, впоследствии, экспрессии мишеней рецептора является одним из предполагаемых механизмов негативного действия пестицидов на клетки молочной железы (Bleak *et al.*, 2021). В пользу этого предположения говорит тот факт, что поздняя менопауза или раннее менархе (т.е. более длительное воздействие эстрогена на ткани женщины) увеличивает риск развития РМЖ (Surakasula *et al.*, 2014). Однако ДДТ и эндосульфан также обладатют антиандрогенными и антипрогестеронными эффектами (Jin *et al.*, 1997; Klotz *et al.*, 1997; Kojima *et al.*, 2004). Сигнальные пути стероидных рецепторов пересекаются, разные рецепторы могут участвовать в регуляции экспрессии одних и тех же генов и, в том числе, влиять на транскрипционную активность

друг друга (Truong and Lange, 2018). Поэтому при исследовании эффектов пестицидов на мишени ER необходимо также учитывать возможный вклад антагонистического действия соединений относительно андрогеннового и прогестеронового рецепторов (AR и PR соответственно).

Среди мишеней ER могут быть микроРНК (miRNAs, miRs) – малые некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Изменения в экспрессии микроРНК сопровождают патологические процессы в организме, а индуцироваться эти изменения могут химическими соединениями (Giza *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2011). Для ряда микроРНК ранее было показано, что ДДТ и эндосульфан могут приводить к изменениям их экспрессии (Tilghman *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2017). Однако такие исследования немногочисленны и необходимы дальнейшие работы по изучению роли микроРНК в токсическом действии ДДТ и эндосульфана на клетки человека.

Степень разработанности темы исследования

Сигнальные пути ER играют значительную роль в канцерогенезе молочной железы. На сегодняшний день известен ряд белок-кодирующих генов-мишеней ER, и обнаружены микроРНК, потенциально регулируемые ER (Cheng *et al.*, 2020; Klinge, 2009; Ovchinnikov *et al.*, 2018). Ранее были выявлены 12 генов (*BCL2*, *CCNA1*, *CTSD*, *FOSL1*, *HMGB1*, *NME1*, *PGR*, *SERPINA3*, *SERPINB5*, *SLC7A5*, *STC2*, *TFF1*), ассоциированных с канцерогенезом молочной железы, экспрессия которых в клетках MCF-7 усиливается как под действием эстрадиола, так и под действием о,п'-ДДТ (Bratton *et al.*, 2012). Кроме этого, показано, что обработка клеток MCF-7 о,п'-ДДТ или эстрадиолом приводит к изменениям в экспрессии miR-26a, miR-1826, miR-21, miR-15b, miR-638, miR-1915, miR-663 (Tilghman *et al.*, 2012). Таким образом, имеющиеся данные указывают на то, что о,п'-ДДТ может обладать сходными с эстрадиолом эффектами на экспрессию белок-кодирующих или микроРНК-кодирующих генов, в том числе генов, ассоциированных с канцерогенезом молочной железы. Однако практически не исследованы эффекты эндосульфана и п,п'-ДДТ на экспрессию чувствительных к эстрадиолу или другим гормонам генов.

Целью диссертационной работы является изучение влияния ДДТ и эндосульфана на экспрессию регулируемых ER генов и микроРНК в клетках молочной железы.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Определить уровень мРНК известных генов-мишеней ER в клетках молочной железы линии MCF-7, обработанных эстрадиолом, прогестероном, тестостероном, о,п'-ДДТ, п,п'-ДДТ или эндосульфаном в течение 6, 24 и 48 ч.

2. Определить уровень микроРНК, содержащих в своих промоторах сайт связывания ER (ERE), в клетках линии MCF-7, обработанных эстрадиолом в течение 6, 24 и 48 часов для выявления эстроген-чувствительных микроРНК, и в клетках, обработанных прогестероном, тестостероном, о,п'-ДДТ, п,п'-ДДТ и эндосульфаном.

3. Определить уровень выявленных гормон-чувствительных микроРНК и генов в культуре клеток молочной железы MDA-MB-231, не экспрессирующих ER, PR, AR, обработанных о,п'-ДДТ, п,п'-ДДТ и эндосульфаном.

4. Определить уровень мРНК и белковых продуктов генов-мишеней микроРНК, экспрессия которых меняется под действием ксенобиотиков, в клетках, обработанных о,п'-ДДТ, п,п'-ДДТ и эндосульфаном.

5. Определить уровни микроРНК, чувствительных к действию пестицидов в эксперименте *in vitro*, в молочной железе самок крыс линии Вистар, обработанных п,п′-ДДТ.

6. Проанализировать уровни экспрессии выявленных мишеней пестицидов и их связь со статусом ER, PR и прогрессией рака в тканях молочной железы пациентов с диагнозом РМЖ.

Научная новизна работы

Имеющиеся немногочисленные исследования о влиянии пестицидов с гормон-подобными свойствами на ER-регулируемые гены в освновном выполнены с использованием о,п'-ДДТ и культуры клеток MCF-7, либо самок крыс/мышей. Практически не проводилось исследований эффектов п,п′-ДДТ и эндосульфана на экспрессию таких генов.

В данной работе с использованием культур клеток MCF-7 и MDA-MB-231, впервые были комплексно исследованы эффекты эндосульфана и двух изомеров ДДТ (о,п′- и п,п′-) на экспрессию известных мишеней ER (*BRCA1*, *CCND1*, *PGR*, *STC2*, *VEGFA*), а также впервые было исследовано их влияние на экспрессию микроРНК, содержащих в своих промоторах сайты связывания ER.

Впервые обнаружено, что о,п′-ДДТ, как и эстрадиол, приводит к увеличению экспрессии *STC2*, miR-190b, а на экспрессию miR-365, miR-27a и miR-190a тестостерон и исследуемые пестициды могут оказывать противоположные эффекты в клетках гормонозависимого рака MCF-7. Обнаружено, что п,п′-ДДТ приводит к изменениям в экспрессии miR-365, miR-190a *in vitro* и *in vivo*.

Впервые выявлено, что эндосульфан и изомеры ДДТ приводят к снижению экспрессии регуляторов апоптоза *TP53INP1* и *APAF1*, которые являются мишенями miR-190a, miR-190b, miR-19b, miR-27a.

Также обнаружено, что низкие уровни miR-190a в определённых подтипах РМЖ ассоциированы с наличием метастазов в лимфоузлах пациентов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты проведенных исследований преимущественно носят фундаментальный характер, однако также могут иметь прикладное значение в клинической практике. Так, обнаружены новые мишени пестицидов, обладающих гормон-подобными свойствами, что расширяет знания о механизмах их действия на клетки молочной железы. Среди генов, экспрессия которых оказалась чувствительна к пестицидам, выявлены гены, изменения в экспрессии которых ассоциированы с клинико-патологическими характеристиками опухолей молочной железы, такими как статус ER или PR,

наличие метастазов в лимфоузлах. Основываясь на полученных результатах, можно предполагать в дальнейшем создание терапии, направленной на снижение уровней экспрессии *CCND1*, miR-190b у пациентов с гормонозависимым РМЖ или восстановление уровней экспрессии miR-190a. Кроме этого, несмотря на все достигнутые успехи в терапии и диагностике РМЖ, поиск новых биомаркеров по-прежнему востребован. Например, традиционные методы диагностики метастазов в лимфоузлах на дооперационном этапе имеют относительно низкую точность и чувствительность, а степень соответствия между результатами иммуногистохимического исследования образцов, полученных в ходе биопсии, и образцов, полученных во время операции, составляет 80-90 %. Таким образом, уровни экспрессии *CCND1*, *STC2*, miR-190b, miR-190a могут стать дополнительными маркерами при определении типа РМЖ или метастатического поражения лимфоузлов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В клетках гормонозависимого рака молочной железы MCF-7 профиль экспрессии генов *BRCA1*, *CCND1*, *PGR*, *STC2*, *VEGFA* и miR-365, miR-190b, miR-190a, miR-27a, miR-19b меняется под действием эстрадиола, тестостерона, прогестерона, эндосульфана, о,п′-ДДТ и п,п′-ДДТ. Регистрируемые изменения в экспрессии генов различны для каждого соединения и зависят от времени его воздействия.
2. Увеличение экспрессии miR-190a в клетках молочной железы под действием п,п′-ДДТ не зависит от статуса рецепторов половых гормонов.
3. о,п′-ДДТ, п,п′-ДДТ и эндосульфан приводят к снижению в клетках MCF-7 количества белка генов *TP53INP1* и *APAF1*, которые предсказываются в качестве мишеней miR-190b, miR-27a, miR-190a, miR-19b.
4. Экспрессия miR-190a, miR-190b, *CCND1*, *STC2* и *TP53INP1* при раке молочной железы зависит от статуса ER. Кроме этого, уровни экспрессии *CCND1* и, при ER-позитивных опухолях с Ki-67<14%, уровни miR-190a ассоциированы со статусом лимфатических узлов.

Публикации и апробация результатов

По материалам работы опубликовано 16 научных работ, из которых 5 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science.

Основные результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: 54-международной научной студенческой конференции (Новосибирск, Россия, 2016); XXI международной экологической студенческой конференции (Новосибирск, Россия, 2016); 11-й международной встрече международного общества изучения ксенобиотиков (11th International ISSX Meeting; Пусан, Республика Корея, 2016); I международном научном форуме студентов и молодых учёных «Науки о жизни: от исследований к практике» (Барнаул, Россия, 2017); III всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, Россия, 2017); 56-й международной научной

студенческой конференции (Новосибирск, Россия, 2018); IV всероссийской конференции по молекулярной онкологии с международным участием (Москва, Россия, 2018); 12-й международной встрече международного общества изучения ксенобиотиков (12th International ISSX Meeting; Портленд, США, 2019); LXXX научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины-2019» (Санкт-Петербург, Россия, 2019); V всероссийской конференции по молекулярной онкологии с международным участием (Москва, Россия, 2019); конгрессе Европейского общества медицинской онкологии 2020 (ESMO Virtual Congress 2020, онлайн конгресс, 2020); конгрессе по молекулярному анализу для точной онкологии 2021 (MAP 2021 Virtual, онлайн конгресс, 2021).

Степень достоверности

Сформулированные в работе выводы подтверждены большим объемом экспериментального материала, который был получен с использованием современных методов, и адекватным статистическим анализом данных. Публикации в рецензируемых журналах свидетельствуют о значимости полученных результатов и их признании научным сообществом.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 131 страницах машинописного текста, включает 38 рисунков и 18 таблиц. Библиография включает 268 наименований.

Вклад автора

Автор самостоятельно выполнила представленные в диссертации эксперименты. Основные результаты исследований получены и проанализированы лично автором. Работы, связанные с поиском сайтов связывания AR и PR в промоторных областях микроРНК, проводились автором совместно с к.б.н. Овчинниковым В.Ю. (Факультет медицины и здравоохранения, Ноттингемский университет, Великобритания).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы

В работе использовались клеточные культуры MCF-7 и MDA-MB-231, 12 половозрелых самок крыс Wistar и 196 пар образцов тканей РМЖ и нормальных прилежащих тканей от пациенток, не получавших предоперационную фармакотерапию. Образцы тканей были собраны в 2017–2020 гг. в Новосибирском городском бюджетном учреждении здравоохранения «Городская клиническая больница № 1» и Новосибирском областном онкологическом диспансере.

В работе применялись стандартные подходы по содержанию лабораторных животных, культивированию линий клеток. Использованы следующие методы: выделение тотальной РНК с использованием TRIzol Reagent и выделение

микроРНК с использованием буфера, состоящего из 4 М гуанидин изотиоцианата, 25 мМ цитрата натрия, 0,3% лауроилсаркозината натрия, 0,1% 2-меркаптоэтанола, 25 мМ ацетата натрия; реакция обратной транскрипции по матрице микроРНК с использованием stem-loop-праймеров и реакция обратной транскрипции по матрице РНК с использованием олиго-dT-праймеров и гексапраймеров; ПЦР с использованием систем детекции SYBR и TaqMan в режиме реального времени; вестерн-блот анализ.

Результаты и обсуждение

Влияние половых гормонов и пестицидов с гормон-подобным действием на экспрессию известных мишеней ER в клетках молочной железы человека

ДДТ и эндосульфан обладают эстрогенным действием и могут проявлять антагонистические эффекты по отношению к AR и PR. При этом многие гены являются мишенями одновременно для ER, PR и/или AR. Поэтому в рамках диссертационного исследования в первую очередь было исследовано влияние гормонов эстрадиола, прогестерона и тестостерона на экспрессию известных мишеней эстрогена в рецептор-позитивных клетках молочной железы.

Исследование влияния эстрадиола, прогестерона и тестостерона на экспрессию BRCA1, CCND1, PGR, STC2, VEGFA в гормон-чувствительных клетках молочной железы человека in vitro

Для исследования было выбрано несколько мишеней эстрогена, обладающих высокой экспрессией в клетках MCF-7: *BRCA1*, *CCND1*, *PGR*, *STC2*, *VEGFA*. Клетки обрабатывали в течение 6, 24 и 48 ч гормонами в дозах 10 нМ или 100 нМ, после чего исследовали уровень мРНК генов в обработанных клетках.

Было подтверждено увеличение экспрессии всех выбранных мишеней эстрогена в клетках, обработанных эстрадиолом (Таблица 1). Однако также было выявлено, что уровни мРНК *BRCA1*, *CCND1*, *PGR*, *STC2* увеличиваются под действием тестостерона. Следовательно, можно ожидать, что ДДТ и эндосульфан могут оказывать ингибирующее действие на их экспрессию.

Таблица 1. Относительные уровни мРНК мишеней эстрогена в клетках MCF-7, обработанных эстрадиолом, тестостероном и прогестероном.

Ген	**Время**	**Эстрадиол**		**Тестостерон**		**Прогестерон**	
		10 нМ	100 нМ	10 нМ	100 нМ	10 нМ	100 нМ
BRCA1	6 ч	1,18	**1,32***	1,10	1,16	**0,75***	0,97
	24 ч	1,05	1,08	1,17	1,23	1,02	0,98
	48 ч	1,16	**1,50***	**1,36****	**1,45***	1,06	1,13
CCND1	6 ч	**1.35***	**1.49****	1.19	**1.33***	1.04	1.11
	24 ч	1.16	1.07	0.96	1.09	0.99	0.94
	48 ч	1.10	1.17	1.07	1.06	0.93	0.86
PGR	6 ч	**2.37****	**3.10****	**1.60****	**2.70****	**0.77***	**0.80***
	24 ч	**1.40***	**1.38***	**1.36***	**1.52****	1.03	0.91
	48 ч	**1.45***	**1.35***	1.18	**1.36***	0.98	0.90

Продолжение Таблицы 1

STC2	6 ч	**1,46****	**1,46****	1,09	**1,41****	0,89	0,96
	24 ч	1,02	1,13	0,97	0,99	1,14	1,05
	48 ч	1,17	1,21	0,90	**0,78***	0,94	0,94
VEGFA	6 ч	**1,28***	**1,41****	1,02	1,18	**0,70***	**0,75***
	24 ч	1,13	1,05	1,08	1,05	**1,35****	**1,27***
	48 ч	1,22	1,19	1,03	1,06	1,02	0,93

Примечание: каждое значение представляет отношение мРНК/мРНК для клеток, обработанных соединениями, к клетам, обработанным ДМСО (контроль). Приведены средние значения (n = 3). **p* < 0,05 по сравнению с контролем; ***p* < 0,01 по сравнению с контролем.

В клетках, обработанных прогестероном в течение 6 ч, было выявлено снижение уровней мРНК *BRCA1*, *PGR*, *VEGFA*. Однако после инкубации с прогестероном в течение 24 ч экспрессия *VEGFA* увеличивалась, что в целом согласуется с полученными ранее данными на культуре клеток T47-D (Mirkin *et al.*, 2006).

Исследование влияния о,п′-ДДТ, п,п′-ДДТ и эндосульфана на экспрессию BRCA1, CCND1, PGR, STC2, VEGFA в гормон-чувствительных клетках молочной железы человека in vitro

Как и ожидалось, обработка клеток о,п′-ДДТ приводила к увеличению экспрессии эстроген-регулируемых *CCND1*, *VEGFA*, *STC2* (Таблица 2).

Таблица 2. Относительные уровни мРНК мишеней эстрогена в клетках MCF-7, обработанных о,п′-ДДТ, п,п′-ДДТ или эндосульфаном.

Ген	**Время**	**о,п′-ДДТ**		**п,п′-ДДТ**		**Эндосульфан**	
		0,1 мкМ	10 мкМ	0,1 мкМ	10 мкМ	0,1 мкМ	1 мкМ
BRCA1	6 ч	0,90	**0,51****	1,21	1,01	0,88	0,87
	24 ч	0,98	1,10	0,86	**0,79***	1,01	1,12
	48 ч	0,96	0,86	0,95	0,81	0,94	0,91
CCND1	6 ч	**1,30***	**1,62****	0,98	0,98	0,92	0,94
	24 ч	1,05	1,10	1,04	1,08	0,92	0,86
	48 ч	1,15	1,14	1,05	0,98	0,89	1,02
PGR	6 ч	0,84	0,99	0,98	0,84	0,88	0,96
	24 ч	0,99	1,20	0,94	1,02	1,06	1,09
	48 ч	1,11	1,19	**0,71***	**0,70***	0,88	**0,77***
STC2	6 ч	1,15	**1,82****	1,13	1,03	1,02	0.95
	24 ч	0,95	1,17	0,91	1,04	0,80	1,11
	48 ч	1,07	1,25	1,08	1,16	1,03	1,12
VEGFA	6 ч	1,17	**1,50****	1,13	0,96	0,92	0,93
	24 ч	1,03	**1,37****	0,93	**1,26***	0,94	**1,27***
	48 ч	1,03	**1,44****	0,87	0,90	1,11	1,13

Примечание: каждое значение представляет отношение мРНК/мРНК для клеток, обработанных соединениями, к клетам, обработанным ДМСО (контроль). Приведены средние значения (n = 3). **p* < 0,05 по сравнению с контролем; ***p* < 0,01 по сравнению с контролем.

Уровень мРНК *VEGFA* увеличивался также под действием п,п′-ДДТ и эндосульфана в 1,3 раза. Учитывая, что *STC2* и *VEGFA* оказались мишенями

тестостерона и прогестерона соответственно, выявленное увеличение их экспрессии под действием пестицидов может быть следствием не только эстрогенных, но и антиандрогенных и антипрогестеронных свойств соединений.

Уровень мРНК известного опухолевого супрессора *BRCA1* снижался под действием о,п′-ДДТ и п,п′-ДДТ в 2 и в 1,3 раза соответсвенно. Также после инкубации клеток с п,п′-ДДТ и эндосульфаном снижалась экспрессия эстроген- и андроген-регулируемого гена *PGR*, кодирующего PR.

Исследование влияния о,п'-ДДТ, п,п'-ДДТ и эндосульфана на экспрессию BRCA1, CCND1, PGR, STC2, VEGFA в клетках молочной железы человека, не экспрессирующих ER, PR и AR, in vitro

Чтобы подтвердить, что выявленные изменения в экспрессии *BRCA1*, *CCND1*, *STC2*, *VEGFA* связаны с действием пестицидов на стероидные рецепторы, был проведён аналогичный эксперимент с использованием культуры клеток MDA-MB-231, не экспрессирующей ER, PR и AR.

В результате эксперимента в клетках MDA-MB-231 было обнаружено снижение экспрессии *STC2* после 48 ч инкубации под действием о,п′-ДДТ и п,п′-ДДТ в 1,3 и 1,6 раз соответственно и увеличение экспрессии гена в 1,5 раза под действием эндосульфана. Экспрессия *BRCA1* снижалась в 1,3 раза после инкубации с 1 мкМ эндосульфана в течение 48 ч. Однако все эти изменения не совпадали с выявленными изменениями в экспрессии генов в клетках MCF7.

Таким образом, подверждено, что изменения в экспрессии *BRCA1*, *CCND1*, *STC2* и *VEGFA* под действием пестицидов в гормон-чувствительных клетках опосредовано их эффектами на рецепторы половых гормонов.

Влияние половых гормонов и пестицидов с гормон-подобным действием на экспрессию микроРНК, содержащих в промоторных областях сайты связывания ER

Отбор микроРНК

Для исследования эффектов пестицидов на экспрессию микроРНК, опосредованных их эстрогенным действием, были отобраны микроРНК, в предполагаемых промоторных регионах которых содержатся сайты связывания ER. Для отбора были использованы ранее опубликованные данные (Ovchinnikov *et al.*, 2018), а также база данных Harmonizome (URL: https://maayanlab.cloud/Harmonizome/), в которых содержится информация о результатах ChIP-seq анализа, проведённого с использованием клеток рака молочной железы T-47D. В первую очередь нас интересовали относительно хорошо изученные микроРНК с высокой экспрессией в клетках молочной железы. Были выбраны miR-135a, miR-342, miR-365b, miR-21, miR-190b, miR-196a, кластер miR-23a/24-2/27a. Помимо микроРНК, регулируемых ER согласно данным ChIP-seq, в исследование были взяты miR-190a, поскольку она разделяет одни и те же гены-мишени с miR-190b, а в её промоторе ранее был обнаружен полу-сайт связывания ER (Chu *et al.*, 2014), и miR-19b, для которой

также с помощью ChIP-анализа была ранее продемонстрирована регуляция с помощью ERα (McKiernan *et al.*, 2020).

Исследование влияния эстрадиола, прогестерона и тестостерона на экспрессию miR-135a, miR-342, miR-365, miR-21, miR-190a, miR-190b, miR-196a, miR-23a, miR-24, miR-27a, miR-19b в гормон-чувствительных клетках молочной железы человека in vitro

В первую очередь было исследовано влияние гормонов эстрадиола, прогестерона и тестостерона на экспрессию микроРНК, потенциально регулируемых ER.

Несмотря на то, что все микроРНК были предсказаны, как эстроген-регулируемые, экспрессия только miR-190b и miR-19b увеличивалась под действием эстрадиола после 24 ч инкубации (Таблица 3). Уровень miR-190b также увеличивался после 48 ч инкубации с прогестероном. Экспрессия miR-19b была чувствительна ко всем гормонам, однако только в клетках, обработанных эстрадиолом, уровень микроРНК увеличивался под действием обеих доз гормона и именно изменения в количестве микроРНК, вызванные эстрадиолом, были наиболее достоверны. Экспрессия miR-365 снижалась в 1,5-1,7 раза после 6 ч инкубации с эстрадиолом и в 1,3 раза после инкубации с тестостероном.

Таблица 3. Относительные уровни микроРНК-мишеней эстрогена в клетках MCF-7, для которых были выявлены достоверные изменения в экспрессии под действием эстрадиола, тестостерона или прогестерона.

МикроРНК	**Время**	**Эстрадиол**		**Тестостерон**		**Прогестерон**	
		10 нМ	100 нМ	10 нМ	100 нМ	10 нМ	100 нМ
mir-135a	6 ч	0,94	0,95	**0,77***	0,98	0,98	0,95
	24 ч	0,83	0,98	1,10	1,05	1,17	1,12
	48 ч	1,10	0,96	1,01	1,01	0,92	1,03
mir-365	6 ч	**0,60***	**0,67***	0,88	**0,79***	0,89	0,82
	24 ч	0,99	0,91	0,94	1,03	1,13	1,13
	48 ч	1,11	1,03	0,99	0,96	1,05	1,13
mir-21	6 ч	1,03	0,98	0,91	**0,62****	1,17	**1,36***
	24 ч	0,97	0,98	0,89	0,91	0,92	0,90
	48 ч	1,07	1,08	**1,36****	**1,40****	1,11	1,08
mir-190b	6 ч	0,97	**0,75****	0,96	0,92	0,93	1,10
	24 ч	**1,36***	**1,36****	1,13	1,09	1,02	1,03
	48 ч	1,12	1,09	1,05	1,15	1,14	**1,29***
miR-190a	6 ч	1,05	1,01	0,91	0,88	1,01	0,90
	24 ч	1,09	1,02	0,90	0,99	0,82	**0,75***
	48 ч	1,08	1,17	**1,24***	**1,36***	0,90	0,96
miR-196a	6 ч	1,12	0,92	0,98	1,13	0,95	0,87
	24 ч	1,04	1,10	1,15	1,17	0,82	1,03
	48 ч	0,90	1,04	1,10	**1,28***	0,85	1,23
miR-27a	6 ч	1,12	0,88	0,92	**0,77***	0,89	0,93
	24 ч	1,07	1,10	1,09	1,08	0,93	0,92
	48 ч	0,92	0,95	1,13	1,09	1,01	1,16

Продолжение Таблицы 3

miR-19b	6 ч	1,27	1,17	0,94	1,20	1,08	1,08
	24 ч	**1,45****	**1,48****	**1,32***	1,12	1,12	1,17
	48 ч	1,21	1,04	1,10	**1,45***	1,03	**1,66***

Примечание: каждое значение представляет отношение микроРНК/микроРНК для клеток, обработанных соединениями, к клетам, обработанным ДМСО (контроль). Приведены средние значения (n = 3). *$p < 0,05$ по сравнению с контролем; **$p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Экспрессия miR-135a, miR-21, miR-190a, miR-196a и miR-27a, согласно полученным результатам, в основном находится под регуляцией андрогенов; уровни miR-21 и miR-190a также менялись при обработке клеток 100 нМ прогестерона.

Исследование влияния о,п′-ДДТ, п,п′-ДДТ и эндосульфана на экспрессию miR-135a, miR-342, miR-365, miR-21, miR-190a, miR-190b, miR-196a, miR-23a, miR-24, miR-27a, miR-19b в гормон-чувствительных клетках молочной железы человека in vitro

Поскольку экспрессия отобранных микроРНК действительно оказалась чувствительной к гормонам, следующим шагом были исследованы уровни этих микроРНК в клетках, обработанных пестицидами ДДТ и эндосульфаном. Для шести микроРНК были выявлены достоверные изменения (Таблица 4).

Таблица 4. Относительные уровни микроРНК-мишеней в клетках MCF-7, экспрессия которых значительно менялась под действием о,п′-ДДТ, п,п′-ДДТ или эндосульфана.

МикроРНК		**о,п′-ДДТ**		**п,п′-ДДТ**		**Эндосульфан**	
		0,1 мкМ	10 мкМ	0,1 мкМ	10 мкМ	0,1 мкМ	1 мкМ
mir-342	6 ч	0,89	1,01	1,00	0,91	1,09	0,94
	24 ч	1,15	**1,32***	0,96	1,16	0,84	0,98
	48 ч	1,18	**1,33***	0,90	0,96	1,16	1,03
mir-365	6 ч	1,06	1,02	1,24	**1,80****	1,07	1,14
	24 ч	0,97	1,06	0,97	1,01	1,04	0,97
	48 ч	0,88	1,06	1,19	1,11	0,96	0,86
mir-190b	6 ч	0,96	1,07	0,93	0,91	0,96	1,06
	24 ч	1,05	**1,26***	0,98	1,02	0,98	1,16
	48 ч	1,00	**1,33***	0,87	0,91	1,08	1,06
miR-190a	6 ч	0,91	0,93	0,90	0,98	1,08	1,09
	24 ч	0,95	0,94	1,01	0,91	0,94	1,01
	48 ч	**0,73***	**0,63****	1,19	**1,23***	0,97	1,07
miR-27a	6 ч	1,14	1,20	0,85	0,92	0,90	0,95
	24 ч	0,97	1,01	1,08	1,00	1,05	1,15
	48 ч	0,94	1,09	1,19	**1,44****	1,08	1,07
miR-19b	6 ч	0,96	0,99	0,84	1,01	1,18	**1,23***
	24 ч	1,03	0,96	**1,40****	**1,64****	1,12	1,11
	48 ч	0,99	1,08	0,98	1,15	0,91	0,82

Примечание: каждое значение представляет отношение микроРНК/микроРНК для клеток, обработанных соединениями, к клетам, обработанным ДМСО (контроль). Приведены средние значения (n = 3). *$p < 0,05$ по сравнению с контролем; **$p < 0,01$ по сравнению с контролем.

Экспрессия эстроген-регулируемой miR-190b увеличивалась в 1,3 раза в клетках, обработанных о,п′-ДДТ после 24 и 48 ч инкубации. В этих же клетках увеличивался уровень miR-342. Уровень другой эстроген-регулируемой микроРНК – miR-19b – увеличивался в 1,4-1,6 раз после 24 ч инкубации с п,п′-ДДТ. Небольшое увеличение её экспрессии наблюдалось после 6 ч инкубации с эндосульфаном.

После инкубации клеток с п,п′-ДДТ происходило увеличение уровня miR-365 в 1,8 раз и увеличение уровня miR-27a в 1,4 раза, что может быть связано с антиандрогенными эффектами пестицида. о,п′-изомер обладает большей эстрогенной активностью по сравнению с п,п′-изомером (Kojima *et al.*, 2004), поэтому отсутствие роста количества miR-365 в клетках, обработанных о,п′-ДДТ, может быть обусловлено действием изомера на ER.

Количество miR-190a, чья экспрессия индуцировалась андрогеном и ингибировалась прогестероном, снижалось под действием о,п′-ДДТ в 1,4-1,6 раз. Под действием п,п′-ДДТ её уровень слегка увеличивался.

Исходя из полученных результатов можно предположить, что ДДТ приводит к изменению экспрессии miR-365, miR-27a, miR-190b, miR-190a, miR-19b через изменение активности ER, AR и PR.

Исследование влияния о,п'-ДДТ, п,п'-ДДТ и эндосульфана на экспрессию miR-342, miR-365, miR-190a, miR-190b, miR-27a в клетках молочной железы человека, не экспрессирующих ER, PR и AR, in vitro

Чтобы проверить, какие выявленные изменения в экспрессии микроРНК могут быть связаны с действием пестицидов на рецепторы ER, PR и AR, была произведена оценка количества микроРНК в клетках MDA-MB-231, обработанных пестицидами.

В клетках MDA-MB-231 было выявлено снижение экспрессии miR-365 в 1,3 раза после 24 ч инкубации с 10 мкМ о,п′-ДДТ и увеличение экспрессии miR-190a в 1,4 раза после 48 ч инкубации с п,п′-ДДТ. Других изменений в экспрессии микроРНК выявлено не было.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что изменение экспрессии miR-365, miR-27a, miR-190b, miR-19b и miR-342 в клетках MCF-7 могут быть обусловлены влиянием пестицидов на рецепторы ER или AR. Изменение экспрессии miR-190a в MCF-7 под действием о,п′-ДДТ также вероятно связано с антиандрогенными эффектами пестицида, однако п,п′-ДДТ приводил к увеличению экспрессии микроРНК как в MCF-7, так и в MDA-MB-231 клетках. Следовательно, влияние п,п′-ДДТ на miR-190a связано с другими сигнальными путями, затрагиваемыми ДДТ, и не является PR-опосредованным.

Исследование влияния гормонов и о,п'-ДДТ, п,п'-ДДТ, эндосульфана на экспрессию генов-мишеней miR-342, miR-365, miR-190a, miR-190b, miR-27a, miR-19b в гормон-чувствительных клетках молочной железы человека in vitro

Эффекты микроРНК на клеточные процессы опосредованы их влиянием на экспрессию генов-мишеней. Поэтому для исследования изменений, которые

могут быть следствием влияния ДДТ на гормон-регулируемые микроРНК, были исследованы уровни мРНК и белковых продуктов генов-мишеней miR-342, miR-365, miR-190a, miR-190b и miR-27a в клетках MCF-7, обработанных пестицидами. Чтобы убедиться, что изменение экспрессии генов не связано с гормон-подобными свойствами пестицидов, уровни их мРНК также были измерены в клетках, обработанных гормонами.

Ресурсы targetscan.org (McGeary *et al.*, 2019) и mirDIP (Tokar *et al.*, 2018) были использованы для прогнозирования мишеней микроРНК. Для исследования были выбраны гены *APAF1*, *TP53INP1*, *PTPRS*, *BAX*, *PHLPP1*, *TRPS1*, *XIAP*, *PTEN*. Для всех генов-мишеней были выявлены изменения под действием как минимум одного из соединений (Таблица 5).

Наиболее значительные изменения экспрессии в клетках, обработанных пестицидами, были выявлены для *APAF1* (потенциальная мишень miR-190-5p, miR-27a-3p, miR-19-3p, miR-365-3p), *TP53INP1* (потенциальная мишень miR-190-5p, miR-19-3p, miR-342-3p, miR-27a-3p, miR-365-3p) и *PTPRS* (потенциальная мишень miR-190-5p, miR-365-3p). Согласно полученным результатам изменения в экспрессии *APAF1* могут быть обусловлены антиандрогенными свойствами пестицидов, а изменения в экспрессии *TP53INP1* – эстрогенными и антипрогестеронными свойствами. Однако, вполне вероятно, что в ингибировании экспрессии *APAF1* и *TP53INP1* под действием п,п′-ДДТ также играет роль увеличение уровней miR-27a, miR-190a и miR-19b.

Выявленное увеличение экспрессии *PTPRS* после 6 ч инкубации с пестицидами может быть обусловлено их влиянием на ER и AR. После 48 ч инкубации экспрессия *PTPRS* снижалась под действием эстрадиола (может быть результатом предшествующего увеличения уровня miR-190b в клетках после 24 ч) и тестостерона (соответствовало увеличению уровня miR-190a). Под действием о,п′-ДДТ количество мРНК гена увеличивалось, что могло быть результатом снижения уровня miR-190a.

Изменения в экспрессии некоторых других генов также могли быть результатом увеличения или снижения уровня микроРНК. Так, в снижении уровня мРНК *BAX* под действием п,п′-ДДТ могло играть роль повышение экспрессии miR-365. Снижение экспрессии *XIAP* в клетках, обработанных о,п′-ДДТ в течение 48 ч, может быть следствием увеличения экспрессии miR-342 и miR-190b после инкубации с соединением в течение 24 и 48 ч. Наконец, выявленные изменения в количестве мРНК *PTEN* под действием гормонов могут быть обусловлены изменениями в экспрессии miR-365 и miR-21.

Таким образом, экспрессия всех выбранных генов изменялась под действием того или иного соединения, при этом многие выявленные изменения в количестве мРНК сопровождались противоположными изменениями в уровне микроРНК, для которых ген является мишенью.

Таблица 5. Относительные уровни мРНК-мишеней исследуемых микроРНК в клетках MCF-7, обработанных гормонами и пестицидами.

Ген		**Эстрадиол**		**Тестостерон**		**Прогестерон**		**о,п′-ДДТ**		**п,п′-ДДТ**		**Эндосульфан**	
		10 нМ	100 нМ	10 нМ	100 нМ	10 нМ	100 нМ	0,1 мкМ	10 мкМ	0,1 мкМ	10 мкМ	0,1 мкМ	1 мкМ
APAF1	6 ч	0,95	1,15	**1,26***	**1,39***	0,84	**0,73***	0,91	**0,72***	1,14	**1,22***	0,92	1,00
	24 ч	1,15	1,07	0,95	0,96	1,20	1,18	1,07	1,16	0,85	0,94	1,17	1,06
	48 ч	0,88	0,95	0,78	0,99	1,06	1,07	1,02	0,87	0,80	**0,73***	1,01	1,07
TP53INP1	6 ч	**0,64****	**0,71***	1,17	1,12	0,93	0,94	1,06	**0,64***	1,08	0,87	1,00	0,98
	24 ч	0,83	0,85	0,82	0,88	**1,31***	**1,29***	1,10	1,02	0,85	0,94	1,11	1,03
	48 ч	0,82	0,86	0,87	1,00	1,05	1,11	1,08	0,96	**0,67****	**0,62****	0,96	0,98
PTPRS	6 ч	1,14	1,20	1,14	1,01	0,90	0,90	**1,35***	**1,72****	1,11	**1,34***	1,01	**1,28***
	24 ч	**1,27***	**1,33***	**0,75***	**0,79***	1,11	1,12	0,99	1,01	1,12	1,03	1,17	1,06
	48 ч	**0,76***	**0,66****	0,80	**0,79***	1,19	1,21	1,21	**1,36***	1,07	1,13	0,84	0,92
BAX	6 ч	**0,62***	**0,45****	0,79	0,99	0,89	1,02	0,90	0,81	**0,78***	**0,78***	0,99	1,08
	24 ч	1,02	0,92	1,06	1,19	1,13	0,95	0,81	0,88	1,02	1,11	0,89	0,95
	48 ч	1,06	1,00	0,81	0,81	1,04	1,15	0,99	1,19	1,11	0,88	1,02	1,00
PHLPP1	6 ч	1,13	**1,31***	1,03	1,15	0,93	1,07	0,90	1,06	1,10	1,05	1,00	0,98
	24 ч	1,03	0,97	0,82	0,91	0,86	1,01	1,13	1,17	0,87	1,07	0,99	1,04
	48 ч	1,14	1,13	0,93	1,00	0,91	0,88	1,16	1.04	0,93	1,11	1,05	1,14
TRPS1	6 ч	1,04	1,11	1,16	1,11	0,85	0,97	0,98	**0,63****	0,98	0,90	0,97	1,01
	24 ч	1,19	0,99	1,06	1,09	1,07	1,02	1,02	1,17	0,90	1,00	1,06	0,98
	48 ч	1,12	**1,62****	**1,32***	**1,33***	1,12	1,12	1,05	1,03	0,88	0,81	0,88	1,07
XIAP	6 ч	0,81	0,95	0,98	1,04	0,86	1,10	1,04	0,83	1,10	0,93	0,88	0,82
	24 ч	1,01	0,97	0,95	0,91	1,07	1,12	1,10	0,96	1,03	1,09	1,00	0,97
	48 ч	1,17	1,13	1,02	1,11	1,08	1,05	0,98	**0,77***	0,93	0,82	1,06	0,93
PTEN	6 ч	1,15	**1,35***	**1,29***	**1,38***	0,74	**0,78***	0,87	**0,73***	1,04	0,85	1,04	1,00
	24 ч	1,08	1,16	1,15	1,04	1,18	1,17	1,02	1,07	0,99	1,14	**1,46***	1,10
	48 ч	1,15	**1,32***	1,16	1,11	1,08	1,03	0,98	0,92	0,96	0,84	0,91	0,94

Примечание: каждое значение отношение мРНК/мРНК для клеток, обработанных соединениями, к клетам, обработанным ДМСО (контроль). Приведены средние значения (n = 3). *p < 0,05 по сравнению с контролем; **p < 0,01 по сравнению с контролем.

Исследование влияния о,п'-ДДТ и п,п'-ДДТ на экспрессию генов-мишеней miR-342, miR-365, miR-190a, miR-190b, miR-27a в клетках молочной железы человека, не экспрессирующих ER и PR, in vitro

При анализе экспрессии генов-мишеней микроРНК в клетках линии MDA-MB-231 достоверных изменений выявлено не было. Таким образом, можно предположить, что в регуляции экспрессии генов *APAF1*, *TP53INP1*, *PTPRS*, *BAX*, *TRPS1*, *XIAP* и *PTEN* под действием пестицидов участвуют ER, PR, AR и miR-190b, miR-19b, miR-342, miR-27a, уровни которых не изменялись в MDA-MB-231 клетках.

Исследование влияния о,п'-ДДТ, п,п'-ДДТ и эндосульфана на уровень белкового продукта генов APAF1, TP53INP1 и PTPRS в гормон-чувствительных клетках молочной железы человека in vitro

Поскольку в уровне мРНК генов *APAF1*, *TP53INP1* и *PTPRS* наблюдались значительные изменения под действием нескольких соединений, была произведена количественная оценка белкового продукта этих генов в клетках MCF-7, обработанных о,п′-ДДТ, п,п′-ДДТ и эндосульфаном в течение 24 и 48 ч.

Количество белка APAF1 снижалось в 2 раза после инкубации с 10 мкМ п,п′-ДДТ в течение 48 ч, что соответствовало результатам ПЦР (Рисунок 1). Снижение в 1,4 раза количества белка APAF1 также наблюдалось после инкубации с о,п′-ДДТ в течение 48 ч, что могло быть следствием увеличения экспрессии miR-190b.

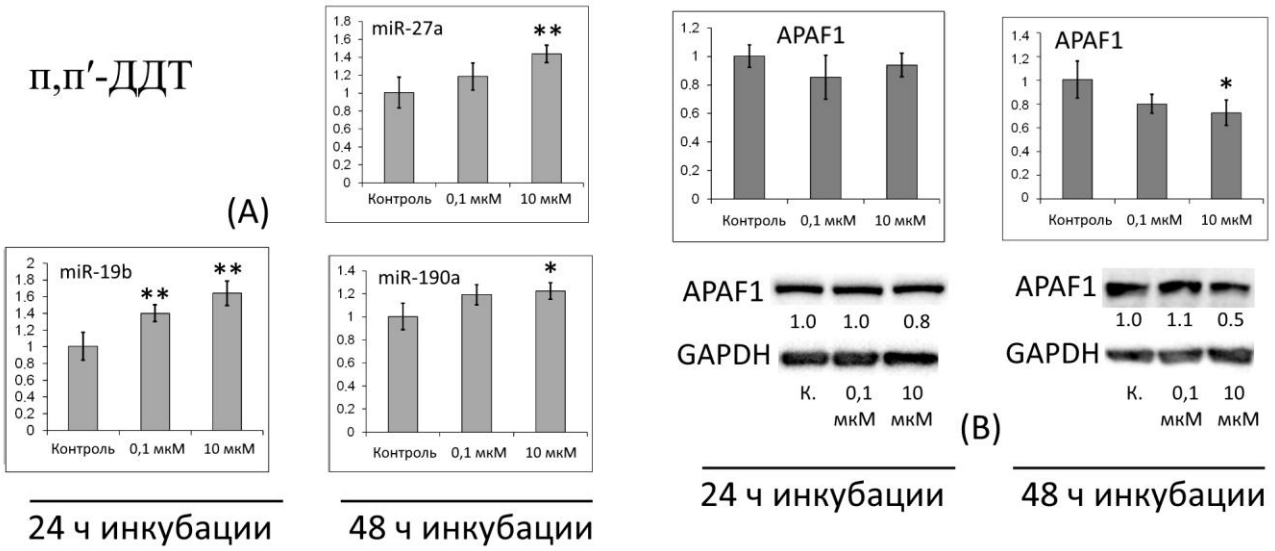

Рисунок 1. (A) Относительные уровни miR-19b, miR-27a, miR-190a в клетках MCF-7, обработанных п,п′-ДДТ. (B) Относительный уровень мРНК и вестерн-блот анализ APAF1 в клетках MCF-7, обработанных п,п′-ДДТ. Цифры под полосами APAF1 обозначают кратность изменения уровня белка по сравнению с первой полосой (К=контроль); каждое значение было нормализовано к соответствующей полосе GAPDH. Представлены данные одного из трех независимых экспериментов (которые дали аналогичные результаты).

Количество TP53INP1 белка оказалось значительно в 1,7-2,5 раз снижено после инкубации с п,п′-ДДТ в течение 24 ч (Рисунок 2). Такое снижение может

быть связано не только с высокой экспрессией miR-19b, но также с предшествующим увеличением экспрессии miR-365 после 6 ч инкубации.

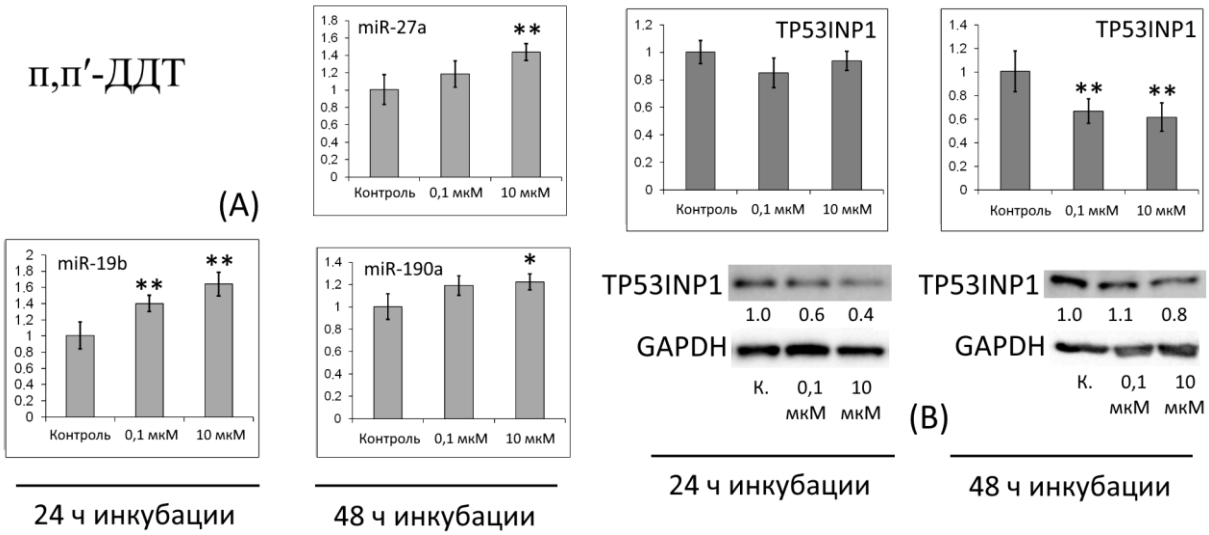

Рисунок 2. (A) Относительные уровни miR-19b, miR-27a, miR-190a в клетках MCF-7, обработанных п,п′-ДДТ. (B) Относительный уровень мРНК и вестерн-блот анализ TP53INP1 в клетках MCF-7, обработанных п,п′-ДДТ. Цифры под полосами TP53INP1 обозначают кратность изменения уровня белка по сравнению с первой полосой (К=контроль); каждое значение было нормализовано к соответствующей полосе GAPDH. Представлены данные одного из трех независимых экспериментов (которые дали аналогичные результаты).

После 24 ч инкубации с о,п′-ДДТ уровень белка TP53INP1 был снижен примерно в 2 раза, что могло быть следствием увеличения экспрессии miR-342 и miR-190b. Однако после 48 ч инкубации с 10 мкМ о,п′-ДДТ количество белка TP53INP1 оказалось увеличено в 2 раза. Возможно, что это результат значительного снижения экспрессии miR-190a (Рисунок 3).

Уровень мРНК *PTPRS* был повышен в клетках, инкубированных с каждым инсектицидом в течение 6 ч, однако наблюдалось снижение в 2,5 и в 2 раза уровня белка PTPRS в клетках, инкубированных с 10 мкМ п,п'-ДДТ или 10 мкМ о,п'-ДДТ соответственно в течение 24 ч.

Хотя эндосульфан не приводил к изменениям в уровне мРНК *APAF1* и *TP53INP1*, после обработки соединением в дозе 1 мкМ наблюдалось снижение количества белка APAF1 в клетках после 24 и 48 ч инкубации. После 48 ч инкубации также снижалось количество TP53INP1 в 1,7 и в 3,3 раза под действием 0,1 мкМ и 1 мкМ эндосульфана соответственно.

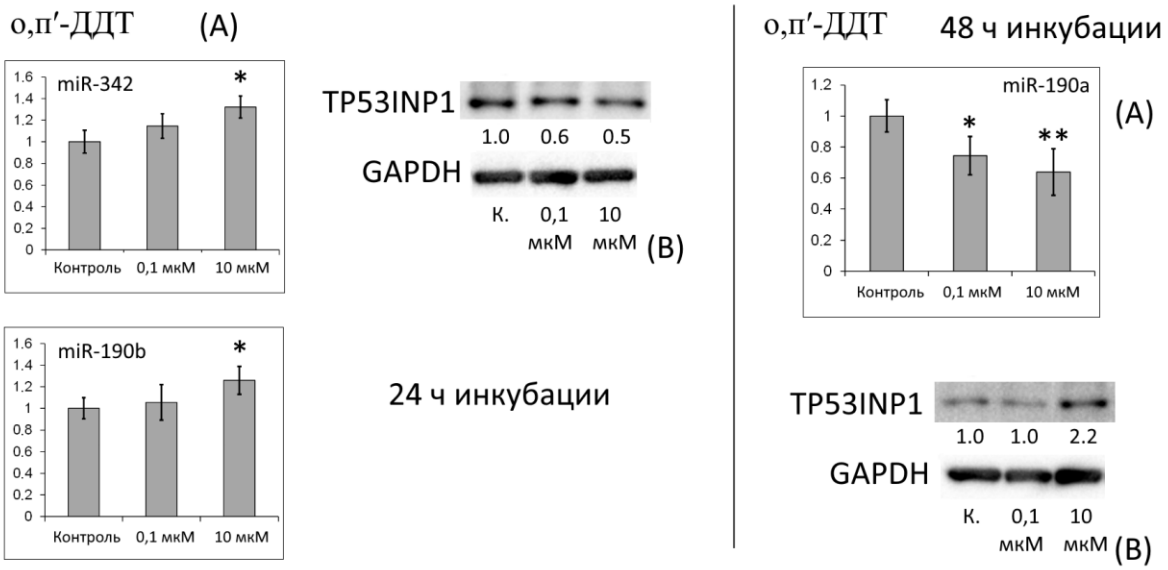

Рисунок 3. (A) Относительные уровни miR-190b, miR-342, miR-190a в клетках MCF-7, обработанных о,п′-ДДТ. (B) Вестерн-блот анализ TP53INP1 в клетках MCF-7, обработанных о,п′-ДДТ. Цифры под полосами TP53INP1 обозначают кратность изменения уровня белка по сравнению с первой полосой (К=контроль); каждое значение было нормализовано к соответствующей полосе GAPDH. Представлены данные одного из трех независимых экспериментов (которые дали аналогичные результаты).

Следовательно, под действием исследуемых пестицидов меняется не только количество мРНК генов *APAF1*, *TP53INP1* и *PTPRS*, но и количество кодируемого ими белка.

Поиск сайтов связывания AR/PR в промоторных областях андроген-регулируемых микроРНК

Согласно результатам исследования пестициды потенциально могут приводить к изменениям в экспрессии miR-365, miR-190a и miR-27a через ингибирование активности AR. Поэтому мы исследовали предполагаемые промоторные области этих микроРНК с использованием позиционных весовых матриц для андрогенового и прогестеронового рецепторов (последовательности их сайтов связывания одинаковы). Последовательности, соответствующие сайтам связывания рецепторов были обнаружены в промоторах miR-190a и miR-365 (a и b), при этом сайт связывания AR/PR в промоторе miR-190a был обнаружен не только у человека, но также у крысы, что указывает на консервативный механизм регуляции экспрессии этой микроРНК рецептором.

Исследование влияния ДДТ на экспрессию miR-365, miR-190a, miR-190b в клетках молочной железы in vivo

Для miR-190b, miR-27a и miR-365 было показано, что в их промоторных регионах у крыс содержатся последовательности, соответствующие сайтам связывания ER (Ovchinnikov *et al.*, 2018). Мы также обнаружили, что в промоторном регионе тестостерон-регулируемой miR-190a у крысы, как и у человека, содержится последовательность сайта связывания AR. У крыс miR-190a потенциально регулируется, в том числе, ER (Ovchinnikov *et al.*, 2018).

Поэтому мы исследовали влияние ДДТ на уровни этих микроРНК в молочной железе *in vivo* с использованием самок крыс линии Вистар. Для этого был использован наиболее распространённый изомер ДДТ – п,п'-ДДТ, который в клетках крыс обладает антиандрогенными и слабыми эстрогенными свойствами (Cecil *et al.*, 1971; Kelce *et al.*, 1995). Крысам вводили ДДТ внутрибрюшинно в течение 3 месяцев.

Экспрессия miR-190 и miR-365 была увеличена в 3-4 раза в тканях молочной железы крыс. Поскольку последовательности miR-190b и miR-190a практически идентичны у крыс, была произведена оценка количества суммарной miR-190 (miR-190-5p) и 3p-вариантов (являются минорным продуктом) для miR-190a и miR-190b. Экспрессия miR-190b-3p увеличивалась примерно в 3 раза, а экспрессия miR-190a-3p – в 5 раз. Примечательно, что экспрессия miR-190a увеличивалась под действием п,п'-ДДТ во всех исследуемых системах – *in vitro*, в клетках MCF-7 и MDA-MB-231, и *in vivo*, в молочной железе крыс.

В молочной железе самок крыс также была исследована экспрессия miR-27a и miR-19b, уровни которых увеличивались под действием п,п'-ДДТ в эксперименте *in vitro*, однако достоверных изменений выявлено не было.

Связь экспрессии чувствительных к действию ХОП генов-мишеней ER – *BRCA1, CCND1, STC2, VEGFA* – с канцерогенезом молочной железы

Чтобы подтвердить, что эффекты пестицидов на экспрессию выявленных в исследовании мишеней соответствуют изменениям в их экспрессии при канцерогенезе, уровень мРНК генов был оценён в злокачественных тканях молочной железы и парных к ним нормальных тканях молочной железы.

Было выявлено, что экспрессия *CCND1* – гена, чувствительного к о,п'-ДДТ, – в опухолевых тканях выше в 2 раза (при сравнении медианных значений), чем в нормальных тканях молочной железы. Для остальных генов достоверной разницы выявлено не было.

Связь экспрессии BRCA1, CCND1, STC2 и VEGFA со статусом рецепторов ER и PR при раке молочной железы

Чтобы проверить, действительно ли экспрессия *BRCA1, CCND1, STC2* и *VEGFA* при РМЖ зависит от активности ER и PR, было произведено сравнение уровней мРНК генов в тканях гормон-зависимого РМЖ и в тканях РМЖ, не экспрессирующих ER и PR. Было выявлено, что уровни мРНК *CCND1* и *STC2* – генов, экспрессия которых индуцируется о,п'-ДДТ, – выше в 2 и в 8 раз соответственно в опухолях, экспрессирующих ER и PR (Таблица 6).

Таблица 6. Ассоциации между количеством мРНК *BRCA1*, *CCND1*, *STC2* или *VEGFA* в образцах тканей больных РМЖ и статусом ER, PR.

Характеристика		**N**	**Относительный уровень* мРНК и *p*-значение**							
			BRCA1	***p***	***CCND1***	***p***	***STC2***	***p***	***VEGFA***	***p***
ER статус	+	107	1,35	*0,693*	1,98	***0,011***	1,46	***<0,001***	1,06	*0,342*
	–	30	1,35		0,87		0,18		1,73	
PR статус	+	93	1,68	*0,607*	2,02	***0,012***	1,41	***<0,001***	1,01	*0,351*
	–	44	1,34		0,90		0,19		1,39	

Примечание: *Медиана различий в уровнях мРНК между тканями РМЖ и образцами нормальной ткани (контроль); результат был нормирован к контролю.
Существенные различия между группами пациентов выделены жирным шрифтом.

Таким образом, экспрессия *CCND1* и *STC2* при канцерогенезе молочной железы действительно зависит от активности ER и PR.

Связь экспрессии miR-342, miR-365, miR-190a, miR-190b, miR-27a, miR-19b и их мишеней APAF1 и TP53INP1, чувствительных к действию ХОП, с канцерогенезом молочной железы

Далее была исследована связь с канцерогенезом молочной железы уровней miR-342, miR-365, miR-190a, miR-190b, miR-27a, miR-19b и мРНК их мишеней *APAF1* и *TP53INP1*.

Экспрессия miR-365, miR-190a, miR-19b, miR-27a оказалась значительно (p<0,001) ниже в опухолевой ткани пациентов с диагнозом РМЖ. Уровень miR-190b, напротив, был значительно (p<0,001) выше в опухолевой ткани. При этом количество мРНК гена *TP53INP1* было ниже в злокачественных тканях (p=0,012).

Связь экспрессии miR-342, miR-365, miR-190a, miR-190b, miR-27a, miR-19b и их мишеней APAF1 и TP53INP1 со статусом рецепторов ER и PR при раке молочной железы

Уровни miR-342, экспрессия которой индуцировалась о,п'-ДДТ, и эстроген-индуцируемой miR-190b оказались значительно выше у пациентов с ER-экспрессирующим РМЖ (Таблица 7). Напротив, уровень miR-190a, экспрессия которой снижалась под действием о,п'-ДДТ и прогестерона *in vitro*, был ниже у таких пациентов. Экспрессия гена-мишени этих микроРНК – *TP53INP1* – была выше в ER-экспрессирующих опухолях. Для остальных микроРНК связи со статусом ER выявлено не было.

Таблица 7. Ассоциации между количеством miR-342, miR-190a, miR-190b и мРНК *TP53INP1* в образцах тканей больных РМЖ и статусом ER, PR.

микроРНК / ген-мишень		**Характеристика**					
		ER статус		**PR статус**		**Люминальный РМЖ**	
						PR статус	
		+	–	+	–	+	–
miR-342	M*	**1,46**	**0,64**	1,21	0,93	1,21	3,59
	p	***0,003***		*0,517*		*0,095*	
miR-190a	M	**0,09**	**0,33**	0,10	0,20	0,10	0,12
	p	***0,044***		*0,361*		*0,993*	

Продолжение Таблицы 7

miR-190b	M	**4,77**	**1,13**	**4,76**	**2,12**	4,76	6,41
	p	***<0,001***		***<0,001***		*0,731*	
TP53INP1	M	**0,71**	**0,40**	0,71	0,57	0,71	0,69
	p	***0,010***		*0,420*		*0,442*	

Примечание: *Медиана (М=медиана) различий в уровнях мРНК/микроРНК между тканями РМЖ и образцами нормальной ткани (контроль); результат был нормирован к контролю. Существенные различия между группыми пациентов выделены жирным шрифтом.

Связь экспрессии выявленных мишеней пестицидов ДДТ и эндосульфана с метастазированием при РМЖ

Чтобы проверить, могут ли изменения в экспрессии выявленных мишеней пестицидов быть связаны с прогрессией РМЖ, мы проанализировали уровни их экспрессии у пациентов с известным статусом лимфатических узлов.

Было выявлено, что уровень мРНК *CCND1* выше у пациентов, имеющих метастазы в лимфоузлах (p=0,045). Близкая к достоверной ассоциация с метастазированием была выявлена для miR-190a (p=0,058 при ER- и/или PR-позитивном РМЖ). В ходе подробного анализа её уровня в опухолях было обнаружено, что её экспрессия действительно значительно ассоциирована с наличием метастазов, но только в опухолях ER- и/или PR-позитивного рака с Ki-67 <14% (p=0,004). Таким образом, можно предположить, что снижая экспрессию miR-190a и увеличивая экспрессию *CCND1*, о,п'-ДДТ может способствовать прогрессии РМЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе диссертационного исследования выявлен ряд мишеней эстрогена, тестостерона и прогестерена, экспрессия которых чувствительна, в том числе, к пестицидам ДДТ и эндосульфану. Наибольшим эстроген-подобным эффектом на экспрессию мишеней ER обладал о,п'-ДДТ, который, как и эстрадиол, приводил к увеличению экспрессии *CCND1*, *STC2*, *VEGFA*, miR-190b (Рисунок 4А). Выявленные под действием одного или двух исследуемых пестицидов изменения в экспрессии *BRCA1*, *PGR*, miR-190a, miR-365 и miR-27a были, вероятно, связаны с антиандрогенными свойствами соединений (Рисунок 4В). Экспрессия miR-190a под действием п,п'-ДДТ увеличивалась как в MCF-7 клетках, так и в MDA-MB-231 клетках и в молочной железе самок крыс, подвергнутых действию пестицида, что указывает на существование независимого от рецепторов половых гормонов механизма регуляции её экспрессии под действием п,п'-ДДТ.

Значительные изменения в уровне miR-190b, miR-190a, miR-27a, miR-19b под действием изомеров ДДТ сопровождались изменениями в экспрессии их мишеней-регуляторов апоптоза – *APAF1* и *TP53INP1*. Ранее было показано, что инкубация клеток с о,п'-ДДТ в течение 5 дней снижает скорость апоптоза (Diel *et al.*, 2002). Таким образом, продемонстрированное ингибирование апоптоза инсектицидом может быть опосредовано, среди прочего, снижением экспрессии *APAF1* и *TP53INP1*.

Рисунок 4. (A) Выявленные общие мишени эстрогена, о,п'-ДДТ, п,п'-ДДТ и эндосульфана. (B) Гены, на экспрессию которых пестициды оказывают противоположные тестостерону эффекты.

В основном выявленные изменения в экспрессии мишеней пестицидов были аналогичны изменениям, которые, как ранее демонстрировалось, сопутствуют канцерогенезу. Так, о,п'-ДДТ приводил к снижению экспрессии опухолевых супрессоров *BRCA1*, *TP53INP1*, *APAF1*, miR-190a и к увеличению экспрессии онкогенов *CCND1*, *VEGFA*. Под действием п,п'-ДДТ снижалась экспрессия *BRCA1*, *TP53INP1*, *APAF1* и увеличивалась экспрессия онкогенов *VEGFA*, miR-27a, miR-19b. Также п,п'-ДДТ и эндосульфан приводили к снижению экспрессии гена *PGR*, кодирующего PR. В целом прогестерон через активацию PR приводит к стимуляции пролиферации (Daniel et al., 2011), однако низкая экспрессия *PGR* при РМЖ связана с худшим прогнозом и характерна для более инвазивных опухолей (Yao et al., 2017).

С использованием образцов РМЖ было подтверждено, что экспрессия *CCND1*, *STC2*, miR-190b в опухолевых тканях пациентов положительно ассоциирована с экспрессией ER, что указывает на участие ER в изменении их экспрессии в ходе канцерогенеза. Также обнаружена ассоциация с наличием метастазов высокой экспрессии *CCND1* и низких уровней miR-190a.

Таким образом, подтверждено, что ДДТ и, в меньшей степени, эндосульфан могут влиять на экспрессию мишеней ER и AR, которые участвуют в инициации и/или прогрессии рака молочной железы.

ВЫВОДЫ

1. Обработка клеток MCF-7 эстрадиолом и обработка о,п′-ДДТ приводит к увеличению экспрессии miR-190b, *CCND1*, *VEGFA*, *STC2*. Экспрессии *VEGFA*, а также miR-19b, экспрессия которой индуцируется не только эстрадиолом, но также прогестероном и тестостероном, увеличивается под действием п,п′-ДДТ и эндосульфана.

2. В клетках MCF-7 эффекты п,п′-ДДТ и/или о,п′-ДДТ на экспрессию *BRCA1*, *PGR*, miR-190a, miR-27a и miR-365 противоположны эффектам тестостерона.

3. Снижение или увеличение уровней miR-190a, miR-190b, miR-27a, miR-19b в клетках MCF-7 сопровождается увеличением или снижением соответственно экспрессии их мишеней *TP53INP1* и *APAF1*.

4. В клетках MDA-MB-231, обработанных пестицидами, не выявлено изменений в экспрессии miR-190b, miR-19b, miR-27a, miR-365, *BRCA1*, *CCND1*, *VEGFA*, *STC2*, которые происходят в MCF-7 клетках. Однако экспрессия miR-190a увеличивается под действием п,п′-ДДТ в обеих клеточных линиях, что указывает на независимый от активности рецепторов половых гормонов механизм её регуляции данным изомером.

5. В молочной железе самок крыс хроническое воздействие п,п′-ДДТ в течение 3-х месяцев приводит к увеличению экспрессии miR-190a и miR-365, что соответствует изменениям, наблюдаемым *in vitro*, и увеличению экспрессии ER-регулируемой miR-190b.

6. Показано, что уровни экспрессии эстроген- и о,п′-ДДТ-чувствительных генов *STC2*, *CCND1* и miR-190b положительно ассоциированы с экспрессией ER в опухолях молочной железы. Уровень miR-190a, экспрессия которой ингибируется прогестероном и о,п′-ДДТ *in vitro*, снижен при РМЖ и обратно коррелирует со статусом ER.

7. Уровни экспрессии *CCND1* и miR-190a зависят от наличия метастазов в лимфатических узлах при РМЖ.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Калинина Т.С.**, Конончук В.В., Гуляева Л.Ф. Экспрессия генов гормонального канцерогенеза и регулирующих их микроРНК в матке и яичниках самок крыс, обработанных ДДТ // Биохимия. – 2017. – Т. 82. – № 10. – С. 1463–1474 (IF=2.8, Web of Science Q4, Scopus Q2).
2. **Kalinina T.S.**, Kononchuk V.V., Ovchinnikov V.Y., Chanyshev M.D., Gulyaeva L.F. Expression of the miR-190 family is increased under DDT exposure in vivo and in vitro // Mol Biol Rep. – 2018. – V.45. – N.6. – P.1937–1945 (IF=2.7, Web of Science Q4, Scopus Q2).
3. **Kalinina T.S.**, Kononchuk V.V., Gulyaeva L.F. Expression of estrogen-, progesterone-, and androgen-responsive genes in MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated with o,p'-DDT, p,p'-DDT, or endosulfan // J Biochem Mol Toxicol. – 2021. – V.35. – N.6. – P.1–8 (IF=3.6, Web of Science Q2, Scopus Q2).
4. **Kalinina T.**, Kononchuk V., Alekseenok E., Obukhova D., Sidorov S., Strunkin D., Gulyaeva L. Expression of estrogen receptor- and progesterone receptor-regulating microRNAs in breast cancer // Genes (Basel). – 2021. – V.12. – N.4. – P.582 (IF=4.1, Web of Science Q2, Scopus Q2).
5. **Kalinina T.**, Kononchuk V., Klyushova L., Gulyaeva L. Effects of endocrine disruptors o,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane, p,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane, and endosulfan on the expression of estradiol-, progesterone-, and testosterone-responsive microRNAs and their target genes in MCF-7 cells // Toxics. – 2022. – V.10. – N.1. – P.25 (IF=4.5, Web of Science Q2, Scopus Q1).