Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

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

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Гуляева Людмила Фёдоровна

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Эстрогеновый рецептор	12
1.1.1 Структура эстрогеновых рецепторов	12
1.1.2 Механизмы регуляции экспрессии генов эстрогеновым рецептором	14
1.1.3 Основные биологические функции эстрогеновых рецепторов	17
1.2 Рак молочной железы	17
1.2.1 Роль эстрогеновых рецепторов в канцерогенезе молочной железы	18
1.3 Ксеноэстрогены	21
1.3.1 Хлорорганические пестициды	23
1.3.2 Дихлордифенилтрихлорэтан, современное состояние проблемы загрязнения	23
1.3.3 История изучения ДДТ	26
1.3.4 Эндосульфан	28
1.3.5 Возможные механизмы канцерогенного действия ДДТ и эндосульфана	29
1.4 МикроРНК	30
1.4.1 Биогенез микроРНК	31
1.4.2 МикроРНК в механизмах регуляции экспрессии генов	33
1.5 Роль микроРНК в канцерогенезе	35
1.6. Влияние ксенобиотиков на экспрессию микроРНК	37
1.7 Заключение к обзору литературы	39
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
2.1 Материалы	40
2.1.1 Реактивы	40
2.1.2 Оборудование	41
2.1.3 Растворы	41
2.1.4 Клеточные культуры	41
2.1.5 Животные	42
2.1.6 Образцы опухолей молочной железы	42
2.2 Методы	43
2.2.1 Обработка клеток	43
2.2.2 Обработка животных	43
2.2.3 Приготовление лизатов из клеток	43

2.2.4 Вертикальный электрофорез белков в полиакриламидном геле в	
денатурирующих условиях	44
2.2.5 Влажный перенос белков на PVDF мембрану	44
2.2.6 Иммунохимический анализ белков	44
2.2.7 Выделение микроРНК из тканей крыс и образцов опухолей	45
2.2.8 Выделение тотальной РНК с использованием TRIzol Reagent	45
2.2.9 Электрофорез РНК	45
2.2.10 Определение концентрации РНК	46
2.2.11 Реакция обратной транскрипции для микроРНК	46
2.2.12 Проведение ПЦР в режиме реального времени для определения уровней	
экспрессии микроРНК	48
2.2.13 Реакция обратной транскрипции для мРНК	49
2.2.14 Проведение ПЦР для определения уровней экспрессии мРНК	50
2.2.15 Биоинформатический анализ	51
2.3 Статистическая обработка данных	52
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	53
3.1 Влияние половых гормонов и пестицидов с гормон-подобным действием на	
экспрессию известных мишеней ER в клетках молочной железы человека	53
3.1.1 Исследование влияния эстрадиола, прогестерона и тестостерона на экспресс	сию
BRCA1, CCND1, PGR, STC2, VEGFA в гормон-чувствительных клетках молочной жел	езы
человека in vitro	53
3.1.2 Исследование влияния о,п'-ДДТ, п,п'-ДДТ и эндосульфана на экспрессию	
BRCA1, CCND1, PGR, STC2, VEGFA в гормон-чувствительных клетках молочной жел	езы
человека in vitro	56
3.1.3 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	59
3.2 Влияние половых гормонов и пестицидов с гормон-подобным действием на	
экспрессию микроРНК, содержащих в промоторных областях сайты связывания ЕР	60
3.2.1 Отбор микроРНК	60
3.2.2 Исследование влияния эстрадиола, прогестерона и тестостерона на экспресс	сию
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 <i>in vitr</i>	o64

3.2.3 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 <i>in vitro</i>
3.2.4 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, <i>in vitro</i>
3.2.5 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 <i>in vitro</i>
3.2.6 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, PR и AR, <i>in vitro</i>
3.2.7 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 <i>in vitro</i>
3.2.8 Поиск сайтов связывания AR/PR в промоторных областях андроген-
регулируемых микроРНК87
3.2.9 Исследование влияния ДДТ на экспрессию miR-365, miR-190a, miR-190b в
клетках молочной железы <i>in vivo</i>
3.3 Связь экспрессии чувствительных к действию XOП генов-мишеней ER – $BRCA1$,
<i>CCND1</i> , <i>STC2</i> , <i>VEGFA</i> – с канцерогенезом молочной железы
3.3.1 Связь экспрессии BRCA1, CCND1, STC2 и VEGFA со статусом рецепторов ER и
PR при раке молочной железы90
3.4 Связь экспрессии miR-342, miR-365, miR-190a, miR-190b, miR-27a, miR-19b и их
мишеней APAF1 и TP53INP1, чувствительных к действию XOП, с канцерогенезом
молочной железы91
3.4.1 Связь экспрессии miR-342, miR-365, miR-190a, miR-190b, miR-27a, miR-19b и
их мишеней <i>APAF1</i> и <i>TP53INP1</i> со статусом рецепторов ER и PR при раке молочной
железы
3.5 Связь экспрессии выявленных мишеней пестицидов ДДТ и эндосульфана с
метастазированием при РМЖ
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ
ВЫВОДЫ103
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

	,	
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОІ	Í ЛИТЕРАТУРЫ1	06

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

К настоящему времени известно около 1000 химических веществ, которые могут влиять на эндокринную систему человека (Schug et al., 2016). Во время конференции на тему «Химически индуцированные изменения в половом созревании: связь между дикой природой и человеком», которая проводилась в 1991 г., для таких веществ было придумано название «эндокринный разрушитель» (Colborn and Clement, 1992). Исследование механизмов действия таких соединений 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, неконтролируемое, интенсивное использование этих пестицидов в прошлом привело к мировому загрязнению. Так, в регионах, где активно применялся ДДТ, до сих пор находят значительное количество его метаболитов в крови жителей. Например, в мексиканском штате Чьяпас, где для борьбы с малярией до 2000 года использовали ДДТ, его метаболит – п,п'-ДДЭ – был обнаружен в 96,7% образцов крови в исследовании, которое проводилось спустя почти 15 лет после прекращения применения в этом регионе ДДТ. В 38,3% образцов также был обнаружен β-эндосульфан (Ruiz-Suárez et al., 2014). В Хорватии п,п'-ДДЭ был признан доминирующим хлорорганическим пестицидом в образцах грудного молока, собранных в 2009-2011 (Klinčić et al., 2014). На данный момент допустимо применение ДДТ для борьбы с малярией. Кроме этого, ДДТ до сих пор незаконно используется в большинстве развивающихся стран (Jayaraj et al., 2016). Таким образом, ДДТ всё ещё можент поступать в организм человека с пищей. Эндосульфан, также как и ДДТ, распространился по всему миру, остатки этих соединений были обнаружены, в том числе, в Арктике (Carrizo et al., 2017; Weber et al., 2010).

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). Вместе с тем имеются данные о том, что ксеноэстроген ДДТ может увеличивать риск развития РМЖ, а эндосульфан оказывает активирующее действие на пролиферацию клеток МСF-7 (Cohn et al., 2007; Ghosh 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 МСF-7 усиливается как под действием эстрадиола, так и под действием о,п'-ДДТ (Bratton et al., 2012). Кроме этого, показано, что обработка клеток МСF-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, а эндосульфан приводит к увеличению экспрессии miR-22 в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (Tilghman *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2017). 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 МСF-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 МСF-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 гормонподобными свойствами на ER-регулируемые гены в освновном выполнены с использованием о,п'-ДДТ и культуры клеток МСГ-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 МСГ-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. Так, было 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 МСГ-7. Обнаружено, что п,п'-ДДТ приводит к изменениям в экспрессии miR-365 и miR-190a *in vitro* и *in vivo*. В эксперименте *in vitro* впервые выявлено, что изомеры ДДТ и эндосульфан приводят к снижению экспрессии регуляторов апоптоза *TP53INP1* и *APAF1*, которые являются мишенями miR-190a, miR-190b, miR-19b, miR-27a. Также было 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 с гормон-подобными свойствами, что расширяет знания о механизмах их действия на клетки молочной железы. Некоторые из обнаруженных мишеней оказались связаны с такими клинико-патологическими характеристиками опухолей молочной железы, 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 иммуногистохимических анализов 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.

Методология и методы исследования

Работа выполнена с помощью общенаучных методов исследования и специальных методов, включая методы биохимии и молекулярной биологии, методы работы с культурами клеток. Для оценки относительного уровня экспрессии генов проводили реакцию обратной транскрипции (по матрице микроРНК с использованием праймеров типа «стебель-петля» и по

матрице РНК с использованием олиго-dT-праймеров и гексапраймеров) с последующей полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени. Для оценки влияния пестицидов на количество белка исследуемых генов проводили вестерн-блот анализ.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1. В клетках гормонозависимого рака молочной железы МСF-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 МСГ-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, 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 рецепторов AR и PR в промоторных областях микроРНК, проводились автором совместно с к.б.н. Овчинниковым В.Ю. (Факультет медицины и здравоохранения, Ноттингемский университет, Великобритания).

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эстрогеновый рецептор

Эстрогены играют ключевую роль в развитии и поддержании нормальной половой и репродуктивной функции. Кроме этого, как у женщин, так и у мужчин эстрогены оказывают широкий спектр биологических эффектов на сердечно-сосудистую, костно-мышечную, иммунную и центральную нервную системы (Heldring et al., 2007). Свои эффекты на органымишени эстрогены оказывают через связывание с эстрогеновыми рецепторами. Рецептор эстрогена (ER) относится к суперсемейству ядерных рецепторов и представляет собой лигандиндуцируемый внутриклеточный фактор транскрипции (Кumar et al., 2011). Существует два основных типа эстрогеновых рецепторов – ЕRa и ERβ. Эти рецепторы кодируются разными генами, расположенными на разных хромосомах. Ген ERa человека расположен на 6-й хромосоме, а ген ERβ — на 14-й хромосоме (Lee et al., 2012). ERa и ERβ имеют разные биологические функции. В регуляции экспрессии некоторых генов, особенно тех, которые участвуют в пролиферации, ERa и ERβ могут оказывать противоположное действие, и клеточный ответ на эстроген зависит от баланса между активностью ERa и ERβ в органахмишенях (Heldring et al., 2007).

1.1.1 Структура эстрогеновых рецепторов

Все члены семейства ядерных рецепторов имеют общую архитектуру: центральный ДНК-связывающий домен, расположенный между N-концевым доменом трансактивации и С-концевым лиганд-связывающим доменом (Farooq, 2015).

ЕRα и ERβ демонстрируют значительную гомологию последовательностей, и оба состоят из пяти доменов, обозначенных от A/B до F (Рисунок 1). С-концевой домен F, представляет собой одну из двух наименее консервативных областей α- и β-рецепторов. Домен F модулирует транскрипцию гена-мишени рецептора лиганд-специфическим образом (Киmar *et al.*, 2011). У многих членов суперсемейства ядерных рецепторов отсутствует этот домен. Однако, если он присутствует, полное удаление F-домена или его мутация изменяет способность рецептора к трансактивации, димеризации, изменяет ответы на агонисты и антагонисты (Patel and Skafar, 2015).

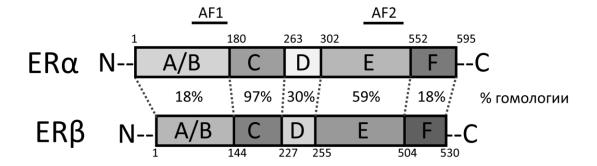


Рисунок 1. Домены и % гомологии последовательностей эстрогеновых рецепторов

Домен Е представляет собой лиганд-связывающий домен, он содержит карман для связывания гормонов и отвечает за большую часть функций, активируемых связыванием лиганда (Кита et al., 2011). Данный домен у ЕRα и ERβ имеет области с гомологичными последовательностями. Так, аминокислотные остатки 223-343 и 404-457 демонстрируют значительно более высокую гомологию, чем последовательности 223-457 и 344-403. Такие консервативные области являются наиболее стабильными и находятся в прямом контакте с лигандом (Кита et al., 2011). Лиганд-связывающий домен состоит из трехслойного антипараллельного α-спирального сэндвича, кэппированного на одном конце β-листом. Внутри этого α-спирального сэндвича центральный слой, состоящий из α-спиралей H5/H6/H9/H10, фланкирован одним слоем α-спиралей H1/H2/H3/H4 слева и одним слоем α-спиралей H7/H8/H11 справа, если смотреть с направления β-листа (S1/S2) или С-концевой α-спирали H12 (Farooq, 2015). Спираль H1 отсутствует у ERβ (Arnal et al., 2017).

Домен D является шарнирной областью. Он содержит сигнал ядерной локализации, который демаскируется при связывании лиганда (Кumar *et al.*, 2011). Домен участвует в конформационных изменениях ER при связывании ДНК и эстрадиола и необходим для взаимодействия рецептора с другими факторами транскрипции, такими как с-Jun или Sp1 (Arnal *et al.*, 2017).

Наиболее консервативный домен С является ДНК-связывающим доменом, необходимым для связывания рецепторов с элементами ответа на эстроген (estrogen response element, ERE), состоящими из палиндромного гексануклеотида 5'-AGGTCAnnnTGACCT-3' (Kumar *et al.*, 2011). Связывание ДНК осуществляется с помощью пары цинковых пальцев С4-типа (Farooq, 2015).

На N-конце рецептора расположен домен A/B, функция и структура которого наименее изучены. Домен A/B и лиганд-связывающий домен E содержат функции активации транскрипции AF-1 и AF-2 соответственно, которые ответственны за регуляцию транскрипционной активности ER. Считается, что полная активность ER достигается за счет синергизма между двумя AF (Киmar *et al.*, 2011). Оба участка AF рекрутируют ряд

корегуляторных белковых комплексов к рецептору после его связывания с ДНК (Heldring *et al.*, 2007). Функция AF-1 считается гормон-независимой из-за ее конститутивной транскрипционной активности при изоляции от остальной части белка. Однако, было показано, что домен A взаимодействует с доменом Е рецептора в отсутствие лиганда и таким образом препятствует лиганд-независимой транскрипции и транс-репрессии (Métivier *et al.*, 2002). Кроме этого, активность AF-1 варьирует в зависимости от лиганда, типа клетки и промотора (Arnal *et al.*, 2017).

1.1.2 Механизмы регуляции экспрессии генов эстрогеновым рецептором

Эффекты эстрогенов, опосредованные ER, могут быть геномными и проявляться на уровне транскрипции генов-мишеней, либо негеномными. Негеномные эффекты представляют собой быстрые эффекты эстрогенов (порядка секунды или минуты), которые приводят к активации нескольких внутриклеточных сигнальных путей, таких как MAPK или PI3K (Kerdivel et al., 2013).

В классическом, геномном, пути при отсутствии гормонов ER находится в цитоплазме в виде мономера в комплексе с белками теплового шока 90 (heat shock protein, hsp90), 70 (hsp70) и иммунофилинами (Stice and Knowlton, 2008). Наиболее важным белком в этом комплексе является hsp90, который необходим для поддержания ER в конформации, обеспечивающей связывание гормона с высоким сродством (Fliss *et al.*, 2000). После связывания с лигандом рецепторы фосфорилируются, образуют гомо- или гетеродимеры, а затем транслоцируются в ядро (Lee *et al.*, 2012). Спираль H12 лиганд-связывающего домена ER играет в этом процессе роль «крышки». Без лиганда путь для проникновения эстрадиола в глубокий внутренний гидрофобный карман рецептора свободен. После входа эстрадиола происходит изменение положения спирали H12 и карман «запечатывается» (Рисунок 2) (Farooq, 2015).

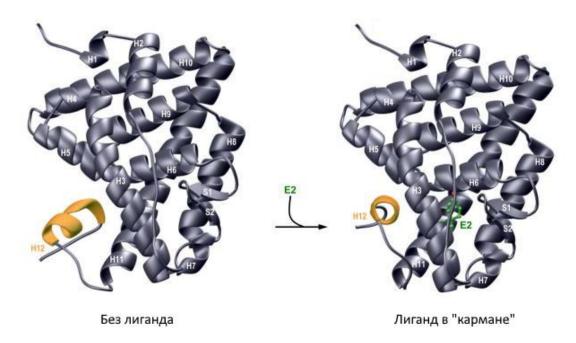
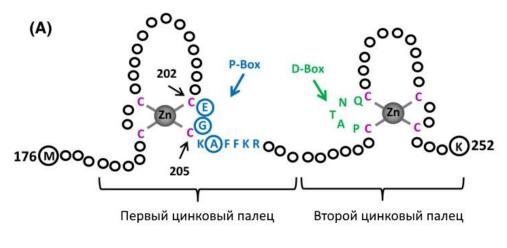


Рисунок 2. Структура ER без лиганда и с лигандом. E2 = эстрадиол (адаптировано из Farooq, 2015)

В ядре димер ER связывается с хроматином, а именно с ERE последовательностями, которые могут быть расположены в пределах промотора или в энхансерных областях недалеко от промотора генов-мишеней (Fuentes and Silveyra, 2019). В связывании с ДНК участвуют два цинк-связывающих мотива. Первый цинковый палец содержит так называемый «Р-box», который необходим для специфического взаимодействия с ДНК. «D-box» во втором цинковом пальце находится на границе между двумя мономерами ER и участвует в определении расстояния между полусайтами ERE (Рисунок 3) (Yaşar et al., 2016). После связывания с ДНК рецепторы с помощью своих АF доменов рекрутируют транскрипционные корегуляторы и компоненты комплекса РНК-полимеразы II (Arnal et al., 2017). Исследование по динамике связывания эстрогеновыми рецепторами хроматина в геноме продемонстрировало что каждый подтип ER, когда он присутствует в одиночку, связывает большинство доступных ERE, но когда в клетке представлены оба рецептора, то они конкурируют друг с другом. При этом ЕРа занимает большинство общих сайтов (Charn et al., 2010). Вероятно, это связано с различным сродством к ERE гомодимеров ERa (высокая аффинность), гетеродимеров (средняя аффинность) и гомодимеров ERβ (низкая аффинность) (Charn et al., 2010; Klinge, 2001). Кроме этого, в нескольких исследованиях было показано, что ΕRα и ΕRβ взаимодействуют с различными корегуляторами, позволяя рецептором выполнять свои специфичные для клетки функции (Maggi, 2011).



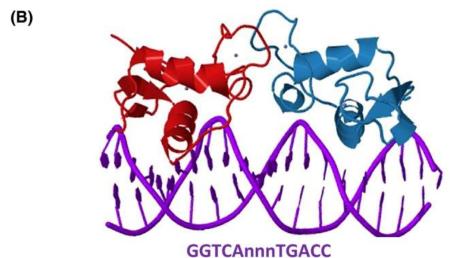


Рисунок 3. Структура цинковых пальцев ДНК-связывающего домена ERs (A) и третичная структура ДНК-связывающего домена в виде димера, связанного с последовательностью ERE (B) (адаптировано из Yaşar *et al.*, 2016)

Помимо прямой регуляции экспрессии генов через связывание с ERE последовательностями эстрогеновые рецепторы также могут регулировать экспрессию генов, содержащих сайты связывания транскрипционных факторов, таких как AP-1, Sp1 или NF-kB, посредством белок-белковых взаимодействий (Schultz *et al.*, 2005; Sommer and Fuqua, 2001).

В случае негеномных эффектов эстрогенов ER, локализованный на плазматической мембране, может действовать координированно с другими мембранными белками, что приводит к инициации сигнальных каскадов (Stice and Knowlton, 2008). С негеномной передачей сигналов эстрогена могут быть связаны как GPER1 (G protein-coupled estrogen receptor 1), так и некоторые варианты ERα и ERβ (Fuentes and Silveyra, 2019).

1.1.3 Основные биологические функции эстрогеновых рецепторов

ЕRα и ERβ являются факторами транскрипции, которые участвуют в регуляции многих физиологических процессов у человека. ЕRα присутствует в основном в молочной железе, матке, яичниках (тека-клетки), мужских репродуктивных органах (семенниках и придатках), предстательной железе, печени (Paterni et al., 2014). ERβ экспрессируется во многих тканях, но главным образом представлен в надпочечниках, яичниках, семенниках и в клетках иммунной системы (The Human Protein Atlas, URL: https://www.proteinatlas.org/). Оба рецептора на значительном уровне экспрессируются в костной (остеобласты, остеоциты, остеокласты) (Khalid and Krum, 2016), жировой, нервной тканях и в эндотелиальных клетках (Kerdivel et al., 2013). Оба ERs играют значительную роль в развитии и функционировании яичников и сердечно-сосудистой системы. Но ERα более важен для развития и функционирования женской и мужской репродуктивной систем, для сохранения скелетного и минерального гомеостаза и регуляции метаболических процессов. ERβ, как предполагается, оказывает более глубокое влияние на центральную нервную и иммунную системы и обычно противодействует гиперпролиферации клеток, стимулируемой ERα, в таких тканях, как молочная железа и матка (Lee et al., 2012; Paterni et al., 2014).

1.2 Рак молочной железы

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным онкологическим заболеванием и основной причиной смерти от рака у женщин. По оценкам, ежегодно в мире диагностируется около 2,3 миллионов новых случаев РМЖ. Существующие прогнозы указывают на то, что к 2030 г. число диагностируемых случаев достигнет 2,7 миллионов новых случаев в год, а число летальных исходов — 0,87 миллионов (Łukasiewicz *et al.*, 2021). РМЖ является метастатическим раком и может распространяться на отдаленные органы, такие как кости, печень, легкие и мозг, что осложняет его лечение (Sun *et al.*, 2017). Показатели выживаемости пациентов с диагнозом РМЖ различаются в зависимости от страны проживания. Для случаев, диагностированных с 2005 по 2015 годы, в развитых странах 5-летняя выживаемость составляла в основном около 85%, в то время как во многих странах с низким уровнем дохода этот показатель был около 60-70%, а в некоторых регионах (Восточно-Капская провинция, Уганда, Кения, Зимбабве, Иордания, Гваделупа) ниже (Allemani *et al.*, 2015; Joko-Fru *et al.*, 2020; Sung *et al.*, 2021). В России 5-летняя выживаемость для случаев, диагностированных с 2010 по 2014, составила 70,8% (Allemani *et al.*, 2018).

В 2000 г. была предложена молекулярная классификация РМЖ, на основе которой стали определять терапию заболевания. Эта классификация делит РМЖ на подтипы в зависимости от уровня экспрессии ER, рецептора прогестерона (PR), рецептора HER2/neu и Ki-67 (Perou *et al.*, 2000). Уровень экспрессии рецепторов определяют с помощью иммуногистохимического (ИГХ) анализа. За положительную (+) экспрессию ER и PR на практике принимают значения экспрессии от 3 до 8, полученные по шкале Allred (Harvey *et al.*, 1999). За положительную экспрессию HER2 принимают значения 3+ и, если была подтверждена амплификация гена HER2 методом флуоресцентной гибридизации *in situ*, 2+ (Ahn *et al.*, 2020).

На данный момент выделяют люминальный A, люминальный B HER2-негативный, люминальный B HER2-позитивный, HER2-позитивный и трижды-негативный подтипы РМЖ. Большое распространение получили рекомендации, предложенные на Санкт-Галленской международной конференции в 2011 году, в соответствии с которыми подтип заболевания определяется следующим образом (Goldhirsch *et al.*, 2011):

люминальный A - ER и/или PR +; HER2 -; низкий уровень Ki-67 (менее 14% позитивноокрашенных клеток);

люминальный В HER2-негативный – ER и/или PR +; HER2 −; высокий уровень Ki-67 (≥14%);

люминальный В HER2-позитивный – ER и/или PR +; HER2 +; любой Ki-67;

HER2-позитивный – ER и PR –; HER2 +;

трижды-негативный – ER, PR и HER2 –.

Однако в 2013 г большинство экспертов на Санкт-Галленской конференции высказались за увеличение порогового значения индекса Кі-67 до 20% для разделения люминального А и люминального В подтипов (Goldhirsch *et al.*, 2013). Данный порог важен при выборе послеоперационной тактики лечения. Но многие исследователи в своих научных работах попрежнему используют для деления на подтипы значение Кі-67 14%.

1.2.1 Роль эстрогеновых рецепторов в канцерогенезе молочной железы

Одним из основных факторов, связанных с повышенным риском развития РМЖ, является пол. Это связано с тем, что, в отличие от мужчин, у женщин клетки молочной железы очень чувствительны к гормонам (в частности, эстрогену и прогестерону), а также к любым нарушениям их баланса (Łukasiewicz *et al.*, 2021). Риск развития РМЖ увеличивается с возрастом, и определяемая в разных исследованиях медиана возраста пациентов находится в диапазоне 50-62 лет, что соответствует, как правило, периоду постменопаузы (Gold, 2011). Примечательно, что уровень эстрадиола в сыворотке у женщин в постменопаузе составляет

всего 5-10% от его уровня до менопаузы. Однако в тканях опухолей уровни эстрогенов сопоставимы с теми, что были до менопаузы. Такой уровень эстрогенов достигается за счёт активности ароматазы, которая катализирует превращение андрогенов, секретируемых надпочечниками и яичниками, в эстрогены (LaPensee and Ben-Jonathan, 2010).

Ранее было продемонстрировано, что введение эстрогена лабораторным животным (мыши, крысы, хомяки), увеличивает вероятность развития рака в ряде органов, включая молочную железу, матку, влагалище, яички и почки. У женщин увеличение риска развития РМЖ связано с использованием комбинированной заместительной гормональной терапии, ранним менархе, поздней менопаузой, высоким уровнем эстрогенов в сыворотке крови, что также подтверждает связь воздействия эстрогенов с инициацией РМЖ (Duffy, 2006; Rosenberg et al., 2021).

Большинство эффектов эстрогенов опосредовано эстрогеновыми рецепторами. До 80% диагностируемых случаев РМЖ относятся к люминальному типу заболевания, для которого характерна, как правило, высокая экспрессия ER (Mullooly et al., 2017). Известно, что обработка эстрогенами ЕRα-позитивных клеток РМЖ стимулирует их пролиферацию и миграцию, а трансфекция клеток конструктами, содержащими ген ERβ, приводит к подавлению данных эстрадиол-индуцированных эффектов (Ma et al., 2016). Более того, было показано, что экспрессия ERβ ассоциирована с неинвазивными опухолями молочной железы (Järvinen et al., 2020). Способность ΕRβ подавлять транскрипционную активность ΕRα вероятно связана со сниженным трансактивационным потенциалом домена AF1 ERβ. Кроме этого, результаты ряда исследований продемонстрировали, что ЕRβ, в отличие от ΕRα, оказывает репрессирующее действие на гены, содержащие в своих промоторах сайты связывания SP1 и AP1, что также может обуславливать противоположные эффекты рецепторов на клеточную пролиферацию (Mal et al., 2020). Однако сообщалось, что в тканях и клетках ERα-негативного РМЖ активность ERβ может способствовать росту и выживанию опухолевых клеток (Leygue and Murphy, 2013). Таким образом, роль ЕВВ в канцерогенезе молочной железы зависит от экспрессионного статуса ERα.

Среди выявленных на данный момент мишеней ER множество генов, для которых была обнаружена связь с канцерогенезом молочной железы. Наиболее исследованные мишени рецептора, их функции и роль в канцерогенезе, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Гены-мишени эстрогенового рецептора, их функции, связь с канцерогенезом

Ген	Тип регуляции	Функция	Связь с канцерогенезом
BRCA1	Экспрессия	Репарация повреждений ДНК,	Мутации <i>BRCA1</i> связаны с
	регулируется	регуляция транскрипции	увеличенным риском развития
	комплексом	(Semmler <i>et al.</i> , 2019). Может	РМЖ (до 70%) (Semmler et al.,
	ER/AP-1 (Jeffy et	участвовать в ингибировании	2019).
	al., 2005).	пролиферации, эпителиально-	Большинство опухолей,
		мезенхимального перехода,	экспрессирующих BRCA1 – ER-
		индукции апоптоза (Bai et al.,	позитивные (Roldán et al., 2006).
		2014; Thangaraju et al., 2000;	
		Zhang, Luo et al., 2016).	
CCND1	Экспрессия	Регуляция клеточного цикла	Выоская экспрессия связана с
	регулируется	(Cicatiello et al., 2004).	положительным статусом ER
	комплексом		(Elsheikh et al., 2008;
	ER/AP-1		Mohammadizadeh et al., 2013).
	(Cicatiello et al.,		
	2004).		
E2F1	Экспрессия	Транскрипционный фактор,	Способствует
	регулируется	регуляция клеточного цикла	метастазированию (Hollern et
	комплексом	(Hollern et al., 2019).	al., 2019).
	ER/Sp1 (Louie et		Нет положительной связи с ER
	al., 2010; Wang		при РМЖ, высокие уровни
	et al., 1999).		экспрессии в основном
			характерны для ER-негативных
			опухолей (Liu <i>et al.</i> , 2018;
			Vuaroqueaux et al., 2007).
PGR	Экспрессия	Транскрипционный фактор.	Как правило, ко-
	регулируется	Прогестерон является	экспрессируется с ER при
	комплексом	пролиферативным гормоном в	РМЖ; является
	ER/Sp1 (Petz et	молочной железе, важным для	прогностическим маркером
	al., 2004).	подготовки молочных желез к	ответа на терапию (Kunc et al.,
		выработке молока (Daniel et	2021).
		al., 2011).	
STC2	Косвенная	Экспрессия <i>STC2</i>	Экспрессия положительно

	регуляция, не	индуцируется при стрессовых	коррелирует с уровнем
	через прямое	состояниях клетки, и STC2	экспрессии ER и
	связывание ERE	предотвращает апоптоз клеток	метастатическим поражением
	c ER (Raulic et	(Qie and Sang, 2022). Входит в	лимфоузлов (Jiang et al., 2019).
	al., 2008).	список 135 генов, экспрессия	В то же время сообщалось, что
		которых повышена в	STC2 ингибирует
		молочной железе по	эпителиально-мезенхимальный
		сравнению с другими тканями	переход, а высокая экспрессия
		(The Human Protein Atlas,	гена может быть маркером
		URL:	благоприятного исхода при
		https://www.proteinatlas.org/hu	РМЖ (Hou et al., 2015; Qie and
		manproteome/tissue/breast)	Sang, 2022).
VEGFA	Прямая	Регуляция образования новых	Стимулирует ангиогенез и
	регуляция через	кровеносных сосудов (Kim et	метастазирование (Kim et al.,
	ERE (Applanat et	al., 2017).	2017). Может способствовать
	al., 2008).		пролиферации клеток РМЖ
			(Liang et al., 2006).
			Данные о связи со статусом ER
			противоречивы (Fuckar et al.,
			2006; Rydén et al., 2005).

1.3 Ксеноэстрогены

Эндокринная система является одной из основных систем гомеостатического контроля, целью которой является поддержание нормальных функций и развития организма в постоянно меняющихся условиях окружающей среды (Marty et al., 2011). Однако способность поддерживать физиологические параметры может нарушаться в результате химических воздействий извне. Примерно с 1930-х годов проводились активные разработки гормональных препаратов для использования их в качестве противозачаточных средств или для лечения болезней эндокринной системы. Тогда же был открыт и введён для медицинского применения печально известный диэтилстильбэстрол. Его широко назначали беременным женщинам для предотвращения выкидышей. Однако, как позже выснилось, воздействие этого вещества в период внутриутробного развития вызывало серьезные деформации и нарушения в репродуктивной системе детей мужского и женского пола (Kerdivel et al., 2013).

Постепенно для всё большего числа веществ обнаруживалась способность нарушать работу эндокринной системы, появлялись конкретные сообщения о связи между такими веществами и заболеваниями и нарушениями развития органов репродуктивной системы (Marty et al., 2011). В 1991 г. для таких веществ было введено название «эндокринный разрушитель» или «эндокринный дизраптор» (Schug et al., 2016).

На сегодняшний день известно около 1000 химических веществ, обладающих эндокринными эффектами (Schug *et al.*, 2016). Особую озобоченность вызывают ксеноэстрогены (Wang *et al.*, 2021). Ксеноэстрогены могут влиять на эндокринную систему на всех уровнях. Так, помимо способности имитировать эндогенные эстрогены, некоторые ксеноэстрогены также обладают способностью нарушать действие ферментов, вовлечённых в стероидогенез или метаболизм эстрогенов (например, нарушение активности ароматазы может изменять баланс эстрогена/андрогена) (Kerdivel *et al.*, 2013).

Среди ксеноэстрогенов есть вещества, как произведённые человеком (пестициды, лекарства, компоненты пластмасс, косметики и др.), так и соединения естественного происхождения (фитоэстрогены, микоэстрогены) (Wang et al., 2021). Масштабное применение таких веществ привело к загрязнению ксеноэстрогенами подземных и поверхностных вод, почв (Costet et al., 2015; Gonsioroski et al., 2020). Некоторые ксеноэстрогены обладают высокой стойкостью в окружающей среде и способны биоаккумулироваться в пищевых цепях, накапливаясь в жировых тканях животных (Kerdivel et al., 2013). Таким образом, человек регулярно подвергается воздействию ксеноэстрогенов при употреблении овощей и фруктов, выращенных на территориях, где применяются или применялись пестициды с эстрогенными свойствами, при употреблении мяса и рыбы, в результате употреблении еды и воды, хранившихся в пластиковых контейнерах, при использовании лекарств и косметики, содержащих вещества с гормон-подобными свойствами (Costet et al., 2015; Gonsioroski et al., 2020). Например, через пищевые контейнеры могут попадать в пищу фталаты и бисфенол A, а в составе косметики часто можно увидеть такие ксеноэстрогены как парабены или бензофеноны (Gonsioroski et al., 2020; Peinado et al., 2020).

Многочисленные исследования указывали на связь воздействия ксенострогенов с увеличенным риском развития онкологическим заболеваний, в особенности РМЖ (Fucic *et al.*, 2012). Можно предположить, что увеличение заболеваемости РМЖ, наблюдаемое с 1940-х годов, в том числе связано с увеличением производства веществ, обладающих эстрогенными свойствами (Héry *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2021). Однако конкретная роль ксеноэстрогенов в канцерогенезе остаётся малоисследованной. Необходимы исследования, которые пролили бы свет на пути, затрагиваемые ксеноэстрогенами при инициации и прогрессии рака.

1.3.1 Хлорорганические пестициды

Одними из распространённых в окружающей среде ксеноэстрогенов являются хлорорганические пестициды (ХОП). ХОП активно применялись в 1940-1960х годах для борьбы с сельскохозяйственными вредителями, а также для борьбы с малярией, тифом и педикулёзом (Brown, 2008; Longnecker et al., 1997). ХОП обладают высокой липофильностью, длительным периодом полураспада и способностью к биоаккумуляции. Они также обладают высоким коэффициентом адсорбции и прочно связываться с частицами почвы, не вымываясь и сохраняясь в почве на долгие годы. До осаждения на почву ХОП могут перемещаться на большие расстояния, а после попадания в почву — проникать в растения или загрязнять подземные воды и в итоге биоаккумулироваться в рыбе и других водных организмах (Тzanetou and Karasali, 2022). Эти свойства и активное использование ХОП в прошлом способствовали мировому загрязнению данными соединениями и их метаболитами (Jayaraj et al., 2016).

В 2001 году двенадцать соединений, в том числе девять ХОП (альдрин, дильдрин, эндрин, дихлордифенилтрихлорэтан, хлордан, гексахлорбензол, мирекс, токсафен и гептахлор), были включены в список Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях. Данный список также получил название «грязная дюжина», но позже был дополнен другими соединениями (Tzanetou and Karasali, 2022). Присоединение к данной конвенции подразуемвает ограничение или запрет в стране производства и использования включенных в список веществ. Как итог, в настоящее время использование ХОП запрещено в большинстве стран, однако люди всё ещё подвергаются их воздействию, в основном при употреблении птицы, рыбы, молочных продуктов (Upson *et al.*, 2013). Многие пестициды также незаконно используются в развивающихся странах в сельском хозяйстве. Учитывая, что ХОП обладают способностью к распространению на большие расстояния, продолжение их использования усиливает мировое загрязнение данными ксенобиотиками (Jayaraj *et al.*, 2016).

1.3.2 Дихлордифенилтрихлорэтан, современное состояние проблемы загрязнения

Наиболее часто используемым пестицидом в сельскохозяйственной практике был дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ), который является умеренно опасным и имеет период полураспада в почве до 30 лет (Mansouri *et al.*, 2017). Соединение впервые было получено в 1874 году австрийским химиком Отмаром Цейдлером. Но его инсектицидные свойства были обнаружены только в 1939 году швейцарским химиком Паулем Мюллером, и крупное производство началось в 1943 году (Buonsenso and Cataldi, 2010). Изначально ДДТ использовали для уничтожения переносчиков малярии и тифа, что спасло миллионы людей,

однако после 1945 года ДДТ начал использоваться и для борьбы с сельскохозяйственными вредителями. В начале 1960-х годов, около 400000 тонн ДДТ ежегодно использовалось во всем мире (Turusov *et al.*, 2002). На данный момент Всемирной организацией здравоохранения одобрено использование ДДТ для борьбы с переносчиками малярии (Tzanetou and Karasali, 2022).

Техническая смесь ДДТ состоит из двух основных изомеров (Рисунок 4), а именно п,п'-ДДТ (около 85%) и о,п'-ДДТ (около 15%) (De Jager *et al.*, 2006). Хотя п,п'-ДДТ и о,п'-ДДТ имеют период полураспада в тканях человека около 7 лет, период полураспада п,п'-ДДЭ, метаболита п,п'-ДДТ, значительно дольше (Persson *et al.*, 2012), что объясняет присутствие его в больших концентрациях в окружающей среде и живых организмах (Longnecker *et al.*, 1997). В регионах, где ранее применялся ДДТ, до сих пор находят его метаболиты в крови жителей или образцах грудного молока (Klinčić *et al.*, 2014; Ruiz-Suárez *et al.*, 2014).

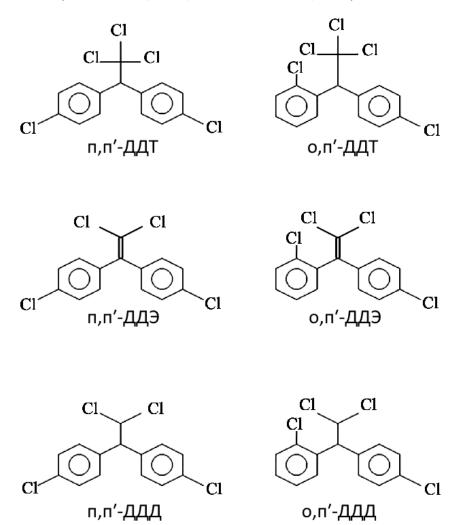


Рисунок 4. Изомеры ДДТ и их основные метаболиты

В исследовании, опубликованном в 2022 году, сообщалось, что в пресноводных водоёмах Китая ДДТ является преобладающим ХОП в донных отложениях и в крабах. При этом анализ выявил свежие поступления ДДТ во многих регионах, что может быть результатом эрозии почвы или местной антропогенной деятельности (Chen *et al.*, 2022). Гексахлорбензол и ДДТ также были доминирующими ХОП в пробах, взятых в 2019 году из реки Меджерда в Тунисе (Necibi and Mzoughi, 2020).

В России также ежегодно проводится мониторинг содержания ряда ХОП в почвах. Согласно данным отчётов в 2020 году загрязненные суммарным ДДТ площади составили 1,33 % от обследованной площади 29,4 тыс. га (в 2019 г. – 2,1 %, в 2018 г. – 1 %, в 2017 г. – 2,5 %, в 2016 г. – 5,3 %, в 2015 г. – 6,3 %, в 2014 г. – 1,33 %). Всего в 2020-2010 годах наиболее значительные загрязнения обнаруживались в почвах Ульяновской, Курганской, Курской, Тамбовской, Липецкой, Самарской, Иркутской, Пензенской, Белгородской областей, в республике Мордовия, в Ханкайском районе. В Новосибирской области превышение предельно допустимой концентрации (ПДК) ДДТ было обнаружено в 2016 г. на территории ЗАО «Птицефабрика» (1,1 ПДК) и на территории детского лагеря «лесная сказка» в Искитимском районе (с максимумом 4,3 ПДК). Значительное превышение ПДК на территории лагеря также было обнаружено в 2014 (11,4 ПДК), в 2012 (11 ПДК), в 2011 (8,4 ПДК). Примечательно, что на территории Обоянского плодсовхоза в Курской области в 2011 г. было обнаружено превышение содержания ДДТ над ДДЭ, что характерно для недавнего применения пестицида (Ежегодник «Мониторинг пестицидов в объектах природной среды Российской Федерации», URL: http://www.rpatyphoon.ru/products/pollution-media.php).

Как уже отмечалось, ситуация осложняется из-за случаев нелегального использования пестицидов, которые регулярно обнаруживаются специалистами Россельхознадзора. Так, например, в 2015 году был выявлен факт использования ДДТ в теплицах Искитимского района (О грубых нарушениях земельного законодательства тепличным хозяйством в Новосибирской области, URL: https://fsvps.gov.ru/ru/fsvps/news/15426.html), в 2013 г. – на полях Приморского края (О выявлении в почве запрещённого химиката, превышающего допустимую норму в 4 раза, URL: https://fsvps.gov.ru/ru/fsvps/news/6821.html). В 2011 году в Костромской области была обнаружена цистерна, содержащая смесь пестицидов, в том числе ДДТ. Целостность цистерны была нарушена, что привело к утечке пестицидов и порче земли сельскохозяйственного назначения (О выявлении случая опасного мошенничества в области утилизации пестицидов, URL: https://fsvps.gov.ru/ru/fsvps/news/2970.html).

Таким образом, стабильность ДДТ, его повсеместное присутствие, эстрогенные свойства вызывают озабоченность его побочными эффектами.

1.3.3 История изучения ДДТ

Первая кампания с использованием ДДТ началась в Неаполе в 1944 году для борьбы с эпидемией сыпного тифа. Затем ДДТ показал свою эффективность против комаров-переносчиков малярии. По оценкам ВОЗ за первые 8 лет использования ДДТ предотвратил не менее 100 миллионов случаев малярии и 5 миллионов смертей. Поэтому в 1948 году Пауль Мюллер был удостоен Нобелевской премии за своё открытие, которое привело к спасению стольких жизней (Buonsenso and Cataldi, 2010).

Однако уже в 1945 году вышла публикация, в которой приводились рассуждения о том, что применять ДДТ нужно с осторожностью (Bishopp, 1945). Эти опасения простимулировали учёных начать подробное исследование токсических свойств ДДТ. И к 1949 году уже были получены данные о действии разных доз ДДТ на нервную систему животных, оценены летальные дозы для разных видов и было выявлено, что данное соединение накапливается в жире животных и молоке коров (Konst and Plummer, 1946; Winslow, 1949).

Открытие метода газовой хроматографии в 1952 году и обнаружение ДДТ в жире и молоке животных привело к многочисленным работам по качественному и количественному определению ДДТ в жире и грудном молоке человека. Первая публикация об обнаружении ДДТ в жире человека вышла в 1953 году (Hunter *et al.*, 1963), в молоке – в 1965, в крови – в 1969 (Egan *et al.*, 1965; Edmundson *et al.*, 1969). Пик таких работ пришёлся на 1960-1970-ые годы, но и сейчас периодически выходят статьи с результатами исследований по определению ХОП, в том числе ДДТ, в жире, молоке или крови человека.

Стоит также отметить, что в 1965 году была проведена первая попытка определить признаки хронической интоксикации у работников, связанных с использованием инсектицидов. Действительно у рабочих наблюдали более высокую частоту неврологических нарушений при сравнении с людьми из контрольной группы, не имевших контакта с инсектицидами (Davignon *et al.*, 1965).

Таким образом, в 1960-1970 годах было доказано, что действительно ДДТ накапливается у человека, что вызвало значительные опасения. После 1962 года развернулась дискуссия о возможном вреде ДДТ для человека, и в 1969 году в ряде стран впервые было запрещено использование инсектицида (Conis, 2010; Parada *et al.*, 2016). В СССР, где ДДТ повсеместно применяли для обработки территорий от клещей, использование инсектицида было интенсивным в 1950-х и 1960-х годах, и продолжалось до начала 1990-х годов (Li *et al.*, 2006).

Активные споры тех лет о возможном вреде ДДТ для человека привели к необходимости исследовать механизмы действия инсектицида на млекопитающих. Так, в 1974 году с использованием лабораторных животных исследовали эффекты ДДТ на сердечнососудистую

систему (Jeyaratnam and Forshaw, 1974), а к 1978 году на крысах и мышах разных линий показали увеличение риска развития рака печени под действием ДДТ (Reuber, 1978; Tomatis *et al.*, 1974).

Однако на тот момент уже было известно, что ДДТ, как и другие ХОП, обладает эстрогенными свойствами, из-за чего возникали подозрения, что ДДТ может также быть связан с гормонозависимым канцерогенезом. В итоге в 1981 году провели модельный эксперимент: у самцов крыс линии Sprague-Dawley индуцировали РМЖ, одновременно «подкармливая» их ДДТ; контрольная группа ДДТ не получала. В ходе сравнения групп животных было выявлено, что у крыс, получавших ДДТ опухоли развились на 6 месяцев раньше (Scribner and Mottet, 1981). Так было подтверждено, что ДДТ действительно может способствовать развитию гормон-зависимых форм рака. Это привело к тому, что вновь возник интерес к количественному определению содержания ДДТ в образцах человека, но уже для сравнения его уровней у больных и здоровых людей. И в 1992 году было опубликованы результаты исследования, показавшие, что содержание ХОП, в том числе ДДТ, больше в образцах жира женщин, у которых выявлены злокачественные новообразования молочной железы по сравнению с теми женщинами, у которых опухоли были доброкачественными (Falck et al., 1992). В 1993 году было проведено аналогичное исследование, но уже с определением уровня пестицидов в крови пациентов, которое показало достоверную разницу в уровне метаболита ДДТ между здоровыми людьми и страдающими РМЖ (Wolff et al., 1993). В дальнейшем такие работы продолжились, часть из них подтверждала корреляцию с риском РМЖ, часть опровергала. До сих пор способность ДДТ индуцировать развитие РМЖ не доказана.

Позже, в 2000 году, также показали повышенные уровни метаболита ДДТ у пациентов с диагнозом рак поджелудочной железы (Hoppin *et al.*, 2000).

В 2001 году был разработан метод полимеразной цепной реакции для измерения количества мРНК генов в образцах. И уже в 2002 году с применением нового метода было оценено влияние ДДТ на экспрессию генов в клеточных линиях матки человека (Frigo *et al.*, 2002). В течение следующих лет было исследовано влияние ДДТ на экспрессию генов на крысах, мышах, клетках матки, молочной железы и печени человека. Многие исследования показали, что под действием ДДТ меняется экспрессия онкогенов и опухолевых супрессоров (*COX2*, *P53*, *VEGFA*, *PGR*, *BCL2*, *STC2* и др.) что указывает на его канцерогенные свойства (Втаtton *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2008; Holloway *et al.*, 2007; Kostka *et al.*, 2016). Однако конкретные молекулярные пути, которые могли бы способствовать индукции опухолей под действием ДДТ, не исследованы.

1.3.4 Эндосульфан

Эндосульфан, как и ДДТ, является хлорорганическим пестицидом. Эндосульфан и его эффекты на млекопитающих значительно менее исследованы по сравнению с ДДТ. Производство эндосульфана в качестве пестицида началось в 1950-х годах, и, по оценкам, глобальное потребление эндосульфана с 1950 по 2000 год составило 308 тыс. тонн (Schuster *et al.*, 2021). В отличие от ДДТ эндосульфан обладает острой токсичностью, и известно о множестве случаев гибели в результате отравления этим пестицидом (Gude and Bansal, 2012; Kucuker *et al.*, 2009). В 2011 г. он был включен в список Стокгольмской конвенции о СОЗ (Schuster *et al.*, 2021). Сейчас использование эндосульфана запрещено более чем в 80 странах. Эндосульфан использовался в виде смеси его изомеров, α и β (Рисунок 5) (Alonso-Trujillo *et al.*, 2020). Хотя скорость разложения эндосульфана в окружающей среде выше, чем у других СОЗ, продукт его разложения — сульфат эндосульфана — является высокостабильным. Период полураспада в почве составляет до 60 дней для α-эндосульфана и 800 дней для β-эндосульфана. Период полураспада смеси (эндосульфан и сульфат эндосульфана) составляет примерно от 9 месяцев до 6 лет (Каtаока, 2018).

Рисунок 5. Изомеры эндосульфана и его метаболит

Наиболее распространёнными проявлениями отравления эндосульфаном являются неврологические расстройства (заторможенность и генерализованные судороги) (Lee et al., 2015). В небольшом исследовании, опубликованном в 2003 году, было показано, что длительное воздействие эндосульфана на детей мужского пола может задерживать половое созревание и нарушать синтез половых гормонов (Saiyed et al., 2003). Сообщалось также о скелетных и других врожденных аномалиях у людей и лабораторных животных после воздействия эндосульфана (Narayana Kurup and Mohanty, 2017). Известно, что эндосульфан генотоксичен для лимфоцитов и клеток печени человека в экспериментах in vitro (Bajpayee et al., 2006; Lu et al., 2000).

Тенденция к прекращению использования эндосульфана в сельском хозяйстве началась в последнее десятилетие. Например, в Китае применение пестицида запретили только в марте

2019 года (Chen *et al.*, 2021). Как и ДДТ, эндосульфан обладает способностью переноситься на большие расстояния и биоаккумулироваться. Остатки эндосульфана были обнаружены в морской биоте даже в регионах Арктики (Weber *et al.*, 2009).

1.3.5 Возможные механизмы канцерогенного действия ДДТ и эндосульфана

В исследовании 2018 года, проведённом в Пакситане, была обнаружена значительная связь между уровнем ХОП в сыворотке пациентов и риском онкологических заболеваний. При этом при РМЖ из 14 исследованных пестицидов наиболее высокие концентрации были обнаружены для п,п'-ДДЭ, за которым следовал эндосульфан. Концентрация п,п'-ДДЭ в группе пациентов с РМЖ по сравнению с контрольной группой составляла 1,017 мг/кг против 0,019 мг/кг, что указывало на значительную связь пестицида с риском развития РМЖ. Средние концентрации эндосульфана составляли 0,537 мг/кг у пациентов с РМЖ и 0,166 мг/кг в контрольной группе (Attaullah et al., 2018). В другом исследовании, проведённом в Индии, также были обнаружены более высокие уровни п,п'-ДДЭ и эндосульфана, а также некоторых других XOП, в сыворотке пациентов с РМЖ (Kaur et al., 2019). Однако ряд исследований не выявлял связи уровня пестицидов в сыворотке/образцах и риском онкологических заболеваний. Предполагается, что расхождение результатов исследований может быть связано с местом исследования и возрастом, в котором пациенты подвергались воздействию пестицидов. Так, связь между уровнями ДДТ и риском РМЖ была намного сильнее в развивающихся странах (где использование ДДТ все еще широко распространено), а воздействие пестицида наиболее критично в раннем возрасте. Было обнаружено, что воздействие ДДТ в детстве и раннем подростковом возрасте (до 14 лет) связано с 5-кратным увеличением риска развития РМЖ в возрасте до 50 лет (Gray et al., 2017).

Изомеры ДДТ и эндосульфана способны связываться с ER и оказывать эстрогенподобные эффекты на гормон-чувствительные клетки (Klotz et al., 1996; Li et al., 2008; Soto et al., 1994). Предполагается, что такие эндокринные разрушители способствуют инициации РМЖ через активацию ER с последующим изменением экспрессии мишеней рецептора (Jaga, 2000; Calaf et al., 2020). Однако ДДТ и эндосульфан также являются антагонистами андрогеннового и прогестеронового рецепторов (AR и PR соответственно), которые, как известно, играют значительную роль в инициации и прогрессии РМЖ (Andersen et al., 2002; Jin et al., 1997; Klotz et al., 1997; Li et al., 2008; Maness et al., 1998). В большинстве случаев в тканях РМЖ наблюдается повышенная экспрессия AR, и было показано, что при ER-положительном РМЖ, если экспрессия AR выше чем ER, то AR может конкурировать с ER, способствуя ингибированию пролиферации (Chen et al., 2020). Прогестерон – мощный митоген в молочной

железе (Daniel *et al.*, 2011). Вместе с этим, высокий уровень экспрессии PR связан с лучшим прогнозом при PMЖ (Yao *et al.*, 2017). Таким образом, можно ожидать, что вмешиваясь в сигнальные пути AR и PR, эндосульфан и ДДТ также могут оказывать канцерогенное действие на клетки молочной железы.

1.4 МикроРНК

Проект «Геном человека» выявил около 20 000 генов у человека. Но лишь около 2 % РНК, считываемых с генома человека, транслируются в белки (Yanokura *et al.*, 2015). К таким не кодирующим белок РНК относятся, например, рибосомальные и транспортные РНК. Важную группу некодирующих РНК составляют микроРНК. Первая микроРНК, lin-4, была обнаружена в 1993 году (Lee *et al.*, 1993). По данным 2016 года существует 1872 аннотированных гена-предшественника микроРНК человека, которые процессируются в ~2578 зрелых последовательностей микроРНК (Peng and Croce, 2016).

МикроРНК – это короткие, как правило 22 нуклеотида в длину, эндогенные некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию генов, вовлечённых в фундаментальные клеточные процессы, такие как развитие, дифференцировка, пролиферация, апоптоз (Garzon et al., 2010). Гены микроРНК составляют примерно 3% генома человека (Gupta et al., 2012), но при этом, по разным оценкам, от 30 до 60 % генов человека являются мишенями для этих некодирующих РНК (Аушев, 2015). Это возможно благодаря тому, что каждая микроРНК может контролировать трансляцию десятков или даже сотен различных мРНК, а трансляция одной мРНК может контролироваться более чем одной микроРНК (Rossi and Calin, 2013). Такие обширные функции приводят к тому, что профиль экспрессии микроРНК меняется при многих патологиях человека, в том числе онкологических заболеваниях. Сейчас микроРНК являются важным объектом медико-биологических исследований. В настоящее время разрабатываются методы лечения, основанные на использовании микроРНК в качестве мишеней, которые могли бы применяться либо сами по себе, либо в сочетании с другими методами лечения с целью повышения их эффективности. Уже предприняты первые попытки применить на практике препараты, направленные на ингибирование тех или иных микроРНК или восстановление их уровня. Первым таким препаратом был MRX34, клинические испытания которого были инициированы в 2013. Препарат предназначен для коррекции дефицита опухольсупрессирующей miR-34 (Beg et al., 2017; Wu et al., 2018). Однако испытания пришлось прервать во время I фазы из-за обнаружения иммуноопосредованной токсичности препарата (Hong et al., 2020). Сейчас проходят II фазу клинических испытаний многие другие препараты, основанные на действии микроРНК: Miravirsen (antagomiR – ингибирование miR-122),

Remlarsen (миметик miR-29b), Cobomarsen (antagomiR — ингибирование miR-155), Mesomir (миметик miR-16) (Bonneau *et al.*, 2019). Данные об экспрессии микроРНК могут быть также информативны в качестве диагностического инструмента или прогностического биомаркера, и значимость микроРНК в данной проблеме сейчас активно изучается. В 2012 году была представлена панель miRview mets, позволяющая идентифицировать рак неизвестного первичного происхождения (Meiri *et al.*, 2012). Доступной для медицинского использования является панель ThyraMIR, включающая 10 микроРНК, которую в комбинации с панелью ThyGeNEXT используют для дифференциальной диагностики опухолей щитовидной железы (Lupo *et al.*, 2020).

Таким образом, исследование регуляции экспрессии микроРНК, может дать дополнительные возможности для разработки лекарственных средств или диагностических инструментов.

1.4.1 Биогенез микроРНК

МикроРНК кодируются в межгенных регионах или в интронах белок-кодирующих генов. Небольшое количество микроРНК млекопитающих закодированы в экзонах, в 3'- нетранслируемых регионах или в месте соединения экзон-интрон (Boivin *et al.*, 2018).

На рисунке 6 показаны основные этапы биогенеза микроРНК, происходящие в ядре. Первый этап биогенеза заключается в транскрипции с ДНК, как правило, РНК-полимеразой II – ферментом, осуществляющим также транскрипцию белок-кодирующих генов (Аушев, 2015), хотя некоторые микроРНК транскрибируются РНК-полимеразой III (Gupta et al., 2012). Экспрессия генов микроРНК, которые находятся в интронах или экзонах белок-кодирующих генов, как правило, регулируется через промотор гена-"хозяина" (Boivin et al., 2018). Однако было показано, что внутригенные микроРНК иногда имеют свои собственные промоторы (На and Kim, 2014). Первичный транскрипт (pri-miRNA), длина которого может составлять несколько тысяч оснований (Conrad et al., 2020), имеет 5'-кэпированную и полиаденилированную структуру (Peng and Croce, 2016). Такой транскрипт содержит самокомплементарные участки, способные формировать шпильку, которая отрезается в ядре от остального транскрипта с помощью комплекса рибонуклеазы Drosha и дцРНК-связывающего белка DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8). Комплекс этих двух белков часто 2018). В клетках называют «микропроцессором» (O'Brien et al., млекопитающих метилтрансфераза METTL3 метилирует при-микроРНК, маркируя их для распознавания с помощью DGCR8 (Alarcón et al., 2015).

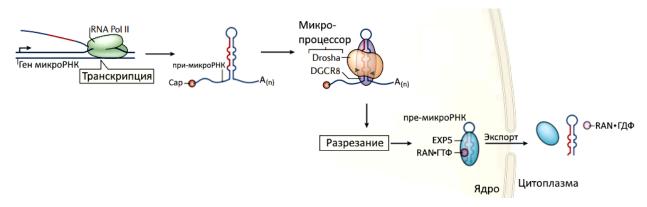


Рисунок 6. Биогенез микроРНК в ядре (адаптировано из Ha and Kim, 2014)

Рибонуклеаза Drosha разрезает шпильку приблизительно в 11 нуклеотидах от её основания и в 22 нуклеотидах от терминальной петли (Рисунок 7). В основном сайт разрезания определяется расстоянием от основания шпильки, но расстояние до терминальной петли также важно для эффективной и точной обработки при-микроРНК (На and Kim, 2014). Для правильного ориентирования комплекса относительно при-микроРНК и определения сайта разрезания важны мотив UGUG в терминальной петле и мотивы UG и CNNC, фланкирующие шпильку (Vorozheykin and Titov, 2020). Итогом этого этапа является образование премикроРНК (pre-miRNA) длиной около 85 нуклеотидов (Peng and Croce, 2016). Одна первичная микроРНК часто содержит последовательности нескольких разных пре-микроРНК (Filipowicz *et al.*, 2008). Процессинг микроРНК возможен и без участия микропроцессора — через механизм сплайсинга. Это происходит в тех случаях, когда область шпильки совпадает с границами вырезаемого интрона (Аушев, 2015).

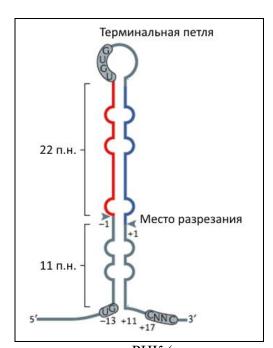


Рисунок 7. Схема строения при-микроРНК (адаптировано из Ha and Kim, 2014)

В пре-микроРНК имеются две самокомплементарные области, соединенные петлей, и одноцепочечный участок на 3'-конце из двух нуклеотидов, который был образован при разрезании рибонуклеазой Drosha (Аушев, 2015; Cai *et al.*, 2004). Этот одноцепочесный участок важен для распознавания белками, отвечающими за транспорт пре-микроРНК в цитоплазму. Транспорт осуществляется белком экспортином-5 в комплексе с малой ГТФазой Ran. После переноса ГТФ гидролизуется, что приводит к разборке комплекса и высвобождению премикроРНК (На and Kim, 2014).

В цитоплазме пре-микроРНК процессируется рибонуклеазой Dicer в комплексе с дцРНКсвязывающим белком TRBP (transactivation response element RNA-binding protein) (Chen, 2010). При этом для распознавания рибонуклеазой Dicer также важен 3'-одноцепочечный участок премикроРНК. Участки расщепления Dicer расположены на фиксированном расстоянии от 3'-конца пре-микроРНК. У млекопитающих существует дополнительный механизм определения места 5'-фосфорилированный расщепления: когда конец пре-микроРНК термодинамически нестабилен, то Dicer может с ним связываться и расщеплять на расстоянии 22 нуклеотида от него (Ha and Kim, 2014). После обработки пре-микроРНК нуклеазой Dicer образуется зрелая двухцепочечная микроРНК вариабельной длины (~ 18-25 нуклеотидов). Полученный дуплекс РНК затем образует вместе с белками семейства Argonaute комплекс, называемый РНКиндуцируемым комплексом выключения гена RISC (RNA-induced silencing complex) (Рисунок 8). Сборка RISC включает два этапа: загрузку РНК-дуплекса и его последующее раскручивание (Ha and Kim, 2014). Цепочка-спутница удаляется из комплекса и, как правило, деградирует (Garzon et al., 2010). Выбор цепи не является строгим, поэтому цепочка-спутница также может с некоторой частотой включаться в комплекс RISC (Ha and Kim, 2014).



Рисунок 8. Формирование зрелого комплекса RISC в цитоплазме (адаптировано из Ha and Kim, 2014)

1.4.2 МикроРНК в механизмах регуляции экспрессии генов

МикроРНК взаимодействует с 3'-нетранслируемой областью (UTR) мРНК-мишени. Как правило, достаточным условием для связывания с мРНК служит комплементарность между консервативным участком со 2-го по 8-й нуклеотид на 5'-конце микроРНК (seed region) и 3'- UTR мРНК. Для взаимодействия микроРНК с мРНК важно отсутствие сложных вторичных

структур 3'-UTR. 3'-конец микроРНК также может вносить вклад во взаимодействие (Bentwich, 2005; Kuhn *et al.*, 2008).

После связывания, при условии, что микроРНК полностью комплементарна мРНКмишени, RISC индуцирует деградацию мРНК, при этом происходит её эндонуклеолитическое встречается расщепление. Данный механизм редко y животных. комплементарности нет, происходит блокировка трансляции. Таким образом, в любом случае происходит уменьшение количества белка, кодируемого мРНК-мишенью. Кроме того, даже при неполной комплементарности в большинстве случаев индуцируется экзонуклеолитическая деградация мРНК, так как микроРНК способствуют привлечению факторов деаденилирования к мРНК-мишени, которые удаляют ее поли(А)-хвост, что и способствует последующей экзонуклеолитической деградации (Martinez-Sanchez and Murphy, 2013). Считается, что деградация или, по крайней мере, ее заключительные стадии происходит в Р-тельцах – клеточных структурах, в которых содержатся ферменты, катаболизирующие мРНК, и репрессоры трансляции (Filipowicz et al., 2008). В настоящее время лишь небольшое количество генов-мишеней микроРНК идентифицировано с помощью биологических экспериментов. В предсказании мишеней микроРНК основным инструментом являются биоинформатические методы. Многие алгоритмы для предсказания генов-мишеней были разработаны на основе оценки комплементарности последовательностей seed-региона зрелой микроРНК и сайтовмишеней в 3'-UTRs мРНК, свободной энергии дуплекса микроРНК-мРНК и консервативности последовательностей сайтов-мишеней среди видов (Chen, 2010). Одними из исопльзуемых в исследованиях баз данных, которые содержат информацию о прогнозируемых генах-мишенях микроРНК, являются miRDB, miRDIP и TargetScan.

Помимо канонических механизмов регуляции генов через 3 'UTR-взаимодействия, существуют и другие, «неканонические», микроРНК-опосредованные механизмы регуляции экспрессии мРНК (Рисунок 9). Было показано, что некоторые микроРНК связываются 5'- нетранслируемой областью мРНК-мишени, что в некоторых случаях приводит к активации трансляции (Ørom et al., 2008), или с кодирующей последовательностью мРНК (Besnier et al., 2019). МикроРНК могут также связываться с рибонуклеопротеидами вне зависимости от RISC и влиять на их РНК-связывающую функцию (Garzon et al., 2010).

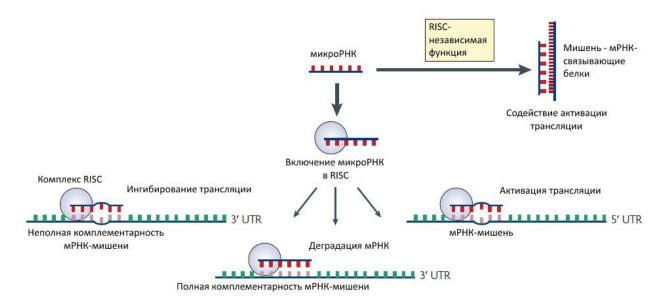


Рисунок 9. Механизмы регуляции экспрессии генов через взаимодействие с микроРНК (адаптировано из Garzon *et al.*, 2010)

Также сообщалось, что RISC может локализоваться в ядре и, подобно факторам транскрипции, принимать участие в регуляции состояния и структуры хроматина и в контроле транскрипции, регулируя её скорость (O'Brien *et al.*, 2018). Все эти данные указывают на сложность регуляции экспрессии генов, осуществляемой микроРНК, что должно быть принято во внимание при исследовании микроРНК-опосредованных эффектов и разработке методов лечения на основе микроРНК.

1.5 Роль микроРНК в канцерогенезе

Изменяя экспрессию генов, участвующих в регуляции клеточного цикла, апоптоза, эпителиально-мезенхимального перехода, межклеточных взаимодействий, микроРНК могут играть роль подобную онкогенам или генам-супрессорам опухолей в развитии рака (Zhang and Ma, 2012; Su et al., 2015; Valastyan and Weinberg, 2011; Yanokura et al., 2010). Первые доказательства участия микроРНК в развитии рака человека были предоставлены в 2002 году. Тогда было обнаружено, что область хромосомы 13q14, часто делетированная при В-клеточном хроническом лимфоцитарном лейкозе, содержит два гена микроРНК, miR-15a и miR-16-1 (Calin et al., 2002; Peng and Croce, 2016). Дальнейшее исследование показало, что эти микроРНК действуют как опухолевые супрессоры, индуцируя апоптоз путем подавления антиапоптотического белка BCL2 (Cimmino et al., 2005; Peng and Croce, 2016). В течение следующих лет было обнаружено, что определенные профили экспрессии микроРНК коррелируют с агрессивностью опухолей, реакцией на лекарственную терапию и результатами

лечения, что предполагает возможность их использования в качестве маркеров для диагностики и прогноза при опухолевых заболеваниях (Kurozumi *et al.*, 2017).

Хорошо исследованной микроРНК, для которой, как правило, характерна онкогенная роль, является микроРНК-21. Имеются данные о высоких уровнях её экспрессии в клетках РМЖ, рака желудка, поджелудочной железы, печени, яичников, эндометрия и др. (Yang et al., 2014; Yanokura et al., 2010) Онкогенная роль микроРНК-21 обусловлена её влиянием на экспрессию генов-мишеней. Так, микроРНК-21 может взаимодействовать с мРНК транскрипционного фактора E2F1, который связан с прогрессированием клеточного цикла (Chegini, 2010), белка PTEN (Phosphatase and tensin homolog), который участвует в контроле пролиферации клеток и апоптоза (Yang et al., 2014), белка PDCD4 (Programmed cell death protein 4), который играет важную роль в апоптозе (Pogribny et al., 2016).

Примерами других микроРНК, экспрессия которых часто меняется при опухолевых заболеваниях печени, мочевого пузыря, щитовидной железы и многих других типах рака, являются микроРНК-221/222, входящие в один кластер. Для данных микроРНК, главным образом, показаны онкогенные свойства. Эти микроРНК способствуют росту числа клеток через ингибирование опухолевых супрессоров p27, p57 (ингибиторы циклин-зависимых киназ, участвующих в продвижении по клеточному циклу) (Fornari *et al.*, 2008), подавляют экспрессию РТЕN и многих других опухолевых супрессоров (Wang, Zhu *et al.*, 2018).

Помимо перечисленных микроРНК хорошо исследованными онкогенными микроРНК при РМЖ выступают микроРНК-301 (Zheng et al., 2018), -10b, -155, -373, -520c (van Schooneveld et al., 2015). Среди мишеней данных микроРНК есть гены, кодирующие такие белки как НОХD10, РТЕN, ТР53INР1, СD44, участвующие в регуляции дифференцировки клеток, апоптоза, межклеточных взаимодействий. Нарушение их экспрессии стимулирует миграцию, инвазию и пролиферацию клеток (Schooneveld et al., 2015). Высокая экспрессия при РМЖ наблюдается для микроРНК-135b, увеличение уровня которой с помощью миметиков, как было показано, приводит к усилению клеточной пролиферации (Hua et al., 2016).

Семейство Let-7 является семейством микроРНК, члены которого выполняют, как правило, опухоль-супрессирующие функции. Например, Let-7f снижает выработку эстрогенов путем подавления экспрессии гена ароматазы *CYP19A1*, кодирующего фермент их синтеза, что предполагает, что данная микроРНК может использоваться при эндокринной терапии РМЖ (Shibahara *et al.*, 2012). Снижение уровня микроРНК let-7b, мишенями которой являются онкогены *H-RAS* и *HMGA2*, часто встречается на ранних стадиях прогрессирования РМЖ (Schooneveld *et al.*, 2015). Другими опухоль-супрессирующими микроРНК при РМЖ являются микроРНК-125b, -205, -17-92, -206, -200, -126, -335, -31, -365, -22 (Loh *et al.*, 2019; Schooneveld *et al.*, 2015). Однако при раке яичников и раке эндометрия уровень микроРНК-205

увеличивается (Кагаауvаz et al., 2012; Li et al., 2017). Связано это с тем, что данная микроРНК обладает двоякой функцией: онко-супрессорной и онкогенной. Так, её мишенями являются гены-супрессоры опухолей *JPH4* (Yanokura et al., 2010), *PTEN* (Кагаауvaz et al., 2012). Но также микроРНК-205 регулирует экспрессию ZEB1 и SIP1 (также известного как ZEB2) — факторов, важных для эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и метастазирования опухолей. Таким образом, микроРНК-205 может иметь функцию опухолевого супрессора через ингибирование ЭМП (Кагаауvаz et al., 2012). Другим примером микроРНК, которые могут выступать и в роли онкогена, и в роли опухолевого супрессора, являются члены семейства микроРНК-200 (микроРНК-141, -200а, -200b, -200с и -429). МикроРНК этого семейства могут подавлять ЭМП и миграцию клеток опухоли путем ингибирования экспрессии ZEB1 и ZEB2 (Рагк et al., 2008). Однако одной из мишеней микроРНК является ген *PTEN*, и подавление его экспрессии, вероятно, является одним из механизмов онкогенного действиях этих микроРНК при раковых заболеваниях эндометрия (Yoneyama et al., 2015).

Механизмы, лежащие в основе изменения экспрессии микроРНК при опухолевых заболеваниях, включают амплификацию или делецию генов микроРНК, нарушения регуляции важных факторов транскрипции или эпигенетических процессов, дефекты в механизме биогенеза микроРНК (Abolghasemi *et al.*, 2020). Эти нарушения могут, в том числе, возникать в результате воздействия ксенобиотиков.

1.6. Влияние ксенобиотиков на экспрессию микроРНК

Накапливается всё больше данных о том, что некоторые химические вещества из окружающей среды могут являться основной причиной возникновения рака у человека (Li et al., 2019). Было показано, что экспрессия микроРНК может меняться после воздействия таких веществ ещё до начала заболевания (Chen, 2010; Vrijens et al., 2015). Впервые это было обнаружено в экспериментах на крысах, которых подвергали воздействию сигаретного дыма. Согласно данным исследования в лёгких таких крыс значительно снижалась экспрессия 126 микроРНК и увеличивались уровни 7 микроРНК. В том числе было отмечено значительное снижение уровней микроРНК let-7, микроРНК-34, микроРНК-125, что, как правило, характерно для рака легких (Izzotti et al., 2009).

В настоящее время изучением влияния ксенобиотиков на экспрессию микроРНК занимаются многие исследователи. Было показано изменение экспрессии микроРНК при воздействии полициклических ароматических углеводородов, N-нитрозосоединений, мышьяка, фенобарбитала, дизельных выхлопных газов и многих других веществ (Pogribny *et al.*, 2016). Значительное число исследований было посвящено влиянию табака. Мощным канцерогеном,

входящим в состав табачного дыма, является никотинпроизводный нитрозамин-кетон (ННК, систематическое наименование — 4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанон). Он вызывает генотоксические изменения, такие как генные мутации и хромосомные аберрации, а также широкий спектр негенотоксических изменений, в том числе аномальное метилирование ДНК (Pogribny *et al.*, 2016). В дополнение к этим изменениям, оказалось, что под его действием изменяется экспрессия некоторых микроРНК. Например, в исследовании 2008 года было показано, что обработка крыс ННК приводит к снижению экспрессии miR-101, miR-126*, miR-199 и miR-34, что соответсвовало опубликованным данным об изменении уровней этих микроРНК при раке лёгкого у человека (Kalscheuer *et al.*, 2008). Подобные изменения были описаны и для других канцерогенов табачного дыма (Li *et al.*, 2019; Pogribny *et al.*, 2016).

Большую опасность для человека представляет мышьяк, воздействие которого связано с онкологическими заболеваниями кожи, легких, мочевого пузыря и печени. Было показано, что обработка бронхиальных эпителиальных клеток человека низкой концентрацией арсенита натрия, индуцирующей злокачественную трансформацию, сопровождается повышенной экспрессией микроРНК-21. Механизм такого усиления экспрессии микроРНК-21 может быть связан с арсенит-индуцированной активацией ядерного фактора-kB (NF-kB), который связывается непосредственно с промотором гена микроРНК (Pogribny *et al.*, 2016).

Многочисленные эпидемиологические исследования связывают воздействие загрязнения воздуха, вызванного дорожным движением, с повышенным риском рака легких и молочной железы. В 2018 году были опубликованы результаты исследования влияния такого загрязнения на сывороточные уровни микроРНК. Участники исследования гуляли в течение 2 часов либо по загруженной движением транспорта улице, либо по парку. В результате значительные изменения уровней были выявлены для микроРНК-133a, -193b, -1224, -433, -145, -27a, -580, -6716 (Krauskopf *et al.*, 2018).

Ряд канцерогенов стимулируют развитие опухоли через негенотоксический механизм. Эти агенты напрямую не вызывают повреждения ДНК, но вызывают изменения, которые стимулируют развитие рака. Группа веществ, называемых пероксисомными пролифераторами, являются негенотоксическими канцерогенами, которые приводят к раку печени у грызунов через рецептор, активируемый пероксисомными пролифераторами α (PPARα) (Chen, 2010). Было показано, что обработка мышей агонистом PPARα в течение 2 недель приводит к изменению экспрессии двадцати семи микроРНК (Shah *et al.*, 2007).

Проводились исследования влияния ДДТ на экспрессию микроРНК. Было показано, что ДДТ и бисфенол А, также оказывающий токсическое действие на эндокринную систему, схожим образом меняют профили экспрессии микроРНК в клетках рака молочной железы МСF-7 (Tilghman *et al.*, 2012). Оба соединения приводили к изменению экспрессии микроРНК-

638, -1915, -663, -1308, -21, -15b, -923, -342. Экспрессия микроРНК-21 снижалась под действием обоих соединений и эстрадиола.

Для эндосульфана было показано, что под его воздействием может изменяться экспрессия микроРНК-22 в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (Xu *et al.*, 2017).

Поднимается вопрос и о том, по какому механизму ксенобиотики могут изменять экспрессию микроРНК. Во-первых, химические соединения могут вызывать широкий спектр генетических и эпигенетических изменений, которые могут влиять непосредственно на экспрессию микроРНК-кодирующих генов и/или генов, участвующих в процессинге микроРНК (Pogribny *et al.*, 2016). Ксенобиотики могут приводить к изменению активности транскрипционных факторов, под регуляцией которых находятся гены микроРНК (Ali Syeda *et al.*, 2020). Также они способны влиять на созревание микроРНК, например, формируя комплексы с DICER, и, как было показано, могут непосредственно повреждать сами микроРНК (Pogribny *et al.*, 2016).

1.7 Заключение к обзору литературы

Хорошо известна связь ксенобиотиков с генотоксическим механизмом действия с канцерогенезом. Однако значительно менее исследована роль негенотоксических канцерогенов в инициации и прогрессии рака. Воздействие на организм таких ксенобиотиков может приводить к изменениям в активности некоторых рецепторов, например, рецепторов стероидных гормонов. При этом существует взаимосвязь между изменением активности рецепторов, нарушением экспрессии их мишеней, среди которых могут быть микроРНКмишени, и канцерогенезом. Эти изменения, вероятно, являются одним из ключевых механизмов, с помощью которого химические канцерогены с негенотоксическим механизмом действия приводят к различным нарушениям в клетках-мишенях. Значительную роль в этих нарушениях могут играть микроРНК, профиль экспрессии которых, как известно, меняется при злокачественной трансформации клетки. Однако значение микроРНК в этиологии рака и точные механизмы, с помощью которых факторы окружающей среды изменяют экспрессию микроРНК, остаются относительно неизученными. Понимание изменений, индуцируемых химическими веществами окружающей среды, предоставит важную информацию о механизмах, лежащих в основе патогенеза химически индуцированного рака, и позволит эффективно диагностировать и лечить рак, возникающий в результате хронического или острого воздействия канцерогенов.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Реактивы

В работе использовались следующие реактивы:

4,4'-ДДТ (п,п'-ДДТ; 98%, артикул 386340), 2,4'-ДДТ (о,п'-ДДТ; аналитический стандарт, артикул 49018), эндосульфан (смесь а и в изомеров, аналитический стандарт, артикул 32015), эстрадиол, прогестерон (≥99%, SKU Р0130) и тестостерон (≥99%, SKU 86500) были приобретены у Sigma-Aldrich (США); трис(гидроксиметил)аминометан – трис (Медиген, Россия); Tris-HCI (Invitrogen, США); трис-ацетатный электродный (ТАЕ) буфер (50X) (Thermo Scientific, США); цитрат натрия (PanReac Applichem, Германия); лауроилсаркозинат натрия (Helicon, Россия); ацетат натрия (Helicon, Россия); PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США); этилендиаминтетрауксусная кислота – ЭДТА (Медиген, Россия); хлорид натрия (Медиген, Россия); дезоксихолат натрия (Amresco, Канада); Nonidet P-40 (Amresco, Канада); додецилсульфат натрия - SDS (Serva, Германия); глицерол (Helicon, Россия); бромфеноловый синий (Медиген, Россия); β-меркаптоэтанол (Helicon, Россия); глицин (Helicon, Россия); фосфатно-солевой буфер (PBS) в таблетках (Invitrogen, США); бычий сывороточный альбумин – BSA (Amresco, Канада); обезжиренное молоко (Bio-Rad Laboratories, США); ингибитор протеаз и фосфатаз в таблетках – Pierce Protease and Phosphatase Inhibitor Mini Tablets (Thermo Scientific, США); первичные моноклональные антитела анти-p53 DINP1 (каталожный номер ab202026, Abcam, США), анти-APAF1 (ab2001), анти-PTPRS (ab55640), анти-GAPDH (ab181602), козье антитело против IgG мыши (HRP) (ab97040; вторичное антитело) и козье антитело против IgG кролика (HRP) (ab97051; вторичное антитело); готовые трис-глициновые гели Novex Tris-Glycine (Invitrogen, США); набор PierceTM ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, США); бромистый этидий (Serva, Германия); набор для проведения обратной транскрипции по матрице РНК и микроРНК - ОТ-М-МuLV-RH (БиоЛабМикс, Россия); гуанидин тиоцианат (PanReac Applichem, Германия); набор реагентов для проведения ПЦР в реальном времени с флуоресцентными зондами для микроРНК – БиоМастер UDG HS-qPCR (2×) (БиоЛабМикс, Россия); набор реагентов для проведения ПЦР в реальном времени с SYBR Green I - БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue(2×) (БиоЛабМикс, Россия), TRIzol Reagent (Invitrogen, США); питательная среда IMDM с фенолом и без фенола (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Invitrogen, США); добавка GlutaMAX (Invitrogen, США); антибиотикиантимикотики (Invitrogen, США); среда DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium,

Invitrogen, США) эмбриональная телячья сыворотка FBS (HyClone, США); 2,5% трипсин (Thermo Scientific, США); диметилсульфоксид (ДМСО; Sigma-Aldrich, США)

2.1.2 Оборудование

Термостат СН-100 (BioSan, Латвия); рН-метр рН-150МИ (Измерительная техника, Россия); микроцентрифуга MiniSpin (Eppendorf, Германия); центрифуга многофункциональная 5425R (Eppendorf, Германия); спектрофотометр NanoPhotometer P-360 (Implen, Германия); амплификатор Т100 (Bio-Rad Laboratories, США); амплификатор СFX96 (Bio-Rad Laboratories, США); микроцентрифуга-вортекс микроспин fv-2400 (BioSan, Латвия); весы аналитические АХ124 (ОНАUS, США); камера для вертикального электрофореза Mini Gel Tank (Invitrogen, США); модуль для влажного переноса белков Mini Blot Module (Invitrogen, США); источник питания PowerPack HC (Bio-Rad Laboratories, США); камера для горизонтального электрофореза SE-1 (Helicon, Россия); система гель-документации ChemiDocTM XRS+ System (Bio-Rad Laboratories, США); бокс микробиологической безопасности класс II тип B2 БМБ-II–ЛАМИНАР-С1,2 (ЗАО "Ламинарные системы", Россия); инвертированный микроскоп EVOSTM XL Core Imaging System (Invitrogen, США), СО2-инкубатор МСО-5АС (Sanyo, Япония).

2.1.3 Растворы

В экспериментах использовали:

- -2x буфер Лэммли (4% SDS, 20% глицерол, 0,004% бромфеноловый синий, 0,125 М трис, pH=6,8);
- -лизирующий буфер RIPA (50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 0,5% дезоксихолат натрия, 0,1% SDS, ингибитор протеаз и фосфатаз);
- -буфер для электрофореза белков в полиакриламидном геле (25 мМ трис, 192 мМ глицин, 0,1% SDS, pH 8,3);
- -буфер для переноса белков на мембрану из поливинилиденфторида (PVDF) (12 мМ Трис, 96 мМ глицин, 20% этанол, pH 8,3);
- -буфер для нанесения проб РНК на агарозный гель (0,25% бромфеноловый синий, 30% глицерин).

2.1.4 Клеточные культуры

Линии клеток рака молочной железы MCF-7 и MDA-MB-231 были получены из Российской коллекции культур клеток (Санкт-Петербург). Клетки MCF-7 культивировали в

среде IMDM, с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки, 2 мМ L-аланил-L-глутамина, 250 мг/мл амфотерицина В и 100 ед./Мл пенициллина/стрептомицина. Клетки MDA-MB-231 выращивали в среде DMEM/F-12 с 10% FBS, 2 мМ L-аланил-L.-глутамин, 250 мг/мл амфотерицина В и 100 Ед/мл пе-нициллин/стрептомицин. Клетки поддерживали в инкубаторе с 5% CO2 при 37 °C и пассировали при 65–80% конфлюэнтности. Для проверки отсутствия контаминации микоплазмой были выполнены стандартные ПЦР-анализы.

2.1.5 Животные

В работе использовались половозрелые самки крыс Wistar, полученные из питомника Института Клинической Иммунологии (Новосибирск). Животные содержались группами по 4 особи в условиях естественного освещения, при свободном доступе к пище и воде.

Работа с экспериментальными животными проводилась в соответствии с приказом министерства Здравоохранения №755 от 12.08.77 и положениями Хельсинской декларации.

2.1.6 Образцы опухолей молочной железы

196 пар образцов тканей РМЖ и нормальных прилежащих тканей от пациенток, не получавших предоперационную фармакотерапию, было собрано в 2017–2020 гг. в Новосибирском городском бюджетном учреждении здравоохранения «Городская клиническая больница № 1» и Новосибирском областном онкологическом диспансере. Образцы тканей помещали в стабилизирующий раствор RNAlater (Invitrogen, USA) и хранили при -20 ° С до проведения экспериментов. Клинико-патологическая информация была получена путем изучения медицинских карт и отчетов о результатах иммуногистохимических анализов. Определяли следующие параметры: стадия N, стадия Т; Оценки ИГХ для ER, PR, HER2 и Кі-67 (Табл. 2).

Таблица 2. Основные характеристики исследуемых опухолей молочной железы

Характеристики		ER- и/или PR- позитивный (n = 156)	ER-и-PR-негативный (n = 40)
Возраст (среднее и диапазон, год)		61 (27–90)	55 (38–76)
N	N0	103	27
стадия N1		37	7

	N2	11	6
	N3	5	-
ER	0–2	3	40
оценка	3–5	7	-
одония	6–8	146	-
PR	0–2	25	40
оценка	3–5	34	-
5451114	6–8	97	-

Примечание: ER и PR оценивались по шкале Allred (Harvey et al., 1999)

2.2 Методы

2.2.1 Обработка клеток

За 48 ч до внесения гормонов питательную среду меняли на свободную от фенолового красного IMDM или DMEM/F-12. Изомеры ДДТ, эндосульфан, эстрадиол, прогестерон и тестостерон растворяли в ДМСО, а затем растворы разбавляли культуральной средой так, чтобы конечная концентрация ДМСО была 0.1% (v/v). В качестве контроля использовали клетки, обработанные 0.1% ДМСО. Клетки обрабатывали в течение 6,24 или 48 часов.

2.2.2 Обработка животных

Было исследовано влияние на экспрессию микроРНК хронического введения ДДТ в течение 3-х месяцев в разных дозах. ДДТ вводили крысам внутрибрющинно из расчета 10 и 50 мг/кг еженедельно. ДДТ растворяли в 0,5 мл растительного масла. Контрольным крысам вводили по 0,5 мл масла. Забой животных производили на 3-и сутки после последнего введения ксенобиотика.

2.2.3 Приготовление лизатов из клеток

Клетки промывали PBS, лизировали в 700 мкл буфера RIPA и затем инкубировали на льду в течение 30 мин. Лизаты очищали центрифугированием при 15000 g в течение 15 мин при температуре +4 °C. Концентрацию белка в лизатах определяли с помощью набора PierceTM BCA Protein Assay Kit, добавляя к 20 мкл разведённого в 10 раз образца белка раствор, содержащий реагенты A и B в соотношении 50:1. Ориентируясь на раствор с наименьшей концентрацией,

образцы разбавляли необходимым количеством воды для получения одинаковых концентраций белка в каждой пробе.

2.2.4 Вертикальный электрофорез белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях

Разделение белков проводили по методу Лэммли в денатурирующих условиях (Laemmli, 1970). Пробы, содержащие 50 мкл лизата, 50 мкл 2х буфера Лэммли, 5 мкл β-меркаптоэтанола, нагревали при 95 °C в течение 3-5 мин и затем наносили в «карманы» трис-глициновых гелей Novex (Invitrogen, США) из расчёта, чтобы в каждый «карман» попало 20 мкг белка. На гель также наносили маркер молекулярного веса белков. Электрофорез проводили в соответствующем буфере 100 мин при напряжении 125 В.

2.2.5 Влажный перенос белков на PVDF мембрану

После электрофоретического разделения белки переносили на PVDF мембрану, предварительно смоченную в этаноле. Мембрану с гелем помещали между прокладками из фильтровальной бумаги и спонжами, смоченными в буфере для переноса. Всю стопку помещали в модуль Mini Blot и после установки модуля в Mini Gel Tank доливали в него буфер для переноса. В Mini Gel Tank заливали деионизированную воду. Перенос осуществляли в соответствии с рекомендациями Invitrogen при напряжении 20 В в течение 60 мин.

2.2.6 Иммунохимический анализ белков

Для блокировки неспецифических связываний антител с мембраной мембрану инкубировали в течение часа в PBS буфере, содержащем 5% обезжиренного молока и 0,1% Tween 20. Мембрану отмывали PBS-T буфером три раза по 5 мин. В течение ночи инкубировали мембраны с первичными антителами в разведении, рекомендуемом производителем. На следующий день мембрану отмывали три раза по 5 мин PBS-T буфером и помещали в раствор коньюгата вторичных антител, меченных пероксидазой (1 мкл раствора антител на 10 мл H_2O), на 1 ч. Далее отмывали PBS-T буфером три раза по 5 мин. Визуализацию иммунореактивных полос проводили с использованием набора PierceTM ECL Western Blotting Substrate, смешивая по 3 мл каждого реагента. Инкубировали мембрану в полученном растворе в течение 3-5 мин.

Значения интенсивности полос были количественно определены в программном обеспечении GelQuant.NET, предоставленном biochemlabsolutions.com (версия 1.8.2). Значения

интенсивности полос исследуемых белков для каждого образца были отнормированы к соответствующим значениям для GAPDH.

2.2.7 Выделение микроРНК из тканей крыс и образцов опухолей

Примерно 50 мг ткани вносили в пробирку с 500 мкл лизирующего буфера (4 М гуанидин изотиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,3% лауроилсаркозинат натрия, 0,1% 2-меркаптоэтанол, 25 мМ ацетат натрия). Ткань в растворе тщательно перемешивали и на 10 мин оставляли в термостате при +65 °C. Затем раствор центрифугировали в течение 2 мин на 10 000 g. К полученному супернатанту добавляли раствор гликогена в качестве соосадителя, и соединяли супернатант с равным объемом изопропанола (~500 мкл), перемешивали, инкубировали 5 мин при комнатной температуре и центрифугировали 10 мин при 10000 g. Затем супернатант сливали, осадок промывали 500 мкл 70%-ного этанола и 300 мкл ацетона. Осадок сушили и растворяли в 100 мкл mQ-H2O.

2.2.8 Выделение тотальной РНК с использованием TRIzol Reagent

Для оценки количества исследуемых микроРНК и мРНК в культурах клеток, а также мРНК в образцах опухолей, из образцов и клеток была выделена тотальная РНК с использованием TRIzol Reagent. Для этого среду из лунок с клетками выливали, добавляли 1 мл PBS для промывания. PBS удаляли, в лунки добавляли 1 мл тризола, пипетировали. Переносили содержимое культуральных планшетов в пробирки на 1,5 мл. В случае с образцами тканей, гомогенизация проходила в жидком азоте, и измельчённые ткани добавляли в TRIzol Reagent. В пробирки, содержащие клетки или гомогенат в TRIzol Reagent, добавляли 200 мкл хлороформа, перемешивали встряхиванием 15 с. Пробирки инкубировали 2-3 мин при комнатной температуре. Центрифугировали образцы при 12000 g в течение 15 мин при +4 °C. Водную фазу, содержащую РНК, переносили в чистые пробирки. Добавляли 400-500 мкл изопропанола. Инкубировали образцы при -20 °C в течение 30 мин. Затем центрифугировали 15 мин при 12000 g (+4 °C). Супернатант удаляли. К осадку РНК для отмывки добавляли 1 мл 75% этанола. Затем пробирки центрифугировали 7 мин при 10000 g (+4 °C). Этанол отбирали. Высушивали осадок в термостате при +40 °C. РНК растворяли в 50 мкл стерильной воды. Выделенные образцы хранили в холодильнике на -70 °C.

2.2.9 Электрофорез РНК

Для проверки качества выделенной РНК проводили горизонтальный электрофорез.

Для приготовления 100 мл геля использовали 1,5 г агарозы, 100 мл 1хТАЕ и 5 мкл бромистого этидия. Смесь перемешивали и разогревали в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Выливали раствор в планшет, устанавливали гребёнки. Когда гель застывал, переносили его в камеру для электрофореза, заполненную 1хТАЕ. В лунки геля вводили по 2 мкл РНК в 5 мкл буфера для нанесения. Электрофорез проводили около 30 минут при напряжении 150 В.

2.2.10 Определение концентрации РНК

Для определения концентрации РНК в полученных растворах измеряли их оптическую плотность (A) на спектрофотометре NanoPhotometer P-360 при длинах волн 230, 260, 280 нм. О степени чистоты РНК от примесей белка судили по отношению поглощения растворов на длинах волн 260 и 280 нм. Приемлемым считали отношение A260:280 > 1,6. О чистоте РНК от органических соединений судили по отношению оптических плотностей на длинах волн 260 и 230 нм. Приемлемым считали отношение A260:230 > 1,8.

2.2.11 Реакция обратной транскрипции для микроРНК

Обратную транскрипцию (ОТ) для получения кДНК по матрице микроРНК проводили с использованием stem-loop-праймеров (Chen *et al.*, 2005). Использовали набор реагентов, полученный от компании БиоЛабМикс. Для каждого образца микроРНК готовили однократный раствор реагента ОТ-буфер-тіх объемом 10 мкл, содержащий 1 мкл микроРНК, 240 нМ соответствующего праймера и 50 ед. акт. фермента М-МиLV-RH ревертаза (100 ед. акт./мкл). Для ОТ использовали праймеры, которые приведены в таблице 3. Праймеры подбирались на основе зрелой последовательности исследуемой микроРНК, взятой из базы данных тіRВаse. К 3'-концу праймера для проведения реакции обратной транскрипции, имеющего шпилечную структуру, добавляли специфичную к зрелой микроРНК последовательность из 6-8 нуклеотидов.

Таблица 3. Последовательности праймеров для обратной транскрипции микроРНК

РНК	Последовательности праймеров
hsa-miR-23a-	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGAAATC-3'
3p	5-01commenced with resemble the resemble of th
hsa-miR-24-	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCTGTTCCT-3'
3p	5 Green Medicine and Green and Miledene Tourist Medice Tourist Teer-5

hsa-miR-27a-	St. CTCCCT LTCC LCTCC LCCCTCCC LCCCTCCC LCTCCC LTLCC LCTCCTC LCLCL
3p	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTGCTCACA-3'
hsa-miR-	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACCTAATA-3'
190a-5p	5-GICGIAICCAGIGCAGGGICCGAGGIAITCGCACIGGAIACGACACCIAAIA-5
hsa-miR-	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAACCCAA-3'
190b-5p	5-drediatecadideaddiatiedeaeiddataedaeaaceaa-5
rno-miR-190-	
5p	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACCTAATA-3'
rno-miR-	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGGAATA-3'
190a-3p	5 - GICGIATCCAGIGCAGGGTATTCGCACTGGATACGACAGGAATA-5
rno-miR-	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGAATG-3'
190b-3p	g Green meeting and a second of the recommendation of
hsa-miR-	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCCAACAA-3'
196a-5p	5 -GICGIAICCAGIGCAGGGICCGAGGIAITCGCACIGGAIACGACCCCAACAA-5
hsa-miR-21-	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAACATC-3'
5p	J-diculatecadiocadorecoadoralicocaciodaracoacicaacaic-s
hsa-miR-342-	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACGGGTG-3'
3p	3 Gredinicendidendedicednoon in redeneration in the second of the second
hsa-miR-	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCACATAG-3'
135a-5p	5 -GICGIAICCAGIGCAGGICCGAGGIAITCGCACIGGAIACGACICACAIAG-5
hsa-miR-365-	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACATAAGG-3'
3p	J GICGIMICCHGIGCHGGGIATICGCACTGGATACGACATAAGG-J
hsa-miR-19b-	5'- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAGTTT - 3'
3p	Green reconstruction of the second of a reconstruction of the second of
U44	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGTCAGT
U48	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAGACGGTCAG-3'

Обратную транскрипцию проводили на амплификаторе Т100. Протокол реакции: 50 мин на +42 °C, 10 мин на +70 °C. Полученные образцы кДНК убирали на -20 °C. Продукты реакции ОТ использовали для ПЦР в реальном времени.

2.2.12 Проведение ПЦР в режиме реального времени для определения уровней экспрессии микроРНК

Для определения количества микроРНК проводили ПЦР в реальном времени с использованием реагентов, полученных от компании БиоЛабМикс, на амплификаторе CFX96. Для нормировки были использованы малые ядерные РНК U_{44} , U_{48} . Олигонуклеотидные пробы, которые использовались в работе, приведены в таблице 4. Прямой и обратный праймеры, длиной \sim 18 нуклеотидов, а также последовательность зонда, были подобраны по принципу комплементарности к ожидаемому продукту реакции обратной транскрипции.

Таблица 4. Последовательности праймеров для ПЦР микроРНК

РНК	Праймер	Последовательности праймеров
hsa-miR-23a-3p	Прямой	5'-GCCGCATCACATTGCCAGG-3'
iisa-iiiik-23a-3p	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACGGAAATC-(BHQ1)-3'
hsa-miR-24-3p	Прямой	5'-GCCGCTGGCTCAGTTCAGC-3'
nsa-mix-24-3p	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACCTGTTCCT-(BHQ1)-3'
miR-190a-5p	Прямой	5'-GCCGCTGATATGTTTGATA-3'
IIIIX-190a-5р	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACACCTAATA-(BHQ1)-3'
hsa-miR-190b-5p	Прямой	5'-GCCGCTGATATGTTTGATA-3'
nsa-mix-1700-3p	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACAACCCAA-(BHQ1)-3'
rno-miR-190-5p	Прямой	5'-GCCGCTGATATGTTTGATA-3'
1110-1111К-190-3р	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACACCTAATA-(BHQ1)-3'
rno-miR-190a-3p	Прямой	5'-GCCGCACTATATATCAAGCA-3'
1110-1111K-130a-3p	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACAGGAATA-(BHQ1)-3'
rno-miR-190b-3p	Прямой	5'-GCCGCAACTAAATGTCAAA-3'
1110 Hill 1700 Sp	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACAGAATG-(BHQ1)-3'
hsa-miR-196a-5p	Прямой	5'-GCCGCCTAGGTAGTTTCATG-3'
nou mire 1500 Sp	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACCCCAACAA-(BHQ1)-3'
hsa-miR-27a-3p	Прямой	5'-GCCGCTTCACAGTGGCTAA-3'
1150 HIR 270 5p	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACGCGGAAC-(BHQ1)-3'
hsa-miR-21-5p	Прямой	5'-GCCGCTAGCTTATCAGACT-3'
115a-1111K-21-3p	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACTCAACATC-(BHQ1)-3'
hsa-miR-342-3p	Прямой	5'-GCCGCTCTCACACAGAAATCG-3'
115a-1111X-342-3p	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACACGGGTGC-(BHQ1)-3'

hsa-miR-135a-5p	Прямой	5'-GCGCGTATGGCTTTTTATTCCT-3'
and there is a specific property of the specif	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACTCACATAG-(BHQ1)-3'
hsa-miR-365-3p	Прямой	5'-AGGTAATGCCCCTAAAAATCC-3'
The same of the sa	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACATAAGG-(BHQ1)-3'
hsa-miR-19b-3p	Прямой	5'-GCCGTGTGCAAATCCATGCA-3'
and the system	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACTCAGTTT-(BHQ1)-3'
U44	Прямой	5'-GCCGCTCTTAATTAGCTCT-3'
	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACTGGATACGACAGTCAGTT-(BHQ1)-3'
	Прямой	5'-GAGTGATGACCCCAGGTAA-3'
U48	Зонд	5'-(R6G)-TTCGCACCAGAGCCAACGGTCAG-(BHQ1)-3'
	Обратный	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

Обратный праймер, комплементарный области «stem-loop» синтезированных кДНК, представлял собой 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTA-3' для всех РНК, кроме U48. Для каждой реакции готовили однократные растворы смеси БиоМастер UDG HS-qPCR объёмом 25 мкл, в которые входили 2,5 мкл раствора полученной кДНК, 1200 нМ прямого, 600 нМ обратного праймеров и 240 нМ зонда ТаqmМап. Протокол реакции ПЦР: предварительный прогрев 2 мин на +50 °C, 2 мин на +94 °C, после этого следовали 50 циклов: денатурация при +95 °C -15 с, отжиг при +60 °C -20 с, элонгация и сбор данных по флуоресценции при +72 °C -30 с.

В каждом эксперименте в одной плашке содержались образцы анализируемой кДНК с праймерами для исследуемой микроРНК и те же образцы с праймерами для референсной РНК (по 3 повтора для каждого случая). Кратность изменения каждой микроРНК рассчитывали с использованием метода порогового цикла $(2-\Delta\Delta Ct)$.

2.2.13 Реакция обратной транскрипции для мРНК

Для получения кДНК по матрице РНК использовали набор ОТ М-МuLV-RH (БиоЛабМикс). Для каждого образца РНК готовили водный раствор объёмом 12 мкл, содержащий 1 мкг РНК, 1,7 мкМ олиго-dT-праймеров и гексапраймеров. Данные растворы инкубировали 2-3 мин при +70 °C, затем ставили на лёд. Далее в каждый из них вносили 8 мкл раствора реагентов 5×ОТ-буфер, ДТТ, dNTP и фермента до следующих конечных концентраций: 1×ОТ-буфер, 10 мМ ДТТ, 0,5 мМ смеси dNTP, 5 ед.акт./мкл фермента М-МuLV-RH ревертаза. Инкубировали растворы 10 мин при +25 °C, затем 50 мин при +42 °C. Реакцию останавливали прогревом растворов при +70 °C в течение 10 мин.

2.2.14 Проведение ПЦР для определения уровней экспрессии мРНК

Для определения уровня экспрессии генов проводили ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue(2×) на амплификаторе CFX96. В качестве генов-нормализаторов были использованы гены *ANKRD17*, *SYMPK*. Праймеры, которые использовали в работе приведены в таблице 5. Концентрация всех пар праймеров в реакционной смеси составляла 300 нМ. Каждую реакцию ПЦР проводили в объеме 20 мкл. Использовали 0,3 мкл кДНК.

Таблица 5. Последовательности праймеров для ОТ-ПЦР в режиме реального времени мРНК

Ген	Праймер	Последовательности праймеров
ANKRD17	Прямой	5'-AATGTTGCCACCACTCTTCC-3'
ANKKDI	Обратный	5'-TGCAGCTGTGCATTCTTTC-3'
SYMPK	Прямой	5'-GCTGGAGAAGAAGAGGTG-3'
SIMIK	Обратный	5'-ACAGGTTGGTGGCTTTGATG-3'
BRCA1	Прямой	5'-GGCTATCCTCTCAGAGTGACATTT-3'
DRCAI	Обратный	5'-GCTTTATCAGGTTATGTTGCATGG-3'
CCND1	Прямой	5'-TGGTGAACAAGCTCAAGTGGAACC-3'
CCNDI	Обратный	5'-GTGAGGCGGTAGTAGGACAGGAAG-3'
PGR	Прямой	5'-GTGGGAGCTGTAAGGTCTTCTTTAA-3'
ION	Обратный	5'-AACGATGCAGTCATTTCTTCCA-3'
STC2	Прямой	5'-ATGCTACCTCAAGCACGACC-3'
5102	Обратный	5'-TCTGCTCACACTGAACCTGC-3'
VEGFA	Прямой	5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3'
VEOTA	Обратный	5'-GCAGTAGCTGCGCTGATAGA-3'
APAF1	Прямой	5'-AACCAGGATGGGTCACCATA-3'
AIAII	Обратный	5'-ACTGAAACCCAATGCACTCC-3'
TP53INP1	Прямой	5'-GCACCCTTCAGTCTTTTCCTGTT-3'
	Обратный	5'-GGAGAAAGCAGGAATCACTTGTATC-3'
PTPRS	Прямой	5'-TCAGAAGAGCGAGCCTACCT-3'
IIIKS	Обратный	5'-TCCTTGCGTTTACTGTCGGG-3'
BAX	Прямой	5'-GGACGAACTGGACAGTAACATGG-3'
DAA	Обратный	5'-GCAAAGTAGAAAAGGGCGACAAC-3'

PHLPP1	Прямой	5'-GACAAGACGCCAAGTCATCC-3'
	Обратный	5'-GTTCCAGGCTACAACACGAGA-3'
TRPS1	Прямой	5'-GTATCCTGCATCGGGAGAAA-3'
	Обратный	5'-AGCTTCTGGTAGAGGCCACA-3'
XIAP	Прямой	5'-TGGCAGATTATGAAGCACGGATC-3'
	Обратный	5'-AGTTAGCCCTCCTCCACAGTGA-3'
PTEN	Прямой	5'-GTTTACCGGCAGCATCAAAT-3'
2.22,	Обратный	5'-CCCCCACTTTAGTGCACAGT-3'

Протокол реакции: предварительный прогрев при 95 °C - 5 мин, после этого следовали 40 основных циклов: денатурация при +95 °C - 15 с, отжиг при +60 °C - 20 с, элонгация и сбор данных по флуоресценции при +72 °C - 30 с. Для контроля специфичности ПЦР использовали кривые плавления. Относительный уровень экспрессии генов оценивали с использованием значений пороговых циклов Сt по методу 2- $\Delta\Delta$ Ct. Для контроля качества продуктов ПЦР проводили электрофорез в 3% агарозном геле.

2.2.15 Биоинформатический анализ

Ранее был опубликован список микроРНК, содержащих сайты связывания ЕR в своих промоторных областях (Ovchinnikov et al., 2018). Чтобы проверить, есть ли в промоторных областях этих микроРНК последовательности, соответствующие сайтам связывания AR или PR, предполагаемые промоторные области микроРНК были извлечены из генома человека (hg38) на 10000 нуклеотидов выше от начала последовательности микроРНК-предшественника в соответствии с MirGeneDB (Fromm et al., 2015). Сайты связывания AR и PR искали в этих областях с использованием матриц позиционных весов (MA0007.2, MA0113.3) из Jaspar (Mathelier et al., 2016) (последовательности сайтов связывания для этих рецепторов одинаковы) с использованием Віоstrings (R Віосопфисто раскаде). В промоторных областях микроРНК крысы поиск осуществлялся с помощью матриц MA0007.1 и MA0113.1. Предполагаемые промоторные области были извлечены из генома крысы (Rnor_6.0), в 10000 нуклеотидов вверх от начала последовательности предшественника микроРНК в соответствии с miRBase v21 (Коzomara and Griffiths-Jones, 2011).

Ресурсы targetscan.org (McGeary *et al.*, 2019) и mirDIP (Tokar *et al.*, 2018) были использованы для прогнозирования мишеней микроРНК.

2.3 Статистическая обработка данных

Программное обеспечение STATISTICA (версия 12; TIBCO Software Inc., США) использовалось для статистического анализа данных и построения графиков. Данные представлены в виде средних значений (при оценке экспрессии в клетках и тканях крыс) и медианных значений (при оценке уровня экспрессии в опухолях). Для проверки нормальности данных использовали критерий Шапиро-Уилка. Для анализа результатов экспериментов *in vitro* и *in vivo* группы сравнивали с помощью непарного двустороннего критерия Стьюдента. Поскольку в некоторых группах образцов опухолей распределение не было нормальным, статистический анализ проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Данные с p < 0.05 считались статистически значимыми.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

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

Как известно, хлорорганические пестициды ДДТ и эндосульфан обладают эстрогенным действием и могут проявлять антагонистические эффекты по отношению к андрогеновому и прогестероновому рецепторам. Следовательно, можно ожидать, что под действием пестицидов будет меняться экспрессия генов-мишеней рецепторов ER, PR, AR. При этом многие гены являются мишенями одновременно для эстрогена, прогестерона и/или андрогена. Таким образом, при исследовании эстрогенных свойств ДДТ и эндосульфана важно учитывать также возможное влияние на мишени, опосредованное антиандрогенными и антипрогестеронными свойствами пестицидов. 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.

3.1.1 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 известных мишеней эстрогена, обладающих высокой экспрессией в клетках МСГ-7. Для оценки влияния гормонов на выбранные гены клетки обрабатывали в течение 6, 24 и 48 ч соединениями в дозах 10 нМ или 100 нМ. Далее исследовался уровень мРНК генов *BRCA1*, *CCND1*, *PGR*, *STC2*, *VEGFA* в обработанных клетках. Имеющиеся опубликованные данные о влиянии половых гормонов на экспрессию этих генов представлены в таблице 6.

Таблица 6. Опубликованные ранее данные о влиянии половых гормонов на экспрессию некоторых генов-мишеней ER.

Ген	Выявленное изменение	Клеточная	Условия	Ссылка
		культура	эксперимента	
BRCA1	Увеличение уровня мРНК	MCF-7	10 нМ Е2; 24, 48, 72 и	Romagnolo
	после инкубации клеток с		144 ч.	et al., 1998.
	Е2 в течение 72 ч.			

1996. 199		Увеличение уровня мРНК	MCF-7	10 нМ Е2; 24 и 48 ч	Rangel et al.,
Уровень мРНК спижался через 24 и 48 ч инкубации с 100 мкМ Р4. МСF-7 100 мкМ, 100 пкМ Р4; Ansquer et al., 2005. ССNDI Уровень белка увеличивался после 6 и 12 ч инкубащии с Е2. МСF-7 10 пМ Е2; Foster and Wimalasena, 1996. R5020 (агопист РR) активировал экспрессию ССNDI. МСF-7 50 пМ R5020; 2 ч. Сicatiello et al., 2004. ССNDI. Спижение уровия мРНК и белка после 48 и 72 ч инкубации. МСF-7 100 пМ ДГТ; 24, 48 и Lanzino et al., 2010. Увеличение уровия мРНК через 24 и 48 ч инкубации с E2. МСF-7 10 пМ E2; 24 и 48 ч Rangel et al., 2017. Увеличение уровия мРНК после инкубации с 10 мкМ R5020 в течение 24 ч. МСF-7 R5020, 10 пМ, 100 пМ, Diep et al., 1 мкМ и 10 мкМ, 24 ч инкубации. 2016. STC2 Увеличение уровия мРНК под действием Е2 и Р4 в Т-47D МСF-7 1 мкМ Е2 или Р4; инкубации. Raulic et al., 3, 24 ч для МСF-7 и в течение 1, 3, 8, 24, 48 и м течение 1, 3, 8, 24, 48 и		через 24 и 48 ч инкубации с		инкубации.	2017.
через 24 и 48 ч инкубации с 100 мкМ Р4. 24 и 48 ч инкубации. 26 и 29 инкубации с 22. 27 инкубации с 22. 28 и 24 ч. 29 инкубации с 22. 28 инкубации с 22. 28 инкубации с 23. 28 инкубации с 24 и 24 ч. 2004. 27 инкубации с 25 инкубации с 26 инкубации. 27 инкубации. 27 инкубации. 28 инкуб		E2.			
100 мкМ Р4. CCND1 Уровень белка увеличивался после 6 и 12 ч инкубации с E2. R5020 (агопист PR) MCF-7 50 пМ R5020; 2 ч. Cicatiello et al., 2004. CCND1. CHижение уровня мРНК и белка после 48 и 72 ч инкубации. MCF-7 100 нМ ДГТ; 24, 48 и Lanzino et 72 ч инкубации. Al., 2010. CCND1. CHижение уровня мРНК иерез 24 и 48 ч инкубации с E2. Vвеличение уровня мРНК после инкубации с 10 мкМ R5020 в течение 24 ч. STC2 Увеличение уровня мРНК под действием E2 и P4 в Т-47D клетках через 24 ч. B клетках мСF-7 уровень мРНК увеличивался только в ответ на E2 через 3 ч инкубации. VEGFA Vвеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Vвеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VSEЛичение уковня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Vвеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VSEЛичение укспрессии CCWR22Rv1 5 пМ R1881; 48 ч Eisermann et al., 2003. CCWR22Rv1 5 пМ R1881; 48 ч Eiser		Уровень мРНК снижался	MCF-7	100 мкМ, 100 пкМ Р4;	Ansquer et
ССND1 Уровень увеличивался после 6 и 12 ч инкубации с Е2. МСF-7 10 им Е2; они К 50 гм м 50 гм м 50 гм м 6, 12 и ч м 1996. Бозго (агонист РR) м 1996. МСF-7 гм гивировал экспрессию ССND1. 50 им к 5020; 2 ч. они к 50 гм м 70 гм гивировал экспрессию ССND1. Ссижсние уровия мРНК и белка после 48 и 72 ч инкубации. МСF-7 гм гивировации. 100 им ДГТ; 24, 48 и гм		через 24 и 48 ч инкубации с		24 и 48 ч инкубации.	al., 2005.
увеличивался после 6 и 12 ч инкубации с E2. R5020 (агонист PR) МСF-7		100 мкМ Р4.			
инкубации с Е2. R5020 (агонист PR) MCF-7 50 нМ R5020; 2 ч. Cicatiello et al., 2004. ССКОВ ССКОВ . ССКОВ . ССКОВ . МСБ-7 100 нМ ДГТ; 24, 48 и Lanzino et al., 2010. ССКОВ . ССКОВ . 100 нМ ДГТ; 24, 48 и Lanzino et al., 2010. Увеличение уровня мРНК через 24 и 48 ч инкубации с инкубации. МСБ-7 10 нМ Е2; 24 и 48 ч Rangel et al., 2017. Увеличение уровня мРНК после инкубации с 10 мкМ R5020 в течение 24 ч. МСБ-7 R5020, 10 нМ, 100 нМ, 1	CCND1	Уровень белка	MCF-7	10 нМ E2;	Foster and
R5020 (агонист PR) активировал экспрессию ZR-75-1. S0 нМ R5020; 2 ч. Cicatiello et al., 2004.		увеличивался после 6 и 12 ч		6, 12 и 24 ч.	Wimalasena,
активировал экспрессию ССND1. Снижение уровня мРНК и белка после 48 и 72 ч инкубации. РGR Увеличение уровня мРНК через 24 и 48 ч инкубации с Е2. Увеличение уровня мРНК после инкубации с 10 мкМ R5020 в течение 24 ч. STC2 Увеличение уровня мРНК под действием Е2 и Р4 в Т-47D клетках через 24 ч. В клетках мСF-7 уровень мРНК увеличивался только в ответ на E2 через 3 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. WEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. WEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. WEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК инкубации.		инкубации с Е2.			1996.
ССND1. Снижение уровня мРНК и белка после 48 и 72 ч инкубации. РGR Увеличение уровня мРНК мсF-7 10 нМ E2; 24 и 48 ч каngel et al., 2010. РGR Увеличение уровня мРНК через 24 и 48 ч инкубации с E2. Увеличение уровня мРНК после инкубации с 10 мкМ клосле инкубации. ВТС2 Увеличение уровня мРНК под действием E2 и P4 в Т-47D инкубации в течение 1, 2008. В клетках мсF-7 уровень мРНК увеличивался только в ответ на E2 через 3 ч инкубации. В клетках мсF-7 уровень мРНК увеличение уровня мРНК мсF-7 10 нМ E2; 2, 6, и 24 ч клета микубации. В клетках мсБ-7 инкубации. В клетках мсБ-7 инкубации. В клетках мсБ-7 уровень мРНК увеличение уровня мРНК мсБ-7 10 нМ E2; 2, 6, и 24 ч клета микубации. В клета мсБ-7 инкубации. В клета после инкубации.		R5020 (агонист PR)	MCF-7	50 нМ R5020; 2 ч.	Cicatiello et
Снижение уровня мРНК и белка после 48 и 72 ч инкубации. РСЯ Увеличение уровня мРНК мСF-7 То нМ Е2; 24 и 48 ч пикубации. В течение 24 ч. То нМ Е2 или Р4; после инкубации с 10 мкМ кбодии. В течение уровня мРНК мСF-7 То нМ Е2 или Р4; под действием Е2 и Р4 в Т-47D В клетках мСF-7 уровень мРНК увеличивался только в ответ на Е2 через 3 ч инкубации. В течение уровня мРНК мСF-7 То нМ Е2 или Р4; под действием Е2 и Р4 в Т-47D В клетках мСF-7 уровень мРНК увеличивался только в ответ на Е2 через 3 ч инкубации. В течение 1, 3, 8, 24, 48 и 72 ч для Т-47D. В клетках мСF-7 уровень мРНК увеличение уровня мРНК мСF-7 В клетках мСF-7 уровень мРНК увеличение уровня мРНК мСF-7 В клетках мСF-7 уровень мРНК увеличение уровня мРНК мСF-7 В течение 1, 3, 8, 24, 48 и 72 ч для Т-47D. В течение 1, 3, 8, 24, 48 и 72 ч для Т-47D. В ответ на Е2 через 3 ч инкубации. В течение 1, 3, 8, 24, 48 и 72 ч для Т-47D.		активировал экспрессию	ZR-75-1.		al., 2004.
белка после 48 и 72 ч инкубации. РGR Увеличение уровня мРНК через 24 и 48 ч инкубации с Е2. Увеличение уровня мРНК после инкубации с 10 мкМ R5020 в течение 24 ч. STC2 Увеличение уровня мРНК под действием Е2 и Р4 в Т-47D инкубации. В клетках через 24 ч. В клетках через 24 ч. В клетках мСF-7 уровень мРНК увеличивался только в ответ на Е2 через 3 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК мСF-7 после 2 и 24 ч инкубации. Темпод действием Е2 и Р4 м Т-47D инкубация в течение 1, 3, 8, 24, 48 и 72 ч для Т-47D. Темпод действием Е2 через 3 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК мСF-7 после 2 и 24 ч инкубации. Темпод действием Е2 через 3 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК мСF-7 после 2 и 24 ч инкубации. Темпод действием Е2 через 3 ч инкубации. Темпод действием Е2 через 4 ч действием действи		CCND1.			
ИНКУбации. РGR Увеличение уровня мРНК через 24 и 48 ч инкубации с Е2. МСБ-7 10 нМ Е2; 24 и 48 ч Rangel et al., 2017. Е2. Увеличение уровня мРНК после инкубации с 10 мкМ R5020 в течение 24 ч. МСБ-7 R5020, 10 нМ, 100 нМ, 24 ч 2016. 2016. STC2 Увеличение уровня мРНК под действием Е2 и Р4 в Т-47D 1 мкМ Е2 или Р4; под действием Е2 и Р4 в Т-47D 2008. 47D клетках через 24 ч. В клетках МСБ-7 уровень мРНК увеличивался только в ответ на Е2 через 3 ч инкубации. Течение 1, 3, 8, 24, 48 и 72 ч для Т-47D. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. МСБ-7 10 нМ Е2; 2, 6, и 24 ч Sengupta et инкубации. VEGFA Увеличение экспрессии СWR22Rv1 5 нМ R1881; 48 ч Eisermann et		Снижение уровня мРНК и	MCF-7	100 нМ ДГТ; 24, 48 и	Lanzino et
РGR Увеличение уровня мРНК через 24 и 48 ч инкубации с Е2. ПО нМ Е2; 24 и 48 ч Rangel et al Увеличение уровня мРНК после инкубации с 10 мкМ R5020 в течение 24 ч. МСF-7 R5020, 10 нМ, 100 нМ, 100 нМ, 100 нМ, 24 ч инкубации. 2016. STC2 Увеличение уровня мРНК под действием Е2 и Р4 в Т-47D инкубация в течение 1, 3, 24 ч для МСF-7 и в в клетках мСF-7 уровень мРНК увеличивался только в ответ на E2 через 3 ч инкубации. 3, 24 ч для МСF-7 и в течение 1, 3, 8, 24, 48 и 72 ч для Т-47D. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. МСF-7 инкубации. 10 нМ Е2; 2, 6, и 24 ч микубации. Sengupta et инкубации. VEGFA Увеличение экспрессии СWR22Rv1 5 нМ R1881; 48 ч Eisermann et 10 нМ R1881; 48 ч Eisermann et		белка после 48 и 72 ч		72 ч инкубации.	al., 2010.
через 24 и 48 ч инкубации с Е2. Увеличение уровня мРНК после инкубации с 10 мкМ R5020 в течение 24 ч. Увеличение уровня мРНК под действием Е2 и Р4 в Т-47D инкубация в течение 1, 2008. В клетках через 24 ч. В клетках мСF-7 уровень мРНК увеличивался только в ответ на Е2 через 3 ч инкубации. УЕGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. МСF-7 после 2 и 24 ч инкубации. МСF-7 после 2 и 24 ч инкубации. ИЕGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. МСF-7 после 2 и 24 ч инкубации. ИЕGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. ИНКУбации. ИНКУбации. ИНКУбации. 2017. 1 мкМ и 10 мкМ, 24 ч инкубации. 1 мкМ E2 или Р4; Raulic et al., инкубация в течение 1, 3, 8, 24, 48 и 72 ч для Т-47D.		инкубации.			
E2. Увеличение уровня мРНК после инкубации с 10 мкМ R5020 в течение 24 ч. МСF-7 покм и 10 мкм, 24 ч инкубации. После инкубации с 10 мкм и 10 мкм, 24 ч инкубации. Отвер et al., 2016. STC2 Увеличение уровня мРНК под действием E2 и P4 в Т-47D инкубация в течение 1, 47D клетках через 24 ч. В клетках МСF-7 уровень мРНК увеличивался только в ответ на E2 через 3 ч инкубации. Течение 1, 3, 8, 24, 48 и 72 ч для Т-47D. Течение 1, 3, 8, 24, 48 и 72 ч для Т-47D. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. МСF-7 инкубации. 10 нМ E2; 2, 6, и 24 ч ментубации. Sengupta et инкубации. Увеличение экспрессии СWR22Rv1 5 нМ R1881; 48 ч Eisermann et	PGR	Увеличение уровня мРНК	MCF-7	10 нМ Е2; 24 и 48 ч	Rangel et al.,
Увеличение уровня мРНК после инкубации с 10 мкМ R5020 в течение 24 ч. МСБ-7 после инкубации. R5020, 10 нМ, 100 нМ, 100 нМ, 24 ч 2016. Diep et al., 2016. STC2 Увеличение уровня мРНК под действием E2 и P4 в T-47D инкубация в течение 1, 47D клетках через 24 ч. В клетках МСБ-7 уровень мРНК увеличивался только в ответ на E2 через 3 ч инкубации. Т-47D инкубация в течение 1, 3, 8, 24, 48 и 72 ч для Т-47D. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. МСБ-7 инм E2; 2, 6, и 24 ч Sengupta et инкубации. VEGFA Увеличение экспрессии СWR22Rv1 5 нМ R1881; 48 ч Eisermann et		через 24 и 48 ч инкубации с		инкубации.	2017.
после инкубации с 10 мкМ R5020 в течение 24 ч. STC2 Увеличение уровня мРНК под действием E2 и P4 в T-47D инкубация в течение 1, 2008. 47D клетках через 24 ч. В клетках МСF-7 уровень мРНК увеличивался только в ответ на E2 через 3 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК МСF-7 после 2 и 24 ч инкубации. МСF-7 после 2 и 24 ч инкубации. МСF-7 после 2 и 24 ч инкубации. ПОСТВЕТА Увеличение уровня мРНК мСF-7 после 2 и 24 ч инкубации. ПОСТВЕТА Увеличение уровня мРНК мСF-7 после 2 и 24 ч инкубации. ПОСТВЕТА Увеличение уровня мРНК мСF-7 после 2 и 24 ч инкубации. МСF-7 после 2 и 24 ч инкубации. ПОСТВЕТА Увеличение уровня мРНК мСF-7 после 2 и 24 ч инкубации. ПОСТВЕТА Увеличение уровня мРНК мСF-7 после 2 и 24 ч инкубации. ПОСТВЕТА Увеличение уровня мРНК инкубации. ПОСТВЕТА Увеличение уровня инкубации. ПОСТВЕТА Увеличение уровня мРНК инкубации. ПОСТВЕТА Увеличение уровня инкубац		E2.			
R5020 в течение 24 ч. инкубации.		Увеличение уровня мРНК	MCF-7	R5020, 10 нМ, 100 нМ,	Diep et al.,
STC2 Увеличение уровня мРНК под действием Е2 и Р4 в Т-47D 1 мкМ Е2 или Р4; инкубация в течение 1, 2008. Raulic et al., 2008. 47D клетках через 24 ч. В клетках МСБ-7 уровень мРНК увеличивался только в ответ на Е2 через 3 ч инкубации. Течение 1, 3, 8, 24, 48 и 72 ч для Т-47D. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. МСБ-7 ив течение 1, 3, 8, 24, 48 и 72 ч для Т-47D. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. МСБ-7 инкубации. Увеличение экспрессии СWR22Rv1 5 нМ R1881; 48 ч Eisermann et		после инкубации с 10 мкМ		1 мкМ и 10 мкМ, 24 ч	2016.
под действием Е2 и Р4 в Т- 47D инкубация в течение 1, 2008. 47D клетках через 24 ч. В клетках МСБ-7 уровень мРНК увеличивался только в ответ на Е2 через 3 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК мСБ-7 после 2 и 24 ч инкубации. Увеличение экспрессии СWR22Rv1 5 нМ R1881; 48 ч Eisermann et		R5020 в течение 24 ч.		инкубации.	
47D клетках через 24 ч. 3, 24 ч для МСБ-7 и в В клетках МСБ-7 уровень мРНК увеличивался только в ответ на E2 через 3 ч инкубации. 72 ч для Т-47D. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. МСБ-7 и в течение 1, 3, 8, 24, 48 и 72 ч для Т-47D. 10 нМ E2; 2, 6, и 24 ч мнкубации. 3, 24 ч для МСБ-7 и в течение 1, 3, 8, 24, 48 и 72 ч для Т-47D. 10 нМ E2; 2, 6, и 24 ч мнкубации. 3, 24 ч для МСБ-7 и в течение 1, 3, 8, 24, 48 и 72 ч для Т-47D. 10 нМ E2; 2, 6, и 24 ч мнкубации. 41, 2003. 10 нМ E2; 2, 6, и 24 ч мнкубации. 48 ч бізегтапп ет 10 нМ E2; 2, 6, и 24 ч мнкубации. 48 ч бізегтапп ет	STC2	Увеличение уровня мРНК	MCF-7	1 мкM E2 или P4;	Raulic et al.,
В клетках МСГ-7 уровень мРНК увеличивался только в ответ на E2 через 3 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. Увеличение экспрессии CWR22Rv1 5 нМ R1881; 48 ч Eisermann et		под действием Е2 и Р4 в Т-	T-47D	инкубация в течение 1,	2008.
мРНК увеличивался только в ответ на E2 через 3 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК мСF-7 после 2 и 24 ч инкубации. Увеличение экспрессии CWR22Rv1 5 нМ R1881; 48 ч Eisermann et		47D клетках через 24 ч.		3, 24 ч для МСГ-7 и в	
в ответ на E2 через 3 ч инкубации. VEGFA Увеличение уровня мРНК мСF-7 10 нм E2; 2, 6, и 24 ч Sengupta et после 2 и 24 ч инкубации. Увеличение экспрессии CWR22Rv1 5 нм R1881; 48 ч Eisermann et		В клетках МСГ-7 уровень		течение 1, 3, 8, 24, 48 и	
VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. MCF-7 инкубации. 10 нМ Е2; 2, 6, и 24 ч Sengupta et инкубации. Sengupta et инкубации. al., 2003. Увеличение экспрессии CWR22Rv1 5 нМ R1881; 48 ч Eisermann et		мРНК увеличивался только		72 ч для T-47D.	
VEGFA Увеличение уровня мРНК после 2 и 24 ч инкубации. МСF-7 10 нМ Е2; 2, 6, и 24 ч Sengupta et инкубации. Sengupta et al., 2003. Увеличение экспрессии СWR22Rv1 5 нМ R1881; 48 ч Eisermann et		в ответ на Е2 через 3 ч			
после 2 и 24 ч инкубации. инкубации. <i>al.</i> , 2003. Увеличение экспрессии CWR22Rv1 5 нМ R1881; 48 ч Eisermann <i>et</i>		инкубации.			
Увеличение экспрессии CWR22Rv1 5 нМ R1881; 48 ч Eisermann et	VEGFA	Увеличение уровня мРНК	MCF-7	10 нМ Е2; 2, 6, и 24 ч	Sengupta et
		после 2 и 24 ч инкубации.		инкубации.	al., 2003.
VEGFA под влиянием LNCaP инкубации. al., 2013.		Увеличение экспрессии	CWR22Rv1	5 нМ R1881; 48 ч	Eisermann et
		VEGFA под влиянием	LNCaP	инкубации.	al., 2013.
R1881 (агонист AR).		R1881 (агонист AR).			

мРНК уровень не	MCF-7	1, 0,1, и 0,01 мкМ Е2; 4,	Mirkin et al.,
изменялся под влиянием		12, 24, и 48 ч	2006.
E2.		инкубации.	
Увеличение уровня мРНК	T47-D	1, 0,1, и 0,01 мкМ Р4,	
под действием		медроксипрогестерона	
прогестерона.		ацетат; 24 ч инкубации.	

Примечание: Е2=эстрадиол; Р4=прогестерон; ДГТ=дигидротестостерон.

В рамках диссертационного исследования было подтверждено увеличение экспрессии всех выбранных мишеней ER в клетках, обработанных эстрадиолом (Таблица 7). 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 экспрессию данных мишеней. 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).

Таблица 7. Относительные уровни мРНК мишеней эстрогена в клетках МСГ-7, обработанных эстрадиолом, тестостероном или прогестероном.

Ген	Время	Эстрадиол		Тесто	стерон	Проге	стерон
		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
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.

Наиболее значительными были изменения в экспрессии PGR. Так, в первые часы инкубации с высокими дозами эстрадиола и тестостерона уровень мРНК гена *PGR*, кодирующего PR, увеличивался примерно в 3 раза.

3.1.2 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 ERрегулируемых *CCND1*, *VEGFA*, *STC2* (Таблица 8). Уровень мРНК *VEGFA* в том числе увеличивался под действием п,п'-ДДТ и эндосульфана в 1,3 раза.

Таблица 8. Относительные уровни мРНК мишеней эстрогена в клетках МСГ-7, обработанных о,п'-ДДТ, п,п'-ДДТ или эндосульфаном.

Ген		о,п'-,	ДДТ	п,п′-	ддт	Эндосу.	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.

Выявленное увеличение экспрессии *STC2* и *VEGFA* под действием пестицидов также может быть следствием антиандрогенных и антипрогестеронных свойств этих соединений (Рисунки 10 и 11).

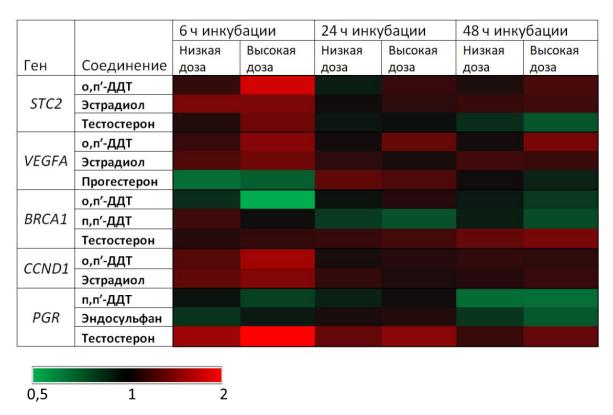
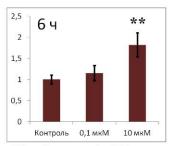


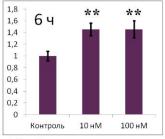
Рисунок 10. Относительные уровни мРНК генов STC2, VEGFA, BRCA1, CCND1, PGR в клетках МСF-7, обработанных гормонами или пестицидами, изменения которых по сравнению с уровнями мРНК в контрольных клетках (обработанных ДМСО) потенциально обусловлены действием соединений на ER, AR или PR. Красный цвет показывает высокое значение экспрессии гена (отношение количества РНК в клетках, обработанных соединениями, к количеству РНК в контрольных клетках = 2), а зелёный цвет – низкое значение экспрессии (отношение количеств РНК = 0,5).

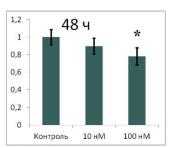
Уровень мРНК известного опухолевого супрессора *BRCA1* снижался под действием о,п'-ДДТ и п,п'-ДДТ в 2 и в 1,3 раза соответсвенно (Рисунки 10 и 11). Также снижалась экспрессия

другого эстроген- и андроген-регулируемого гена – PGR – после инкубации клеток с п,п'-ДДТ и эндосульфаном (Рисунок 10).

Относительный уровень мРНК гена STC2





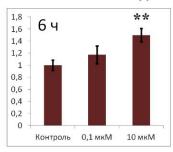


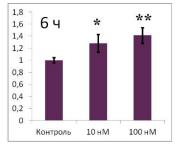
Обработка о,п'-ДДТ

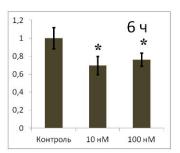
Обработка эстрадиолом

Обработка тестостероном

Относительный уровень мРНК гена VEGFA





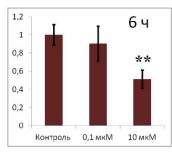


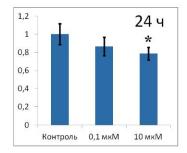
Обработка о,п'-ДДТ

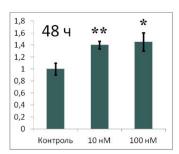
Обработка эстрадиолом

Обработка прогестероном

Относительный уровень мРНК гена BRCA1







Обработка о,п'-ДДТ

Обработка п,п'-ДДТ

Обработка тестостероном

Рисунок 11. Относительные уровни мРНК *STC2*, *VEGFA*, *BRCA1* в клетках МСF-7, обработанных гормонами и изомерами ДДТ. По оси Y показано отношение количества РНК в клетках, обработанных соединениями, к количеству РНК в клетках, обработанных ДМСО. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение (n = 3). *статистическая значимость различий по сравнению с контролем, p < 0.05; **p < 0.01.

Таким образом, выявлены изменения в экспрессии *BRCA1*, *CCND1*, *PGR*, *STC2*, *VEGFA* в ER-, PR-позитивных клетках молочной железы под действием изомеров ДДТ и изменения в экспрессии *PGR* и *VEGFA* под действием эндосульфана, которые вероятно связаны с гормон-подобными свойствами пестицидов.

3.1.3 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*, *PGR*, *STC2*, *VEGFA* связаны с действием пестицидов на рецепторы половых гормонов, был проведён аналогичный эксперимент с использованием культуры клеток MDA-MB-231, не экспрессирующей ER, PR и AR.

Было обнаружно, что экспрессия генов *CCND1* и *VEGFA*, количество мРНК которых росло в клетках MCF-7 после инкубации с пестицидами, не увеличивается в MDA-MB-231 клетках, обработанных соединениями (Таблица 9). Уровень мРНК *STC2* снижался в клетках после инкубации с о,п'-ДДТ и п,п'-ДДТ, что также не совпадало с изменениями, выявленными в эксперименте с MCF-7.

Таблица 9. Относительные уровни мРНК мишеней эстрогена в клетках MDA-MB-231, обработанных о,п'-ДДТ, п,п'-ДДТ или эндосульфаном.

Ген		о,п'-,	ДДТ	п,п'-,	ДДТ	Эндосу.	Эндосульфан	
		0,1 мкМ	10 мкМ	0,1 мкМ	10 мкМ	0,1 мкМ	1 мкМ	
BRCA1	6 ч	0,89	0,87	0,95	0,88	1,02	0,95	
	24 ч	0,97	0,89	1,05	1,04	0,91	0,97	
	48 ч	0,91	0,89	0,97	1,02	1,10	0,99	
CCND1	6 ч	0,96	0,96	0,98	0,87	0,99	1,04	
	24 ч	1,05	1,01	1,00	0,95	0,98	1,09	
	48 ч	1,02	0,91	1,07	1,09	0,85	0,76*	
STC2	6 ч	1,07	0,87	0,98	0,84	1,05	0,93	
	24 ч	0,91	0,80	0,89	0,86	0,97	0,95	
	48 ч	0,92	0,78*	0,81	0,62**	1,22	1,53*	
VEGFA	6 ч	0,98	0,93	1,01	0,90	1,11	1,00	
	24 ч	0,90	0,84	0,96	0,90	0,99	0,80	
	48 ч	1,03	1,05	0,97	1,08	1,09	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.

Наблюдалась тенденция к снижению экспрессии BRCA1 в клетках, обработанных о,п'-ДДТ, однако достоверных изменений, которые наблюдались в клетках MCF-7, выявлено не было.

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.

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

3.2.1 Отбор микроРНК

Значительную роль в канцерогенезе играют микроРНК. Экспрессия многих микроРНК может напрямую контролироваться ER. Для исследования эффектов ХОП 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. Информация о выбранных микроРНК представлена в таблице 10.

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, и miR-19b, для которой также с помощью ChIP-анализа была ранее продемонстрирована регуляция с помощью ER.

Таблица 10. МикроРНК, в промоторных областях которых содержатся сайты связывания ER, их роль в канцерогенезе молочной железы.

МикроРНК	Роль в канцерогенезе	Информация о наличии	Информация о
		сайтов связывания ESR1	наличии сайтов
		или ESR2* согласно	связывания ESR1
		Ovchinnikov et al., 2018	согласно базе данных
			Harmonizome
hsa-mir-135a-	Сообщалось о ингибирующем действии микроРНК на	Связывание происходит в	_
2	пролиферацию, миграцию и инвазию клеток MDA-MB-468 и MCF-7	клетках эндометрия и в	
	(Ahmad et al., 2018; Jiang et al., 2019). Напротив, другое исследование	клетках молочной железы.	
	показало, что miR-135a может усиливать миграцию и инвазию		
	клеток РМЖ BT549, SKBr3 и MDA-MB-231 (Chen et al., 2012).		
	Для miR-135a-1, совпадающей по последовательности с miR-135a-2,		
	ранее было продемонстрировано, что её экспрессия регулируется		
	ERα (Zhang et al., 2018).		
hsa-mir-342	Экспрессия в образцах РМЖ коррелирует с экспрессией ERα (He et	Связывание происходит в	_
	al., 2013).	клетках молочной железы.	
	Повышенная экспрессия микроРНК значительно снижала		
	пролиферацию, жизнеспособность и скорость миграции клеток		
	трижды-негативного РМЖ (Romero-Cordoba et al., 2018).		
hsa-mir-365b	Функционирует как онкоген, стимулируя пролиферацию и миграцию	Связывание происходит в	Связывание
	клеток (Li et al., 2015). В другом исследовании для miR-365 были	клетках молочной железы.	происходит в клетках
	показалы опухоль-супрессирующие функции при РМЖ (Zhang et al.,		молочной железы (в 5

	2016).		повторах из 6).
hsa-mir-21	Онкоген, ассоциированный с пролиферацией, метастазированием и	Связывание происходит в	_
	опухолевой прогрессией (Wang et al., 2019).	клетках молочной железы.	
hsa-mir-190b	Экспрессия коррелирует со статусом ΕRα, выживаемостью,	Связывание происходит в	Связывание
	свободной от местатаз. Не влияет на пролиферацию клеток РМЖ	клетках молочной железы.	происходит в клетках
	(Cizeron-Clairac et al., 2015).		молочной железы (в 4
	Другое исследование продемонстрировало, что сверхэкспрессия		повторах из 6).
	микроРНК стимулирует пролиферацию и миграцию клеток РМЖ		
	(Dai et al., 2019).		
hsa-mir-196a	Высокая экспрессия микроРНК связана с худшим прогнозом при	Связывание происходит в	Связывание
	РМЖ (Milevskiy et al., 2019).	клетках молочной железы.	происходит в клетках
	Было продемонстрировано, что микроРНК напрямую регулируется		молочной железы (в 6
	ERα (Jiang <i>et al.</i> , 2018).		повторах из 6).
hsa-miR-	МикроРНК кластера функционируют как онкогены при РМЖ,	Связывание происходит в	Связывание
23a/24-2/27a	стимулируя миграцию и инвазию клеток, а уровень микроРНК	клетках эндометрия.	происходит в клетках
	коррелирует со статусом метастазирования (Li et al., 2013).		эндометрия и, в 1
			повторе из 6, в клетках
			молочной железы.
hsa-miR-190a	С помощью репортёрного анализа было продемонстрировано, что в	_	_
	промоторе микроРНК содержится полу-сайт связывания ER.		
	Повышенная экспрессия miR-190a ингибирует миграцию клеток, а её		
	экспрессия связана с лучшим исходом при РМЖ (Chu et al., 2014).		

hsa-miR-19b	Показано, что с-MYC и ERα участвуют в регуляции экспрессии -	_
	кластера, в который входит miR-19b (McKiernan et al., 2020).	
	МикроРНК вовлечена в прогрессию РМЖ, усиливает пролиферацию,	
	играцию и инвазию клеток РМЖ (Li et al., 2018).	

Примечание: *ESR1=ER α ; ESR2=ER β .

3.2.2 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 в 1,4 и в 1,5 раз соответственно после 24 ч инкубации (Таблица 11). Уровень miR-190b также увеличивался после 48 ч инкубации с прогестероном. Экспрессия miR-19b оказалась 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. Под действием эстрадиола также изменялся уровень miR-365 — количество микроРНК снижалось в 1,5-1,7 раз после 6 ч инкубации с эстрадиолом. Также уровень miR-365 снижался в 1,3 раза после инкубации с тестостероном. МiR-190a и miR-196a оказались тестостерон-регулируемыми — их экспрессия увеличивалась в клетках, обработанных в течение 48 ч гормоном. Уровень miR-21 снижался после 6 ч инкубации с тестостероном, но увеличивался в 1,4 раза после 48 ч инкубации. Экспрессия miR-27a снижалась под действием тестостерона, при этом для других микроРНК из кластера также наблюдалась тенденция к снижению их уровня.

Таблица 11. Относительные уровни микроРНК-мишеней эстрогена в клетках МСГ-7, обработанных эстрадиолом, тестостероном и прогестероном.

МикроРНК	Время	Эстра	адиол	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-342	6 ч	0,83	0,96	0,89	1,10	0,92	1,12
	24 ч	0,96	1,02	1,15	1,10	0,89	0,94
	48 ч	1,07	1,08	1,17	1,19	0,90	1,18
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	бч	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-23a	6 ч	1,12	1,08	0,96	0,86	0,84	0,84
	24 ч	0,89	0,95	0,88	1,00	0,92	0,88
	48 ч	0,89	0,85	1,02	0,94	1,11	0,92
miR-24	6 ч	1,10	1,00	0,91	0,81	0,90	0,97
	24 ч	0,96	0,97	1,02	0,99	0,93	0,92
	48 ч	0,88	1,00	1,15	1,20	0,98	1,14
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
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.

Таким образом, экспрессия miR-365, miR-190b и miR-19b оказалась чувствительна к действию эстрадиола. Согласно полученным результатам, экспрессия остальных микроРНК (за исключением miR-342) в основном находится под регуляцией андрогенов.

3.2.3 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 (Таблица 12).

Таблица 12. Относительные уровни микроРНК-мишеней в клетках МСF-7, обработанных о,п'-ДДТ, п,п'-ДДТ или эндосульфаном.

МикроРНК		0,п′-	ДДТ	п,п′-ДДТ		Эндосульфан	
		0,1 мкМ	10 мкМ	0,1 мкМ	10 мкМ	0,1 мкМ	1 мкМ
mir-135a	6 ч	1,01	1,00	0,99	0,93	0,97	1,06
	24 ч	1,10	1,14	1,07	1,05	0,83	1,07
	48 ч	0,94	1,02	0,95	1,00	0,89	1,01
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-21	6 ч	1,03	1,07	0,97	1,11	1,06	1,04
	24 ч	1,03	1,03	1,10	1,11	1,11	1,16
	48 ч	1,05	1,10	0,91	0,97	1,01	1,19
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-196a	6 ч	0,88	0,95	0,94	1,08	0,87	1,07
	24 ч	1,01	1,01	0,91	0,91	0,85	0,90
	48 ч	0,84	1,04	0,92	1,02	0,95	1,16

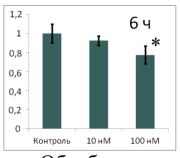
miR-23a	6 ч	0,87	1,01	0,85	0,92	0,83	0,90
	24 ч	1,10	1,03	0,99	0,98	0,91	0,93
	48 ч	0,86	0,99	1,08	1,20	0,96	1,03
miR-24	6 ч	0,90	1,07	1,00	1,12	0,92	1,09
	24 ч	0,97	1,09	1,02	1,03	1,02	1,08
	48 ч	1,08	1,14	0,91	1,01	1,06	1,13
miR-27a	6 ч	1,14	1,20	0,85	0,92	0,90	0,95
	24 ч	0,97	1,01	1,08	1,00	1,05	1,15
	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

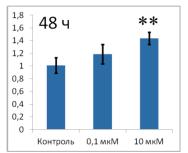
Каждое значение представляет отношение микроРНК/микроРНК для клеток, обработанных соединениями, к клетам, обработанным ДМСО (контроль). Приведены средние значения (n = 3). *p < 0.05 по сравнению с контролем; **p < 0.01 по сравнению с контролем.

Было выявлено увеличение уровня miR-365 в 1,8 раз после 6 ч инкубации с с п,п'-ДДТ и увеличение уровня miR-27а в 1,4 раз после 48 ч инкубации с соединением, что может быть связано с антиандрогенными эффектами пестицида (Рисунок 12). о,п'-изомер обладает большей эстрогенной активностью по сравнению с п,п'-изомером (Којіта *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, снижалась под действием о,п'-ДДТ в 1,4-1,6 раз. Под действием п,п'-ДДТ её уровень слегка увеличивался – возможно из-за антипрогестеронной активности ДДТ, которая сильнее выражена у п,п'-изомера (Klotz *et al.*, 1997).

Относительный уровень miR-27a





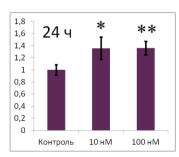
Обработка тестостероном

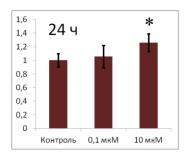
Обработка п,п'-ДДТ

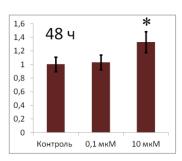
Рисунок 12. Относительный уровень miR-27а в клетках МСF-7, обработанных тестостероном или п,п'-ДДТ. По оси Y показано отношение количества РНК в клетках, обработанных соединениями, к количеству РНК в клетках, обработанных ДМСО. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение (n = 3). *статистическая значимость различий по сравнению с контролем, p<0,05; **p<0,01.

Экспрессия эстроген-регулируемой miR-190b увеличивалась в 1,3 раза в клетках, обработанных о,п'-ДДТ после 24 и 48 ч инкубации (Рисунок 13). В этих же клетках увеличивался уровень miR-342.

Относительный уровень miR-190b







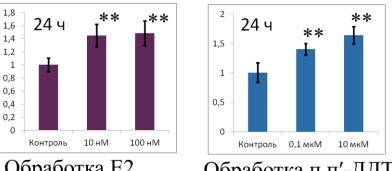
Обработка Е2

Обработка о,п'-ДДТ

Рисунок 13. Относительный уровень miR-190b в клетках МСF-7, обработанных эстрадиолом или о,п'-ДДТ. По оси Y показано отношение количества РНК в клетках, обработанных соединениями, к количеству РНК в клетках, обработанных ДМСО. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение (n = 3). *статистическая значимость различий по сравнению с контролем, p<0,05; **p<0,01.

Уровень эстроген-регулируемой miR-19b увеличивался в 1,4-1,6 раз после 24 ч инкубации с п,п'-ДДТ (Рисунок 14). Небольшое увеличение наблюдалось после 6 ч инкубации с эндосульфаном.

Относительный уровень miR-19b



Обработка Е2

Обработка п,п'-ДДТ

Рисунок 14. Относительный уровень miR-19b в клетках MCF-7, обработанных эстрадиолом или п,п'-ДДТ. По оси У показано отношение количества РНК в клетках, обработанных соединениями, к количеству РНК в клетках, обработанных ДМСО. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение (n = 3). *статистическая значимость различий по сравнению с контролем, p<0.05; **p<0.01.

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.

3.2.4 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, не экспрессирующих ER, PR и AR, обработанных пестицидами.

Полученные результаты указывают на то, что изменение экспрессии miR-365, miR-27a, miR-190b, miR-19b и miR-342 могут быть обусловлены влиянием пестицидов на рецепторы ER или AR (Таблица 13).

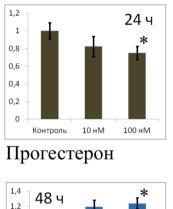
Таблица 13. Относительные уровни микроРНК-мишеней в клетках MDA-MB-231, обработанных о,п'-ДДТ, п,п'-ДДТ или эндосульфаном.

МикроРНК		0,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	1,02	1,09	1,00	1,03	0,99	1,01
	24 ч	1,11	0,93	1,02	1,00	0,98	0,94
	48 ч	1,00	0,92	0,96	1,03	1,12	1,16
mir-365	6 ч	1,04	1,01	1,07	1,02	1,06	0,87
	24 ч	0,92	0,75*	0,99	1,02	1,02	1,09
	48 ч	0,98	1,01	1,04	1,03	1,00	1,02
mir-190b	6 ч	1,05	1,16	1,01	0,96	1,00	1,04
	24 ч	1,01	0,95	1,07	1,12	1,05	1,09
	48 ч	1,02	1,05	0,95	1,14	1,01	0,98
miR-190a	6 ч	0,99	1,03	1,04	1,10	0,98	1,08
	24 ч	1,00	1,04	1,05	1,20	1,02	1,04
	48 ч	1,06	1,21	1,18	1,37*	0,90	0,86
miR-27a	6 ч	1,00	1,05	1,08	1,09	1,03	1,08
	24 ч	1,09	1,08	0,97	1,02	1,01	0,93
	48 ч	0,99	1,12	1,02	1,08	1,05	1,20
miR-19b	6 ч	1,03	1,07	0,97	1,03	1,09	1,15
	24 ч	0,93	0,85	1,01	0,96	1,07	0,98
	48 ч	1,11	1,17	0,99	1,17	1,05	1,14

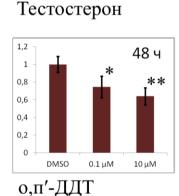
Примечание: каждое значение представляет отношение микроРНК/микроРНК для клеток, обработанных соединениями, к клетам, обработанным ДМСО (контроль). Приведены средние значения (n=3). *p<0.05 по сравнению с контролем.

Изменение экспрессии miR-190a в MCF-7 под действием о,п'-ДДТ вероятно связано с гормон-подобными эффектами пестицида, однако п,п'-ДДТ приводил к увеличению экспрессии микроРНК как в MCF-7, так и в MDA-MB-231 клетках (Рисунок 15). Таким образом, влияние п,п'-ДДТ на miR-190a вероятно связано с другими сигнальными путями, затрагиваемыми ДДТ, и не является PR-опосредованным.

Относительный уровень miR-190a 1,6 1,4 1,2 1 0,8 0,6 0,6 0,4 1 24 ч 1 0,8 0,6 0,4



MCF-7



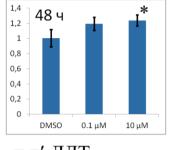
10 HM

100 HM

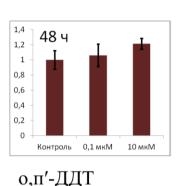
0,4

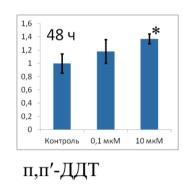
0,2

Контроль



п,п'-ДДТ



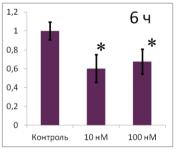


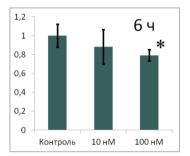
MDA-MB-231

Рисунок 15. Относительный уровень miR-190а в клетках МСF-7 и MDA-MB-231, обработанных тестостероном, прогестероном или изомерами ДДТ. По оси Y показано отношение количества РНК в клетках, обработанных соединениями, к количеству РНК в клетках, обработанных ДМСО. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение (n = 3). *статистическая значимость различий по сравнению с контролем, p < 0.05; **p < 0.01.

Экспрессия miR-365 не увеличивалась под действием п,п'-ДДТ в MDA-MB-231 клетках, но снижалась после 24 ч инкубации с о,п'-ДДТ. Таким образом, ДДТ регулирует экспрессию miR-365 в клетках трижды-негативного РМЖ и в клетках гормонозависимого РМЖ через разные сигнальные пути (Рисунок 16).

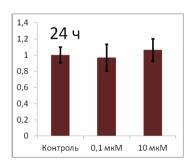
Относительный уровень miR-365

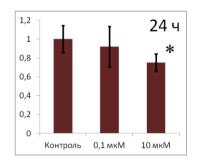




E2, MCF-7

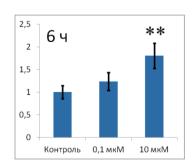
Тестостерон, МСГ-7

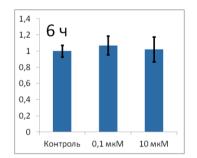




о,п'-ДДТ, MCF-7

о,п'-ДДТ, МDА-МВ-231





п,п'-ДДТ, МСГ-7

п,п'-ДДТ, МDА-МВ-231

Рисунок 16. Относительный уровень miR-365 в клетках МСF-7 и MDA-MB-231, обработанных эстрадиолом, тестостероном или изомерами ДДТ. По оси Y показано отношение количества РНК в клетках, обработанных соединениями, к количеству РНК в клетках, обработанных ДМСО. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение (n = 3). *статистическая значимость различий по сравнению с контролем, p < 0.05; **p < 0.01.

Проведённые исследования указывают на то, что ХОП, в частности ДДТ, могут влиять на экспрессию miR-342, miR-190b, miR-190a, miR-27a, miR-19b и miR-365 через влияние на активность рецепторов гормонов, таких как ER и AR.

3.2.5 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 гормончувствительных 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 опосредованы влиянием 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 МСF-7, обработанных пестицидами (Таблица 14). Чтобы убедиться, что изменение экспрессии генов не связано с гормон-подобными свойствами пестицидов, уровни их мРНК также были измерены в клетках, обработанных гормонами.

Таблица 14. Гены мишени исследуемых микроРНК и их роль в канцерогенезе.

Ген-мишень	Наличие сайта	Наличие сайта	Роль в канцерогенезе
	связывания	связывания	
	микроРНК	микроРНК	
	согласно	согласно	
	miRDIP*	TargetScan	
APAF1	miR-190-5p ^H	miR-190-5p	Основной компонент апоптосомы.
(Apoptotic protease-	miR-27a-3p ^H	miR-27a-3p	Показана негативная корреляция
activating factor-1)	miR-19b-3p ^M	miR-19-3p	между уровнем экспрессии <i>APAF1</i>
	miR-365-3p ^M		и инвазивностью аденомы
			гипофиза (Tanase <i>et al.</i> , 2014).
TP53INP1	miR-190-5p ^V	miR-190-5p	Стресс-индуцируемый белок,
(Tumor protein 53-	miR-19b-3p ^H	miR-19-3p	опухолевый супрессор. Низкая
induced nuclear	miR-342-3p ^M	miR-342-3p	экспрессия <i>TP53INP1</i> является
protein 1)	miR-27a-3p ^M	miR-27a-3p	фактором плохого прогноза у
	miR-365-3p ^M		пациентов с РМЖ (Nishimoto et al.,
			2019). Ингибирует пролиферацию
			и эпителиально-мезенхимальный
			переход клеток РМЖ (Wang, Sun
			et al., 2018; Zhang et al., 2013).
PTPRS	miR-190-5p ^V	miR-190-5p	Учатствует в регуляции
(Receptor-type	miR-365-3p ^M		клеточного цикла, апоптоза. Как
tyrosine-protein			правило, PTPR действуют как

phosphatase S)			супрессоры онкогенеза (Du and				
			Grandis, 2015).				
BAX	miR-365-3p ^H	miR-365-3p	Апоптотический регулятор.				
(BCL2 associated X,	$miR-342-3p^{M}$	miR-342-3p	Инактивирующие мутации <i>ВАХ</i>				
apoptosis regulator)	miR-27a-3p ^M	miR-27a-3p	встречаются при многих типах				
			рака (Kang <i>et al.</i> , 2017).				
PHLPP1	miR-190-5p ^V	miR-190-5p	PHLPPs участвуют в регуляции				
(PH domain and	miR-27a-3p ^M		пролиферации, миграции,				
leucine rich repeat	miR-19b-3p ^M		апоптоза, проявляя				
protein phosphatase			противоопухолевые свойства				
1)			(Zhou et al., 2015).				
TRPS1	miR-190-5p ^V	miR-190-5p	Является репрессором				
(Transcriptional	miR-365-3p ^H	miR-365-3p	транскрипции и в норме участвует				
repressor GATA	miR-19b-3p ^H	miR-19-3p	в регуляции остеобластогенеза и				
binding 1)	miR-27a-3p ^M	miR-27a-3p	созревания хондроцитов				
	$miR-342-3p^{M}$		Экспрессия TRPS1				
			повышена при РМЖ и				
			коррелирует со статусом ER и PR				
			(Su et al., 2014).				
XIAP	miR-190-5p ^H	miR-190-5p	Апоптотический супрессор.				
(X-linked inhibitor	miR-27a-3p ^H	miR-27a-3p	Высокая экспрессия – плохой				
of apoptosis)	miR-19b-3p ^M	miR-19-3p	прогностический маркер при РМЖ				
	$miR-342-3p^{M}$		(Hussain et al., 2017).				
	miR-365-3p ^M						
PTEN	miR-19b-3p ^V	miR-19-3p	Негативный регулятор PI3K/Akt				
(Phosphatase and	miR-365-3p ^H	miR-365-3p	сигнального пути, аберрантно				
tensin homolog)	miR-190-5p ^M		активированного при раке				
	miR-27a-3p ^M		(Carbognin et al., 2019).				
П 4г	,DDID		DITIC				

Примечание: *База данных miRDIP позволяет ранжировать микроРНК по вероятности их связывания с мРНК: V=very high; H=high; M=medium.

Для всех выбранных генов-мишеней были выявлены изменения под действием как минимум одного из соединений (Таблица 15).

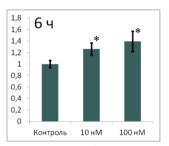
Таблица 15. Относительные уровни мРНК-мишеней исследуемых микроРНК в клетках МСГ-7, обработанных гормонами и пестицидами.

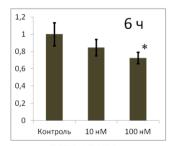
Ген		Эстрадиол		Тесто	стерон	Проге	стерон	о,п'-ДДТ		п,п′-ДДТ		Эндосульфан	
		10 нМ	100 нМ	10 нМ	100 нМ	10 нМ	100 нМ	0,1 мкМ	10 мкМ	0,1 мкМ	10 мкМ	0,1 мкМ	1 мкМ
	6 ч	0,95	1,15	1,26*	1,39*	0,84	0,73*	0,91	0,72*	1,14	1,22*	0,92	1,00
APAF1	24 ч	1,15	1,07	0,95	0,96	1,20	1,18	1,07	1,16	0,85	0,94	1,17	1,06
	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
TD 5 2 IN ID 1	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
TP53INP1	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
DEED D.C.	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*
PTPRS	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
	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
BAX	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
DAM DD I	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
PHLPP1	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
TD DC1	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
TRPS1	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
WIA D	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
XIAP	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
DTEN	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
PTEN	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

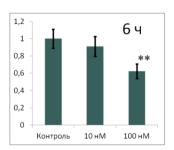
Примечание: каждое значение отношение мРНК/мРНК для клеток, обработанных соединениями, к клетам, обработанным ДМСО (контроль). Приведены средние значения (n = 3). *p < 0.05 по сравнению с контролем; **p < 0.01 по сравнению с контролем.

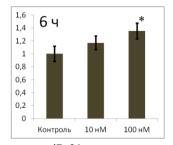
Экспрессия *APAF1* увеличивалась под действием тестостерона и п,п'-ДДТ после 6 ч инкубации. При обработке клеток прогестероном и о,п'-ДДТ в течение 6 ч уровень мРНК гена снижался в 1,4 раза. Также количество мРНК *APAF1* снижалось в 1,4 раза после 48 ч инкубации клеток с п,п'-ДДТ. Наблюдаемые снижения в уровне мРНК *APAF1* под действием пестицидов могут быть следствием их антиандрогенных свойств, но также увеличение количества мРНК в клетках, обработанных тестостероном, и снижение в клетках, обработанных п,п'-ДДТ, может быть опосредовано соответствующими изменениями в экспрессии miR-27а в этих клетках. Снижение уровней мРНК *APAF1* под действием прогестерона и увеличение под действием тестостерона также может быть связано с изменением экспрессии miR-21 (Рисунок 17), для которой *APAF1* является мишенью (Рараgiannakopoulos *et al.*, 2008).



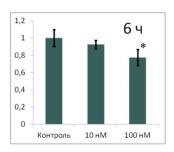


Относительный уровень мРНК APAF1





Относительный уровень miR-21



Относительный уровень miR-27a

Тестостерон Прогестерон

Рисунок 17. Относительные уровни мРНК *АРАF1*, miR-21и miR-27а в клетках МСF-7, обработанных тестостероном или прогестероном. По оси Y показано отношение количества РНК в клетках, обработанных соединениями, к количеству РНК в клетках, обработанных ДМСО. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение (n = 3). *статистическая значимость различий по сравнению с контролем, p<0,05; **p<0,01.

Выявленное снижение экспрессии *ТР53INP1* в 1,4-1,6 раз в клетках, обработанных эстрадиолом и о,п'-ДДТ в течение 6 ч, вероятно, связано с сигнальными путями ER. Обработка клеток прогестероном в течение 24 ч приводила к увеличению количества мРНК гена, а обработка п,п'-ДДТ в течение 48 ч – к уменьшению. Снижение под действием п,п'-ДДТ может быть результатом антагонистического действия ДДТ к PR, но также изменения уровней мРНК *ТР53INP1* под действием прогестерона и п,п'-ДДТ коррелировали с изменением уровня miR-190а в этих клетках (Рисунок 18).

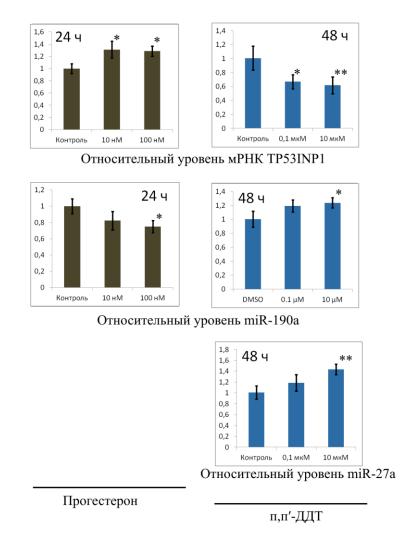


Рисунок 18. Относительные уровни мРНК *ТР53INP1*, miR-190a и miR-27a в клетках MCF-7, обработанных прогестероном или п,п'-ДДТ. По оси Y показано отношение количества РНК в клетках, обработанных соединениями, к количеству РНК в клетках, обработанных ДМСО. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение (n = 3). *статистическая значимость различий по сравнению с контролем, p<0,05; **p<0,01.

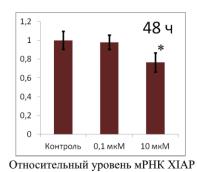
Уровень мРНК гена *PTPRS* увеличивался после 24 ч инкубации с эстрадиолом и снижался после 24 ч инкубации с тестостероном. Поэтому выявленное увеличение экспрессии *PTPRS* после 6 ч инкубации с пестицидами может быть обусловлено их влиянием на ER и AR.

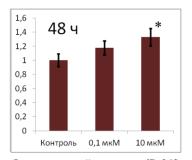
После 48 ч инкубации экспрессия *PTPRS* снижалась под действием эстрадиола (может быть результатом предшествующего увеличения уровня miR-190b в клетках после 24 ч) и тестостерона (соответствовало увеличению уровня miR-190a). Под действием о,п'-ДДТ количество мРНК гена увеличивалось, что могло быть результатом снижения уровня miR-190a.

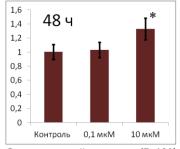
Экспрессия *BAX* снижалась в 1,6-2,2 и в 1,3 раз в клетках, обработанных эстрадиолом и п,п'-ДДТ в течение 6 ч соответственно. Возможно, что в снижении уровня мРНК гена под действием п,п'-ДДТ играет роль повышение экспрессии miR-365.

Экспрессия *TRPS1* оказалась эстроген- и андроген-зависимой. Под действием о,п'-ДДТ уровень мРНК гена снижался в 1,6 раз после 6 ч инкубации.

Количество мРНК *XIAP* снижалось в 1,3 раза в клетках, обработанных о,п'-ДДТ в течение 48 ч. Это может быть следствием увеличения экспрессии miR-342 и miR-190b после инкубации с соединением в течение 24 и 48 ч (Рисунок 19).







Относительный уровень miR-342

Относительный уровень miR-190b

Рисунок 19. Относительные уровни мРНК *XIAP*, miR-342 и miR-190b в клетках МСF-7, обработанных 0,n'-ДДТ. По оси Y показано отношение количества РНК в клетках, обработанных соединениями, к количеству РНК в клетках, обработанных ДМСО. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение (n = 3). *статистическая значимость различий по сравнению с контролем, p<0,05.

Экспрессия *PTEN* увеличивалась под действием эстрадиола после 6 и 48 ч инкубации и под действием тестостерона после 6 ч инкубации. После 6 ч инкубации с прогестероном и о,п'-ДДТ количество мРНК *PTEN* в клетках снижалось в 1,3-1,4 раза. Выявленные изменения в

количестве мРНК *РТЕN* под действием гормонов могут быть обусловлены изменениями в экспрессии miR-365 и miR-21 (Рисунок 20).

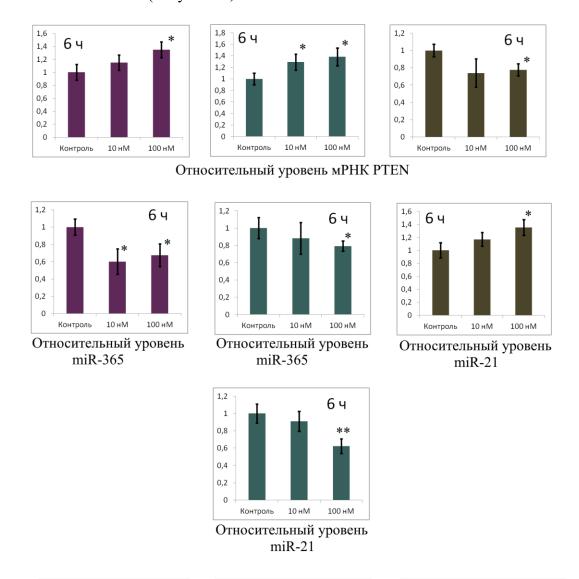


Рисунок 20. Относительные уровни мРНК *РТЕN*, miR-365 и miR-21 в клетках МСF-7, обработанных гормонами. По оси Y показано отношение количества РНК в клетках, обработанных соединениями, к количеству РНК в клетках, обработанных ДМСО. Приведены средние значения \pm стандартное отклонение (n = 3). *статистическая значимость различий по сравнению с контролем, p<0,05; **p<0,01.

Тестостерон

Прогестерон

Эстрадиол

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. Однако под действием пестицидов наиболее значительные изменения в экспрессии наблюдались для генов *APAF1*, *TP53INP1* и *PTPRS*.

3.2.6 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, PR и AR, *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.

3.2.7 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 МСF-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 21).

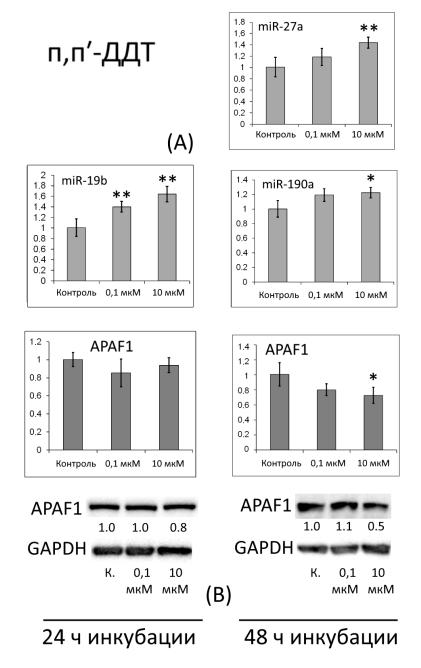


Рисунок 21. (A) Относительные уровни мРНК *APAF1* и miR-19b, miR-27a, miR-190a в клетках МСF-7, обработанных п,п'-ДДТ. (B) Вестерн-блот анализ APAF1 в клетках МСF-7, обработанных п,п'-ДДТ. Цифры под полосами APAF1 обозначают кратность изменения уровня белка по сравнению с первой полосой (К=контроль); каждое значение было нормализовано к соответствующей полосе GAPDH. Представлены данные одного из трех независимых экспериментов (которые дали аналогичные результаты).

Небольшое снижение количества белка APAF1 также наблюдалось после инкубации с о,п'-ДДТ (Рисунок 22).

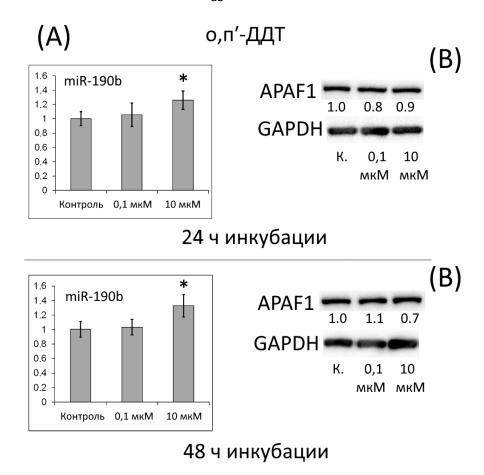


Рисунок 22. (А) Относительные уровни miR-190b в клетках МСF-7, обработанных о,п'-ДДТ. (В) Вестерн-блот анализ APAF1 в клетках МСF-7, обработанных о,п'-ДДТ. Цифры под полосами APAF1 обозначают кратность изменения уровня белка по сравнению с первой полосой (К=контроль); каждое значение было нормализовано 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 23). Такое снижение может быть связано не только с высокой экспрессией miR-19b, но также с предшествующим увеличением экспрессии miR-365 после 6 ч инкубации.

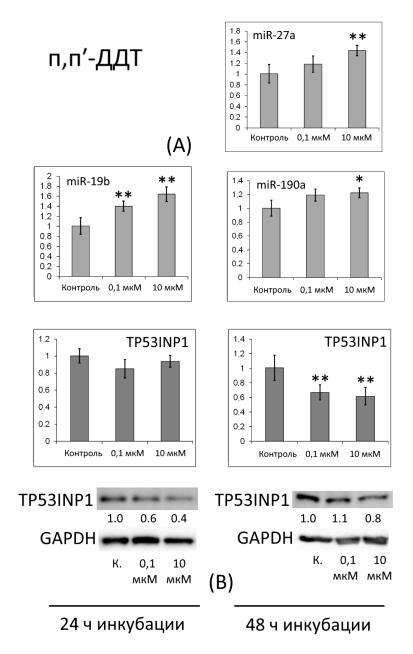


Рисунок 23. (А) Относительные уровни мРНК *ТР53INP1*, miR-19b, miR-27a, miR-190a в клетках МСF-7, обработанных п,п'-ДДТ. (В) Вестерн-блот анализ ТР53INP1 в клетках МСF-7, обработанных п,п'-ДДТ. Цифры под полосами ТР53INP1 обозначают кратность изменения уровня белка по сравнению с первой полосой (К=контроль); 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 (Рисунок 24). Это может быть следствием как увеличения экспрессии miR-342 и miR-190b, так и наблюдаемого после 6 ч инкубации снижения уровня мРНК гена.

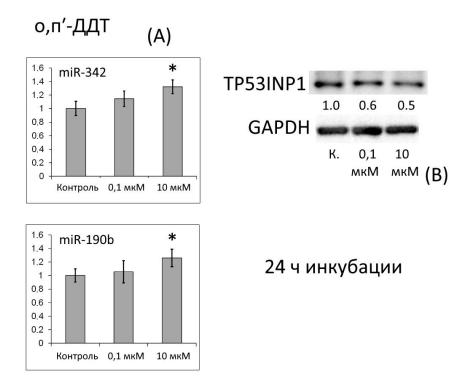
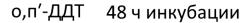
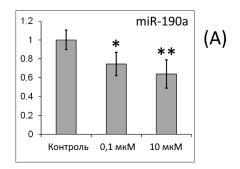


Рисунок 24. (А) Относительные уровни miR-190b, miR-342 в клетках МСF-7, обработанных о,п'-ДДТ в течение 24 ч. (В) Вестерн-блот анализ TP53INP1 в клетках МСF-7, обработанных о,п'-ДДТ. Цифры под полосами TP53INP1 обозначают кратность изменения уровня белка по сравнению с первой полосой (К=контроль); каждое значение было нормализовано к соответствующей полосе GAPDH. Представлены данные одного из трех независимых экспериментов (которые дали аналогичные результаты).

Однако после 48 ч инкубации с 10 мкМ о,п'-ДДТ количество белка TP53INP1 оказалось увеличено в 2 раза (Рисунок 25). Возможно, что это результат значительного снижения экспрессии miR-190a.





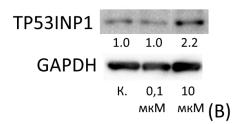


Рисунок 25. (А) Относительный уровень miR-190a в клетках МСF-7, обработанных о,п'ДДТ в течение 48 ч. (В) Вестерн-блот анализ TP53INP1 в клетках МСF-7, обработанных о,п'ДДТ. Цифры под полосами TP53INP1 обозначают кратность изменения уровня белка по
сравнению с первой полосой (К=контроль); каждое значение было нормализовано к
соответствующей полосе GAPDH. Представлены данные одного из трех независимых
экспериментов (которые дали аналогичные результаты).

Хотя уровень мРНК PTPRS оказался повышенным в клетках, инкубированных с каждым инсектицидом в течение 6 ч, наблюдалось снижение уровня белка PTPRS в клетках, инкубированных с п,п'-ДДТ или о,п'-ДДТ в течение 24 ч (Рисунок 26).

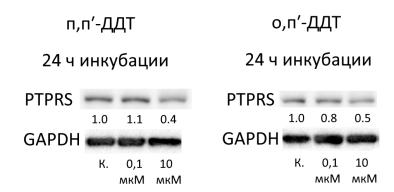


Рисунок 26. Вестерн-блот анализ PTPRS в клетках MCF-7, обработанных о,п'-ДДТ и п,п'-ДДТ в течение 24 ч. Цифры под полосами PTPRS обозначают кратность изменения уровня белка по сравнению с первой полосой (К=контроль); каждое значение было нормализовано к соответствующей полосе GAPDH. Представлены данные одного из трех независимых экспериментов (которые дали аналогичные результаты).

Хотя эндосульфан не приводил к изменениям в уровне мРНК *APAF1* и *TP53INP1*, количество белка в клетках после инкубации с пестицидом менялось. Так после обработки эндосульфаном в дозе 1 мкМ наблюдалось снижение количества белка APAF1 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 27).

Эндосульфан

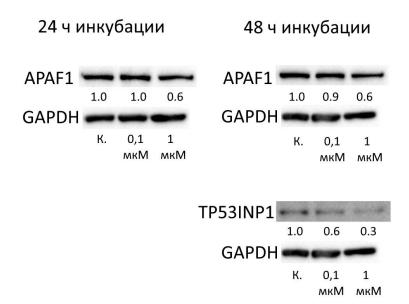


Рисунок 27. Вестерн-блот анализ APAF1 и TP53INP1 в клетках МСF-7, обработанных эндосульфаном. Цифры под полосами исследуемых белков обозначают кратность изменения уровня белка по сравнению с первой полосой (К=контроль); каждое значение было нормализовано к соответствующей полосе GAPDH. Представлены данные одного из трех независимых экспериментов (которые дали аналогичные результаты).

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

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

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 (а и b), при этом сайт связывания AR/PR в промоторе miR-190а был обнаружен не только у человека, но также у крысы, что указывает на консервативный механизм регуляции экспрессии этой микроPHK рецептором.

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

Для выявленных в этом исследовании эстроген-регулируемых miR-190b 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 (Сесіl et al., 1971; Kelce et al., 1995). Крысам вводили ДДТ внутрибрюшинно в течение 3 месяцев.

Экспрессия всех трёх микроРНК была увеличена в тканях молочной железы крыс (Рисунок 28). 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. Примечательно, что экспрессия miR-190a увеличивалась под действием п,п'-ДДТ во всех исследуемых системах — *in vitro*, в клетках МСF-7 и MDA-MB-231, и *in vivo*, в молочной железе крыс.

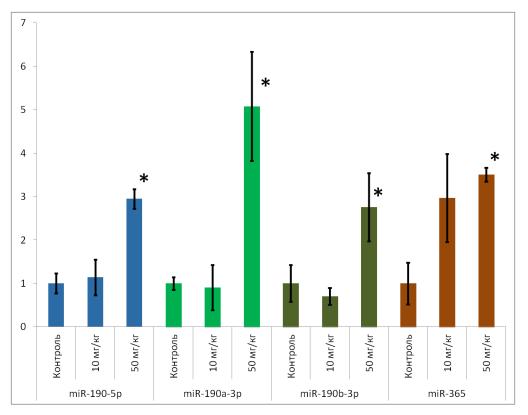


Рисунок 28. Относительные уровни miR-190-5p, miR-190a-3p, miR-190b-3p и miR-365 в молочной железе самок крыс Вистар, подвергнутых хроническому действию п,п'-ДДТ в течение трёх месяцев. По оси Y показано отношение количества РНК в тканях крыс, обработанных ДДТ, к количеству РНК в тканях крыс, обработанных растворителем (масло). Приведены средние значения \pm стандартное отклонение (n = 4). *статистическая значимость различий по сравнению с контролем, p<0,05.

В молочной железе самок крыс также была исследована экспрессия miR-27a (содержит последовательность сайта связывания ER у крыс согласно Ovchinnikov *et al.*, 2018) и miR-19b, уровни которых увеличивались под действием п,п'-ДДТ в эксперименте *in vitro*, однако достоверных изменений выявлено не было.

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

Чтобы подтвердить, что эффекты пестицидов на выявленные в исследовании мишени 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 (Рисунок 29).

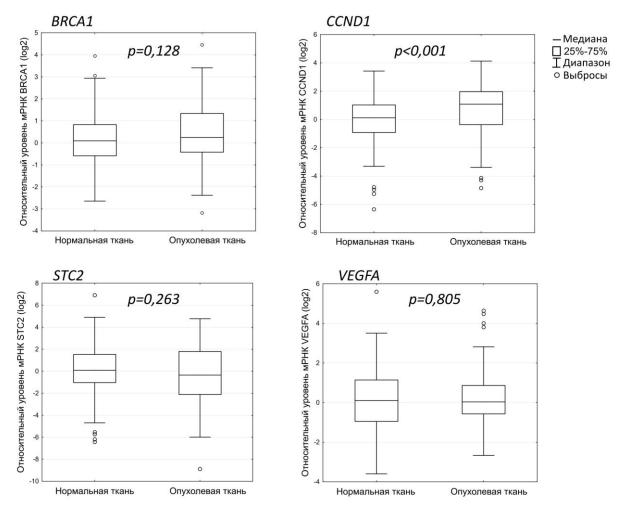


Рисунок 29. Относительные уровни мРНК *BRCA1*, *CCND1*, *STC2*, *VEGFA* в злокачественных опухолях и парных нетрансформированных тканях молочной железы пациентов с диагнозом РМЖ.

Было выявлено, что экспрессия *CCND1*, мишени о,п'-ДДТ, в опухолевых тканях выше в 2 раза (при сравнении медианных значений), чем в нормальных тканях молочной железы.

3.3.1 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 гормонозависимого РМЖ и в тканях РМЖ, не экспрессирующих ER и PR.

Было выявлено, что уровни мРНК CCND1 и STC2 — генов, экспрессия которых индуцируется 0,n'-ДДТ — выше в 2 и в 8 раз соответственно в опухолях, экспрессирующих ER и PR (Таблица 16).

Таблица 16. Ассоциации между количеством мРНК *BRCA1*, *CCND1*, *STC2* или *VEGFA* в образцах тканей больных РМЖ и статусом ER, PR.

Характері	истика	N	Относительный уровень* мРНК и <i>р-</i> 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	1	0,19	1	1,39	1		
		<u> </u>		Люми	нальный	РМЖ		1		1		
PR статус	+	93	1,68	0,174	2,07	0,482	1,40	0,178	1,01	0,498		
	_	18	1,32		1,62	=	0,46		1,41	=		

Примечание: *медиана различий в уровнях мРНК между тканями РМЖ и образцами нормальной ткани (контроль); результат был нормирован к контролю.

Существенные различия между группыми пациентов выделены жирным шрифтом.

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

3.4 Связь экспрессии miR-342, miR-365, miR-190a, miR-190b, miR-27a, miR-19b и их мишеней *APAF1* и *TP53INP1*, чувствительных к действию XOП, 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*.

Изменения в уровне всех микроРНК, кроме miR-342, оказались ассоциированы с канцерогенезом молочной железы (Рисунок 30). Так, экспрессия miR-365, miR-190a, miR-19b, miR-27a оказалась значительно ниже в опухолевой ткани пациентом с диагнозом РМЖ. Уровень miR-190b, напротив, был значительно выше в опухолевой ткани. При этом количество мРНК гена *ТР53INP1* было ниже в злокачественных тканях.

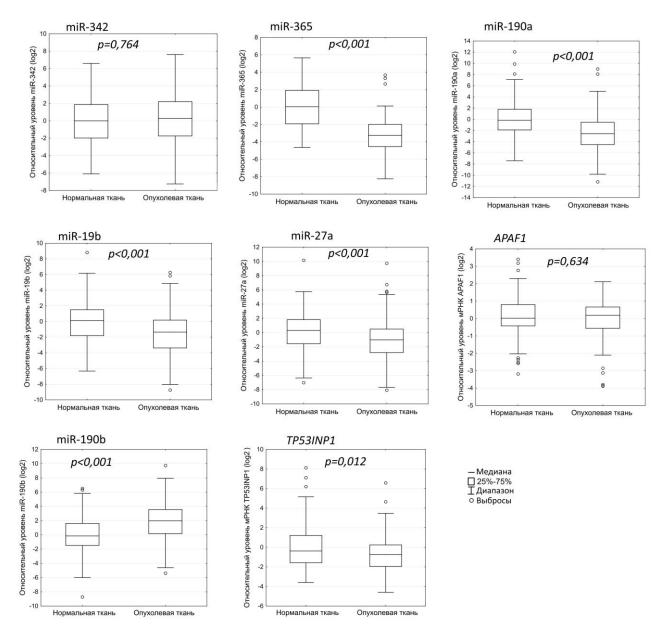


Рисунок 30. Относительные уровни miR-342, miR-365, miR-190a, miR-190b, miR-27a, miR-19b и мРНК их мишеней *APAF1* и *TP53INP1* в злокачественных опухолях и парных нетрансформированных тканях молочной железы пациентов с диагнозом РМЖ.

3.4.1 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

Было исследовано, зависит ли экспрессия микроРНК, чувствительных к пестицидам, и их генов-мишеней от активности ER и PR при РМЖ.

Уровни miR-342, экспрессия которой индуцировалась о,п'-ДДТ, и эстрогениндуцируемой miR-190b оказались значительно выше у пациентов с ER-экспрессирующим РМЖ (Таблица 17). 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.

Таблица 17. Ассоциации между количеством miR-342, miR-365, miR-190a, miR-190b, miR-27a, miR-19b и мPHK *APAF1*, *TP53INP1* в образцах тканей больных PMЖ и статусом ER, PR.

микроРНК /		Характеристика									
ген-мишень		ER c	татус	PR c	гатус	Люминальный РМЖ					
						PR c	гатус				
		+	_	+	_	+	_				
miR-342	M*	1,46	0,64	1,21	0,93	1,21	3,59				
	p	0,0	003	0,5	17	0,0	95				
miR-365	M	0,10	0,09	0,11	0,06	0,11	0,05				
	p	0,626		0,249		0,257					
miR-190a	M	0,09	0,33	0,10	0,20	0,10	0,12				
	p	0,044		0,361		0,993					
miR-190b	M	4,77	1,13	4,76	2,12	4,76	6,41				
	p	<0,	001	<0,001		0,731					
miR-27a	M	0,33	0,43	0,30	0,46	0,30	0,50				
	p	0,4	413	0,179		0,313					
miR-19b	M	0,37	0,22	0,31	0,31	0,31	0,79				
	p	0,3	370	0,6	516	0,1	80				
APAF1	M	0,95	0,84	0,94	0,91	0,94	0,93				
	p	0,227		0,2	288	0,5	523				
TP53INP1	M	0,71	0,40	0,71	0,57	0,71	0,69				
	p	0,0	010	0,4	120	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.

3.5 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 (Таблица 18).

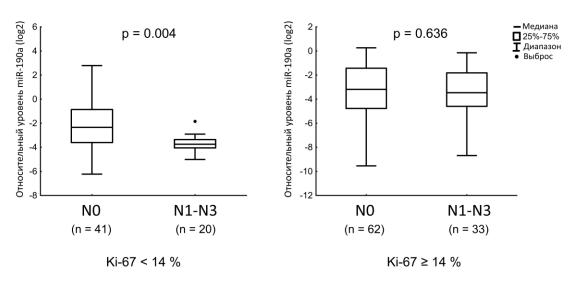
Таблица 18. Ассоциации между количеством микроРНК или мРНК мишеней пестицидов в образцах тканей больных РМЖ и наличием метастазов в лимфоузлах.

микроРНК /			Характе	ристика				
ген-мишень		N статус			альный ИЖ	Гормон-не- зависимый РМЖ		
				N ст	гатус	N cT	атус	
		+	_	+	_	+	_	
BRCA1	M*	1,11	1,36	1,09	1,37	2,00	1,35	
	p	0,8	332	0,8	866	0,3	62	
CCND1	M	2,36	1,31	2,80	1,80	1,26	0,76	
	p	0,0	045	0, .	114	0,4	22	
STC2	M	0,96	0,67	1,44	0,85	0,16	0,19	
	p	0,990		0,696		0,976		
VEGFA	M	1,06	1,13	1,06 1,07		1,38	1,39	
	p	0,554		0,2	763	0,556		
miR-342	M	0,96	1,10	1,07	1,49	0,67	0,64	
	p	0,8	1 39 <i>4</i>	0,7	0,770		1 163	
miR-365	M	0,08	0,13	0,06	0,13	0,10	0,09	
	p	0,1	199	0,133		0,687		
miR-190a	M	0,09	0,17	0,08	0,13	0,24	0,37	
	p	0,1	103	0,0	058	0,824		
miR-190b	M	4,21	3,47	5,41	4,57	1,14	1,07	
	p	0,5	1 592	0,477		0,835		
miR-27a	M	0,42	0,37	0,52	0,37	0,52	0,39	
	p	0,8	1 8 <i>34</i>	0,.	391	0,183		
miR-19b	M	0,29	0,32	0,28	0,43	0,30	0,22	
	p	0,8	1 89 <i>1</i>	0,4	1 414	0,386		
APAF1	M	0,82	0,99	0,82	1,00	0,66	0,98	
	p	0,2	l 277	0,.	 303	0,8	1 206	
						,		

TP53INP1	M	0,66	0,68	0,70	0,71	0,47	0,37
	p	0,980		0,7	91	0,8	74

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.

Близкая к достоверной ассоциация с метастазированием была выявлена для miR-190a. 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% (Рисунок 31).



ER+ и/или PR+ опухоли

Рисунок 31. Относительные уровни miR-190a (log2) в злокачественных опухолях молочной железы с разным индексом Ki-67 и статусом лимфатических узлов. Уровни микроРНК в тканях РМЖ были нормированы на уровни микроРНК в нормальных тканях.

Таким образом, можно предполагать, что снижая экспрессию miR-190a и увеличивая экспрессию *CCND1*, о,п'-ДДТ может способствовать прогрессии РМЖ.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

ДДТ является одним из наиболее исследованных эндокринных разрушителей. воздействие которого многие исследователи связывали с увеличением риска развития РМЖ (Attaullah *et al.*, 2018; Cohn *et al.*, 2007; Mekonen *et al.*, 2021). Сходными с ДДТ свойствами обладает эндосульфан, глобальный запрет которого был рекомендован в 2011 году (Dayakar *et al.*, 2015). Как именно ДДТ, эндосульфан и подобные им соединения с гормон-подобным действием могут способствовать развитию рака, в настоящий момент недостаточно исследовано.

Предполагается, что ДДТ и эндосульфан могут способствовать развитию и/или прогрессии РМЖ, усиливая транскрипционную активность ER, который является важным участником канцерогенеза молочной железы (Calaf et al., 2020). Однако ДДТ и эндосульфан способны связываться не только с ER, но также с AR и PR, активность которых они ингибируют. Стероидные рецепторы могут участвовать в регуляции экспрессии одних и тех же генов и, в том числе, влиять на транскрипционную активность друг друга, поэтому при исследовании эффектов пестицидов на мишени ER необходимо также учитывать возможный вклад антагонистического действия соединений к AR и PR (Truong and Lange, 2018). Поэтому в рамках диссертационного исследования была произведена оценка эффектов двух изомеров ДДТ и эндосульфана, а также гормонов прогестерона и тестостерона на экспрессию известных генов-мишеней ER, кодирующих белки-супрессоры опухолей и белки, обладающие онкогенной ролью, а также на экспрессию предполагаемых микроРНК-мишеней ER. Для подтверждения роли эстрогена в регуляции их экспрессии, уровни мРНК- и микроРНК-мишеней были оценены в клетках, обработанных эстрадиолом.

Экспрессия всех генов, кодирующих белок, индуцировалась эстрогеном. Кроме этого, обработка клеток эстрадиолом приводила к увеличению экспрессии miR-190b, miR-19b. Подобное эстрогену действие пестициды оказывали на 5 мишеней — CCND1, STC2, VEGFA, miR-190b, miR-19b (Рисунок 32). Согласно полученным результатам эффекты о,п'-ДДТ на экспрессию мишеней ER были наиболее близки к действию на них эстрогена. Это соответствует полученным ранее данным, согласно которым аффинность связывания ER, а также способность активировать транскрипционную активность ER выше у о,п'-ДДТ, чем у п,п'-ДДТ (Chen et al., 1997; Којіта et al., 2004). Только уровень miR-19b не изменялся достоверно под действием о,п'-изомера, но при этом увеличивался при обработке клеток п,п'-ДДТ или эндосульфаном. Возможно, что изменение в экспрессии miR-19b не были обусловлены прямым действием п,п'-ДДТ и эндосульфана на ER.

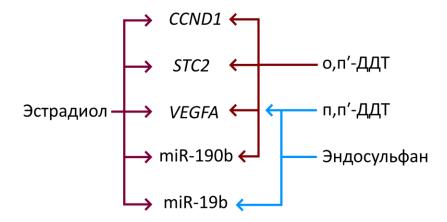


Рисунок 32. Выявленные общие мишени эстрогена, о,п'-ДДТ, п,п'-ДДТ и эндосульфана.

Противоположные тестостерону эффекты пестициды оказывали на экспрессию *BRCA1*, *PGR*, miR-190a, miR-27a, miR-365 (Рисунок 33). При этом наибольшее количество таких изменений было выявлено в клетках, обработанных п,п'-ДДТ, у которого аффинность связывания AR выше чем у о,п'-ДДТ (Kelce *et al.*, 1995). Только эффект на экспрессию miR-190a у п,п'-ДДТ не был противоположен тестостерону. Однако экспрессия miR-190a под действием п,п'-ДДТ увеличивалась также в MDA-MB-231 клетках и в молочной железе самок крыс, подвергнутых хроническому действию пестицида. Таким образом, вероятно существует консервативный AR-независимый механизм регуляции экспрессии miR-190a под действием п,п'-ДДТ. Кроме этого, экспрессия miR-365 увеличивалась под действием п,п'-ДДТ в клетках МСF-7 и в тканях крыс, хотя последовательность сайта связывания AR в промоторе микроРНК была обнаружена только у человека. Исходя из этого, можно предположить, что экспрессия miR-365 регулируется не через прямое связывание AR с промотором.

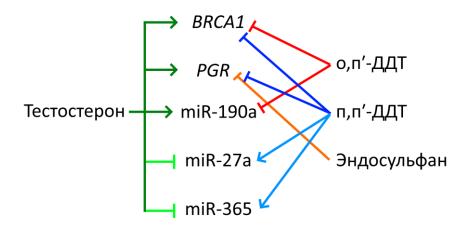


Рисунок 33. Выявленные мишени о,п'-ДДТ, п,п'-ДДТ и эндосульфана, эффекты на экспрессию которых были противоположны действию тестостерона.

Эндосульфан приводил к наименьшим изменениям в экспрессии мишеней среди исследуемых пестицидов. Действительно, аффинность связывания ER и AR у эндосульфана ниже, чем у изомеров ДДТ (Којіта *et al.*, 2004).

Значительные изменения в уровне мРНК и/или белка генов *APAF1* и *TP53INP1* были выявлены в клетках, обработанных пестицидами. 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 ДДТ также играет роль увеличение уровней miR-190b, miR-342, miR-27a, miR-19b (Рисунки 34 и 35).

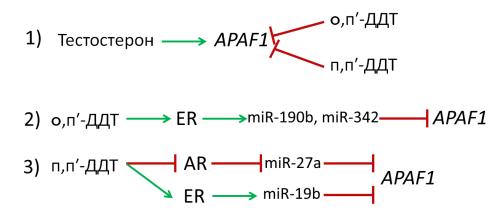


Рисунок 34. Возможные механизмы регуляции экспрессии *APAF1* под действием ДДТ.

К увеличению количества белка *TP53INP1* после 48 ч инкубации с о,п'-ДДТ могло приводить снижение экспрессии AR-регулируемой miR-190a.

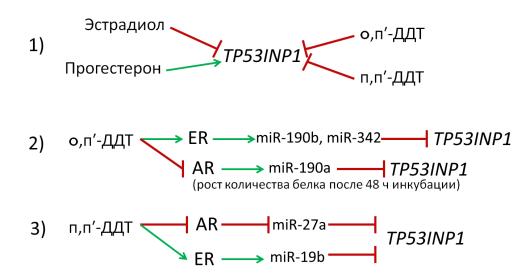


Рисунок 35. Возможные механизмы регуляции экспрессии *TP53INP1* под действием ДДТ.

В основном выявленные изменения в экспрессии мишеней пестицидов были аналогичны изменениям, которые происходят в ходе канцерогенеза. Так, о,п'-ДДТ приводил к снижению экспрессии опухолевых супрессоров *BRCA1*, *TP53INP1*, *APAF1*, miR-190a, и в то же время к увеличению экспрессии онкогенов *CCND1*, *VEGFA* (Рисунок 36). С использованием образцов РМЖ было подтверждено, что для опухолей молочной железы характерны высокий уровень экспрессии *CCND1* и низкие уровни экспрессии *TP53INP1* и miR-190a при сравнении с неизменёнными тканями. Относительно роли *STC2* и miR-190b в канцерогенезе опубликованы противоречивые данные (Cizeron-Clairac *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2019; Hou *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2019; Qie and Sang, 2022). о,п'-ДДТ также приводил к увеличению уровня miR-342, для которой ранее были продемонстрированы опухоль-супрессирующие свойства при РМЖ (Crippa *et al.*, 2014; Leivonen *et al.*, 2014). Однако, среди её мишеней есть как онкогены, так и опухолевые супрессоры, что указывает на то, что микроРНК потенциально может играть и онкогенную роль.

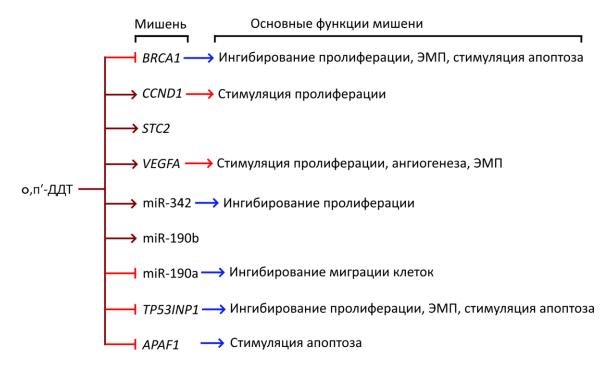


Рисунок 36. Основные функции мишеней о,п'-ДДТ. Синей стрелкой отмечены опухольсупрессирующие функции, красной – онкогенные.

Основная функция APAF1 и TP53INP1 заключается в стимуляции апоптоза. Ранее было показано, что инкубация клеток с о,п'-ДДТ в течение 5 дней снижает скорость апоптоза (Diel *et al.*, 2002). Другие исследователи продемонстрировали, что о,п'-ДДТ обладает способностью подавлять апоптоз, вызванный фактором некроза опухоли альфа (TNF), в клетках МСF-7 (Вигоw *et al.*, 1999). Таким образом, ранее продемонстрированное ингибирование апоптоза этим

инсектицидом может быть опосредовано, среди прочего, снижением экспрессии APAF1 и TP53INP1.

Подобно о,п'-изомеру п,п'-ДДТ приводил к снижению экспрессии опухолевых супрессоров *BRCA1*, *TP53INP1*, *APAF1* и к увеличению экспрессии *VEGFA*, miR-27a, miR-19b, для которых ранее были продемонстрированы онкогенные свойства (Рисунок 37). Также п,п'-ДДТ приводил к снижению экспрессии *PGR*. В целом прогестерон через активацию PGR 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). Имеющиеся данные о связи miR-365 с канцерогенезом противоречивы (Li *et al.*, 2015; Zhang, Zhang *et al.*, 2016).

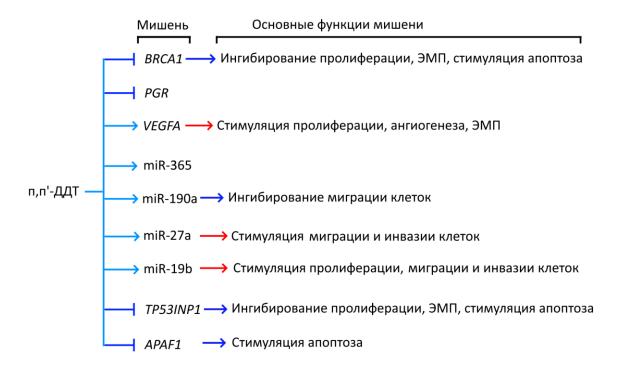


Рисунок 37. Основные функции мишеней п,п'-ДДТ. Синей стрелкой отмечены опухольсупрессирующие функции, красной — онкогенные.

В ходе исследования было подтверждено, что экспрессия *CCND1*, *STC2*, miR-342, miR-190b положительно ассоциирована с экспрессией ER, что совпадает с опубликованными ранее результатами исследований (Cizeron-Clairac *et al.*, 2015; Elsheikh *et al.*, 2008; He *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2019). Таким образом, изменения в их экспрессии при РМЖ вероятно действительно опосредованы изменениями в экспрессии и активности ER.

Также было обнаружено, что для пациентов, у которых имеются метастазы в лимоузлах, характерны более высокие уровни экспрессии *CCND1* и, при ER-позитивных опухолях с Ki-67<14%, низкие уровни miR-190a. Ранее было продемонстрировано, что miR-190a ингибирирует метастазирование РМЖ (Yu *et al.*, 2018). Следовательно, изменяя экспрессию

CCND1 и miR-190a, о,п'-ДДТ возможно способен стимулировать метастазирование РМЖ (Рисунок 38).

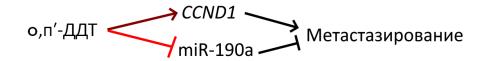


Рисунок 38. Предполагаемая роль о,п'-ДДТ в индукции метастазирования РМЖ.

Таким образом, все полученные результаты указывают на то, что ДДТ и эндосульфан являются канцерогенами для клеток молочной железы, а их негативные эффекты могут быть обсуловлены влиянием на сигнальные пути ER и AR.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многие вещества, как естественного происхождения, так и синтезированные человеком, обладают эстрогенными свойствами. Предполагается, что значительная доля таких соединений может способствовать развитию и/или прогрессии опухолей гормон-зависимых тканей. Такими соединениями являются пестициды ДДТ и эндосульфан, остатки которых обнаруживаются по всему миру.

В ходе диссертационного исследования был выявлен ряд мишеней гормонов эстрогена, тестостерона и прогестерена, экспрессия которых была 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. Но выявленные под действием одного или двух исследуемых соединений изменения в экспрессии *BRCA1*, *PGR*, miR-190a, miR-365 и miR-27a были вероятно связаны с антиандрогенными свойствами пестицидов. Кроме этого, было обнаружено, что экспрессия miR-190a под действием п,п'-ДДТ увеличивается также в MDA-MB-231 клетках и в молочной железе самок крыс, подвергнутых хроническому действию пестицида, что указывает на существование AR-независимого 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*.

В основном выявленные изменения в экспрессии мишеней пестицидов были аналогичны изменениям, которые, как ранее было продемонстрировано, сопутствуют канцерогенезу. Так, о,п'-ДДТ приводил к снижению экспрессии опухолевых супрессоров BRCA1, TP53INP1, APAF1, miR-190a, и в то же время к увеличению экспрессии онкогенов CCND1, VEGFA. Под действием п,п'-ДДТ снижалась экспрессия опухолевых супрессоров BRCA1, TP53INP1, APAF1 и увеличивалась экспрессия VEGFA, miR-27a, miR-19b, ДЛЯ которых ранее были продемонстрированы онкогенные функции. С использованием образцов РМЖ 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 была 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 развитии и/или прогрессии рака молочной железы.

ВЫВОДЫ

- 1. Обработка клеток МСF-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 МСF-7 эффекты Π,Π' -ДДТ и/или $0,\Pi'$ -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 ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДГТ – дигитротестостерон

ДДТ – дихлордифенилтрихлорэтан

ДДЭ – дихлордифенилдихлорэтилен

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дцРНК – двухцепочечная РНК

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

РМЖ – рак молочной железы

РНК – рибонуклеиновая кислота

ХОП – хлорорганические пестициды

ч – час

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

APAF1 – apoptotic protease activating factor 1; фактор актавации апоптотической протеазы 1

AR – androgen receptor; андрогеновый рецептор

BAX – Bcl-2 associated X-protein; X-белок, ассоциированный с апоптотическим регулятором Bcl-2

BRCA1 – breast cancer 1; ген рака молочной железы

CCND1 – cyclin D1; циклин D1

ChiP – иммунопреципитации хроматина

ChIP-seq – метод анализа ДНК-белковых взаимодействий, основанный на иммунопреципитации хроматина (ChiP) и секвенировании (seq) ДНК

Е2 – эстрадиол

ER – estrogen receptor; эстрогеновый рецептор

ERE – estrogen response element; элемент ответа на эстроген

HER2 – human epidermal growth factor receptor 2; рецептор эпидермального фактора роста, тип 2

hsp – heat shock protein; белок теплового шока

MCF-7 — эпителиоподобная клеточная линия, образуемая клетками аденокарциномы протоков молочной железы человека

MDA-MB-231 — эпителиальная клеточная линия трижды-негативного рака молочной железы miRNA, miR — микроРНК

Р4 – прогестерон

РНГРР1 – протеинфосфатаза

PR, PGR – progesterone receptor; прогестероновый рецептор

PTEN – гомолог фосфатазы и тензина

PTPRS — protein tyrosine phosphatase receptor type S; протеиновая тирозинфосфатаза, рецепторный тип S

PVDF – polyvinylidene fluoride; поливинилиденфторид

STC2 – stanniocalcin 2; станниокальцин 2

TP53INP1 – tumor protein p53-inducible nuclear protein 1; ядерный белок 1, индуцируемый опухолевым белком p53

TRPS1 – транскрипционный репрессор

UTR – untranslated region, нетранслируемая область

VEGFA – vascular endothelial growth factor-A; фактор роста эндотелия сосудов-А

XIAP – X-linked inhibitor of apoptosis; X-сцепленный ингибитор апоптоза

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Аушев В.Н. МикроРНК: малые молекулы с большим значением // Клин онкогематология. -2015.-B.1.-C.1-12.
- 2. Ежегодник «Мониторинг пестицидов в объектах природной среды Российской Федерации» // Обнинск: ФГБУ «НПО «Тайфун». 2006–2020. URL: http://www.rpatyphoon.ru/products/pollution-media.php (дата обращения: 12.04.2022).
- 3. О выявлении в почве запрещённого химиката, превышающего допустимую норму в 4 раза // Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор) [электронный ресурс]. 2013. URL: https://fsvps.gov.ru/ru/fsvps/news/6821.html (дата обращения 20.08.2022).
- 4. О выявлении случая опасного мошенничества в области утилизации пестицидов // Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор) [электронный ресурс]. 2011. URL: https://fsvps.gov.ru/ru/fsvps/news/2970.html (дата обращения 20.08.2022).
- 5. О грубых нарушениях земельного законодательства тепличным хозяйством в Новосибирской области // Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор) [электронный ресурс]. 2015. URL: https://fsvps.gov.ru/ru/fsvps/news/15426.html (дата обращения 20.08.2022).
- 6. Abolghasemi M., Tehrani S.S., Yousefi T., Karimian A., Mahmoodpoor A., Ghamari A., Jadidi-Niaragh F., Yousefi M., Kafil H.S., Bastami M., Edalati M., Eyvazi S., Naghizadeh M., Targhazeh N., Yousefi B., Safa A., Majidinia M., Rameshknia V. MicroRNAs in breast cancer: Roles, functions, and mechanism of actions // J Cell Physiol. 2020. V.235. N.6. P.5008–5029. doi: 10.1002/jcp.29396.
- 7. Ahmad A., Zhang W., Wu M., Tan S., Zhu T. Tumor-suppressive miRNA-135a inhibits breast cancer cell proliferation by targeting ELK1 and ELK3 oncogenes // Genes Genomics. 2018. V.40. N.3. P.243–251. doi: 10.1007/s13258-017-0624-6.
- 8. Ahn S., Woo J.W., Lee K., Park S.Y. HER2 status in breast cancer: changes in guidelines and complicating factors for interpretation // J Pathol Transl Med. 2020. V.54. N.1. P.34–44. doi: 10.4132/jptm.2019.11.03.
- 9. Alarcón C.R., Lee H., Goodarzi H., Halberg N., Tavazoie S.F. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing // Nature. 2015. V.519. N.7544. P.482–485. doi: 10.1038/nature14281.

- 10. Ali Syeda Z., Langden S.S.S., Munkhzul C., Lee M., Song S.J. Regulatory mechanism of microRNA expression in cancer // Int J Mol Sci. 2020. V.21. N.5. P.1723. doi: 10.3390/ijms21051723.
- 11. Allemani C., Weir H.K., Carreira H., Harewood R., Spika D., Wang X.S., Bannon F., Ahn J.V., Johnson C.J., Bonaventure A., Marcos-Gragera R., Stiller C., Azevedo e Silva G., Chen W.Q., Ogunbiyi O.J., Rachet B., Soeberg M.J., You H., Matsuda T., Bielska-Lasota M., Storm H., Tucker T.C., Coleman M.P.; CONCORD Working Group. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2) // Lancet. 2015. V.385. N.9972. P.977–1010. doi: 10.1016/S0140-6736(14)62038-9.
- 12. Allemani C., Matsuda T., Di Carlo V., Harewood R., Matz M., Nikšić M., Bonaventure A., Valkov M., Johnson C.J., Estève J., Ogunbiyi O.J., Azevedo E. Silva G., Chen W.Q., Eser S., Engholm G., Stiller C.A., Monnereau A., Woods R.R., Visser O., Lim G.H., Aitken J., Weir H.K., Coleman M.P.; CONCORD Working Group. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries // Lancet. 2018. V.391. N.10125. P.1023–1075. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33326-3.
- 13. Alonso-Trujillo M., Muñiz-González A.B., Martínez-Guitarte J.L. Endosulfan exposure alters transcription of genes involved in the detoxification and stress responses in Physella acuta // Sci Rep. 2020. V.10. N.1. P.7847. doi: 10.1038/s41598-020-64554-8.
- 14. Andersen H.R., Vinggaard A.M., Rasmussen T.H., Gjermandsen I.M., Bonefeld-Jørgensen E.C. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro // Toxicol Appl Pharmacol. 2002. V.179. N.1. P.1–12. doi: 10.1006/taap.2001.9347.
- 15. Ansquer Y., Legrand A., Bringuier A.F., Vadrot N., Lardeux B., Mandelbrot L., Feldmann G. Progesterone induces BRCA1 mRNA decrease, cell cycle alterations and apoptosis in the MCF7 breast cancer cell line // Anticancer Res. 2005. V.25. N.1A. P.243–248.
- 16. Applanat M.P., Buteau-Lozano H., Herve M.A., Corpet A. Vascular endothelial growth factor is a target gene for estrogen receptor and contributes to breast cancer progression // Adv Exp Med Biol. 2008. V.617. P.437–444. doi: 10.1007/978-0-387-69080-3_42.
- 17. Arnal J.F., Lenfant F., Metivier R., Flouriot G., Henrion D., Adlanmerini M., Fontaine C., Gourdy P., Chambon P., Katzenellenbogen B., Katzenellenbogen J. Membrane and nuclear estrogen receptor alpha actions: from tissue specificity to medical implications // Physiol Rev. 2017. V.97. N.3. P.1045–1087. doi: 10.1152/physrev.00024.2016.

- 18. Attaullah M., Yousuf M.J., Shaukat S., Anjum S.I., Ansari M.J., Buneri I.D., Tahir M., Amin M., Ahmad N., Khan S.U. Serum organochlorine pesticides residues and risk of cancer: A case-control study // Saudi J Biol Sci. 2018. V.25. N.7. P.1284–1290. doi: 10.1016/j.sjbs.2017.10.023.
- 19. Bai F., Chan H.L., Scott A., Smith M.D., Fan C., Herschkowitz J.I., Perou C.M., Livingstone A.S., Robbins D.J., Capobianco A.J., Pei X.H. BRCA1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell dedifferentiation during mammary and tumor development // Cancer Res. 2014. V.74. N.21. P.6161–6172. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1119.
- 20. Bajpayee M., Pandey A.K., Zaidi S., Musarrat J., Parmar D., Mathur N., Seth P.K., Dhawan A. DNA damage and mutagenicity induced by endosulfan and its metabolites // Environ Mol Mutagen. 2006. V.47. N.9. P.682–692. doi: 10.1002/em.20255.
- 21. Beg M.S., Brenner A.J., Sachdev J., Borad M., Kang Y.K., Stoudemire J., Smith S., Bader A.G., Kim S., Hong D.S. Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors // Invest New Drugs. 2017. V.35. N.2. P.180—188. doi: 10.1007/s10637-016-0407-y.
- 22. Bentwich I. Prediction and validation of microRNAs and their targets // FEBS Lett. 2005. V.579. N.26. P.5904–5910. doi: 10.1016/j.febslet.2005.09.040.
- 23. Besnier M., Shantikumar S., Anwar M., Dixit P., Chamorro-Jorganes A., Sweaad W., Sala-Newby G., Madeddu P., Thomas A.C., Howard L., Mushtaq S., Petretto E., Caporali A., Emanueli C. miR-15a/-16 inhibit angiogenesis by targeting the Tie2 coding sequence: therapeutic potential of a miR-15a/16 decoy system in Limb Ischemia // Mol Ther Nucleic Acids. 2019. V.17. P.49–62. doi: 10.1016/j.omtn.2019.05.002.
- 24. Bishopp F.C. The Medical and Public Health Importance of the Insecticide DDT // Bull N Y Acad Med. 1945. V.21. N.11. P.561–580.
- 25. Bleak T.C., Calaf G.M. Breast and prostate glands affected by environmental substances (Review) // Oncol Rep. 2021. V.45. N.4. P.20. doi: 10.3892/or.2021.7971.
- 26. Boivin V., Deschamps-Francoeur G., Scott M.S. Protein coding genes as hosts for noncoding RNA expression // Semin Cell Dev Biol. 2018. V.75. P.3–12. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.08.016.
- 27. Bonneau E., Neveu B., Kostantin E., Tsongalis G.J., De Guire V. How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market // EJIFCC. -2019. V.30. N.2. P.114-127.
- 28. Bratton M.R., Frigo D.E., Segar H.C., Nephew K.P., McLachlan J.A., Wiese T.E., Burow M.E. The organochlorine o,p'-DDT plays a role in coactivator-mediated MAPK crosstalk in MCF-7

- breast cancer cells // Environ Health Perspect. 2012. V.120. N.9. P.1291–1296. doi: 10.1289/ehp.1104296.
- 29. Brown V.J. Life after lindane in California // Environ Health Perspect. 2008. V.116. N.3. P.A128. doi: 10.1289/ehp.116-a128a.
- 30. Buonsenso D., Cataldi L. Watch out for malaria: still a leading cause of child death worldwide // Ital J Pediatr. 2010. V.36. P.58. doi: 10.1186/1824-7288-36-58.
- 31. Burow M.E., Tang Y., Collins-Burow B.M., Krajewski S., Reed J.C., McLachlan J.A., Beckman B.S. Effects of environmental estrogens on tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in MCF-7 cells // Carcinogenesis. 1999. V.20. N.11. P.2057–2061. doi: 10.1093/carcin/20.11.2057.
- 32. Cai X., Hagedorn C.H., Cullen B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs // RNA. 2004. V.10. N.12. P.1957–1966. doi: 10.1261/rna.7135204.
- 33. Calaf G.M., Ponce-Cusi R., Aguayo F., Muñoz J.P., Bleak T.C. Endocrine disruptors from the environment affecting breast cancer // Oncol Lett. 2020. V.20. N.1. P.19–32. doi: 10.3892/ol.2020.11566.
- 34. Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C.M. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia // Proc Natl Acad Sci U S A. 2002. V.99. N.24. P.15524–15529. doi: 10.1073/pnas.242606799.
- 35. Carbognin L., Miglietta F., Paris I., Dieci M.V. Prognostic and predictive implications of PTEN in breast cancer: unfulfilled promises but intriguing perspectives // Cancers (Basel). 2019. V.11. N.9. P.1401. doi: 10.3390/cancers11091401.
- 36. Carrizo D., Sobek A., Salvadó J.A., Gustafsson Ö. Spatial distributions of DDTs in the water masses of the Arctic Ocean // Environ Sci Technol. 2017. V.51. N.14. P.7913–7919. doi: 10.1021/acs.est.7b01369.
- 37. Cecil H.C., Bitman J., Harris S.J. Estrogenicity of o,p'-DDT in rats // J Agric Food Chem. 1971. V.19. N.1. P.61–65. doi: 10.1021/jf60173a049.
- 38. Charn T.H., Liu E.T., Chang E.C., Lee Y.K., Katzenellenbogen J.A., Katzenellenbogen B.S. Genome-wide dynamics of chromatin binding of estrogen receptors alpha and beta: mutual restriction and competitive site selection // Mol Endocrinol. 2010. V.24. N.1. P.47–59. doi: 10.1210/me.2009-0252.
- 39. Chegini N. Uterine microRNA signature and consequence of their dysregulation in uterine disorders // Anim Reprod. -2010. V.7. N.3. P.117-128.

- 40. Chen C.W., Hurd C., Vorojeikina D.P., Arnold S.F., Notides A.C. Transcriptional activation of the human estrogen receptor by DDT isomers and metabolites in yeast and MCF-7 cells // Biochem Pharmacol. 1997. V.53. N.8. P.1161–1172. doi: 10.1016/s0006-2952(97)00097-x.
- 41. Chen C., Ridzon D.A., Broomer A.J., Zhou Z., Lee D.H., Nguyen J.T., Barbisin M., Xu N.L., Mahuvakar V.R., Andersen M.R., Lao K.Q., Livak K.J., Guegler K.J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // Nucleic Acids Res. 2005. V.33. N.20. P.e179. doi: 10.1093/nar/gni178.
- 42. Chen T. The role of MicroRNA in chemical carcinogenesis // J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 2010. V.28. N.2. P.89–124. doi: 10.1080/10590501.2010.481477.
- 43. Chen Y., Zhang J., Wang H., Zhao J., Xu C., Du Y., Luo X., Zheng F., Liu R., Zhang H., Ma D. miRNA-135a promotes breast cancer cell migration and invasion by targeting HOXA10 // BMC Cancer. 2012. V.12. P.111. doi: 10.1186/1471-2407-12-111.
- 44. Chen M., Yang Y., Xu K., Li L., Huang J., Qiu F. Androgen receptor in breast cancer: from bench to bedside // Front Endocrinol (Lausanne). 2020. V.11. P.573. doi: 10.3389/fendo.2020.00573.
- 45. Chen W., Zeng F., Liu W., Bu J., Hu G., Xie S., Yao H., Zhou H., Qi S., Huang H. Organochlorine pesticides in karst soil: levels, distribution, and source diagnosis // Int J Environ Res Public Health. 2021. V.18. N.21. P.11589. doi: 10.3390/ijerph182111589.
- 46. Chen L., Qian Y., Jia Q., Weng R., Zhang X., Li Y., Qiu J. A large geographic-scale characterization of organochlorine pesticides (OCPs) in surface sediments and multiple aquatic foods of inland freshwater aquaculture ponds in China: Co-occurrence, source and risk assessment // Environ Pollut. 2022. V.308. P.119716. doi: 10.1016/j.envpol.2022.119716.
- 47. Cheng R., Qi L., Kong X., Wang Z., Fang Y., Wang J. Identification of the significant genes regulated by estrogen receptor in estrogen receptor-positive breast cancer and their expression pattern changes when tamoxifen or fulvestrant resistance occurs // Front Genet. 2020. V.11. P.538734.
- 48. Chu H.W., Cheng C.W., Chou W.C., Hu L.Y., Wang H.W., Hsiung C.N., Hsu H.M., Wu P.E., Hou M.F., Shen C.Y., Yu J.C. A novel estrogen receptor-microRNA 190a-PAR-1-pathway regulates breast cancer progression, a finding initially suggested by genome-wide analysis of loci associated with lymph-node metastasis // Hum Mol Genet. 2014. V.23. N.2. P.355–367. doi: 10.1093/hmg/ddt426.
- 49. Cicatiello L., Addeo R., Sasso A., Altucci L., Petrizzi V.B., Borgo R., Cancemi M., Caporali S., Caristi S., Scafoglio C., Teti D., Bresciani F., Perillo B., Weisz A. Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional

- derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter // Mol Cell Biol. -2004. V.24. N.16. P.7260-7274. doi: 10.1128/MCB.24.16.7260-7274.2004.
- 50. Cimmino A., Calin G.A., Fabbri M., Iorio M.V., Ferracin M., Shimizu M., Wojcik S.E., Aqeilan R.I., Zupo S., Dono M., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu C.G., Kipps T.J., Negrini M., Croce C.M. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 // Proc Natl Acad Sci U S A. 2005. V.102. N.39. P.13944–13949. doi: 10.1073/pnas.0506654102.
- 51. Cizeron-Clairac G., Lallemand F., Vacher S., Lidereau R., Bieche I., Callens C. MiR-190b, the highest up-regulated miRNA in ERα-positive compared to ERα-negative breast tumors, a new biomarker in breast cancers? BMC Cancer. 2015. V.15. P.499. doi: 10.1186/s12885-015-1505-5.
- 52. Cohn B.A., Wolff M.S., Cirillo P.M., Sholtz R.I. DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure // Environ Health Perspect. 2007. V.115. N.10. P.1406–1414. doi: 10.1289/ehp.10260.
- 53. Colborn T., Clement C. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection // Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing Co. 1992.
- 54. Conis E. Debating the health effects of DDT: Thomas Jukes, Charles Wurster, and the fate of an environmental pollutant // Public Health Rep. 2010. V.125. N.2. P.337–342. doi: 10.1177/003335491012500224.
- 55. Conrad T., Ntini E., Lang B., Cozzuto L., Andersen J.B., Marquardt J.U., Ponomarenko J., Tartaglia G.G., Vang Ørom U.A. Determination of primary microRNA processing in clinical samples by targeted pri-miR-sequencing // RNA. 2020. V.26. N.11. P.1726–1730. doi: 10.1261/rna.076240.120.
- 56. Costet N., Pelé F., Comets E., Rouget F., Monfort C., Bodeau-Livinec F., Linganiza E.M., Bataille H., Kadhel P., Multigner L., Cordier S. Perinatal exposure to chlordecone and infant growth // Environ Res. 2015. V.142. P.123–134. doi: 10.1016/j.envres.2015.06.023.
- 57. Crippa E., Lusa L., De Cecco L., Marchesi E., Calin G.A., Radice P., Manoukian S., Peissel B., Daidone M.G., Gariboldi M., Pierotti M.A. miR-342 regulates BRCA1 expression through modulation of ID4 in breast cancer // PLoS One. 2014. V.9. N.1. P.e87039. doi: 10.1371/journal.pone.0087039.
- 58. Dai W., He J., Zheng L., Bi M., Hu F., Chen M., Niu H., Yang J., Luo Y., Tang W., Sheng M. miR-148b-3p, miR-190b, and miR-429 regulate cell progression and act as potential biomarkers for breast cancer // J Breast Cancer. 2019. V.22. N.2. P.219–236. doi: 10.4048/jbc.2019.22.e19.

- 59. Daniel A.R., Hagan C.R., Lange C.A. Progesterone receptor action: defining a role in breast cancer // Expert Rev Endocrinol Metab. 2011. V.6. N.3. P.359–369. doi: 10.1586/eem.11.25.
- 60. Davignon L.F., St-Pierre J., Charest G., Tourangeau F.J. A study of the chronic effects of insecticides in man // Can Med Assoc J. 1965. V.92. N.12. P.597–602.
- 61. Dayakar M.M., Shivprasad D., Dayakar A., Deepthi C.A. Assessment of oral health status among endosulfan victims in endosulfan relief and remediation cell A cross-sectional survey // J Indian Soc Periodontol. 2015. V.19. N.6. P.709–711. doi: 10.4103/0972-124X.156869.
- 62. De Jager C., Farias P., Barraza-Villarreal A., Avila M.H., Ayotte P., Dewailly E., Dombrowski C., Rousseau F., Sanchez V.D., Bailey J.L. Reduced seminal parameters associated with environmental DDT exposure and p,p'-DDE concentrations in men in Chiapas, Mexico: a cross-sectional study // J Androl. 2006. V.27. N.1. P.16–27. doi: 10.2164/jandrol.05121.
- 63. Diel P., Olff S., Schmidt S., Michna H. Effects of the environmental estrogens bisphenol A, o,p'-DDT, p-tert-octylphenol and coumestrol on apoptosis induction, cell proliferation and the expression of estrogen sensitive molecular parameters in the human breast cancer cell line MCF-7 // J Steroid Biochem Mol Biol. 2002. V.80. N.1. P.61–70. doi: 10.1016/s0960-0760(01)00173-x.
- 64. Diep C.H., Ahrendt H., Lange C.A. Progesterone induces progesterone receptor gene (PGR) expression via rapid activation of protein kinase pathways required for cooperative estrogen receptor alpha (ER) and progesterone receptor (PR) genomic action at ER/PR target genes // Steroids. 2016. V.114. P.48–58. doi: 10.1016/j.steroids.2016.09.004.
- 65. Du Y., Grandis J.R. Receptor-type protein tyrosine phosphatases in cancer // Chin J Cancer. 2015. V.34. N.2. P.61–69. doi: 10.5732/cjc.014.10146.
- 66. Duffy M.J. Estrogen receptors: role in breast cancer // Crit Rev Clin Lab Sci. 2006. V.43. N.4. P.325–347. doi: 10.1080/10408360600739218.
- 67. Edmundson W.F., Davies J.E., Nachman G.A., Roeth R.L. P,p'-DDT and p,p'-DDE in blood samples of occupationally exposed workers // Public Health Rep. 1969. V.84. N.1. P.53–58.
- 68. Egan H., Goulding R., Roburn J., O'G. Tatton J. Organo-chlorine pesticide residues in human fat and human milk // Br Med J. -1965. -V.2. -N.5453. -P.66-69.
- 69. Eisermann K., Broderick C.J., Bazarov A., Moazam M.M., Fraizer G.C. Androgen upregulates vascular endothelial growth factor expression in prostate cancer cells via an Sp1 binding site // Mol Cancer. 2013. V.12. P.7. doi: 10.1186/1476-4598-12-7.
- 70. Elsheikh S., Green A.R., Aleskandarany M.A., Grainge M., Paish C.E., Lambros M.B., Reis-Filho J.S., Ellis I.O. CCND1 amplification and cyclin D1 expression in breast cancer and their

- relation with proteomic subgroups and patient outcome // Breast Cancer Res Treat. -2008. V.109. V.2. P.325-335. doi: 10.1007/s10549-007-9659-8.
- 71. Falck F. Jr., Ricci A. Jr., Wolff M.S., Godbold J., Deckers P. Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer // Arch Environ Health. 1992. V.47. N.2. P.143–146.
- 72. Farooq A. Structural and functional diversity of estrogen receptor ligands // Curr Top Med Chem. 2015. V.15. N.14. P.1372–1384. doi: 10.2174/1568026615666150413154841.
- 73. Filipowicz W., Bhattacharyya S.N., Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? // Nat Rev Genet. 2008. V.9. N.2. P.102–114. doi: 10.1038/nrg2290.
- 74. Fliss A.E., Benzeno S., Rao J., Caplan A.J. Control of estrogen receptor ligand binding by Hsp90 // J Steroid Biochem Mol Biol. 2000. V.72. N.5. P.223–230. doi: 10.1016/s0960-0760(00)00037-6.
- 75. Fornari F., Gramantieri L., Ferracin M., Veronese A., Sabbioni S., Calin G.A., Grazi G.L., Giovannini C., Croce C.M., Bolondi L., Negrini M. MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma // Oncogene. 2008. V.27. N.43. P.5651–5661. doi: 10.1038/onc.2008.178.
- 76. Foster J.S., Wimalasena J. Estrogen regulates activity of cyclin-dependent kinases and retinoblastoma protein phosphorylation in breast cancer cells. Mol Endocrinol // 1996. V.10. N.5. P.488-498. doi: 10.1210/mend.10.5.8732680.
- 77. Frigo D.E., Burow M.E., Mitchell K.A., Chiang T.C., McLachlan J.A. DDT and its metabolites alter gene expression in human uterine cell lines through estrogen receptor-independent mechanisms // Environ Health Perspect. 2002. V.110. N.12. P.1239–1245. doi: 10.1289/ehp.021101239.
- 78. Fromm B., Billipp T., Peck L.E., Johansen M., Tarver J.E., King B.L., Newcomb J.M., Sempere L.F., Flatmark K., Hovig E., Peterson K.J. A uniform system for the annotation of vertebrate microRNA genes and the evolution of the human microRNAome // Annu Rev Genet. 2015. V.49. P.213—242. doi: 10.1146/annurev-genet-120213-092023.
- 79. Fucic A., Gamulin M., Ferencic Z., Katic J., Krayer von Krauss M., Bartonova A., Merlo D.F. Environmental exposure to xenoestrogens and oestrogen related cancers: reproductive system, breast, lung, kidney, pancreas, and brain // Environ Health. 2012. V.11. Suppl 1. P.S8. doi: 10.1186/1476-069X-11-S1-S8.
- 80. Fuckar D., Dekanić A., Stifter S., Mustać E., Krstulja M., Dobrila F., Jonjić N. VEGF expression is associated with negative estrogen receptor status in patients with breast cancer // Int J Surg Pathol. 2006. V.14. N.1. P.49–55. doi: 10.1177/106689690601400109.

- 81. Fuentes N., Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms // Adv Protein Chem Struct Biol. 2019. V.116. P.135–170. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.01.001.
- 82. Garzon R., Marcucci G., Croce C.M. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges // Nat Rev Drug Discov. 2010. V.9. N.10. P.775–789. doi: 10.1038/nrd3179.
- 83. Ghosh K., Chatterjee B., Jayaprasad A.G., Kanade S.R. The persistent organochlorine pesticide endosulfan modulates multiple epigenetic regulators with oncogenic potential in MCF-7 cells // Sci Total Environ. 2018. V.624. P.1612–1622. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.058.
- 84. Giza D.E., Vasilescu C., Calin G.A. Key principles of miRNA involvement in human diseases // Discoveries (Craiova). 2014. V.2. N.4. P.e34. doi: 10.15190/d.2014.26.
- 85. Gold E.B. The timing of the age at which natural menopause occurs // Obstet Gynecol Clin North Am. 2011. V.38. N.3. P.425–440. doi: 10.1016/j.ogc.2011.05.002.
- 86. Goldhirsch A., Wood W.C., Coates A.S., Gelber R.D., Thürlimann B., Senn H.J.; Panel members. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. // Ann Oncol. 2011. V.22. N.8. P.1736–1747. doi: 10.1093/annonc/mdr304.
- 87. Goldhirsch A., Winer E.P., Coates A.S., Gelber R.D., Piccart-Gebhart M., Thürlimann B., Senn H.J.; Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013 // Ann Oncol. 2013. V.24. N.9. P. 2206–2223. doi: 10.1093/annonc/mdt303.
- 88. Gonsioroski A., Mourikes V.E., Flaws J.A. Endocrine disruptors in water and their effects on the reproductive system // Int J Mol Sci. 2020. V.21. N.6. P.1929. doi: 10.3390/ijms21061929.
- 89. Gray J.M., Rasanayagam S., Engel C., Rizzo J. State of the evidence 2017: an update on the connection between breast cancer and the environment // Environ Health. -2017.-V.16.-N.1.-P.94. doi: 10.1186/s12940-017-0287-4.
- 90. Gude D., Bansal D.P. Revisiting endosulfan // J Family Med Prim Care. 2012. V.1. N.1. P.76–78. doi: 10.4103/2249-4863.94460.
- 91. Gupta A., Caffrey E., Callagy G., Gupta S. Oestrogen-dependent regulation of miRNA biogenesis: many ways to skin the cat // Biochem Soc Trans. 2012. V.40. N.4. P.752–758. doi: 10.1042/BST20110763.
- 92. Ha M., Kim V.N. Regulation of microRNA biogenesis // Nat Rev Mol Cell Biol. 2014. V.15. N.8. P.509–524. doi: 10.1038/nrm3838.
- 93. Han E.H., Kim J.Y., Kim H.K., Hwang Y.P., Jeong H.G. o,p'-DDT induces cyclooxygenase-2 gene expression in murine macrophages: Role of AP-1 and CRE promoter elements

- and PI3-kinase/Akt/MAPK signaling pathways // Toxicol Appl Pharmacol. 2008. V.233. N.2. P.333–342. doi: 10.1016/j.taap.2008.09.003.
- 94. Harmonizome [Электронный ресурс]. URL: https://maayanlab.cloud/Harmonizome/ (дата обращения: 05.12.2021).
- 95. Harvey J.M., Clark G.M., Osborne C.K., Allred D.C. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer // J Clin Oncol. 1999. V.17. N.5. P.1474–1481. doi: 10.1200/JCO.1999.17.5.1474.
- 96. He Y.J., Wu J.Z., Ji M.H., Ma T., Qiao E.Q., Ma R., Tang J.H. miR-342 is associated with estrogen receptor-α expression and response to tamoxifen in breast cancer // Exp Ther Med. 2013. V.5. N.3. P.813–818. doi: 10.3892/etm.2013.915.
- 97. Heldring N., Pike A., Andersson S., Matthews J., Cheng G., Hartman J., Tujague M., Ström A., Treuter E., Warner M., Gustafsson J.A. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets // Physiol Rev. 2007. V.87. N.3. P.905–931. doi: 10.1152/physrev.00026.2006.
- 98. Héry C., Ferlay J., Boniol M., Autier P. Changes in breast cancer incidence and mortality in middle-aged and elderly women in 28 countries with Caucasian majority populations // Ann Oncol. 2008. V.19. N.5. P.1009–1018. doi: 10.1093/annonc/mdm593.
- 99. Hollern D.P., Swiatnicki M.R., Rennhack J.P., Misek S.A., Matson B.C., McAuliff A., Gallo K.A., Caron K.M., Andrechek E.R. E2F1 drives breast cancer metastasis by regulating the target gene FGF13 and altering cell migration // Sci Rep. 2019. V.9. N.1. P.10718. doi: 10.1038/s41598-019-47218-0.
- 100. Holloway A.C., Petrik J.J., Younglai E.V. Influence of dichlorodiphenylchloroethylene on vascular endothelial growth factor and insulin-like growth factor in human and rat ovarian cells // Reprod Toxicol. 2007. V.24. N.3–4. P.359–364. doi: 10.1016/j.reprotox.2007.05.003.
- 101. Hong D.S., Kang Y.K., Borad M., Sachdev J., Ejadi S., Lim H.Y., Brenner A.J., Park K., Lee J.L., Kim T.Y., Shin S., Becerra C.R., Falchook G., Stoudemire J., Martin D., Kelnar K., Peltier H., Bonato V., Bader A.G., Smith S., Kim S., O'Neill V., Beg M.S. Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours // Br J Cancer. 2020. V.122. N.11. P.1630–1637. doi: 10.1038/s41416-020-0802-1.
- 102. Hoppin J.A., Tolbert P.E., Holly E.A., Brock J.W., Korrick S.A., Altshul L.M., Zhang R.H., Bracci P.M., Burse V.W., Needham L.L. Pancreatic cancer and serum organochlorine levels // Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2000. V.9. N.2. P.199–205
- 103. Hou J., Wang Z., Xu H., Yang L., Yu X., Yang Z., Deng Y., Meng J., Feng Y., Guo X., Yang G. Stanniocalicin 2 suppresses breast cancer cell migration and invasion via the PKC/claudin-1-

- mediated signaling // PLoS One. 2015. V.10. N.4. P.e0122179. doi: 10.1371/journal.pone.0122179.
- 104. Hua K., Jin J., Zhao J., Song J., Song H., Li D., Maskey N., Zhao B., Wu C., Xu H., Fang L. miR-135b, upregulated in breast cancer, promotes cell growth and disrupts the cell cycle by regulating LATS2 // Int J Oncol. 2016. V.48. N.5. P.1997–2006. doi: 10.3892/ijo.2016.3405.
- 105. Hunter C.G., Robinson J., Richardson A. Chlorinated insecticide content of human body fat in Southern England // Br Med J. 1963. V.1. N.5325. P.221–224. doi: 10.1136/bmj.1.5325.221.
- 106. Hussain A.R., Siraj A.K., Ahmed M., Bu R., Pratheeshkumar P., Alrashed A.M., Qadri Z., Ajarim D., Al-Dayel F., Beg S., Al-Kuraya K.S. XIAP over-expression is an independent poor prognostic marker in Middle Eastern breast cancer and can be targeted to induce efficient apoptosis // BMC Cancer. 2017. V.17. N.1. P.640. doi: 10.1186/s12885-017-3627-4.
- 107. Izzotti A., Calin G.A., Arrigo P., Steele V.E., Croce C.M., De Flora S. Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke // FASEB J. 2009. V.23. N.3. P.806–812. doi: 10.1096/fj.08-121384.
- 108. Jaga K. What are the implications of the interaction between DDT and estrogen receptors in the body? // Med Hypotheses. -2000. V.54. N.1. P.18-25. doi: 10.1054/mehy.1998.0811.
- 109. Järvinen T.A., Pelto-Huikko M., Holli K., Isola J. Estrogen receptor beta is coexpressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer // Am J Pathol. 2000. V.156. N.1. P.29–35. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64702-5.
- 110. Jayaraj R., Megha P., Sreedev P. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment // Interdiscip Toxicol. -2016. -V.9. -N.3-4. -P.90-100. doi: 10.1515/intox-2016-0012.
- 111. Jeffy B.D., Hockings J.K., Kemp M.Q., Morgan S.S., Hager J.A., Beliakoff J., Whitesell L.J., Bowden G.T., Romagnolo D.F. An estrogen receptor-alpha/p300 complex activates the BRCA-1 promoter at an AP-1 site that binds Jun/Fos transcription factors: repressive effects of p53 on BRCA-1 transcription // Neoplasia. 2005. V.7. N.9. P.873–882. doi: 10.1593/neo.05256.
- 112. Jeyaratnam J., Forshaw P.J. A study of the cardiac effects of DDT in laboratory animals // Bull World Health Organ. 1974. V.51. N.5. P.531–535.
- 113. Jiang C.F., Shi Z.M., Li D.M., Qian Y.C., Ren Y., Bai X.M., Xie Y.X., Wang L., Ge X., Liu W.T., Zhen L.L., Liu L.Z., Jiang B.H. Estrogen-induced miR-196a elevation promotes tumor growth and metastasis via targeting SPRED1 in breast cancer // Mol Cancer. 2018 V.17. N.1. P.83. doi: 10.1186/s12943-018-0830-0.

- 114. Jiang S.T., Wang H.Q., Yang T.C., Wang D.W., Yang L.J., Xi Y.Q., Kong F.Z., Pan X.K., Xu L.H., Feng M.H., Xie W., Su F. Expression of stanniocalcin 2 in breast cancer and its clinical significance // Curr Med Sci. 2019. V.39. N.6. P.978–983. doi: 10.1007/s11596-019-2131-2.
- 115. Jiang D., Zhou B., Xiong Y., Cai H. miR-135 regulated breast cancer proliferation and epithelial-mesenchymal transition acts by the Wnt/ β -catenin signaling pathway // Int J Mol Med. 2019. V.43. N.4. P.1623–1634. doi: 10.3892/ijmm.2019.4081.
- 116. Jin L., Tran D.Q., Ide C.F., McLachlan J.A., Arnold S.F. Several synthetic chemicals inhibit progesterone receptor-mediated transactivation in yeast // Biochem Biophys Res Commun. 1997. V.233. N.1. P.139–146. doi: 10.1006/bbrc.1997.6417.
- 117. Joko-Fru W.Y., Miranda-Filho A., Soerjomataram I., Egue M., Akele-Akpo M.T., N'da G., Assefa M., Buziba N., Korir A., Kamate B., Traore C., Manraj S., Lorenzoni C., Carrilho C., Hansen R., Finesse A., Somdyala N., Wabinga H., Chingonzoh T., Borok M., Chokunonga E., Liu B., Kantelhardt E., McGale P., Parkin D.M. Breast cancer survival in sub-Saharan Africa by age, stage at diagnosis and human development index: A population-based registry study // Int J Cancer. 2020. V.146. N.5. P.1208–1218. doi: 10.1002/ijc.32406.
- 118. Kalscheuer S., Zhang X., Zeng Y., Upadhyaya P. Differential expression of microRNAs in early-stage neoplastic transformation in the lungs of F344 rats chronically treated with the tobacco carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone // Carcinogenesis. 2008. V.29. N.12. P.2394–2399. doi: 10.1093/carcin/bgn209.
- 119. Kang S., Kim E.O., Kim S.H., Lee J.H., Ahn K.S., Yun M., Lee S.G. Morusin induces apoptosis by regulating expression of Bax and Survivin in human breast cancer cells // Oncol Lett. 2017. V.13. N.6. P.4558–4562. doi: 10.3892/ol.2017.6006.
- 120. Karaayvaz M., Zhang C., Liang S., Shroyer K.R., Ju J. Prognostic significance of miR-205 in endometrial cancer // PLoS One. 2012. V.7. N.4. P.e35158. doi: 10.1371/journal.pone.0035158.
- 121. Kataoka R. Biodegradability and biodegradation pathways of chlorinated cyclodiene insecticides by soil fungi // J Pestic Sci. -2018.-V.43.-N.4.-P.314-320. doi: 10.1584/jpestics.J18-03.
- 122. Kaur N., Swain S.K., Banerjee B.D., Sharma T., Krishnalata T. Organochlorine pesticide exposure as a risk factor for breast cancer in young Indian women: A case-control study // South Asian J Cancer. 2019. V.8. N.4. P.212–214. doi: 10.4103/sajc.sajc_427_18.
- 123. Kelce W.R., Stone C.R., Laws S.C., Gray L.E., Kemppainen J.A., Wilson E.M. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist // Nature. 1995. V.375. N.6532. P.581–585. doi: 10.1038/375581a0.

- 124. Kerdivel G., Habauzit D., Pakdel F. Assessment and molecular actions of endocrine-disrupting chemicals that interfere with estrogen receptor pathways // Int J Endocrinol. 2013. V.2013. P.501851. doi: 10.1155/2013/501851.
- 125. Khalid A.B., Krum S.A. Estrogen receptors alpha and beta in bone // Bone. 2016. V.87. P.130–135. doi: 10.1016/j.bone.2016.03.016.
- 126. Kim M., Jang K., Miller P., Picon-Ruiz M., Yeasky T.M., El-Ashry D., Slingerland J.M. VEGFA links self-renewal and metastasis by inducing Sox2 to repress miR-452, driving Slug // Oncogene. 2017. V.36. N.36. P.5199–5211. doi: 10.1038/onc.2017.4.
- 127. Klinčić D., Herceg Romanić S., Matek Sarić M., Grzunov J., Dukić B. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human milk samples from two regions in Croatia // Environ Toxicol Pharmacol. 2014. V.37. N.2. P.543–552. doi: 10.1016/j.etap.2014.01.009.
- 128. Klinge C.M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements // Nucleic Acids Res. 2001. V.29. N.14. P.2905–2919. doi: 10.1093/nar/29.14.2905.
- 129. Klotz D.M., Beckman B.S., Hill S.M., McLachlan J.A., Walters M.R., Arnold S.F. Identification of environmental chemicals with estrogenic activity using a combination of in vitro assays // Environ Health Perspect. 1996. V.104. N.10. P.1084–1089. doi: 10.1289/ehp.961041084.
- 130. Klotz D.M., Ladlie B.L., Vonier P.M., McLachlan J.A., Arnold S.F. o,p'-DDT and its metabolites inhibit progesterone-dependent responses in yeast and human cells // Mol Cell Endocrinol. 1997. V.129. N.1. P.63–71. doi: 10.1016/s0303-7207(96)04041-5.
- 131. Kojima H., Katsura E., Takeuchi S., Niiyama K., Kobayashi K. Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells // Environ Health Perspect. 2004. V.112. N.5. P.524–531. doi: 10.1289/ehp.6649.
- 132. Konst H., Plummer P.J. Studies on the toxity of DDT // Can J Comp Med Vet Sci. 1946. V.10. N.5. P.128–136.
- 133. Kostka G., Urbanek-Olejnik K., Liszewska M., Winczura A. The effect of acute dichlorodiphenyltrichloroethane exposure on hypermethylation status and down-regulation of p53 and p16INK4a genes in rat liver // Environ Toxicol. 2016. V.31. N.5. P.584–592. doi: 10.1002/tox.22071.
- 134. Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data // Nucleic Acids Res. 2011. V.39(Database issue). P.D152–157. doi: 10.1093/nar/gkq1027.
- 135. Krauskopf J., Caiment F., van Veldhoven K., Chadeau-Hyam M., Sinharay R., Chung K.F., Cullinan P., Collins P., Barratt B., Kelly F.J., Vermeulen R., Vineis P., de Kok T.M., Kleinjans

- J.C. The human circulating miRNome reflects multiple organ disease risks in association with short-term exposure to traffic-related air pollution // Environ Int. 2018. V.113. P.26–34. doi: 10.1016/j.envint.2018.01.014.
- 136. Kucuker H., Sahin O., Yavuz Y., Yürümez Y. Fatal acute endosulfan toxicity: a case report // Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2009. V.104. N.1. P.49–51. doi: 10.1111/j.1742-7843.2008.00216.x.
- 137. Kuhn D.E., Martin M.M., Feldman D.S., Terry A.V. Jr., Nuovo G.J., Elton T.S. Experimental validation of miRNA targets // Methods. 2008. V.44. N.1. P.47–54. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.09.005.
- 138. Kumar R., Zakharov M.N., Khan S.H., Miki R., Jang H., Toraldo G., Singh R., Bhasin S., Jasuja R. The dynamic structure of the estrogen receptor // J Amino Acids. 2011. V.2011. P.812540. doi: 10.4061/2011/812540.
- 139. Kunc M., Popęda M., Biernat W., Senkus E. Lost but not least-novel insights into progesterone receptor loss in estrogen receptor-positive breast cancer // Cancers (Basel). 2021. V.13. N.19. P.4755. doi: 10.3390/cancers13194755.
- 140. Kurozumi S., Yamaguchi Y., Kurosumi M., Ohira M., Matsumoto H., Horiguchi J. Recent trends in microRNA research into breast cancer with particular focus on the associations between microRNAs and intrinsic subtypes // J Hum Genet. 2017. V.62. N.1. P.15–24. doi: 10.1038/jhg.2016.89.
- 141. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V.227. N.5259. P.680–685. doi: 10.1038/227680a0.
- 142. Lanzino M., Sisci D., Morelli C., Garofalo C., Catalano S., Casaburi I., Capparelli C., Giordano C., Giordano F., Maggiolini M., Andò S. Inhibition of cyclin D1 expression by androgen receptor in breast cancer cells--identification of a novel androgen response element // Nucleic Acids Res. 2010. V.38. N.16. P.5351–5365. doi: 10.1093/nar/gkq278.
- 143. LaPensee E.W., Ben-Jonathan N. Novel roles of prolactin and estrogens in breast cancer: resistance to chemotherapy // Endocr Relat Cancer. 2010. V.17. N.2. P.R91–107. doi: 10.1677/ERC-09-0253.
- 144. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14 // Cell. 1993. V.75. N.5. P.843–854. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.
- 145. Lee H.R., Kim T.H., Choi K.C. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, $ER\alpha$ and $ER\beta$, identified by estrogen receptor knockout mouse // Lab Anim Res. 2012. V.28. N.2. P.71-76. doi: 10.5625/lar.2012.28.2.71.

- 146. Lee I., Eriksson P., Fredriksson A., Buratovic S., Viberg H. Developmental neurotoxic effects of two pesticides: Behavior and neuroprotein studies on endosulfan and cypermethrin // Toxicology. 2015. V.335. P.1–10. doi: 10.1016/j.tox.2015.06.010.
- 147. Leivonen S.K., Sahlberg K.K., Mäkelä R., Due E.U., Kallioniemi O., Børresen-Dale A.L., Perälä M. High-throughput screens identify microRNAs essential for HER2 positive breast cancer cell growth // Mol Oncol. 2014. V.8. N.1. P.93–104. doi: 10.1016/j.molonc.2013.10.001.
- 148. Leygue E., Murphy L.C. A bi-faceted role of estrogen receptor β in breast cancer // Endocr Relat Cancer. 2013. V.20. N.3. P.R127–139. doi: 10.1530/ERC-12-0389.
- 149. Li Y.F., Zhulidov A.V., Robarts R.D., Korotova L.G., Zhulidov D.A., Gurtovaya T.Y., Ge L.P. Dichlorodiphenyltrichloroethane usage in the former Soviet Union // Sci Total Environ. 2006. V.357. N.1–3. P.138–145. doi: 10.1016/j.scitotenv.2005.06.009.
- 150. Li J., Li N., Ma M., Giesy J.P., Wang Z. In vitro profiling of the endocrine disrupting potency of organochlorine pesticides // Toxicol Lett. 2008. V.183. N.1–3. P.65–71. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.10.002.
- 151. Li X., Liu X., Xu W., Zhou P., Gao P., Jiang S., Lobie P.E., Zhu T. c-MYC-regulated miR-23a/24-2/27a cluster promotes mammary carcinoma cell invasion and hepatic metastasis by targeting Sprouty2 // J Biol Chem. 2013. V.288. N.25. P.18121–18133. doi: 10.1074/jbc.M113.478560.
- 152. Li M., Liu L., Zang W., Wang Y., Du Y., Chen X., Li P., Li J., Zhao G. miR-365 overexpression promotes cell proliferation and invasion by targeting ADAMTS-1 in breast cancer // Int J Oncol. 2015. V.47. N.1. P.296–302. doi: 10.3892/ijo.2015.3015.
- 153. Li J., Hu K., Gong G., Zhu D., Wang Y., Liu H., Wu X. Upregulation of MiR-205 transcriptionally suppresses SMAD4 and PTEN and contributes to human ovarian cancer progression // Sci Rep. 2017. V.7. P.41330. doi: 10.1038/srep41330.
- 154. Li C., Zhang J., Ma Z., Zhang F., Yu W. miR-19b serves as a prognostic biomarker of breast cancer and promotes tumor progression through PI3K/AKT signaling pathway // Onco Targets Ther. 2018. V.11. P.4087–4095. doi: 10.2147/OTT.S171043.
- 155. Li M., Huo X., Davuljigari C.B., Dai Q., Xu X. MicroRNAs and their role in environmental chemical carcinogenesis // Environ Geochem Health. 2019. V.41. N.1. P.225–247. doi: 10.1007/s10653-018-0179-8.
- 156. Liang Y., Brekken R.A., Hyder S.M. Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones // Endocr Relat Cancer. 2006. V.13. N.3. P.905–919. doi: 10.1677/erc.1.01221.

- 157. Liu Z.L., Bi X.W., Liu P.P., Lei D.X., Wang Y., Li Z.M., Jiang W.Q., Xia Y. Expressions and prognostic values of the E2F transcription factors in human breast carcinoma // Cancer Manag Res. 2018. V.10. P.3521–3532. doi: 10.2147/CMAR.S172332.
- 158. Loh H.Y., Norman B.P., Lai K.S., Rahman N.M.A.N.A., Alitheen N.B.M., Osman M.A. The regulatory role of microRNAs in breast cancer // Int J Mol Sci. 2019. V.20. N.19. P.4940. doi: 10.3390/ijms20194940.
- 159. Longnecker M.P., Rogan W.J., Lucier G. The human health effects of DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and PCBS (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health // Annu Rev Public Health. 1997. V.18. P.211–244. doi: 10.1146/annurev.publhealth.18.1.211.
- 160. Louie M.C., McClellan A., Siewit C., Kawabata L. Estrogen receptor regulates E2F1 expression to mediate tamoxifen resistance // Mol Cancer Res. 2010. V.8. N.3. P.343–352. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0395.
- 161. Lu Y., Morimoto K., Takeshita T., Takeuchi T., Saito T. Genotoxic effects of alphaendosulfan and beta-endosulfan on human HepG2 cells // Environ Health Perspect. 2000. V.108. N.6. P.559–561. doi: 10.1289/ehp.00108559.
- 162. Łukasiewicz S., Czeczelewski M., Forma A., Baj J., Sitarz R., Stanisławek A. Breast cancer-epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies-an updated review // Cancers (Basel). 2021. V.13. N.17. P.4287. doi: 10.3390/cancers13174287.
- 163. Lupo M.A., Walts A.E., Sistrunk J.W., Giordano T.J., Sadow P.M., Massoll N., Campbell R., Jackson S.A., Toney N., Narick C.M., Kumar G., Mireskandari A., Finkelstein S.D., Bose S. Multiplatform molecular test performance in indeterminate thyroid nodules // Diagn Cytopathol. 2020. V.48. N.12. P.1254–1264. doi: 10.1002/dc.24564.
- 164. Ma L., Liu Y., Geng C., Qi X., Jiang J. [Corrigendum] Estrogen receptor β inhibits estradiol-induced proliferation and migration of MCF-7 cells through regulation of mitofusin 2 // Int J Oncol. -2016.-V.49.-N.5.-P.2187. doi: 10.3892/ijo.2016.3695.
- 165. Maggi A. Liganded and unliganded activation of estrogen receptor and hormone replacement therapies // Biochim Biophys Acta. 2011. V.1812. N.8. P.1054–1060. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.05.001.
- 166. Mal R., Magner A., David J., Datta J., Vallabhaneni M., Kassem M., Manouchehri J., Willingham N., Stover D., Vandeusen J., Sardesai S., Williams N., Wesolowski R., Lustberg M., Ganju R.K., Ramaswamy B., Cherian M.A. Estrogen receptor beta (ERβ): a ligand activated tumor suppressor // Front Oncol. 2020. V.10. P.587386. doi: 10.3389/fonc.2020.587386.

- 167. Maness S.C., McDonnell D.P., Gaido K.W. Inhibition of androgen receptor-dependent transcriptional activity by DDT isomers and methoxychlor in HepG2 human hepatoma cells // Toxicol Appl Pharmacol. 1998. V.151. N.1. P.135–142. doi: 10.1006/taap.1998.8431.
- 168. Mansouri A., Cregut M., Abbes C., Durand M.J., Landoulsi A., Thouand G. The environmental issues of DDT pollution and bioremediation: a multidisciplinary review // Appl Biochem Biotechnol. 2017. V.181. N.1. P.309–339. doi: 10.1007/s12010-016-2214-5.
- 169. Martinez-Sanchez A., Murphy C.L. MicroRNA target identification-experimental approaches // Biology (Basel). 2013. V.2. N.1. P.189–205. doi: 10.3390/biology2010189.
- 170. Marty M.S., Carney E.W., Rowlands J.C. Endocrine disruption: historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing // Toxicol Sci. 2011. V.120. Suppl 1. P.S93–108. doi: 10.1093/toxsci/kfq329.
- 171. Mathelier A., Fornes O., Arenillas D.J., Chen C.Y., Denay G., Lee J., Shi W., Shyr C., Tan G., Worsley-Hunt R., Zhang A.W., Parcy F., Lenhard B., Sandelin A., Wasserman W.W. JASPAR 2016: a major expansion and update of the open-access database of transcription factor binding profiles // Nucleic Acids Res. 2016. V.44. N.D1. P.D110–115. doi: 10.1093/nar/gkv1176.
- 172. McGeary S.E., Lin K.S., Shi C.Y., Pham T.M., Bisaria N., Kelley G.M., Bartel D.P. The biochemical basis of microRNA targeting efficacy // Science. 2019. V.366. N.6472. P.eaav1741. doi: 10.1126/science.aav1741.
- 173. McKiernan P.J., Smith S.G.J., Durham A.L., Adcock I.M., McElvaney N.G., Greene C.M. The estrogen-induced miR-19 downregulates secretory leucoprotease inhibitor expression in monocytes // J Innate Immun. 2020. V.12. N.1. P.90–102. doi: 10.1159/000500419.
- 174. Meiri E., Mueller W.C., Rosenwald S., Zepeniuk M., Klinke E., Edmonston T.B., Werner M., Lass U., Barshack I., Feinmesser M., Huszar M., Fogt F., Ashkenazi K., Sanden M., Goren E., Dromi N., Zion O., Burnstein I., Chajut A., Spector Y., Aharonov R. A second-generation microRNA-based assay for diagnosing tumor tissue origin // Oncologist. 2012. V.17. N.6. P.801–812. doi: 10.1634/theoncologist.2011-0466.
- 175. Mekonen S., Ibrahim M., Astatkie H., Abreha A. Exposure to organochlorine pesticides as a predictor to breast cancer: A case-control study among Ethiopian women // PLoS One. 2021. V.16. N.9. P.e0257704. doi: 10.1371/journal.pone.0257704.
- 176. Métivier R., Stark A., Flouriot G., Hübner M.R., Brand H., Penot G., Manu D., Denger S., Reid G., Kos M., Russell R.B., Kah O., Pakdel F., Gannon F. A dynamic structural model for estrogen receptor-alpha activation by ligands, emphasizing the role of interactions between distant A and E domains // Mol Cell. 2002. V.10. N.5. P.1019–1032. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00746-3.

- 177. Milevskiy M.J.G., Gujral U., Del Lama Marques C., Stone A., Northwood K., Burke L.J., Gee J.M.W., Nephew K., Clark S., Brown M.A. MicroRNA-196a is regulated by ER and is a prognostic biomarker in ER+ breast cancer // Br J Cancer. 2019. V.120. N.6. P.621–632. doi: 10.1038/s41416-019-0395-8.
- 178. Mirkin S., Wong B.C., Archer D.F. Effects of 17beta-estradiol, progesterone, synthetic progestins, tibolone, and raloxifene on vascular endothelial growth factor and Thrombospondin-1 messenger RNA in breast cancer cells // Int J Gynecol Cancer. 2006. V.16. Suppl 2. P.560–563. doi: 10.1111/j.1525-1438.2006.00696.x.
- 179. Mohammadizadeh F., Hani M., Ranaee M., Bagheri M. Role of cyclin D1 in breast carcinoma // J Res Med Sci. 2013. V.18. N.12. P.1021–1025.
- 180. Mullooly M., Murphy J., Gierach G.L., Walsh P.M., Deady S., Barron T.I., Sherman M.E., Rosenberg P.S., Anderson W.F. Divergent oestrogen receptor-specific breast cancer trends in Ireland (2004-2013): Amassing data from independent Western populations provide etiologic clues // Eur J Cancer. 2017. V.86. P.326–333. doi: 10.1016/j.ejca.2017.08.031.
- 181. Narayana Kurup J.K., Mohanty S.P. Congenital scoliosis: an anomalous association with endosulfan // BMJ Case Rep. 2017. V.2017. P.bcr2017220803. doi: 10.1136/bcr-2017-220803.
- 182. Necibi M., Mzoughi N. Determination of organochlorine pesticides in the surface water from Medjerda river, Tunisia // Int J Environ Anal Chem. 2020. P.1–12. doi: 10.1080/03067319.2020.1849668.
- 183. Nishimoto M., Nishikawa S., Kondo N., Wanifuchi-Endo Y., Hato Y., Hisada T., Dong Y., Okuda K., Sugiura H., Kato H., Takahashi S., Toyama T. Prognostic impact of TP53INP1 gene expression in estrogen receptor α-positive breast cancer patients // Jpn J Clin Oncol. 2019. V.49. N.6. P.567–575. doi: 10.1093/jjco/hyz029.
- 184. O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation // Front Endocrinol (Lausanne). 2018. V.9. P.402. doi: 10.3389/fendo.2018.00402.
- 185. Ørom U.A., Nielsen F.C., Lund A.H. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation // Mol Cell. 2008. V.30. N.4. P.460–471. doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.001.
- 186. Ovchinnikov V.Y., Antonets D.V., Gulyaeva L.F. The search of CAR, AhR, ESRs binding sites in promoters of intronic and intergenic microRNAs // J Bioinform Comput Biol. 2018. V.16. N.1. P.1750029. doi: 10.1142/S0219720017500299.
- 187. Papagiannakopoulos T., Shapiro A., Kosik K.S. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells // Cancer Res. 2008. V.68. N.19. P.8164–8172. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1305.

- 188. Parada H. Jr., Wolff M.S., Engel L.S., White A.J., Eng S.M., Cleveland R.J., Khankari N.K., Teitelbaum S.L., Neugut A.I., Gammon M.D. Organochlorine insecticides DDT and chlordane in relation to survival following breast cancer // Int J Cancer. 2016. V.138. N.3. P.565–575. doi: 10.1002/ijc.29806.
- 189. Park S.M., Gaur A.B., Lengyel E., Peter M.E. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2 // Genes Dev. -2008.-V.22.-N.7.-P.894-907. doi: 10.1101/gad.1640608.
- 190. Patel S.R., Skafar D.F. Modulation of nuclear receptor activity by the F domain // Mol Cell Endocrinol. 2015. V.4180. P.298–305. doi: 10.1016/j.mce.2015.07.009.
- 191. Paterni I., Granchi C., Katzenellenbogen J.A., Minutolo F. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential // Steroids. 2014. V.90. P.13–29. doi: 10.1016/j.steroids.2014.06.012.
- 192. Peinado F.M., Iribarne-Durán L.M., Ocón-Hernández O., Olea N., Artacho-Cordón F. Endocrine disrupting chemicals in cosmetics and personal care products and risk of endometriosis // in C. Marsh (ed.), Endometriosis. IntechOpen, London. 2020. doi: 10.5772/intechopen.93091.
- 193. Peng Y., Croce C.M. The role of MicroRNAs in human cancer // Signal Transduct Target Ther. -2016.-V.1.-P.15004. doi: 10.1038/sigtrans.2015.4.
- 194. Perou C.M., Sørlie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S.X., Lønning P.E., Børresen-Dale A.L., Brown P.O., Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours // Nature. 2000. V.406. N.6797. P.747–752. doi: 10.1038/35021093.
- 195. Persson E.C., Graubard B.I., Evans A.A., London W.T., Weber J.P., LeBlanc A., Chen G., Lin W., McGlynn K.A. Dichlorodiphenyltrichloroethane and risk of hepatocellular carcinoma // Int J Cancer. 2012. V.131. N.9. P.2078–2084. doi: 10.1002/ijc.27459.
- 196. Petz L.N., Ziegler Y.S., Schultz J.R., Kim H., Kemper J.K., Nardulli A.M. Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites // J Steroid Biochem Mol Biol. 2004. V.88. N.2. P.113–122. doi: 10.1016/j.jsbmb.2003.11.008.
- 197. Pogribny I.P., Beland F.A., Rusyn I. The role of microRNAs in the development and progression of chemical-associated cancers // Toxicol Appl Pharmacol. 2016. V.312. P.3–10. doi: 10.1016/j.taap.2015.11.013.
- 198. Qie S., Sang N. Stanniocalcin 2 (STC2): a universal tumour biomarker and a potential therapeutical target // J Exp Clin Cancer Res. -2022.-V.41.-N.1.-P.161. doi: 10.1186/s13046-022-02370-w.

- 199. Rangel N., Villegas V.E., Rondón-Lagos M. Profiling of gene expression regulated by 17β-estradiol and tamoxifen in estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative human breast cancer cell lines // Breast Cancer (Dove Med Press). 2017. V.9. P.537–550. doi: 10.2147/BCTT.S146247.
- 200. Raulic S., Ramos-Valdes Y., DiMattia G.E. Stanniocalcin 2 expression is regulated by hormone signalling and negatively affects breast cancer cell viability in vitro // J Endocrinol. 2008. V.197. N.3. P.517–529. doi: 10.1677/JOE-08-0043.
- 201. Reuber M.D. Carcinomas of the liver in Osborne-Mendel rats ingesting DDT // Tumori. 1978. V.64. N.6. P.571–577.
- 202. Rodrigues A.C., Li X., Radecki L., Pan Y.Z., Winter J.C., Huang M., Yu A.M. MicroRNA expression is differentially altered by xenobiotic drugs in different human cell lines // Biopharm Drug Dispos. 2011. V.32. N.6. P.355–367. doi: 10.1002/bdd.764.
- 203. Roldán G., Delgado L., Musé I.M. Tumoral expression of BRCA1, estrogen receptor alpha and ID4 protein in patients with sporadic breast cancer // Cancer Biol Ther. 2006. V.5. N.5. P.505–510. doi: 10.4161/cbt.5.5.2597.
- 204. Romagnolo D., Annab L.A., Thompson T.E., Risinger J.I., Terry L.A., Barrett J.C., Afshari C.A. Estrogen upregulation of BRCA1 expression with no effect on localization // Mol Carcinog. 1998. V.22. N.2. P.102–109.
- 205. Romero-Cordoba S.L., Rodriguez-Cuevas S., Bautista-Pina V., Maffuz-Aziz A., D'Ippolito E., Cosentino G., Baroni S., Iorio M.V., Hidalgo-Miranda A. Loss of function of miR-342-3p results in MCT1 over-expression and contributes to oncogenic metabolic reprogramming in triple negative breast cancer // Sci Rep. 2018. V.8. N.1. P.12252. doi: 10.1038/s41598-018-29708-9.
- 206. Rosenberg V., Bareket-Samish A., Chodick G., Siegelmann-Danieli N. Hormone-replacement therapy and its association with breast cancer subtypes: a large retrospective cohort study // Int J Womens Health. 2021. V.13. P.1207–1216. doi: 10.2147/IJWH.S311696.
- 207. Rossi S., Calin G.A. Bioinformatics, non-coding RNAs and its possible application in personalized medicine // Adv Exp Med Biol. 2013. V.774. P.21–37. doi: 10.1007/978-94-007-5590-1_2.
- 208. Ruiz-Suárez L.E., Castro-Chan R.A., Rivero-Pérez N.E., Trejo-Acevedo A., Guillén-Navarro G.K., Geissen V., Bello-Mendoza R. Levels of organochlorine pesticides in blood plasma from residents of malaria-endemic communities in Chiapas, Mexico // Int J Environ Res Public Health. 2014. V.11. N.10. P.10444–10460. doi: 10.3390/ijerph111010444.
- 209. Rydén L., Stendahl M., Jonsson H., Emdin S., Bengtsson N.O., Landberg G. Tumor-specific VEGF-A and VEGFR2 in postmenopausal breast cancer patients with long-term follow-up.

- Implication of a link between VEGF pathway and tamoxifen response // Breast Cancer Res Treat. -2005. V.89. N.2. P.135-143. doi: 10.1007/s10549-004-1655-7.
- 210. Saha Roy S., Vadlamudi R.K. Role of estrogen receptor signaling in breast cancer metastasis // Int J Breast Cancer. 2012. V.2012. P.654698. doi: 10.1155/2012/654698.
- 211. Saiyed H., Dewan A., Bhatnagar V., Shenoy U., Shenoy R., Rajmohan H., Patel K., Kashyap R., Kulkarni P., Rajan B., Lakkad B. Effect of endosulfan on male reproductive development // Environ Health Perspect. 2003. V.111. N.16. P.1958–1962. doi: 10.1289/ehp.6271.
- 212. Schug T.T., Johnson A.F., Birnbaum L.S., Colborn T., Guillette L.J. Jr., Crews D.P., Collins T., Soto A.M., Vom Saal F.S., McLachlan J.A., Sonnenschein C., Heindel J.J. Minireview: Endocrine disruptors: past lessons and future directions // Mol Endocrinol. 2016. V.30. N.8. P.833–847. doi: 10.1210/me.2016-1096.
- 213. Schultz J.R., Petz L.N., Nardulli A.M. Cell- and ligand-specific regulation of promoters containing activator protein-1 and Sp1 sites by estrogen receptors alpha and beta // J Biol Chem. 2005. V.280. N.1. P.347–354. doi: 10.1074/jbc.M407879200.
- 214. Schuster J.K., Harner T., Eng A., Rauert C., Su K., Hornbuckle K.C., Johnson C.W. Tracking POPs in global air from the first 10 years of the GAPS network (2005 to 2014) // Environ Sci Technol. 2021. V.55. N.14. P.9479–9488. doi: 10.1021/acs.est.1c01705.
- 215. Scribner J.D., Mottet N.K. DDT acceleration of mammary gland tumors induced in the male Sprague-Dawley rat by 2-acetamidophenanthrene // Carcinogenesis. 1981. V.2. N.12. P.1235–1239. doi: 10.1093/carcin/2.12.1235.
- 216. Semmler L., Reiter-Brennan C., Klein A. BRCA1 and breast cancer: a review of the underlying mechanisms resulting in the tissue-specific tumorigenesis in mutation carriers // J Breast Cancer. 2019. V.22. N.1. P.1–14. doi: 10.4048/jbc.2019.22.e6.
- 217. Sengupta K., Banerjee S., Saxena N., Banerjee S.K. Estradiol-induced vascular endothelial growth factor-A expression in breast tumor cells is biphasic and regulated by estrogen receptor-alpha dependent pathway // Int J Oncol. 2003. V.22. N.3. P.609–614.
- 218. Shah Y.M., Morimura K., Yang Q., Tanabe T., Takagi M., Gonzalez F.J. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates a microRNA-mediated signaling cascade responsible for hepatocellular proliferation // Mol Cell Biol. 2007. V.27. N.12. P.4238–4247. doi: 10.1128/MCB.00317-07.
- 219. Shibahara Y., Miki Y., Onodera Y., Hata S., Chan M.S., Yiu C.C., Loo T.Y., Nakamura Y., Akahira J., Ishida T., Abe K., Hirakawa H., Chow L.W., Suzuki T., Ouchi N., Sasano H. Aromatase inhibitor treatment of breast cancer cells increases the expression of let-7f, a microRNA targeting CYP19A1 // J Pathol. 2012. V.227. N.3. P.357–366. doi: 10.1002/path.4019.

- 220. Sommer S., Fuqua S.A. Estrogen receptor and breast cancer // Semin Cancer Biol. 2001. V.11. N.5. P.339–352. doi: 10.1006/scbi.2001.0389.
- 221. Soto A.M., Chung K.L., Sonnenschein C. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells // Environ Health Perspect. 1994. V.102. N.4. P.380–383. doi: 10.1289/ehp.94102380.
- 222. Stice J.P., Knowlton A.A. Estrogen, NFkappaB, and the heat shock response // Mol Med. 2008. V.14. N.7-8. P.517–527. doi: 10.2119/2008-00026.Stice.
- 223. Su P., Hu J., Zhang H., Jia M., Li W., Jing X., Zhou G. Association of TRPS1 gene with different EMT markers in ERα-positive and ERα-negative breast cancer // Diagn Pathol. 2014. V.9. P.119. doi: 10.1186/1746-1596-9-119.
- 224. Su Z., Yang Z., Xu Y., Chen Y., Yu Q. MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis // Oncotarget. 2015. V.6. N.11. P.8474–8490. doi: 10.18632/oncotarget.3523.
- 225. Sun Y.S., Zhao Z., Yang Z.N., Xu F., Lu H.J., Zhu Z.Y., Shi W., Jiang J., Yao P.P., Zhu H.P. Risk factors and preventions of breast cancer // Int J Biol Sci. 2017. V.13. N.11. P.1387–1397. doi: 10.7150/ijbs.21635.
- 226. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // CA Cancer J Clin. 2021. V.71. N.3. P.209–249. doi: 10.3322/caac.21660.
- 227. Surakasula A., Nagarjunapu G.C., Raghavaiah K.V. A comparative study of pre- and post-menopausal breast cancer: Risk factors, presentation, characteristics and management // J Res Pharm Pract. 2014. V.3. N.1. P.12–18. doi: 10.4103/2279-042X.132704.
- 228. Tanase C., Albulescu R., Codrici E., Calenic B., Popescu I.D., Mihai S., Necula L., Cruceru M.L., Hinescu M.E. Decreased expression of APAF-1 and increased expression of cathepsin B in invasive pituitary adenoma // Onco Targets Ther. 2014. V.8. P.81–90. doi: 10.2147/OTT.S70886.
- 229. Thangaraju M., Kaufmann S.H., Couch F.J. BRCA1 facilitates stress-induced apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines // J Biol Chem. 2000. V.275. N.43. P.33487–33496. doi: 10.1074/jbc.M005824200.
- 230. The Human Protein Atlas [электронный ресурс]. URL: https://www.proteinatlas.org/ (дата обращения 12.07.2022).
- 231. Tilghman S.L., Bratton M.R., Segar H.C., Martin E.C., Rhodes L.V., Li M., McLachlan J.A., Wiese T.E., Nephew K.P., Burow M.E. Endocrine disruptor regulation of microRNA expression in breast carcinoma cells // PLoS One. 2012. V.7. N.3. P.e32754. doi: 10.1371/journal.pone.0032754.

- 232. Tokar T., Pastrello C., Rossos A.E.M., Abovsky M., Hauschild A.C., Tsay M., Lu R., Jurisica I. mirDIP 4.1-integrative database of human microRNA target predictions // Nucleic Acids Res. 2018. V.46. N.D1. P.D360–D370. doi: 10.1093/nar/gkx1144.
- 233. Tomatis L., Turusov V., Charles R.T., Boiocchi M., Gati E. Liver tumours in CF-1 mice exposed for limited periods to technical DDT // Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol. 1974. V.82. N.1. P.25–35.
- 234. Truong T.H., Lange C.A. Deciphering steroid receptor crosstalk in hormone-driven cancers // Endocrinology. 2018. V.159. N.12. P.3897–3907. doi: 10.1210/en.2018-00831.
- 235. Turusov V., Rakitsky V., Tomatis L. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks // Environ Health Perspect. 2002. V.110. N.2. P.125–128. doi: 10.1289/ehp.02110125.
- 236. Tzanetou E.N., Karasali H. A comprehensive review of organochlorine pesticide monitoring in agricultural soils: the silent threat of a conventional agricultural past // Agriculture. 2022. V.12. N.5. P.728. doi: 10.3390/agriculture12050728.
- 237. Upson K., De Roos A.J., Thompson M.L., Sathyanarayana S., Scholes D., Barr D.B., Holt V.L. Organochlorine pesticides and risk of endometriosis: findings from a population-based case-control study // Environ Health Perspect. 2013. V.121. N.11–12. P.1319–1324. doi: 10.1289/ehp.1306648.
- 238. Valastyan S., Weinberg R.A. Roles for microRNAs in the regulation of cell adhesion molecules // J Cell Sci. 2011. V.124. N.Pt 7. P.999–1006. doi: 10.1242/jcs.081513.
- 239. van den Berg H. Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease // Environ Health Perspect. 2009. V.117. N.11. P.1656–1663. doi: 10.1289/ehp.0900785.
- 240. van Schooneveld E., Wildiers H., Vergote I., Vermeulen P.B., Dirix L.Y., Van Laere S.J. Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management // Breast Cancer Res. 2015. V.17. P.21. doi: 10.1186/s13058-015-0526-y.
- 241. Vorozheykin P.S., Titov I.I. How miRNA structure of animals influences their biogenesis // Russ J Genet. 2020. V.56. P.17–29. doi: 10.1134/S1022795420010135.
- 242. Vrijens K., Bollati V., Nawrot T.S. MicroRNAs as potential signatures of environmental exposure or effect: a systematic review // Environ Health Perspect. 2015. V.123. N.5. P.399–411. doi: 10.1289/ehp.1408459.
- 243. Vuaroqueaux V., Urban P., Labuhn M., Delorenzi M., Wirapati P., Benz C.C., Flury R., Dieterich H., Spyratos F., Eppenberger U., Eppenberger-Castori S. Low E2F1 transcript levels are a

- strong determinant of favorable breast cancer outcome // Breast Cancer Res. 2007. V.9. N.3. P.R33. doi: 10.1186/bcr1681.
- 244. Wang W., Dong L., Saville B., Safe S. Transcriptional activation of E2F1 gene expression by 17beta-estradiol in MCF-7 cells is regulated by NF-Y-Sp1/estrogen receptor interactions // Mol Endocrinol. 1999. V.13. N.8. P.1373–1387. doi: 10.1210/mend.13.8.0323.
- 245. Wang N., Zhu C., Xu Y., Qian W., Zheng M. Negative regulation of PTEN by microRNA-221 and its association with drug resistance and cellular senescence in lung cancer cells // Biomed Res Int. -2018. -V.2018. -P.7908950. doi: 10.1155/2018/7908950.
- 246. Wang Y., Sun H., Zhang D., Fan D., Zhang Y., Dong X., Liu S., Yang Z., Ni C., Li Y., Liu F., Zhao X. TP53INP1 inhibits hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation via the ROS/snail signalling axis in breast cancer // J Cell Mol Med. 2018. V.22. N.7. P.3475–3488. doi: 10.1111/jcmm.13625.
- 247. Wang H., Tan Z., Hu H., Liu H., Wu T., Zheng C., Wang X., Luo Z., Wang J., Liu S., Lu Z., Tu J. microRNA-21 promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting LZTFL1 // BMC Cancer. 2019. V.19. N.1. P.738. doi: 10.1186/s12885-019-5951-3.
- 248. Wang L.H., Chen L.R., Chen K.H. In vitro and vivo identification, metabolism and action of xenoestrogens: an overview // Int J Mol Sci. 2021. V.22. N.8. P.4013. doi: 10.3390/ijms22084013.
- 249. Weber J., Halsall C.J., Muir D., Teixeira C., Small J., Solomon K., Hermanson M., Hung H., Bidleman T. Endosulfan, a global pesticide: a review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic // Sci Total Environ. 2010. V.408. N.15. P.2966–2984. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.10.077.
- 250. Winslow C.E. Possible hazards from the use of DDT # Am J Public Health Nations Health. -1949.-V.39.-N.7.-P.925-927.
- 251. Wolff M.S., Toniolo P.G., Lee E.W., Rivera M., Dubin N. Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer // J Natl Cancer Inst. 1993. V.85. N.8. P.648–652. doi: 10.1093/jnci/85.8.648.
- 252. Wu Q.B., Sheng X., Zhang N., Yang M.W., Wang F. Role of microRNAs in the resistance of colorectal cancer to chemoradiotherapy // Mol Clin Oncol. 2018. V.8. N.4. P.523–527. doi: 10.3892/mco.2018.1578.
- 253. Xu D., Guo Y., Liu T., Li S., Sun Y. miR-22 contributes to endosulfan-induced endothelial dysfunction by targeting SRF in HUVECs // Toxicol Lett. 2017. V.269. P.33–40. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.01.014.

- 254. Yang J., Han S., Huang W., Chen T., Liu Y., Pan S., Li S. A meta-analysis of microRNA expression in liver cancer // PLoS One. 2014. V.9. N.12. P.e114533. doi: 10.1371/journal.pone.0114533.
- 255. Yanokura M., Banno K., Kobayashi Y., Kisu I., Ueki A., Ono A., Masuda K., Nomura H., Hirasawa A., Susumu N., Aoki D. MicroRNA and endometrial cancer: Roles of small RNAs in human tumors and clinical applications (Review) // Oncol Lett. 2010. V.1. N.6. P.935–940. doi: 10.3892/ol.2010.173.
- 256. Yanokura M., Banno K., Iida M., Irie H., Umene K., Masuda K., Kobayashi Y., Tominaga E., Aoki D. MicroRNAS in endometrial cancer: recent advances and potential clinical applications // EXCLI J. 2015. V.14. P.190–198. doi: 10.17179/excli2014-590.
- 257. Yao N., Song Z., Wang X., Yang S., Song H. Prognostic impact of progesterone receptor status in Chinese estrogen receptor positive invasive breast cancer patients // J Breast Cancer. 2017. V.20. N.2. P.160–169. doi: 10.4048/jbc.2017.20.2.160.
- 258. Yaşar P., Ayaz G., User S.D., Güpür G., Muyan M. Molecular mechanism of estrogenestrogen receptor signaling // Reprod Med Biol. 2016. V.16. N.1. P.4–20. doi: 10.1002/rmb2.12006.
- 259. Yilmaz B., Terekeci H., Sandal S., Kelestimur F. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention // Rev Endocr Metab Disord. 2020. V.21. N.1. P.127–147. doi: 10.1007/s11154-019-09521-z.
- 260. Yoneyama K., Ishibashi O., Kawase R., Kurose K., Takeshita T. miR-200a, miR-200b and miR-429 are onco-miRs that target the PTEN gene in endometrioid endometrial carcinoma // Anticancer Res. -2015. -V.35. -V.3
- 261. Yu Y., Luo W., Yang Z.J., Chi J.R., Li Y.R., Ding Y., Ge J., Wang X., Cao X.C. miR-190 suppresses breast cancer metastasis by regulation of TGF-β-induced epithelial-mesenchymal transition // Mol Cancer. 2018. V.17. N.1. P.70. doi: 10.1186/s12943-018-0818-9.
- 262. Zhang J., Ma L. MicroRNA control of epithelial-mesenchymal transition and metastasis // Cancer Metastasis Rev. -2012.-V.31.-N.3-4.-P.653-662. doi: 10.1007/s10555-012-9368-6.
- 263. Zhang C.M., Zhao J., Deng H.Y. MiR-155 promotes proliferation of human breast cancer MCF-7 cells through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1 // J Biomed Sci. 2013. V.20. N.1. P.79. doi: 10.1186/1423-0127-20-79.
- 264. Zhang W., Luo J., Yang F., Wang Y., Yin Y., Strom A., Gustafsson J.Å., Guan X. BRCA1 inhibits AR-mediated proliferation of breast cancer cells through the activation of SIRT1 // Sci Rep. 2016. V.6. P.22034. doi: 10.1038/srep22034.

- 265. Zhang J., Zhang Z., Wang Q., Xing X.J., Zhao Y. Overexpression of microRNA-365 inhibits breast cancer cell growth and chemo-resistance through GALNT4 # Eur Rev Med Pharmacol Sci. -2016.-V.20.-N.22.-P.4710-4718.
- 266. Zhang W., Wu M., Chong Q.Y., Zhang M., Zhang X., Hu L., Zhong Y., Qian P., Kong X., Tan S., Li G., Ding K., Lobie P.E., Zhu T. Loss of estrogen-regulated MIR135A1 at 3p21.1 promotes tamoxifen resistance in breast cancer // Cancer Res. 2018. V.78. N.17. P.4915–4928. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0069.
- 267. Zheng J.Z., Huang Y.N., Yao L., Liu Y.R., Liu S., Hu X., Liu Z.B., Shao Z.M. Elevated miR-301a expression indicates a poor prognosis for breast cancer patients // Sci Rep. 2018. V.8. N.1. P.2225. doi: 10.1038/s41598-018-20680-y.
- 268. Zhou J., Yu X., Wang J., Li T., Jin T., Lei D., Pan X. Aberrant expression of PHLPP1 and PHLPP2 correlates with poor prognosis in patients with hypopharyngeal squamous cell carcinoma // PLoS One. 2015. V.10. N.3. P.e0119405. doi: 10.1371/journal.pone.0119405.