

## Отзыв

официального оппонента, кандидата биологических наук  
Щербакова Дмитрия Николаевича  
на диссертационную работу Калининой Татьяны Сергеевны  
«Эффекты пестицидов ДДТ и эндосульфана на экспрессию генов-мишеней  
эстрогенового рецептора в клетках молочной железы», представленную на  
соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности 1.5.4. - биохимия.

### Актуальность темы диссертационной работы

Под широким термином «эндокринные разрушители» (Endocrine Disruptors), понимают химические вещества, которые при попадании в организм воздействуют на него подобно гормонам, могут изменять функции гормональной системы, разрушают систему внутренней регуляции организма – гормональную или эндокринную. Пути попадания таких веществ в природу различны, они могут попадать в окружающую среду, в основном с выбросами и сбросами предприятий, с выбросами транспорта, с полигонов твердых бытовых отходов, из сельскохозяйственных отходов, при сжигании и утилизации мусора. Эндокринные разрушители могут попадать в организм человека с пищевыми продуктами, водой, при вдыхании газов, пыли и мельчайших частиц, содержащихся в воздухе, а также при попадании этих веществ на кожу. Впервые о веществах, наносящих вред эндокринной системе, заговорили еще в 60-годы XX века. В 1996 году американскими учеными были опубликованы результаты исследований, в которых говорилось о том, что производные пестицида ДДТ (дихлордифенилтрихлорметилметан), попавшего в озеро Апопка (штат Флорида) из резервуара с отходами предприятия по производству пестицидов, тормозят синтез андрогенных (мужских) гормонов, тестостерона и дигидротестостерона и именно это задерживает рост и развитие мужских половых органов у аллигаторов, а также продукты распада ДДТ накапливаются в жировой ткани животных.

К настоящему времени известно около 1000 химических веществ, которые могут влиять на эндокринную систему человека. 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. Одним из самых известных эндокринных разрушителей является вышеупомянутый ДДТ, другим эндосульфан. Как именно ДДТ, эндосульфан и подобные им соединения с гормон-подобным действием могут способствовать развитию рака, в настоящий момент недостаточно исследовано.

Диссертационное исследование Калининой Т.С. посвящено исследованию влияния ДДТ и эндосульфана на экспрессию регулируемых ER генов и микроРНК в клетках молочной железы является актуальной задачей современной молекулярной биохимии. Исследование охватывает этап подготовки материала для проведения молекулярно-биологических работ, получения информации об экспрессии генов и микроРНК и завершается работа построением моделей объясняющих полученные результаты при помощи арсенала инструментов молекулярной биологии.

### **Научная новизна**

Новизна данной работы заключается в том, что автор применил широкий набор методов молекулярной биологии и биохимии. Автором в диссертационной работе с использованием культур клеток MCF-7 и MDA-MB-231, впервые были комплексно исследованы эффекты эндосульфана и двух изомеров ДДТ (о,п'- и п,п'-) на экспрессию известных мишеней ER, 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 MCF-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*.

Важной вкладом в новизну работы вносят предложенные Калининой Т.С. модели позволяющие понять возможный механизм влияния ХОП на экспрессию и развития РМЖ.

## **Теоретическая и практическая значимость полученных результатов**

Результаты проведенных исследований обладают большой практической значимостью, Калининой Т.С. обнаружены новые мишени пестицидов с гормоноподобными свойствами, при этом некоторые из обнаруженных мишеней оказались связаны с такими клинико-патологическими характеристиками опухолей молочной железы, как статус ER или PR, наличие метастазов в лимфоузлах. 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*. Значимым как с точки зрения теории так и практики является поиск новых биомаркеров РМЖ. Обнаруженные автором изменения уровня экспрессии *CCND1*, *STC2*, *miR-190b*, *miR-190a* могут стать дополнительными маркерами при определении типа РМЖ или метастатического поражения лимфоузлов.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа Калининой Татьяны Сергеевны изложена на 131 странице машинописного текста и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, четырех глав исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 38 рисунками и 18 таблицами. Список литературы содержит 268 источников.

Во введении автор обосновывает актуальность тематики проведенной работы, приводит информацию о степени разработанности решаемой научной проблемы, четко формулирует цель и задачи для ее решения, подчеркивает научную новизну исследования, а также обозначает теоретическую и практическую значимость исследования, методологию и методы исследования, дает информацию о степени достоверности результатов, их апробации, а также личном вкладе в проведенное исследование.

В главе «Обзор литературы» автор последовательно излагает современные представления об эстрогеновых рецепторах, механизмах регуляции экспрессии генов эстрогеновым рецептором, основных биологических функциях эстрогеновых рецепторов. Далее автор раскрывает роль которую играют эстрогеновые рецепторы в канцерогенезе молочной железы. Рассказывая о

ксеноэстрогенах, автор подробно рассматривает их химическую структуру и возможные механизмы биологической активности. В финальном разделе литературного обзора Татьяна Сергеевна подробно рассказывает о микроРНК и ее роли в канцерогенезе. В заключении к обзору литературы автор делает справедливое обобщение о том что 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.

Вторая глава «Материалы и методы» содержит информацию об используемых реагентах, клеточных культурах, и животных. Значительная часть главы содержит описание используемых методов. Это современные методы молекулярной биологии и биохимии, такие как: работа с РНК и микроРНК, реакция обратной транскрипции, проведение ПЦР в режиме реального времени для определения уровней экспрессии микроРНК, белковый электрофорез и иммуноблоттинг. Здесь также представлены методы биоинформатического анализа. В целом, методы, используемые в работе, позволяют решить поставленную цель и задачи, результаты получены на достаточном количестве экспериментального и теоретического материала. Методы статистической обработки результатов выполнены корректно с использованием современных подходов.

В главе 3 «Результаты» представлены результаты собственных исследований. Автором показано что в клетках MCF-7, обработанных эстрадиолом, и в клетках, обработанных о,п'-ДДТ, увеличивалась экспрессия *miR-190b*, *CCND1*, *VEGFA*, *STC2*. При этом п,п'-ДДТ и эндосульфат приводили к увеличению экспрессии *VEGFA* и *miR-19b*, экспрессия которой индуцировалась всеми исследуемыми гормонами. В клетках MCF-7, эффекты ДДТ на экспрессию *BRCA1*, *PGR*, *miR-190a*, *miR-27a* и *miR-365* были противоположны эффектам тестостерона: под действием п,п'-ДДТ экспрессия *BRCA1* и *PGR* снижалась, а экспрессия *miR-27a* и *miR-365* увеличивалась; под действием о,п'-ДДТ снижалась экспрессия *BRCA1* и *miR-190a*; тестостерон приводил к увеличению экспрессии *BRCA1*, *PGR* и *miR-190a* и снижению

уровней miR-27a, miR-365. Снижение или увеличение уровня выявленных микроРНК в клетках MCF-7 сопровождалось увеличением или снижением соответственно экспрессии их мишеней *TP53INP1* и *APAF1*. В клетках MDA-MB-231, обработанных пестицидами, не было выявлено изменений в экспрессии miR-190b, miR-19b, miR-27a, miR-365, *BRCA1*, *CCND1*, *VEGFA*, *STC2*, которые наблюдались в MCF-7 клетках. Однако экспрессия miR-190a увеличивалась под действием п,п'-ДДТ в обеих клеточных линиях, что по мнению автора может указывать на независимый от активности стероидных рецепторов механизм её регуляции данным изомером. Эксперимент на животных, показал что в молочной железе самок крыс, подвергнутых воздействию п,п'-ДДТ, происходило увеличение экспрессии miR-190a и miR-365. Было показано, что уровни miR-190b и мРНК *STC2*, *CCND1* положительно ассоциированы с экспрессией ER в опухолях молочной железы. Уровень miR-190a снижен при РМЖ и обратно коррелирует со статусом ER. Для мишеней о,п'-ДДТ – *CCND1* и miR-190a – была обнаружена ассоциация с наличием метастазов при раке молочной железы: для пациентов, у которых имеются метастазы в лимфоузлах, характерны более высокие уровни экспрессии *CCND1* и, при ER-позитивных опухолях с Ki-67<14%, низкие уровни miR-190a.

В главе 4 автор обсуждает полученные результаты с современных научных позиций. Отмечается, что в ходе диссертационного исследования был выявлен ряд мишеней эстрогена, тестостерона и прогестерона, экспрессия которых была чувствительна, в том числе, к пестицидам ДДТ и эндосульфону. 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. Выявленные под действием одного или двух исследуемых пестицидов изменения в экспрессии *BRCA1*, *PGR*, miR-190a, miR-365 и miR-27a были, вероятно, связаны с антиандрогенными свойствами соединений. Экспрессия miR-190a под действием п,п'-ДДТ увеличивалась как в MCF-7 клетках, так и в MDA-MB-231 клетках и в молочной железе самок крыс, подвергнутых действию пестицида, что указывает на существование не зависимо от стероидных рецепторов механизма регуляции её экспрессии под действием п,п'-ДДТ.

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

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

### **Степень обоснованности научных положений, выводов, сформулированных в диссертации, их достоверность**

Положения, выносимые на защиту, написаны кратко адекватно и полностью соответствуют полученным результатам, достоверность которых не вызывает сомнения. Вывода, сделанные по итогам работы, сформулированы корректно.

### **Замечания**

В работе содержится ряд орфографических ошибок, на страницах 7, 8, 20, 33, 34.

В разделе обзор литературы при описании эстрогеновых рецепторов присутствует предложение «Так, аминокислотные остатки 223-343 и 404-457 демонстрируют значительно более высокую гомологию, чем последовательности 223-457 и 344-403». Не совсем понятен смысл предложения.

Рисунок 18, складывается впечатление что отсутствует часть изображения касающегося уровня *miR-27a*.

### **Заключение**

Диссертационная работа Калининой Татьяны Сергеевны «Эффекты пестицидов ДДТ и эндосульфата на экспрессию генов-мишеней эстрогенового рецептора в клетках молочной железы», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия, является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой. По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости квалификационная работа соответствует требованиям пп. 9 – 14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного

Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 (с изменениями в ред. Постановления Правительства Российской Федерации №426 от 20.03.2021), а автор заслуживает ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Официальный оппонент:

ведущий научный сотрудник

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадз

кандидат биологических наук

(03.01.03 – молекулярная биология)

Дата « 21 » февраля 2023 г.

Д.Н. Щербаков

Подпись Щербакова Дмитрия Николае

Начальник отдела кадров

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребна

:

И.В. Ильин

Федеральное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора)

630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово,

Тел: +7(383)363-47-10

E-mail: [vector@vector.nsc.ru](mailto:vector@vector.nsc.ru)

Сайт: <http://www.vector.nsc.ru>

