

ОТЗЫВ

официального оппонента 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

Химические вещества, которые могут влиять на эндокринную систему человека, так называемые «эндокринные разрушители», представляют большой интерес для изучения, поскольку оценка последствий их воздействия на человека затруднена в связи с тем, что побочные эффекты могут проявляться через годы после воздействия или не проявляться вовсе. Одним из самых известных эндокринных разрушителей является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) - пестицид, ранее применявшийся в сельском хозяйстве - воздействие которого многие исследователи связывали с увеличением риска развития рака молочной железы (РМЖ). После запрета ДДТ в сельском хозяйстве активно использовали эндосульфан, который обладает сходными с ДДТ свойствами.

Широкое, неконтролируемое, интенсивное использование ДДТ в прошлом привело к мировому загрязнению. Так, в регионах, где активно применялся ДДТ, до сих пор находят значительное количество его метаболитов в крови жителей, поскольку ДДТ является «стойким» токсином. Эндосульфан, также как и ДДТ, распространился по всему миру.

В канцерогенезе молочной железы значительную роль играют сигнальные пути эстрогенового рецептора (ER). 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. Однако ДДТ и эндосульфан также обладают антиандрогенными и антипрогестеронными эффектами.

Как именно ДДТ, эндосульфан и подобные им соединения с гормон-подобным действием могут способствовать развитию рака, в настоящий момент исследовано недостаточно. Таким образом, диссертационная работа Калининой Т.С., посвященная изучению эффектов пестицидов ДДТ и эндосульфана на экспрессию генов-мишеней эстрогенового рецептора в клетках молочной железы, является актуальной и значимой.

Научная новизна

В работе Калининой Т.С. впервые комплексно исследованы эффекты эндосульфана и двух изомеров ДДТ (о,п'- и п,п'-) на экспрессию известных мишеней ER (*BRCA1*, *CCND1*, *PGR*, *STC2*, *VEGFA*) в клетках MCF-7 и MDA-MB-231, а также впервые исследовано их влияние на экспрессию миРНК, содержащих в своих промоторах сайты связывания ER. Впервые обнаружено, что о,п'-ДДТ, как и эстрадиол, приводит к увеличению экспрессии *STC2* и miR-190b. Показаны противоположные эффекты тестостерона и исследуемых пестицидов на экспрессию miR-365, miR-27a и miR-190a 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 в клетках MCF-7 изомеры ДДТ и эндосульфан приводят к снижению экспрессии регуляторов апоптоза *TP53INP1* и *APAF1*, которые являются мишенями miR-190a, miR-190b, miR-19b, miR-27a. Обнаружено, что низкие уровни miR-190a в определённых подтипах РМЖ ассоциированы с наличием метастазов в лимфоузлах пациентов.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов

Результаты проведенных исследований преимущественно носят фундаментальный характер, однако также могут иметь прикладное значение в клинической практике. В работе выявлены новые мишени пестицидов с гормон-подобными свойствами в клетках рака молочной железы и показано, что ряд обнаруженных мишеней связан 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* и miR-190b у пациентов с гормонозависимым РМЖ или восстановление уровней экспрессии miR-190a. Уровни экспрессии генов *CCND1*, *STC2* и miR-190b, miR-190a могут быть предложены в качестве дополнительных маркеров при определении типа РМЖ или метастатического поражения лимфоузлов.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа Калининой Т.С. построена по традиционной схеме и состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов исследований, Результаты, Обсуждения, Заключение, Выводов и Списка литературы. Работа изложена на 131 странице, содержит 38 рисунков и 18

таблиц. Список цитируемой литературы включает 268 литературных источников.

Во введении автор представляет общую характеристику работы, которая содержит аргументацию актуальности и степень разработанности, формулирует цели и задачи своей работы, оценивает научную новизну и потенциальную практическую значимость результатов, формулирует положения, выносимые на защиту.

Глава 1, содержащая обзор литературы, посвящена анализу современных данных о механизмах регуляции экспрессии генов эстрогеновым рецептором, роли эстрогеновых рецепторов в канцерогенезе молочной железы и возможных механизмах канцерогенного действия хлорорганические пестицидов с участием эстрогеновых рецепторов. Автором рассмотрена роль миРНК в регуляции экспрессии генов и влияние ксенобиотиков на экспрессию миРНК.

Глава 2, содержащая описание материалов и методов исследования, подробно описывает научно-методологические подходы, примененные автором для решения поставленных задач и достижения цели исследования. Все методики, использованные в исследовании, детально прописаны и пояснены, что предоставляет возможность воспроизведения экспериментов по приведенным протоколам.

Глава 3 «Результаты» описывает исследование влияния эстрадиола, тестостерона, прогестерона, эндосульфана, о,п'-ДДТ и п,п'-ДДТ на экспрессию ряда генов-мишеней рецепторов ER, PR, AR и ряда миРНК в ER-, PR-позитивных клетках молочной железы MCF-7 и клетках молочной железы человека MDA-MB-231, не экспрессирующих ER, PR и AR, *in vitro*. Описаны результаты исследования влияния половых гормонов и пестицидов с гормон-подобным действием на экспрессию миРНК, содержащих в промоторных областях сайты связывания ER. Автором проанализирована связь уровня экспрессии ряда миРНК и выявленных мРНК-мишеней пестицидов ДДТ и эндосульфана в образцах тканей больных РМЖ с наличием метастазов в лимфоузлах пациентов с РМЖ.

Достоверность полученных результатов подтверждается статистической обработкой данных с использованием корректно подобранных критериев и тестов. Выводы основываются на фактически полученном автором материале и отражают суть проведенного экспериментального исследования. Автор выносит на защиту четыре научных положения, логично вытекающих из анализа результатов исследования. Обоснованность научных положений и выводов не вызывает сомнений. Материал, представленный в диссертации, получен и проанализирован автором исследования лично либо при его непосредственном участии.

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

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием широкого спектра современных биохимических и молекулярно-биологических методов исследований, детальным анализом полученных данных и корректными способами статистической обработки.

Результаты работы представлены в 5 публикациях в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК и индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science, доложены и обсуждены на 11 российских научных форумах и конференциях. Публикации в рецензируемых журналах свидетельствуют о значимости полученных результатов и их признании научным сообществом.

Замечания

В работе можно отметить небольшое количество замечаний. Так, например, нет общего названия для Обзора литературы. Присутствует некоторое количество сленговых терминов, неудачных выражений и опечаток.

При прочтении работы возникли следующие дискуссионные вопросы:

1. Поскольку автор использовал метод выделения обычно используемый для получения суммарной РНК и не применял методов фракционирования более коротких последовательностей, была ли автором получена при выделении из тканей именно фракция микроРНК или суммарная РНК, включающая рибосомальную РНК, мРНК и миРНК?

2. Как вы считаете, чем обусловлено различие в уровнях экспрессии мРНК-мишеней исследованных вами миРНК в клетках MCF-7, обработанных разными изомерами дихлордифенилтрихлорэтан - о,п'-ДДТ и п,п'-ДДТ (Таблица 15)? Для мРНК ряда генов (например, *APAF1*, *TP53INP*, *PTPRS*) действие этих изомеров прямо противоположное – один из них снижает уровень экспрессии мРНК, другой повышает.

3. Такой же вопрос по поводу влияния изомеров дихлордифенилтрихлорэтан на экспрессию миРНК. Так, в случае с miR-190a о,п'-ДДТ и п,п'-ДДТ в клетках MCF-7 вызвали снижение и повышение уровня ее экспрессии, соответственно (Рис. 15). С чем это оппозитное действие изомеров может быть связано. И почему в таком случае для эксперимента по изучению влияния дихлордифенилтрихлорэтана на клетки рака молочной железы у крыс был выбран именно п,п'-ДДТ?

Тем не менее, сделанные замечания имеют дискуссионный характер, не снижают научной ценности полученных результатов и сделанных выводов и ни в коей мере не умаляют хорошего впечатления от работы.

Заключение

Диссертационная работа Калининой Татьяны Сергеевны «Эффекты пестицидов ДДТ и эндосульфана 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 п.9, предъявляемым к кандидатским диссертациям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней, утвержденным постановлением правительства Российской Федерации от 24.09.2013 года №842 (в редакции Постановления Правительства РФ №1168 от 01.10.2018 г.), а автор заслуживает ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия.

Официальный оппонент,

Доктор биологических наук (специальность 03.01.04 – биохимия), ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной биологии» Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН).



Миронова Надежда Львовна

Дата «15» февраля 2023 г.

Адрес организации: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук.

Адрес учреждения: 630090, Россия, г. Новосибирск, проспект Лаврентьева 8.

Адрес официального сайта: www.niboch.nsc.ru

e-mail: mironova@niboch.nsc.ru,

телефон: +7(913)466-8424

Подпись д.б.н. Н.Л. Миронов.



Т.С. Новопашина

Ч.

ИХБФМ СО РАН,
иных наук