

Чанышев Михаил Дамирович

**Экспрессия генов-мишеней гормонального канцерогенеза под воздействием
ДДТ, бензо[а]пирена и 3-метилхолантрена**

03.01.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, г. Новосибирск, Россия.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Гуляева Людмила Федоровна

Официальные оппоненты: **Дымшиц Григорий Моисеевич**
доктор биологических наук, профессор
Специализированный учебно-научный центр
Новосибирского государственного университета
(СУНЦ НГУ), кафедра естественных наук,
заведующий кафедрой

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет», факультет
естественных наук, кафедра молекулярной
биологии, профессор

Воронина Елена Николаевна
кандидат биологических наук
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки «Институт химической биологии
и фундаментальной медицины» Сибирского
отделения Российской академии наук, лаборатория
фармакогеномики, младший научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки «Институт молекулярной и
клеточной биологии» Сибирского отделения
Российской академии наук.

Защита состоится « » ноября 2014 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д.001.034.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт биохимии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2; тел. 8 (383) 333-54-81).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт биохимии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук по адресу: www.niibch.ru

Автореферат разослан «15 » октября 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Г.С. Русских

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Онкологические заболевания представляют значительную и актуальную проблему и являются второй по частоте причине смертности населения после сердечно-сосудистых заболеваний. Среди них большую долю занимают гормонозависимые опухоли, в первую очередь, рак молочной железы и рак матки. Так, в мире по данным ВОЗ ежегодно регистрируется более 1,5 млн. заболевших раком молочной железы женщин, в РФ – около 60 тыс., причем этот показатель неуклонно возрастает [Каприн А.Д. и др., 2014].

Диагностика и лечение рака напрямую связаны с изучением и пониманием механизмов его возникновения. Причиной трансформации нормальной ткани являются нарушения в процессах пролиферации и дифференцировки клеток, а также мутации в ДНК. Важную роль в пролиферации клеток наряду с другими гормонами играют эстрогены. На сегодняшний день можно считать установленной взаимосвязь между особенностями метаболизма эстрогенов и гормональным канцерогенезом, т.е. возникновением гормонозависимых опухолей, в частности рака яичников, молочной железы и эндометрия [Henderson В.Е. et al., 2000]. Предполагается, что подобный эффект эстрогенов связан с их стимулирующим действием на процессы клеточной пролиферации в органах-мишенях. Биосинтез эстрогенов осуществляется в сложной цепи превращений из андрогенов, ключевую роль в этом процессе играет фермент ароматаза (СYP19) [Bulun S.Е. et al., 2005]. Метаболизм эстрогенов осуществляется суперсемейством цитохромов P450, главным образом, СYP1A1, СYP1A2, СYP1В1, СYP3A4 [Lee A.J. et al., 2002]. Эстрогены гидроксигируются и далее выводятся из организма в виде конъюгатов, образованных во 2-й стадии метаболизма, преимущественно в сульфонируемом виде [Cole G.В. et al., 2010].

Повышенное содержание эстрогенов может оказывать существенное влияние на экспрессию генов, отвечающих за регуляцию клеточной пролиферации и, как результат, стимулировать клетки к делению. Причиной таких изменений метаболизма может быть повышенная экспрессия гена ароматазы с увеличением ее ферментативной активности. Другой возможной причиной клеточной трансформации эстроген-чувствительных клеток может быть изменение

содержания эстрогеновых рецепторов ER α и ER β , вследствие чего клетки становятся более восприимчивыми к эстрадиолу. В регуляции эстроген-зависимой передачи сигнала, как и во многих других клеточных сигнальных путях, участвуют микроРНК, небольшие некодирующие РНК длиной ~ 20 нуклеотидов. МикроРНК связываются с комплементарной им последовательностью, расположенной, как правило, в 3'-нетранслируемом участке (3'UTR) мРНК, и ингибируют синтез белка [Zeng Y. et al., 2003]. В опухолях профиль экспрессии микроРНК изменен [Iorio M.V. et al., 2009].

Технологический прогресс, интенсивное развитие промышленности и сельского хозяйства привели к загрязнению окружающей среды отходами производства, пестицидами, инсектицидами. Особое влияние на процессы гормонального канцерогенеза могут оказывать ксеноэстрогены, т.е. ксенобиотики, обладающие эстрогеноподобным действием. Среди ксеноэстрогенов наибольшее распространение получил инсектицид ДДТ. Показано, что ДДТ способен проявлять токсические эффекты через эстрогеновый рецептор, а также влиять на другие сигнальные пути клетки, стимулируя пролиферацию клеток и, тем самым, увеличивая риск возникновения раковых опухолей [Park J.H. et al., 2014]. Наряду с хлорорганическими пестицидами, подобные эффекты на живые организмы могут осуществлять ПАУ – канцерогены, которые содержатся в дыме сжигаемого угля, мазута, нефти. Эти соединения могут влиять на системы метаболизма как экзогенных, так и эндогенных соединений [Pfeifer G.P. et al., 2002; Cheshenko K. et al., 2007]. И если индуцирующий эффект ПАУ и ПХБ на монооксигеназы печени показан и изучен достаточно детально, то влияние этих соединений на метаболизм стероидных гормонов и регуляцию клеточного деления остается мало исследованным.

Целью работы являлось изучить влияние ДДТ, бензо[а]пирена и 3-метилхолантрена на экспрессию генов-мишеней гормонального канцерогенеза.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Определить уровень экспрессии онкогенных микроРНК miR-21, 221, 222, 429 в печени, матке, яичниках крыс, обработанных данными соединениями.

2. Оценить индукцию цитохромов P450 *CYP1A1*, *CYP1B1*, *CYP2B1*, *CYP2B2*, *CYP3A2* и рецепторов *AhR*, *CAR*, *PXR* в печени, матке, яичниках крыс, обработанных данными соединениями.
3. Определить уровень экспрессии генов-мишеней гормонального канцерогенеза – *ERα*, *Cyclin D1*, *CYP19* и *SULT1E1* в тканях печени, матки, яичников крыс, обработанных ДДТ, бензо[а]пиреном и 3-метилхолантреном.
4. Для выявления возрастных различий при воздействии ксенобиотиков определить экспрессию генов-мишеней гормонального канцерогенеза в разных органах неполовозрелых самок крыс.

Научная новизна работы

Впервые рассмотрено воздействие ДДТ, БП и МХ на экспрессию генов-мишеней гормонального канцерогенеза, связанных как с генотоксическим, так и с промоторным типом канцерогенеза. В работе показано, что ДДТ индуцирует промоторный тип канцерогенеза, вызывая повышенную экспрессию генов *CYP19*, *ERα*, *Cyclin D₁*, *CYP3A2*. Полициклические ароматические соединения БП и МХ индуцируют совершенно иной профиль экспрессии генов, чем под воздействием ДДТ. Впервые показано, что *CYP1B1* индуцируется на фоне сниженной экспрессии гена *SULT1E1*, что говорит в пользу генотоксического типа гормонального канцерогенеза. Впервые показано, что БП вызывает увеличение экспрессии генов *ERα*, *Cyclin D₁*, *CYP3A2*, что может свидетельствовать об его участии и в промоторном типе канцерогенеза.

Также в работе впервые показано тканеспецифичное изменение уровня экспрессии онкогенных микроРНК при однократном введении индукторов цитохромов P450, что также говорит в пользу их вовлечения в эпигенетические механизмы гормонального канцерогенеза.

Научно-практическая значимость

По своему содержанию работа носит преимущественно фундаментальный характер и представляет собой исследование молекулярных механизмов активации генов-мишеней гормонального канцерогенеза при воздействии ДДТ, БП и МХ. Полученные данные говорят о том, что ДДТ (представитель класса ПХБ) индуцирует гормональный канцерогенез промоторного типа, в то время как БП и МХ (представители класса ПАУ) приводят как к повреждению ДНК метаболитами

эстрогенов, так и стимулируют деление клеток. Вывод имеет, прежде всего, фундаментальное значение для понимания механизмов гормонального канцерогенеза. С другой стороны, изучение иницирующих этапов канцерогенеза способствует разработке не только методов диагностики и лечения онкологических заболеваний, но и их профилактике.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Введение самкам крыс ДДТ, бензо(а)пирена и 3-метилхолантрена вызывает заметные изменения в экспрессии генов *CYP1A1*, *CYP1B1*, *CYP2B1*, *CYP2B2*, *CYP3A2*, *SULT1E1*, участвующих в метаболизме стероидов, а также их активирующих рецепторов *AhR*, *CAR*, *PXR* как в печени, так и эстроген-зависимых органах. Регистрируемые изменения зависят как от вида органа, так и типа индуктора.
2. ДДТ проявляет свойство ксеноэстрогена, вызывая увеличение экспрессии гена *CYP19* в матке и яичниках крыс.
3. Профиль экспрессии микроРНК *miR-21,221,222,429* в печени, матке и яичниках крыс меняется при однократном введении всех исследуемых соединений.
4. ДДТ активирует гены-мишени канцерогенеза промоторного типа, тогда как бензо(а)пирен и 3-метилхолантрен активируют гены-мишени, вовлеченные как в генотоксический, так и промоторный тип канцерогенеза.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на следующих конференциях: IV Всероссийская научно-практическая конференции молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Молодые ученые за устойчивое развитие страны в глобальном мире» с международным участием, Москва, 2012; VII региональная конференция молодых ученых-онкологов, Томск, 2012; IV конференция молодых ученых и студентов «Экспериментальная и прикладная физиология», Москва, 2013; 27TH Annual Symposium of The Protein Society, Boston, MA, USA, 2013; 5TH Asia Pacific ISSX Meeting, Tianjin, China, 2014.

Публикации. Результаты работы изложены в 8 публикациях, из них 3 статьи в зарубежных рецензируемых журналах и 5 тезисов докладов в сборниках российских и международных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования,

результатов и обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 106 страницах машинописного текста, включает 44 рисунка и 3 таблицы. Библиография включает 178 наименований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. В работе использовались половозрелые и неполовозрелые самки крыс Wistar (130-150 г. и 80-90 г. соответственно), полученные из питомника Института клинической иммунологии, СО РАМН (г. Новосибирск). Исследуемые соединения вводили крысам внутрибрюшинно из расчета ДДТ (1,1,1-Трихлор-2,2-ди(п-хлорфенил)этан) 50 мг/кг, БП (бензо[а]пирен) и МХ (3-метилхолантрен) - 75мг/кг, растворенными в 0,5 мл растительного масла; контрольным крысам было введено по 0,5 мл масла. Животные содержались группами по 2 особи в условиях естественного освещения и при свободном доступе к пище и воде.

Выделение микросомальной фракции печени животных. Крысы были забиты на четвертый день после внутрибрюшинной инъекции исследуемыми соединениями. Микросомальную фракцию печени выделяли при температуре +4°C общепринятым методом дифференциального центрифугирования гомогената печени в среде, содержащей 10 mM трис-HCl (pH 7,4), 1,15% KCl. Выделенную микросомальную фракцию печени суспендировали в 0,1 M калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 20% глицерин.

Определение концентрации белка в микросомах. Концентрацию белка в микросомах печени животных определяли по методу Бредфорд [Bradford M.M., 1976]. Пробы белка разбавляли водой и добавляли к 1 мл раствора Bradford Reagent, ready-to-use (Fermentas®) и измеряли оптическую плотность растворов на спектрофотометре Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System при длине волны 595 нм.

Определение общего содержания цитохрома P450 в микросомах печени. Количество цитохрома P450 в микросомах определяли по методу Омуре и Сато [Omura T. et al., 1964] на спектрофотометре Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System в 0,1 M K-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 20% водный глицерин. Общее содержания цитохромов P450 определяли из дифференциального спектра по разнице между восстановленной дитионитом натрия (кювета сравнения) и SO-восстановленной формами (опытная кювета) на длине волны $\lambda = 450$ нм.

Определение ферментативной активности цитохромов P450. Скорости O-деалкилирования 7-метокси-, 7-этокси-, 7-пентоксирезорруфинов (субстраты, высокоспецифичные для CYP1A1, CYP2B1/2) определяли флуориметрическим методом на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse по скорости образования резорруфина (длины волн возбуждения и эмиссии 530 и 585 нм). К 0,4 мл буфера (50 mM HEPES, 15 mM MgCl₂, 0,1 mM ЭДТА, pH=7,6) добавляли 20 мкг микросомного белка, субстрат до концентрации 1 мкМ и NADPH до 1 mM.

Вертикальный электрофорез белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Разделение микросомальных белков проводили по методу Лэммли в денатурирующих условиях [Brunelle J.L., 2014]. Концентрирующий гель содержал 3% ПААГ, 0,125 M трис-HCl (pH 6,8), 0,1% SDS. Разделяющий гель содержал 10% ПААГ, 0,375 M трис-HCl (pH 8,8), 0,1% SDS. Пробы перед нанесением нагревали при 95⁰C в течение 3-5 мин в буфере: 62,5 mM трис-HCl (pH 6,8), 0,1% SDS, 10% глицерин, 2% β-меркаптоэтанол, 0,001% бромфеноловый синий и наносили на гель. Электрофорез проводили в буфере: 25 mM Трис- HCl (pH 8,3), 195 mM глицин, 0,1% SDS при 120 V. Параллельно на гель наносили маркер молекулярного веса белков.

Полусухой электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану. После электрофоретического разделения белки переносили на 0,45 μм нитроцеллюлозную мембрану методом полусухого переноса на приборе Fastblot “Biometra” (Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Перенос осуществляли в течение 1,5 ч при силе тока 120 mA.

Иммунохимический анализ белков микросом.

Для блокировки центров неспецифической сорбции нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в PBS-T буфере (“фосфатно-солевой буфер”, Россия, 0,05% Tween-20), содержащем 2% BSA. Мембрану отмывали PBS-T буфером три раза по 5 мин и инкубировали с моноклональными антителами против CYP1A1/2 (Abcam ab81816) и CYP2B1/2 (Abcam ab22719), разведенными в PBS-T буфере, в течение 1 ч. Затем отмывали три раза по 5 мин PBS-T буфером и помещали в раствор конъюгата вторичных антител против мышиных IgG, меченных

пероксидазой (Abscam ab97040), в PBS-T на 1 ч. Далее отмывали PBS-T буфером три раза по 5 мин. Визуализацию иммунореактивных полос проводили с использованием 4-хлор-1-нафтола (MP Biomedicals).

Выделение РНК. Выделение суммарной РНК проводили с использованием набора Qiagen (Rneasy® Lipid Tissue Mini Kit (50)) согласно рекомендациям производителя. Была проведена ДНКазная обработка образцов при помощи набора RNase-Free DNase Set (50) Qiagen® согласно рекомендациям производителя.

Электрофорез РНК. Для оценки качества суммарную клеточную РНК анализировали электрофорезом в 1,5 % агарозном геле. В гель добавляли 5 мкл бромистого этидия на 100 мл геля для интеркалирования РНК; гель сканировали в УФ свете с помощью видеосистемы “DNA Analyzer” (Москва).

Определение концентрации РНК. Для определения количества выделенной суммарной клеточной РНК измеряли оптическую плотность раствора (D) на спектрофотометре Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System при длине волны 260 нм.

Реакция обратной транскрипции. Обратную транскрипцию проводили для получения кДНК по матрице РНК, выделенной из клеток контрольных и индуцированных животных. Использовали набор QuantiTect® Reverse Transcription Kit, согласно рекомендациям производителя.

Проведение RT-ПЦР. Для определения уровня экспрессии генов *CYP1A1*, *CYP1B1*, *CYP2B1*, *CYP2B2*, *CYP3A2*, *Cyclin D₁*, *ER α* , *AhR*, *CYP19*, *PXR*, *SULT1E1*, *CAR* проводили ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x) на амплификаторе IQ5 (Bio-Rad Laboratories). В качестве гена сравнения использовали «ген домашнего хозяйства» *18S RNA*. Каждую реакцию ПЦР, содержащую 0,3 мкл кДНК, проводили в объеме 25 мкл в следующих условиях: предварительный прогрев при 95°C – 3 мин., после этого следовали 40 основных циклов: денатурация при 95°C – 15 сек., отжиг при 58°C – 20 сек., элонгация и сбор данных по флуоресценции при 72°C – 30 сек. Относительный уровень экспрессии генов оценивали с использованием значений пороговых циклов *Ct* с учетом эффективностей реакций (E) исследуемого гена и гена «домашнего хозяйства».

Выделение микроРНК. К 50 мг ткани добавляли 500 мкл лизирующего гуанидинового буфера (4 М гуанидин изотиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,3% саркозил, 0,1% 2-меркаптоэтанол, 25 мМ CH₃COONa). Ткань в растворе интенсивно перемешивали и оставляли в термостате при 65⁰С на 10 мин. Далее раствор центрифугировали 2 мин. на 10 000 g, после чего выделяли супернатант и добавляли к нему равный объем (~500 мкл) изопропанола. Полученный раствор тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 5 мин. Отстоявшийся раствор центрифугировали 10 мин. на 13 000 об/мин., супернатант сливали и промывали осадок 70% этанолом и ацетоном. Осадок оставляли сушиться на воздухе 5 минут, после чего к нему добавляли 200 мкл mQ-H₂O.

Реакция обратной транскрипции для микроРНК. Обратную транскрипцию проводили для получения кДНК по матрице микроРНК, выделенной из образцов тканей. Использовали набор реагентов, полученный от компании ЗАО «Вектор-бест» согласно рекомендациям производителя с модификациями. Для каждого образца микроРНК был приготовлен раствор объемом 30 мкл, содержащий 3 мкл микроРНК, 16,2 мкл трегалозы, 3 мкл буфера для ревертирования, 3 мкл раствора dNTP, 3 мкл раствора BSA, 0,32 мкл RT, 1,5 мкл раствора соответствующего праймера к микроРНК. Раствор последовательно инкубировали 5 мин. на 25⁰С, 30 мин. на 42⁰С, 2 мин. на 85⁰С, после чего полученные образцы кДНК были убраны в -20⁰С. Продукты реакции обратной транскрипции использовали для ОТ-ПЦР.

Проведение RT-PCR для определения экспрессии микроРНК. Для определения уровня экспрессии микроРНК miR-21,221,222,429 проводили ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием реагентов, полученных от компании ЗАО «Вектор-бест», согласно рекомендациям производителя с модификациями на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories). В качестве гена сравнения использовали малую РНК U₆, которая стабильно экспрессируется в тканях животных. Объем реакционной смеси для каждой реакции составлял 30 мкл, в него входили: 3 мкл полученной кДНК, 14 мкл mQ-H₂O, 3 мкл буфера для ПЦР, 3 мкл раствора dNTP, 3 мкл раствора BSA, 1 мкл Taq-полимеразы, 3 мкл раствора соответствующего праймера, соединенного с флуорофором (HEX), 0,17 мкл урацил-ДНК-гликозилазы. Протокол реакции ПЦР: 95⁰С – 3 мин., 50х 95⁰С – 15 сек., 58⁰С – 20 сек., 72⁰С – 30 сек. Относительный уровень экспрессии генов

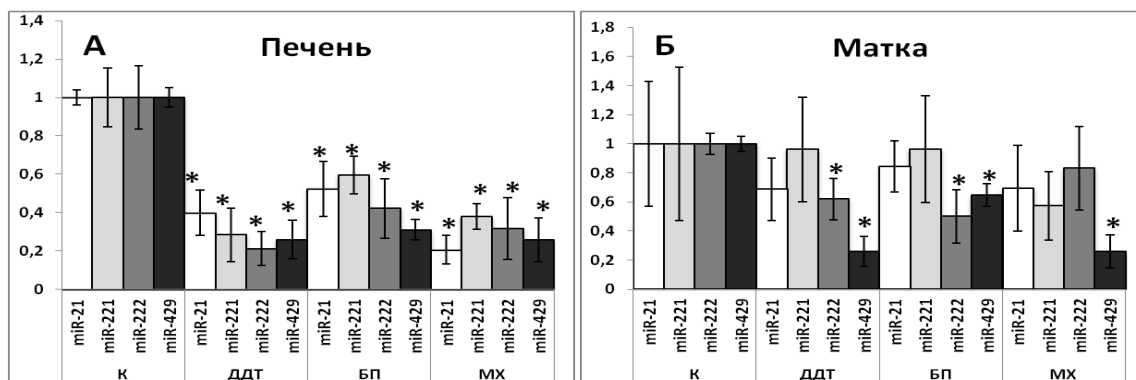
оценивали с использованием значений пороговых циклов Ct с учетом эффективностей реакций (E) исследуемого гена и гена «домашнего хозяйства».

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программ STATISTICA 6.0 и MS Office. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M - среднее, m – ошибка среднего. Для оценки достоверности различий между выборками использовался t -критерий Стьюдента. Коэффициент корреляции между массивами данных рассчитывался по формуле Пирсона. Для оценки достоверности корреляции между выборками использовалась таблица критических значений коэффициента Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ДДТ, БП, МХ на экспрессию микроРНК. МикроРНК играют важную роль в регуляции экспрессии генов. Как уже отмечалось в обзоре литературы, экспрессия микроРНК нарушена в опухолях, причем каждый тип опухоли демонстрирует определенный профиль экспрессии микроРНК.

При исследовании экспрессии микроРНК важной задачей является определение референтного гена домашнего хозяйства, относительно которого идет нормализация полученных результатов. Проведенный анализ научной литературы показал, что наиболее оправданно использовать в качестве референтного гена мяРНК U₆. Проведенный биоинформатический анализ показал, что в число генов-мишеней для многих микроРНК входят цитохромы P450 [Ramamoorthy A. et al., 2011]. Среди микроРНК были выбраны те, которые наиболее активно участвуют в процессах канцерогенеза: miR-21,221,222,429. Методом ОТ-ПЦР были измерены уровни экспрессии данных микроРНК. Данные этого эксперимента представлены на рис. 1.



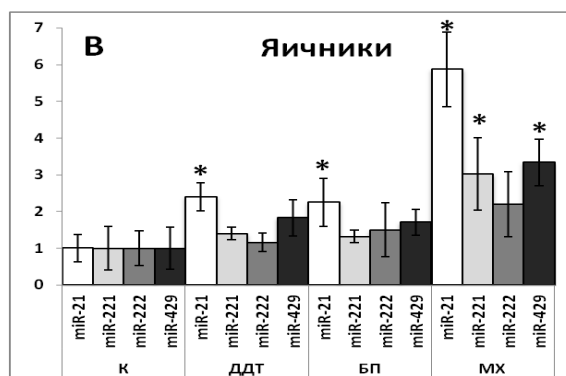


Рисунок 1. Уровень экспрессии miR-21, 221, 222, 429 в печени (А), матке (Б) и яичниках (В) самок крыс, обработанных ДДТ, БП и МХ. По оси Y: отношение количества микроРНК для индуцированной группы животных к контрольной группе. Приведены средние значения \pm ошибка среднего ($n=6$). * - достоверность различий по сравнению с контролем ($p<0.05$).

Введение всех исследуемых соединений приводило к снижению уровня экспрессии miR-21,221,222,429 в печени, в матке также наблюдалась тенденция к снижению уровня микроРНК, статистически достоверным было снижение уровня экспрессии miR-429 при введении ДДТ, БП, МХ и miR-222 при введении ДДТ и БП. В яичниках при введении исследуемых соединений происходило увеличение уровня экспрессии микроРНК, статистически достоверным было увеличение содержания miR-21 под воздействием ДДТ, БП и МХ, а также увеличение экспрессии miR-221 и miR-429 под воздействием МХ. Полученные данные демонстрируют зависимое от ткани изменение экспрессии микроРНК при введении ДДТ и ПАУ, что, в свою очередь, может приводить к нарушению экспрессии многочисленных генов, участвующих в канцерогенезе. Чрезвычайно важным и представляющим новизну работы является тот факт, что даже единичное введение ксенобиотиков приводит к изменению профиля экспрессии микроРНК. До недавнего времени изменения уровня экспрессии микроРНК при заболеваниях, в т.ч. онкологических объяснялись преимущественно различными хромосомными aberrациями, такими, как потеря локусов, на которых расположены гены микроРНК [Negrini M. et al., 1995]. Очевидно, что одноразовое воздействие исследуемых ксенобиотиков и период времени 72 часа между введением ксенобиотиков и забоем животных недостаточны для возникновения значимых хромосомных нарушений. На сегодняшний день предпринимаются попытки связать воздействие ксенобиотиков и изменение уровня экспрессии микроРНК. В

частности, было показано, что изменение экспрессии микроРНК при введении ДДТ может быть связано с нарушениями метилирования ДНК [Collotta M. et al., 2013].

Влияние ксенобиотиков на микросомную монооксигеназную систему печени, матки, яичников самок крыс

Для изучения влияния ДДТ, БП и МХ на гены-мишени гормонального канцерогенеза были измерены общее содержание цитохромов P450, ферментативные активности 3-х его изоформ (CYP1A1, CYP1A2 и CYP2B1), содержание изоформ CYP1A1/2 и CYP2B1/2 в микросомальной фракции печени крыс, обработанных данными соединениями. Также были определены уровни экспрессии генов цитохромов *CYP1A1*, *CYP1B1*, *CYP2B1*, *CYP2B2*, *CYP3A2* и активирующих их транскрипцию рецепторов *AhR*, *CAR*, *PXR*. Экспрессия генов цитохромов 1-го семейства и *AhR* измерялась в печени, матке и яичниках самок крыс, тогда как цитохромы 2-го семейства, *CAR* и *PXR* экспрессировались на детектируемом уровне лишь в печени. Для того, чтобы нивелировать действие эндогенных эстрогенов, в эксперименте использовались как половозрелые, так и неполовозрелые самки крыс.

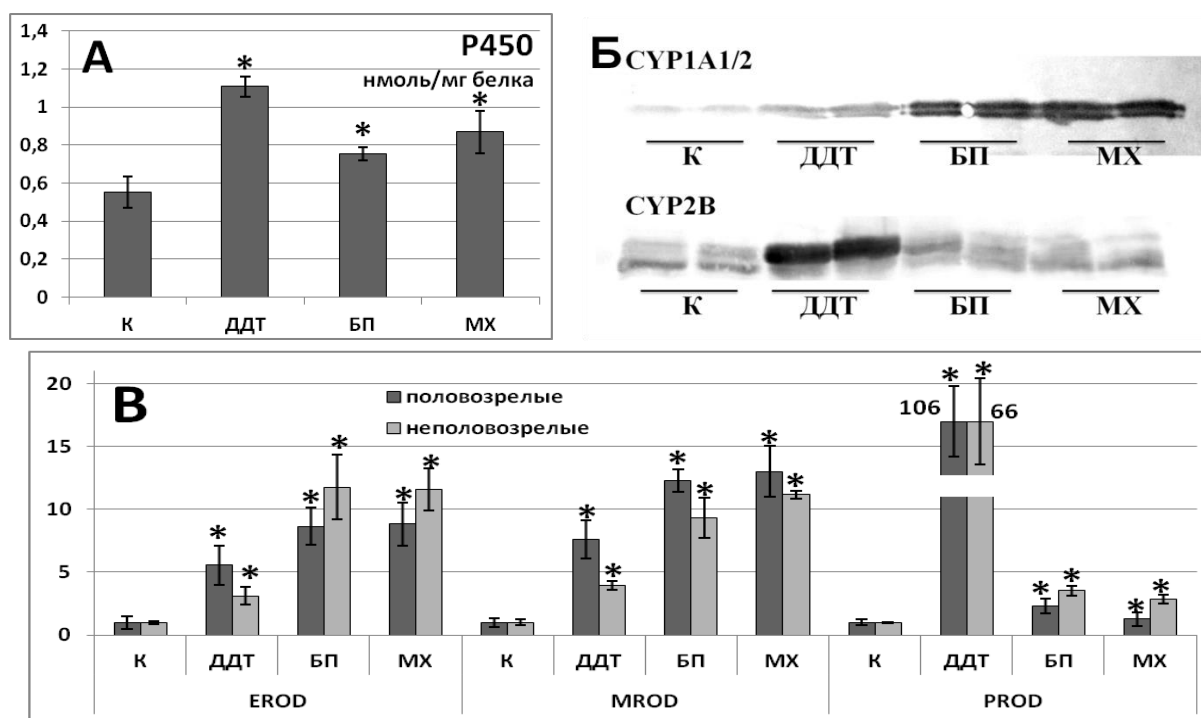


Рисунок 2. Результаты, демонстрирующие индукцию цитохрома P450 в печени. А. - Общее содержание P450 в микросомах, нмоль/мг белка; Б. - Вестерн-блот анализ цитохромов CYP1A1/2 и CYP2B1/2; В. - Скорости О-деалкилирования (нмоль/мин/мг) этокси-, метокси-, пентокси-резорудинов изоформами CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1/2 соответственно.

Полученные результаты (рис. 2) подтверждают индуцирующее действие используемых ксенобиотиков на монооксигеназы печени крыс и полностью согласуются с данными научной литературы [Denison M.S. et al., 2003; Nims R.W. et al., 1998]. Введение всех исследуемых ксенобиотиков приводило к увеличению общего содержания цитохрома P450 в микросомальной фракции печени крыс. БП и МХ индуцировали изоформы CYP1A1/2, ДДТ оказывал меньший эффект. В свою очередь, введение ДДТ приводило к увеличению активности и содержания белка CYP2B1/2. Введение БП и МХ также многократно увеличивало экспрессию генов *CYP1A1*, *CYP1B1* во всех исследуемых органах как у половозрелых, так и у неполовозрелых крыс (рис. 3), ДДТ оказывал меньший эффект, а в печени половозрелых крыс уровень экспрессии генов *CYP1A1* и *CYP1B1* был даже снижен.

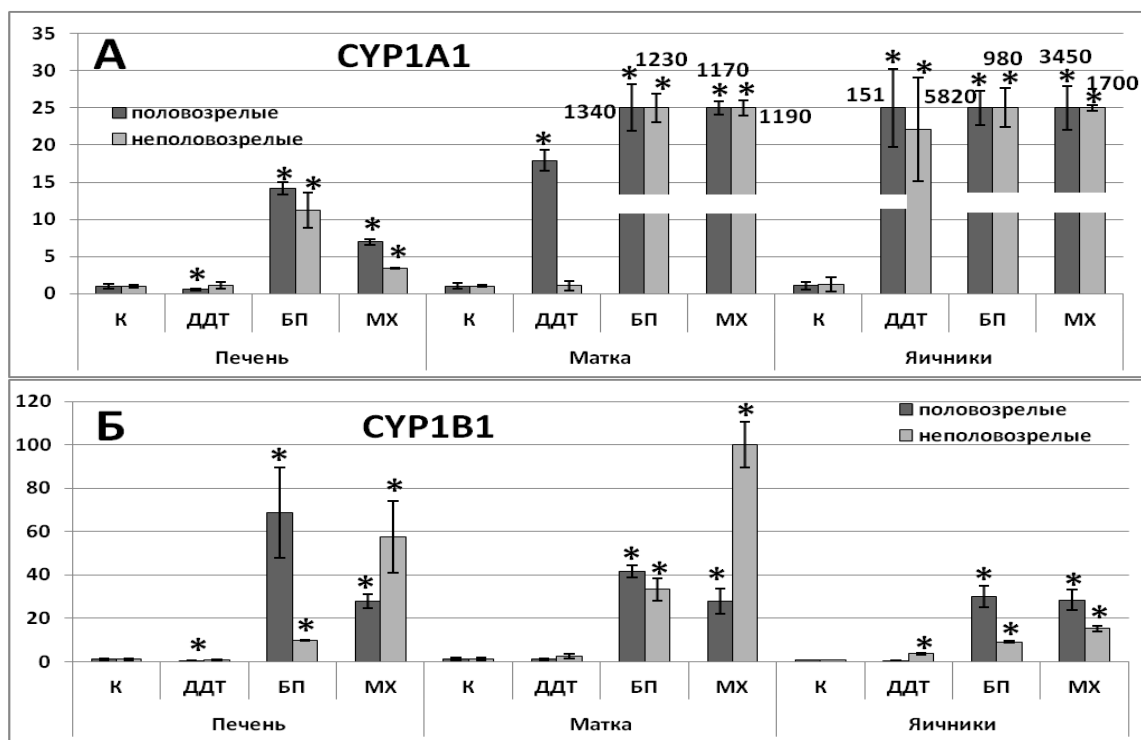


Рисунок 3. Относительный уровень экспрессии генов *CYP1A1* (А) и *CYP1B1* (Б) в печени, матке, яичниках самок крыс, обработанных ДДТ, БП и МХ. По оси Y: отношение количества мРНК для индуцированной группы животных к контрольной группе. Приведены средние значения ± ошибка среднего (n=6 для группы половозрелых крыс и n=3 для неполовозрелых). * - достоверность различий по сравнению с контролем (p<0.05).

Введение самкам ДДТ вызывало индукцию цитохромов P450 2-го семейства и увеличение уровня экспрессии генов *CYP2B1/CYP2B2* в печени как половозрелых, так и неполовозрелых самок крыс (рис. 4). Полученные результаты также показали, что все изучаемые ксенобиотики увеличивали уровень экспрессии гена *CYP3A2* в

печени половозрелых и неполовозрелых крыс, причем наибольший эффект был зарегистрирован для ДДТ, наименьший – для МХ.

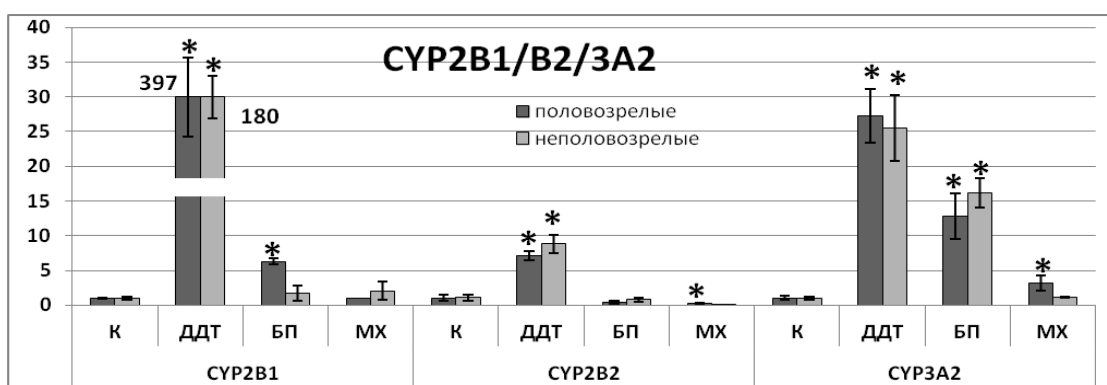


Рисунок 4. Относительный уровень экспрессии генов *CYP2B1/2* и *CYP3A2* в печени самок крыс, обработанных ДДТ, БП и МХ. По оси Y: соотношение количества мРНК для индуцированной группы животных к контрольной группе. Приведены средние значения \pm ошибка среднего ($n=6$ для группы половозрелых крыс и $n=3$ для неполовозрелых). * - достоверность различий по сравнению с контролем ($p<0.05$).

Наряду с измерением экспрессии генов цитохрома P450, были определены уровни экспрессии генов рецепторов *AhR*, *PXR*, *CAR*, регулирующих экспрессию генов *CYP* (Рис. 5).

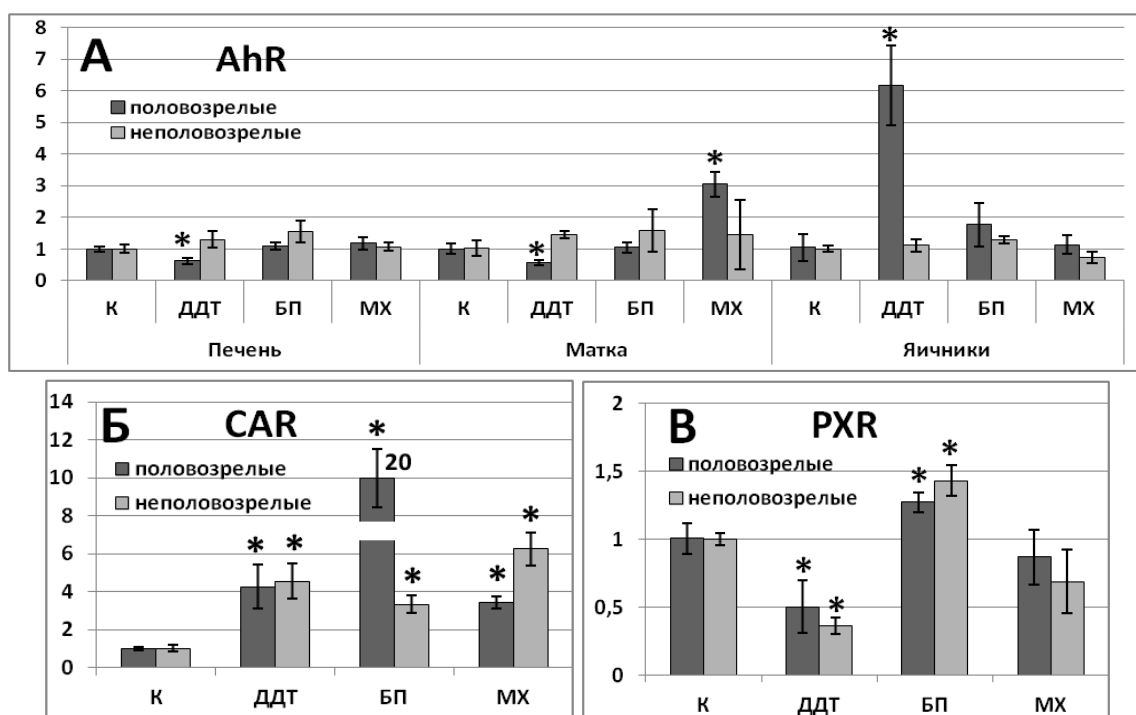


Рисунок 5. Относительный уровень экспрессии гена *AhR* (А) в печени, матке, яичниках и генов *CAR* (Б) и *PXR* (В) в печени самок крыс, обработанных ДДТ, БП и МХ. По оси Y: отношение количества мРНК для индуцированной группы животных к контрольной группе. Приведены средние значения \pm ошибка среднего ($n=6$ для группы половозрелых крыс и $n=3$ для неполовозрелых). * - достоверность различий по сравнению с контролем ($p<0.05$).

Введение ДДТ снижало экспрессию гена *AhR* в печени и матке половозрелых крыс, что может быть причиной снижения экспрессии генов *CYP1A1* и *CYP1B1* в печени под действием ДДТ (рис. 3). Уровни экспрессии генов *AhR* и *CYP1A1* статистически достоверно коррелировали друг с другом (коэффициент корреляции составлял 0,833, $p < 0,05$), что отражает регуляцию экспрессии гена *CYP1A1* рецептором AhR. Все исследуемые соединения вызывали усиление экспрессии гена *SAR* в печени половозрелых и неполовозрелых самок крыс, наибольший эффект на его экспрессию у половозрелых крыс оказывал БП, для неполовозрелых – МХ. Введение ДДТ снижало экспрессию гена *PXR* в печени как половозрелых, так и неполовозрелых крыс, БП оказывал противоположный эффект; введение МХ не приводило к статистически достоверным изменениям экспрессии гена *PXR*. Следует заметить, что ДДТ является сильным лигандом PXR [Kretschmer X.C. et al., 2005], поэтому даже при снижении уровня экспрессии гена *PXR* введение ДДТ вызывало наибольший эффект на экспрессию гена *CYP3A2* в печени самок крыс (рис. 4). При введении БП и МХ наблюдалась статистически значимая корреляция между уровнями экспрессии генов *CYP3A2* и *PXR*, коэффициент корреляции составлял 0,886, $p < 0,05$.

Влияние ксенобиотиков на экспрессию генов-мишеней гормонального канцерогенеза

Для изучения эффекта введенных ксенобиотиков на гены-мишени, вовлеченные в гормональный канцерогенез, были измерены уровни экспрессии таких генов, как *ER α* , *Cyclin D₁*, *CYP19*, *SULT1E1*. Выбор этих генов был обусловлен их ключевой ролью в метаболизме эстрогенов, а также в митогенных клеточных каскадах, регулируемых эстрогеновым рецептором [Zhang X. et al., 2014]. Следует отметить, что выбранные гены охватывают метаболизм эстрогенов, синтез эстрогенов, где ключевым ферментом является ароматаза или *CYP19*, а также ER, который придает клеткам чувствительность к эстрадиолу, ген *Cyclin D₁* – мишень ER, напрямую связанный с клеточной пролиферацией, *SULT1E1* участвующий в детоксификации эстрадиола для его элиминации из организма.

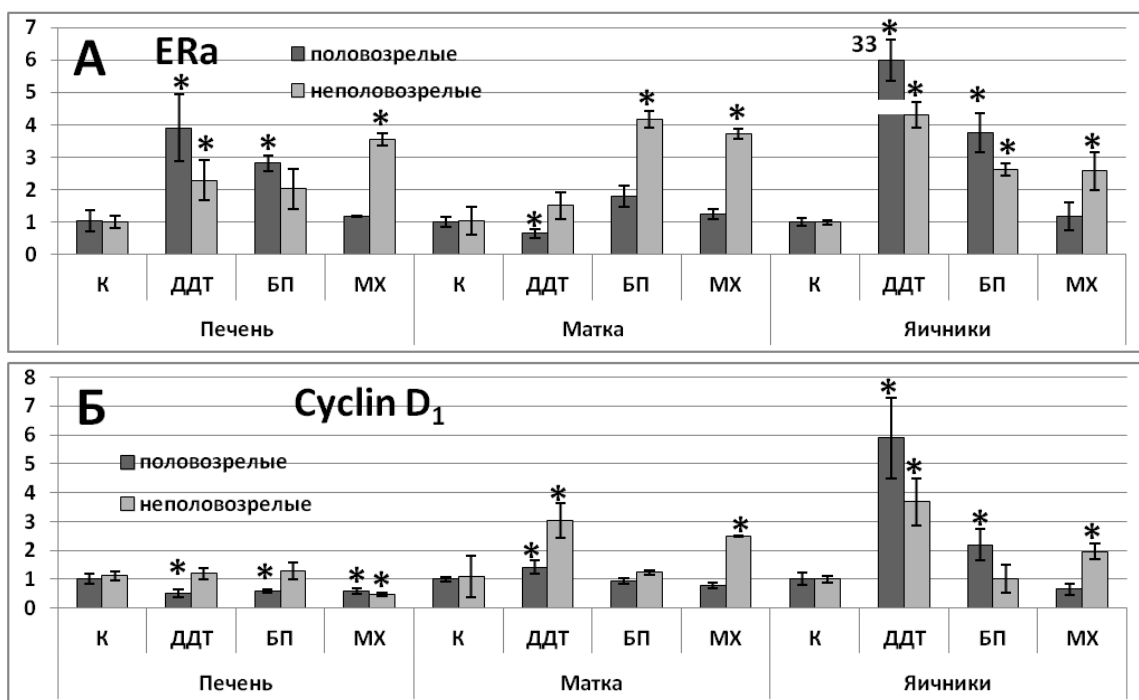


Рисунок 6. Относительный уровень экспрессии генов *ERα* (А) и *Cyclin D₁* (Б) в печени, матке, яичниках самок крыс, обработанных ДДТ, БП и МХ. По оси Y: отношение количества мРНК для индуцированной группы животных к контрольной группе. Приведены средние значения ± ошибка среднего (n=6 для группы половозрелых крыс и n=3 для неполовозрелых). * - достоверность различий по сравнению с контролем (p<0.05).

Наиболее интересными, по нашему мнению, являются результаты по экспрессии этого гена в яичниках. Введение ДДТ и БП половозрелым самкам крыс, также как и введение ДДТ и МХ неполовозрелым крысам, сопровождалось увеличением уровня экспрессии генов *ERα* и *Cyclin D₁*, причем эти величины достоверно коррелировали друг с другом (коэффициент корреляции составлял 0,886, $p < 0,05$). Можно предположить, что увеличение экспрессии гена *Cyclin D₁*, приводящее к ускорению клеточной пролиферации, является следствием действия ксенобиотиков на экспрессию гена *ERα*, а также их взаимодействия с рецептором *ERα*, как ксеноэстрогенов.

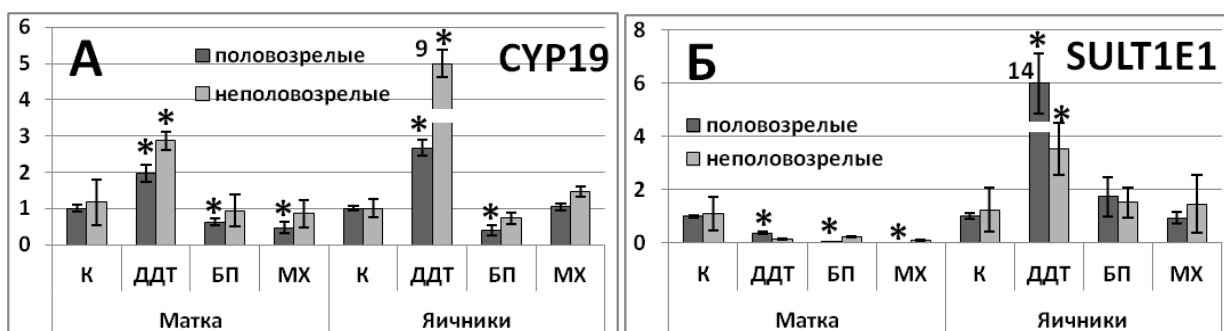


Рисунок 7. Относительный уровень экспрессии генов *CYP19* (А) и *SULT1E1* (Б) в матке и яичниках самок крыс, обработанных ДДТ, БП и МХ. По оси Y: отношение количества

мРНК для индуцированной группы животных к контрольной группе. Приведены средние значения \pm ошибка среднего (n=6 для группы половозрелых крыс и n=3 для неполовозрелых). * - достоверность различий по сравнению с контролем (p<0.05).

Введение ДДТ вызывало увеличение экспрессии гена *CYP19* в матке и яичниках половозрелых и неполовозрелых самок крыс, причем для неполовозрелых эффект ДДТ был выражен сильнее. Такие результаты согласуются с данными, полученными ранее в нашей лаборатории и данными литературы, в частности с тем, что введение ДДТ увеличивает активность ароматазы, что, в свою очередь, может привести к значительному увеличению содержания эстрадиола [Бочкарева Н.В. и др., 2003]. ДДТ увеличивал экспрессию гена *SULT1E1* в яичниках, тогда как БП и МХ не оказывали ярко выраженного эффекта. Введение всех исследуемых соединений оказывало негативный эффект на экспрессию данного гена в матке, причем, если ДДТ снижал ее более, чем наполовину у половозрелых крыс, то БП и МХ вообще сводили экспрессию гена *SULT1E1* к нулю! Для неполовозрелых крыс наблюдалась схожая картина, причем эффект МХ был выражен сильнее, чем БП. Таким образом, можно предположить, что исследуемые соединения вовлечены в гормональный канцерогенез по генотоксическому типу, способствуя повышению содержания высокореакционных гидроксильированных ДНК-тропных метаболитов эстрогенов за счет снижения их сульфонирования.

Исследование эффектов ксенобиотиков для половозрелых и неполовозрелых самок крыс

Полученные результаты говорят о том, что, в целом, ДДТ, БП, МХ оказывали схожий эффект на систему цитохрома P450 как половозрелых, так и неполовозрелых самок крыс. Различия были выявлены при исследовании экспрессии генов ядерных рецепторов и ароматазы. Введение ДДТ сопровождалось увеличением уровня экспрессии гена *CYP19* в матке в 2 и 3 раза для половозрелой и неполовозрелой групп, соответственно, тогда как в яичниках уровень экспрессии гена ароматазы увеличивался в 3 и 9 раз для половозрелой и неполовозрелой групп, соответственно (рис. 7). Полученные результаты говорят о том, что гиперэстрогенному эффекту ДДТ в большей степени подвержены неполовозрелые самки крыс, что подтверждается другими работами о высокой

чувствительности ювенильных особей к внешнему воздействию [Asaoka Y. et al., 2010]. Что касается воздействия ДДТ на организм человека, также отмечалось увеличение риска заболеваемости раком молочной железы в ювенильном периоде [Cohn B.A. et al., 2007].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итогом проведенных экспериментов явилось обобщение полученных результатов с целью создания модели взаимодействия исследуемых соединений с их ядерными рецепторами с последующей активацией их генов-мишеней, включая микроРНК (рис. 8-9). Все исследуемые соединения понижали экспрессию miR-21,221,222,429 в печени и увеличивали уровень экспрессии miR-21 в яичниках. Показано, что повышенная экспрессия данной микроРНК связана с ингибированием апоптоза [Si M.L. et al., 2007]. ДДТ увеличивал экспрессию гена ароматазы в матке и яичниках самок крыс, что, в свою очередь, способно привести к гиперэстрогении, ассоциирующейся с развитием рака молочной железы или эндометрия. Следует заметить, что данный эффект был сильнее выражен для неполовозрелых крыс.

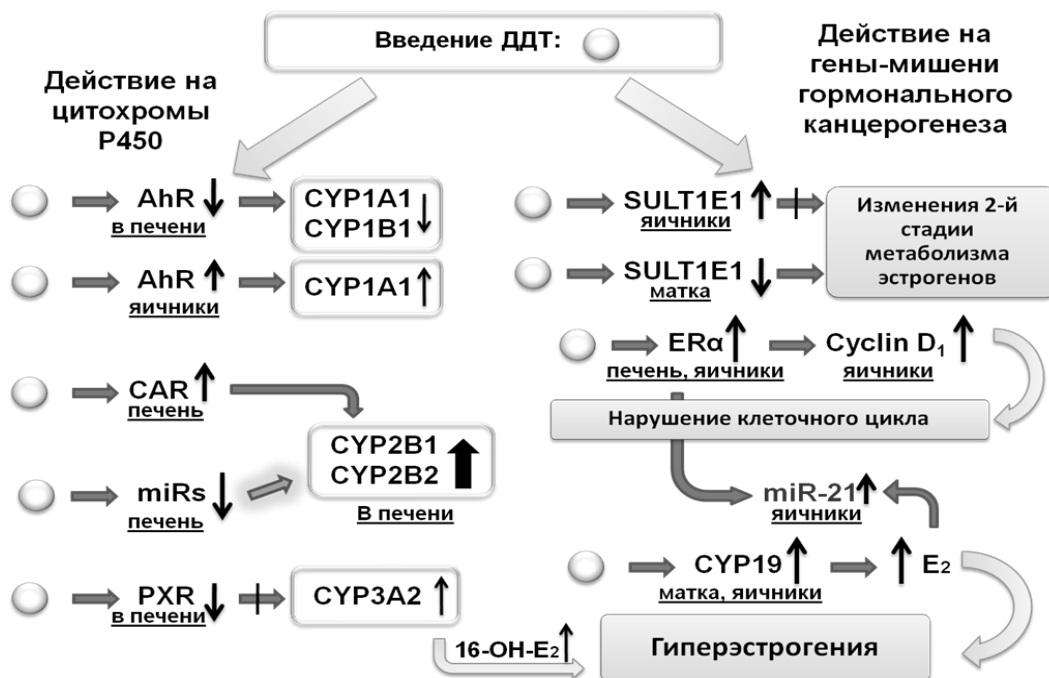


Рисунок 8. Схема, обобщающая эффекты ДДТ на ключевые гены гормонального канцерогенеза.

Введение ДДТ также сопровождалось увеличением экспрессии гена *ERα* и, как следствие, *Cyclin D₁*, в яичниках как половозрелых, так и неполовозрелых крыс,

что способно привести к нарушению регуляции клеточного цикла. Из полученных результатов можно сделать вывод, что ДДТ активирует экспрессию генов-мишеней, связанных с промоторным типом канцерогенеза. Введение БП или МХ сопровождалось многократным увеличением экспрессии генов P450 1-го семейства во всех исследуемых органах экспериментальных животных. Сверхэкспрессия гена *CYP1B1*, в свою очередь, способна привести к ускоренному метаболизму эстрогенов и, как следствие, увеличению содержания генотоксичных продуктов 1-й стадии метаболизма ксенобиотиков. Кроме того, БП и МХ снизили экспрессию гена *SULT1E1* в матке до нуля, таким образом, препятствуя конъюгации и снижению токсичности этих продуктов. БП вызывал увеличение экспрессии гена *ERα* во всех органах как у половозрелых, так и у неполовозрелых крыс, МХ проявлял такой эффект лишь у неполовозрелых животных. В яичниках увеличение экспрессии гена *ERα* приводило к переэкспрессии гена *Cyclin D1*. Вероятно, переэкспрессия miR-21 в яичниках самок крыс, обработанных БП и МХ, опосредована именно через ER.

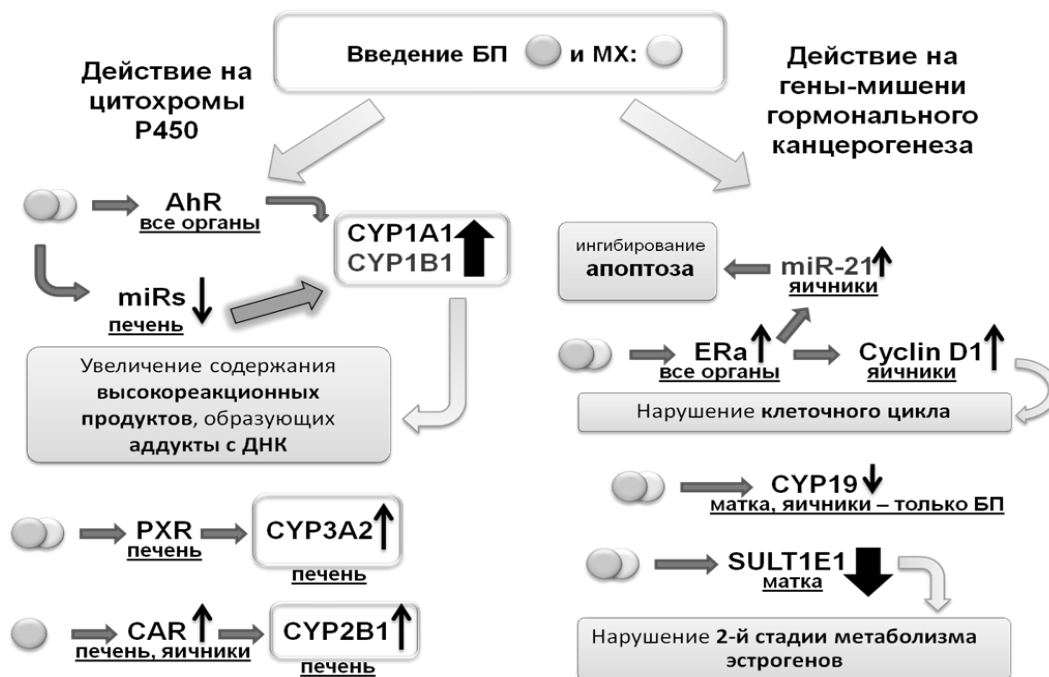


Рисунок 9. Схема, обобщающая эффекты бензо[а]пирена и 3-метилхолантрена на ключевые гены гормонального канцерогенеза.

Таким образом, БП и МХ могут быть активными участниками канцерогенеза, осуществляемого как по генотоксическому, так и промоторному типам.

Из полученных результатов можно сделать вывод, что исследуемые соединения оказывают множественные (плейотропные) эффекты на биохимические процессы в клетках, нарушая, таким образом, клеточный метаболизм, что может быть иницирующим шагом для запуска процессов клеточной трансформации.

ВЫВОДЫ

1. Профиль экспрессии микроРНК miR-21, 221, 222, 429 менялся в зависимости от органа крыс, подвергавшихся воздействию ДДТ, бензо[а]пирена и 3-метилхолантрена.
2. Экспрессия гена *CYP1A1* при введении ДДТ коррелировала с экспрессией гена *AhR*: увеличивалась в яичниках и снижалась в печени половозрелых крыс.
3. Экспрессия *CYP2B1* увеличилась в 5 раз в печени половозрелых крыс, обработанных бензо[а]пиреном, что сопровождалось усилением экспрессии гена *CAR*. Все исследуемые соединения увеличивали уровень экспрессии гена *CYP3A2* в печени в 2-30 раз. Изменение экспрессии гена *CYP3A2* при введении бензо[а]пирена и 3-метилхолантрена коррелировало с экспрессией гена *PXR*.
4. Введение исследуемых соединений самкам крыс увеличивало уровень экспрессии гена *ERα* в 2-30 раз во всех органах. Экспрессия гена *Cyclin D₁* коррелировала с геном *ERα* в яичниках половозрелых и неполовозрелых самок крыс, обработанных всеми исследуемыми соединениями. Экспрессия гена *CYP19* в матке и яичниках половозрелых и неполовозрелых крыс, обработанных ДДТ, увеличивалась в 2-9 раз. Бензо[а]пирен, напротив, в 2 раза снижал экспрессию гена ароматазы в матке и яичниках половозрелых крыс, 3-метилхолантрен – в 2 раза в матке.
5. Исследуемые соединения значительно снижали уровень экспрессии гена *SULT1E1* в матке как половозрелых, так и неполовозрелых крыс. Введение ДДТ вызывало увеличение уровня экспрессии этого гена в яичниках (15 и 4 раза для половозрелых и неполовозрелых самок крыс, соответственно).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Chanyshev M.D.**, Kosorotikov N.I., Titov S.E., Kolesnikov N.N., Gulyaeva L.F. Expression of microRNAs, CYP1A1 and CYP2B1 in the livers and ovaries of female rats treated with DDT and PAHs // *Life sciences*. – 2014. - V. 103. - P. 95-100.
2. Гуляева Л.Ф., **Чанышев М.Д.**, Колмыков С. К., Колесников Н.Н. Биоинформатические и экспериментальные подходы к изучению роли микроРНК в видо-специфичной индукции цитохрома P4502B // *Вестник НГУ. Биология и клиническая медицина*. – 2014. – Т. 12. - №1. – С. 5-11.
3. Gulyaeva L.F., **Chanyshev M.D.**, Kolmykov S.K., Titov S.E., Kolesnikov N.N. Expression of microRNAs in rat and mouse liver under exposure to CYP inducers // *Abstracts of 5th Asia Pacific Meeting*. - 2014, Tianjin, China, the International Society for the Study of Xenobiotics, P. 69.
4. Gulyaeva L.F., **Chanyshev M.D.**, Kosorotikov N.S., Kolesnikov N.N. miRNAs in post-transcriptional regulation of tissue-specific cytochrome P450 activity in female Wistar rats // *Protein Science 2013, Volume 22, Issue Supplement S1*, P. 225.
5. Колмыков С.К., **Чанышев М.Д.** МикроРНК в пост-транскрипционной регуляции активности цитохромов P450 // *Сб. Трудов IV конференции молодых ученых и студентов «Экспериментальная и прикладная физиология»*, Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина РАМН – Москва, Россия, 2013. - С. 17-18.
6. **Чанышев М.Д.** Исследование механизмов гормонального канцерогенеза на модели экспериментальных животных, обработанных различными ксенобиотиками // *Сибирский онкологический журнал, приложение №1, VII Региональная конференция молодых ученых-онкологов, посвященная памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии»* - Томск, Россия, 2012. – С. 174-175.
7. **Чанышев М.Д.** Воздействие ДДТ и бензо[а]пирена на иницирующие этапы гормонального канцерогенеза // *Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Молодые ученые за устойчивое развитие страны в глобальном мире» с международным участием – Москва, Россия, 2012. – С. 336-337.*

8. **Chanyshev M.D.**, Pustyl'nyak V.O., Gulyaeva L.F. Tissue-specific expression of hormonal carcinogenesis target genes in rats treated with polycyclic aromatic hydrocarbons // *Biochemistry (Moscow), Biomedical Chemistry*. – 2011. - V.5(3). - P. 226–230.