

УТВЕРЖДАЮ:

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки

«Институт молекулярной и клеточной биологии»
Сибирского отделения Российской академии наук

академик РАН Жимулев И.Ф.



15 «октября» 2014 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию

Чанышева Михаила Дамировича

«Экспрессия генов-мишеней гормонального канцерогенеза под воздействием ДДТ, бензо[а]пирена и 3-метилхолантрена», представленной к защите на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Актуальность для науки и практики

Работа Михаила Дамировича посвящена изучению механизмов возникновения гормонозависимых опухолей. Несомненно, что онкологические заболевания (и в том числе гормонозависимые опухоли) представляют очень актуальную проблему здравоохранения. Известно, что особенности метаболизма эстрогенов прямо влияют на развитие гормонального канцерогенеза в связи с тем, что именно эстрогены стимулируют процессы клеточной пролиферации в органах-мишенях. Автор диссертационной работы исследовал способ влияния ксенобиотиков на метаболизм стероидных гормонов и регуляцию клеточного деления. В качестве объектов изучения возникновения канцерогенеза были выбраны крысы из лабораторных линий, обработанные тремя химическими агентами, для которых ранее был показан индуцирующий эффект на монооксигеназы печени (хлорорганический инсектицид ДДТ и полициклические ароматические углеводороды - бензо[а]пирен (БП) и 3-метилхолантрен (МХ)).

Оригинальность данной работы заключается в том, что впервые рассмотрено воздействие ДДТ, БП и МХ на экспрессию генов-мишеней гормонального канцерогенеза

как генотоксического, так и промоторного типа. В работе выявлено, что ДДТ прежде всего индуцирует гены, вовлеченные в промоторный тип канцерогенеза, тогда как полициклические ароматические соединения индуцируют совершенно другой профиль экспрессии генов. Впервые установлено, что один из цитохромов P450 (CYP1B1) индуцируется на фоне сниженной экспрессии гена *SULT1E1*, что интерпретируется автором, как генотоксический тип гормонального канцерогенеза. Впервые также показано, что БП вызывает увеличение экспрессии генов эстрогенового рецептора *ERα*, белка клеточного цикла *Cyclin D₁* и цитохрома *CYP3A2*, что может свидетельствовать об его участии и в промоторном типе канцерогенеза.

Кроме того, в работе впервые продемонстрировано тканеспецифичное изменение уровня экспрессии онкогенных микроРНК при однократном введении индукторов цитохромов P450, что может свидетельствовать в пользу гипотезы об участии микроРНК в эпигенетических механизмах гормонального канцерогенеза.

Основные научные результаты

Основные научные результаты, полученные Чанышевым М.Д. в данной работе:

1. Показано, что экспрессия микроРНК miR-21, 221, 222, 429 может как увеличиваться, так и уменьшаться в разных органах крыс, подвергавшихся воздействию ксенобиотиков.
2. Введение ДДТ вызывает увеличение экспрессия генов *CYP1A1* и *AhR* в яичниках, но снижает экспрессию тех же генов в печени половозрелых крыс.
3. Показано пятикратное увеличение экспрессии цитохрома *CYP2B1*, сопровождаемое усилением экспрессии гена *CAR*, в печени половозрелых крыс, обработанных БП. Экспрессия гена цитохрома *CYP3A2* стабильно увеличивалась в печени 2-30 раз при введении ксенобиотиков.
4. Показано индуцированное увеличение уровня экспрессии гена рецептора эстрогена *ERα* в 2-30 раз во всех органах крыс. Экспрессия гена *Cyclin D₁* коррелировала с экспрессией гена *ERα*. Экспрессия гена *CYP19* в матке и яичниках крыс, обработанных ДДТ, увеличивалась в 2-9 раз. Показано, что БП в два раза снижал экспрессию гена ароматазы в матке и яичниках половозрелых крыс, а МХ – в два раза в матке.
5. Было обнаружено снижение уровня экспрессии гена сульфотрансферазы *SULT1E1* в матке как половозрелых, так и неполовозрелых крыс. Введение ДДТ вызывало увеличение уровня экспрессии гена сульфотрансферазы в яичниках (15 и 4 раза для половозрелых и неполовозрелых самок крыс, соответственно).

На основе полученных результатов делается вывод о том, что введение ДДТ активирует гены-мишени, связанные с промоторным типом канцерогенеза, в то время как БП и МХ являются индукторами канцерогенеза как промоторного, так и генотоксического типов.

Общая оценка работы

Диссертация написана по стандартной схеме, представлена на 107 страницах машинописного текста. Список литературы представлен 178 источниками, из которых 174 – из международных журналов. Большинство проанализированных работ опубликованы недавно в ведущих журналах по данной тематике.

Первой главой диссертации является обзор научной литературы, он изложен на 30 страницах, содержит 17 рисунков. Обзор написан хорошим языком и даёт представление о двух типах (генотоксическом и промоторном) канцерогенеза и о роли микроРНК в этих процессах. Здесь также подробно обсуждены токсические и канцерогенные свойства ДДТ, БП и МХ.

Глава 2 «Материалы и методы» изложена на 11 страницах, иллюстрирована тремя таблицами и одним рисунком. В этой главе достаточно детально описаны использованные методы исследования.

Самая большая глава «Результаты и их обсуждение» изложена на 32 страницах, иллюстрирована 24 рисунками. Автор диссертации оценил всю цепь индукции цитохромов P450 в печени крыс: количество матричной РНК (уровень экспрессии), содержание белка и его ферментативную активность. Показано, что введение экспериментальным животным (крысам) БП и МХ главным образом увеличивает в микросомах печени активность и содержание цитохромов P450 подсемейства 1A, тогда как ДДТ, наоборот, в большей степени увеличивает активность и содержание CYP2B.

Уровень экспрессии генов *CYP1A1/B1*, *CYP2B1/2*, *CYP3A2*, *AhR*, *CAR*, *PXR*, *ERα*, *Cyclin D1*, *CYP19*, *SULT1E1* наряду с уровнем микроРНК miR-21, 221, 222, 429 измерялся при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в трех органах – печени, матке и яичниках. Показано соответствие с данными результатов по активности ферментов. Особый интерес вызывают результаты оценки уровней экспрессии генов, регулирующих пролиферативную активность клетки, таких как *ERα*, *Cyclin D1*, *CYP19*. Так, например, показано, что при введении ДДТ уровень экспрессии гена ароматазы *CYP19* увеличивается в два раза в матке и яичниках самок крыс, что способно привести к состоянию гиперэстрогении, ассоциирующейся с раком тела матки. Вместе с тем,

экспрессия *SULT1E1*, одного из ключевых регуляторов концентрации эстрогенов, снижается в яичниках и возрастает в матке.

Важным результатом работы является также доказательство тканеспецифичности экспрессии микроРНК, участвующих в процессах канцерогенеза: miR-21, 221, 222, 429, что говорит об их участии в ответе клетки на воздействие исследуемых соединений.

Основным выводом работы является то, что ДДТ, БП и МХ обладают ярко выраженным действием на экспрессию генов цитохромов P450, участвующих в метаболизме эстрогенов (*CYP1A1/2*, и *CYP1B1*), генов *ERα*, *Cyclin D1*, *CYP19*, *SULT1E1*, участие которых в гормональном канцерогенезе считается доказанным, а также на профиль экспрессии микроРНК miR-21, 221, 222, 429.

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 гены-мишени гормонального канцерогенеза промоторного типа. Представители класса ПАУ БП и МХ влияют, помимо хорошо исследованного генотоксичного типа канцерогенеза, на метаболизм эстрогенов, что может привести к стимуляции деления ER-экспрессирующих 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 профилактики.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Считаем целесообразным продолжить работу по исследованию механизмов гормонального канцерогенеза, в частности, вовлеченности микроРНК в процессы канцерогенеза. Наиболее интересными для практического использования нам кажутся результаты по определению уровня экспрессии микроРНК и использования их для создания системы ранней диагностики онкологических заболеваний на основе микроРНК.

Общие замечания

В качестве замечаний следует отметить, что в рисунке 1 не хватает описания (количество выявленных случаев по оси ординат) и источника информации (даже если он указан в тексте). На рисунке 9 не указаны названия соединений. Главу 1.7. следовало

бы назвать «Заключение к обзору литературы». Глава 2.10 - не указана концентрация бромистого этидия в стоковом растворе. В глава 2.1. «полученные образцы кДНК были убраны в морозильщик» лучше было использовать стандартное «хранили при -20». Первый абзац главы 2.15 больше бы подошел для раздела «результаты», чем для раздела «Методы». На стр.79 название рыбы (*Fundulus heteroclitus*) не выделено курсивом, и видовое название не следует писать с заглавной буквы.

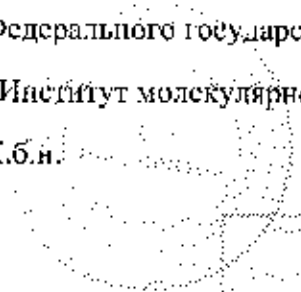
Ссылки на литературу в диссертации оформлены померами, но не порядку, т.к. в список литературы построен по алфавиту. Однако все ссылки можно легко найти, и они соответствуют померам.

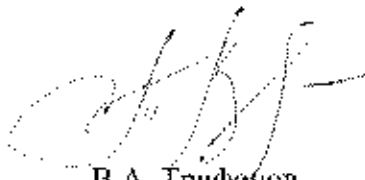
Следует заметить, что эти замечания не носят принципиальный характер и не умаляют научно-практической значимости диссертационной работы Чанышева М.Д.

Заключение

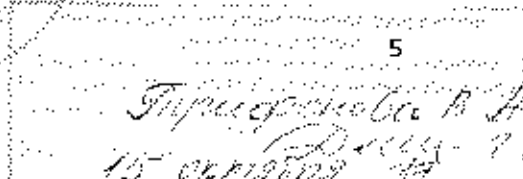
Диссертация Чанышева М.Д. «Изучение механизмов активации теплов-мишней гормонального канцерогенеза ксенобиотиками окружающей среды» (соискание ученой степени кандидата биологических наук, специальность 03.01.04 – биохимия) является законченным оригинальным исследованием, выводы которого полностью соответствуют полученному материалу, результаты отражены в достаточном количестве публикаций в рецензируемых журналах с высоким импакт-фактором, апробированы и обсуждены на научных конференциях. Представленная работа по своей актуальности, научной новизне, теоретической значимости результатов полностью отвечает требованиям пункта 7 «Положения ВАК РФ о порядке присуждения ученых степеней и ученых званий» утвержденного постановлением Правительства РФ, а ее автор Чанышев М.Д. заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 биохимия.

Отзыв на диссертацию и автореферат обсужден на семинаре Отдела разнообразия и эволюции животных от 12 сентября 2014 г., протокол № 12.

Заведующий лаборатории сравнительной геномики
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Институт молекулярной и клеточной биологии» СО РАН.
К.б.н. 


В.А. Трифонов

15 октября 2014 г.


5
Трифонов В.А.
15 октября 2014 г.