

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
им. Н.Н. Петрова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

на правах рукописи

ГУБАРЕВА Екатерина Александровна

Влияние постоянного освещения и введения мелатонина на канцерогенез и
экспрессию часовых генов в опухолях у мышей

14.01.12 – онкология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель;
член-корреспондент РАН,
д.м.н., профессор
Анисимов Владимир Николаевич

Санкт-Петербург, 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Циркадианные ритмы	13
1.1.1. Физиологические механизмы поддержания суточных ритмов	13
1.1.2. Молекулярные механизмы функционирования клеточных «часов»	16
1.1.3. Роль света в регуляции часовых генов и циркадианных ритмов	21
1.1.4. Роль мелатонина в регуляции часовых генов и циркадианных ритмов	25
1.2. Нарушение циркадианных ритмов и опухолевый процесс	29
1.2.1. Взаимосвязь часовых генов и ключевых характеристик рака	29
1.2.2. Нарушение экспрессии часовых генов в опухолях	34
1.2.3. Нарушение циркадианных ритмов как канцерогенный фактор	38
1.2.4. Антиканцерогенные свойства мелатонина	43
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	51
2.1. Препараты	51
2.2. Животные	51
2.3. Дизайн экспериментов	53
2.3.1. Исследование влияния режима освещения и введения мелатонина на канцерогенез легкого	53
2.3.2. Исследование влияния режима освещения и введения мелатонина на химически индуцированный канцерогенез кожи мышей	54
2.3.3. Изучение суточных колебаний экспрессии часовых генов и белков и пролиферации кишечного эпителия у мышей линии FBV, трансгенных по HER2/neu	56
2.4. Оценка экспрессии часовых генов	57
2.5. Гистологическое исследование	59
2.6. Окраска гематоксилином-эозином	60
2.7. Иммуногистохимическое окрашивание	60
2.8. Оценка часовых белков	62
2.8.1. Оценка содержания часовых белков в опухолевой и нормальной ткани легкого	62
2.8.2. Оценка содержания часовых белков в коже и опухолях кожи	63
2.8.3. Оценка содержания часовых белков в молочной железе и спонтанных опухолях молочной железы мышей линии FBV, трансгенных по HER2/neu	63

2.9. Изучение суточных колебаний митотической активности спонтанных опухолей молочной железы мышей линии FBV, трансгенных по HER2/neu.....	64
2.10. Изучение суточных колебаний пролиферации и апоптоза в кишечном эпителии мышей линии FBV, трансгенных по HER2/neu.....	64
2.11. Статистическая обработка данных.....	64
3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	66
3.1. Влияние режима освещения и введения мелатонина на канцерогенез легких, индуцированный уретаном у мышей.....	66
3.2. Влияние режима освещения и введения мелатонина на канцерогенез кожи, индуцированный ДМБА и ТФА у мышей SHR возрастом 14 месяцев	70
3.3. Экспрессия часовых генов в опухолях легких, индуцированных уретаном у мышей.....	78
3.4. Содержание часовых белков в опухолях легких, индуцированных уретаном у мышей SHR	83
3.5. Содержание часовых белков в опухолях кожи, индуцированных ДМБА и ТФА у мышей.....	88
3.6. Суточные изменения экспрессии часовых генов и белков в нормальных тканях и спонтанных опухолях молочной железы мышей линии FBV и линии FBV, трансгенных по HER2/neu.....	95
3.7 . Суточные изменения митотической активности спонтанных опухолей молочной железы мышей FBV/N, трансгенных по HER2/neu	107
3.8. Суточные изменения пролиферации и апоптоза в кишечном эпителии мышей FBV, трансгенных по HER2/neu.....	109
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	111
4.1. Влияние режима освещения и введения мелатонина на канцерогенез легких, индуцированный уретаном у мышей.....	111
4.2. Влияние режима освещения и введения мелатонина на канцерогенез кожи, индуцированный ДМБА и ТФА у мышей SHR	113
4.3. Экспрессия часовых генов в опухолях легких, индуцированных уретаном у мышей SHR	114
4.4. Экспрессия часовых белков в опухолях легкого, индуцированных уретаном у мышей SHR	115
4.5. Экспрессия часовых белков в опухолях кожи, индуцированных ДМБА и ТФА у мышей SHR.....	116
4.6. Экспрессия часовых генов в опухолях молочной железы и неопухолевых тканях мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu.....	117
4.7. Суточная динамика пролиферации в опухолях молочной железы и кишечном эпителии мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu	120
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122

ВЫВОДЫ	123
СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ	125
СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ	126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:	131

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Биологические ритмы у живых организмов возникли как адаптивный механизм, позволяющий не просто реагировать на циклически изменяющиеся параметры окружающей среды, но заблаговременно готовиться к ним. У млекопитающих в течение суток изменяется уровень активности мозга (сон-бодрствование), артериального давления, температуры тела, синтеза и секреции гормонов, иммунных реакций, пролиферации клеток и апоптоза в некоторых тканях [55, 237]. Основную роль в регуляции суточных ритмов играет супрахиазматическое ядро гипоталамуса (СХЯ); «гормон темноты» мелатонин (МТ) выполняет функцию синхронизации центрального (СХЯ) и периферических осцилляторов.

Биологические часы на клеточном уровне реализуются осцилляциями транскрипции генов *Bmal1,2*, *Clock* и *Npas2*, *Per1–3*, *Cry1, 2*, возникающими благодаря нескольким транскрипционно-трансляционным контурам обратной связи между уровнями продуктов этих генов и их активности. В результате осцилляций в системе этих часовых генов (ЧГ) и белков в клетке с суточной периодичностью происходит транскрипция многих других генов, ремоделирование хроматина [145], пост-транскрипционный процессинг [117, 154] и трансляция мРНК [98]. Свет является важнейшим фактором синхронизации циркадианных ритмов у млекопитающих, а нарушение режима освещения негативным образом сказывается не только на поддержании суточных ритмов активности, но и на поведении, метаболизме, синтезе и секреции различных гормонов [108]. Свет, поступающий на сетчатку ночью, блокирует синтез мелатонина - гормона эпифиза, ответственного за синхронизацию суточных ритмов, а также обладающего антиоксидантным, антигонадотропным и противоопухолевым действием [5]. Нарушение циркадианных ритмов,

вызванное световым загрязнением в больших городах, а также изменением ритма жизни (сменная работа, круглосуточный доступ к телевидению и интернету), является важной проблемой современного общества. Доказано, что освещение ночью увеличивает риск развития многих заболеваний, в т.ч. онкологических [6]. Как в эпидемиологических исследованиях, так и в эксперименте доказана связь нарушений режима освещения с повышением частоты развития опухолей молочной железы, простаты и прямой кишки [151].

Показано, что в различных опухолях человека нарушается согласованная экспрессия ЧГ; во многих случаях экспрессия репрессоров транскрипции *Per* и *Cry* снижается, а экспрессия активаторов транскрипции *Bmal* и *Clock* повышается [196, 255]. При этом экспериментальные данные о ритме экспрессии часовых генов в опухолях не позволяют выявить общих тенденций [146, 229].

Доказано, что МТ влияет на различные характеристики опухоли через множественные механизмы [49, 226]. *In vivo* торможение роста опухолей МТ у лабораторных животных показано на многих моделях, в том числе и при нарушении суточных ритмов [163, 262]. Возможности фармакологической коррекции нарушений циркадианных ритмов в опухолях, а также влияние нарушения режима освещения и введения МТ на клеточные «часы» в них остаются недостаточно изученными, причем эти вопросы не могут быть полноценно исследованы в эпидемиологических и клинических наблюдениях. Кроме того, в некоторых экспериментах описано противоопухолевое действие мелатонина в условиях стандартного и постоянного освещения [38, 203], тогда как в других работах показано, что МТ не угнетает канцерогенез при нарушении суточных ритмов [10, 163], поэтому данный вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

Таким образом, изучение влияния МТ на канцерогенез при нарушении суточных ритмов, а также оценка суточного ритма экспрессии

часовых генов и белков у животных с опухолями представляются актуальной задачей.

Степень разработанности темы

Изучение связи между нарушением суточных ритмов и опухолевым процессом ведется уже несколько десятилетий. Доказано, что клеточные «часы» участвуют в регуляции таких фундаментальных процессов, как пролиферация, дифференцировка и апоптоз, которые, как правило, нарушаются при возникновении опухолей [207]. К настоящему времени на клиническом материале описаны изменения экспрессии основных часовых генов в опухолях различных локализаций [196, 272]. Однако, материал клинических исследований не позволяет оценивать суточные ритмы экспрессии ЧГ в опухолях и влияние на них различных факторов окружающей среды. Экспериментальные данные в этой области на сегодняшний день немногочисленны. В нескольких работах показано, что ритмы в опухолевой ткани по сравнению с нормальной нарушаются [93, 146, 214], тогда как результаты, полученные на других моделях, свидетельствуют о сохранении суточных ритмов в опухолевых клетках [182, 229, 254]. Кроме того, в последние годы опубликовано несколько работ, посвященных влиянию опухолей на суточные ритмы организма или дистантных тканей, не затронутых опухолевым процессом [93, 146].

Несмотря на большое количество экспериментальных исследований, посвященных частным аспектам изучения взаимосвязи циркадианных ритмов и опухолевого процесса, наблюдается недостаток комплексных исследований, в частности таких, где оценивались бы одновременно влияния нарушений суточных ритмов и введения МТ на систему часовых генов и белков.

Цель исследования:

Оценка влияния постоянного освещения и введения мелатонина на химически индуцированный канцерогенез у мышей; оценка экспрессии часовых генов и их белковых продуктов в опухолях различных локализаций.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние постоянного освещения и введения мелатонина на химически индуцированный канцерогенез легкого у мышей SHR.
2. Изучить влияние постоянного освещения и введения мелатонина на химически индуцированный канцерогенез кожи у мышей SHR.
3. Изучить влияние постоянного освещения и введения мелатонина на экспрессию часовых генов и содержание часовых белков в опухолевой и нормальной тканях легкого у мышей SHR.
4. Изучить влияние постоянного освещения и введения мелатонина на содержание часовых белков в опухолевой и нормальной тканях кожи у мышей SHR.
5. Оценить суточные колебания экспрессии часовых генов в опухолевой и нормальной ткани молочной железы, СХЯ и печени у мышей линии FVB/N дикого типа и трансгенных по HER2/neu.
6. Оценить суточные колебания пролиферативной активности опухолей молочной железы и кишечного эпителия у мышей линии FVB/N, трансгенных по HER2/neu.

Научная новизна

Экспериментальное исследование влияния режима освещения в сочетании с введением МТ на канцерогенез и экспрессию часовых генов и белков проведено впервые. Показано, что содержание часовых белков в опухолях кожи и легкого изменяется по сравнению с нормальной тканью, в опухолях двух локализаций разного гистогенеза продемонстрировано увеличение содержания часовых белков-активаторов транскрипции.

Показано влияние постоянного освещения и введения мелатонина как на показатели канцерогенеза, так и на систему часовых генов и белков.

Впервые показано, что развитие спонтанных опухолей молочной железы влияет на ритм экспрессии часовых генов в тканях, не затронутых непосредственно опухолевым процессом – печени и центральном осцилляторе организма.

Теоретическая и практическая значимость

В результате экспериментального исследования выявлено, что нарушение суточных ритмов способствует канцерогенезу, а опухолевый процесс влияет на ритм экспрессии генов не только в окружающей опухоль ткани, но и в СХЯ, которое регулирует суточные ритмы всего организма. В связи с этим целесообразно дальнейшее изучение препаратов с хронобиотической активностью на экспериментальных моделях различных опухолей. Применение хронобиотиков в лечении онкологических пациентов потенциально может не только повысить эффективность лечения, но и улучшить качество жизни за счет стабилизации суточных ритмов. Помимо этого, полученные данные расширяют теоретические представления о роли часовых генов и белков в развитии опухолевого процесса.

Методология и методы исследования

Исследование проведено с использованием трех экспериментальных моделей опухолей:

- 1) химически индуцированный канцерогенез легкого у мышей SHR;
- 2) химически индуцированный канцерогенез кожи у мышей SHR;
- 3) спонтанные опухоли молочной железы у мышей FBV/N, трансгенных по HER2/neu.

В каждом эксперименте использовано достаточное для получения статистически значимых результатов число животных; предусмотрены

необходимые для обоснования наблюдаемых эффектов контрольные группы мышей. На каждой модели опухолей проводили измерения новообразований, затем проводили расчет их частоты и множественности. Для оценки часовых генов использован метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, позволяющий оценить уровень экспрессии исследуемого гена по отношению к гену домашнего хозяйства. Для оценки содержания часовых белков в опухолях и неопухолевых тканях использован метод иммуногистохимии, который позволяет оценить уровень содержания белка с использованием полуколичественных методик, а также его локализацию в клетках. Для обработки полученных данных использованы адекватные статистические критерии. Полученные результаты исследований обобщены, подвергнуты анализу и сопоставлены с результатами, описанными в мировой литературе.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Нарушение светового режима способствует развитию химически индуцированных опухолей легкого и кожи. Введение мелатонина тормозит канцерогенез при постоянном освещении, тогда как в условиях смены дня и ночи у животных его введение не влияет на число и размеры опухолей обеих локализаций.

2. Содержание часовых белков в опухолях изменяется по сравнению с нормальной тканью. Содержание белков-активаторов транскрипции BMAL1 и CLOCK возрастает в доброкачественных и злокачественных опухолях по сравнению с соответствующей нормальной тканью.

3. Нарушение светового режима, так же как экзогенный мелатонин, могут влиять на экспрессию часовых генов и содержание часовых белков в опухолевых и нормальных тканях.

4. В спонтанных опухолях молочной железы у мышей, трансгенных по HER-2/neu отсутствуют суточные колебания экспрессии часовых генов. При этом суточные колебания экспрессии ЧГ в центральном осцилляторе

организма (СХЯ), печени и молочной железе при опухолевом процессе нарушаются.

5. У мышей, трансгенных по HER-2/neu суточная динамика пролиферации в кишечном эпителии прогрессивно нарушается с увеличением объема опухолевой ткани.

Степень достоверности и апробация работы

Результаты проведенного исследования достоверны и обоснованы, что обусловлено достаточным количеством экспериментальных животных, использованных в опытах (270 мышей), включением необходимых контрольных групп, оценкой нескольких экспериментальных моделей и применением современных морфологических и молекулярных методов исследования.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на следующих мероприятиях: II Российский симпозиум с международным участием «Световой режим, старение и рак» (Петрозаводск, 2013), VIII Всероссийский съезд онкологов (Санкт-Петербург, 2013), 4 Всероссийский симпозиум с международным участием (Екатеринбург, 2013), конференция молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2014), Всероссийская конференция молодых ученых-онкологов «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 2014), Всероссийская конференция молодых ученых-онкологов в рамках II форума молодых ученых U-NOVUS (Томск, 2015), международная конференция «Молекулярная онкология. Итоги и перспективы» (Москва, 2016), I, III и IV Петербургский международный онкологический форум "Белые ночи (Санкт-Петербург, 2015; 2017 и 2018).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Личный вклад автора

Автор работы принимал непосредственное участие в планировании экспериментальных исследований, работе с животными, взятии материала, проведении патоморфологического анализа, ПЦР, ИГХ, статистической обработке результатов и подготовке публикаций.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа «Влияние постоянного освещения и введения мелатонина на канцерогенез и экспрессию часовых генов в опухолях у мышей», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, соответствует специальности 14.01.12 – онкология в области изучения патогенеза злокачественных опухолей с использованием методов молекулярной биологии и морфологии (п.2).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов собственных исследований, заключения и обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Диссертационная работа изложена на 163 страницах, иллюстрирована 15 таблицами и 41 рисунком. Список использованной литературы включает в себя 273 источника, из них 261 на иностранных языках.

Благодарности

Автор выражает благодарность Анисимову Владимиру Николаевичу за руководство работой, научному коллективу лаборатории канцерогенеза и старения за помощь в планировании и организации исследований. Также автор благодарит сотрудников лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России за предоставленную возможность провести исследование экспрессии часовых генов.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Циркадианные ритмы

1.1.1. Физиологические механизмы поддержания суточных ритмов

Практически все процессы в организме млекопитающих подвержены суточным колебаниям: локомоторная активность, сон-бодрствование, синтез и секреция гормонов и нейромедиаторов, поддержание температуры тела, различные метаболические процессы, экспрессия генов и др. [190, 264]. Смена дня и ночи является одним из важнейших периодически повторяющихся изменений в окружающей среде, и суточные ритмы необходимы для того, чтобы не просто реагировать на эти изменения, но предвосхищать их, т.е. заранее включать необходимые поведенческие или другие программы. Предполагается, что суточные ритмы появились уже у древнейших одноклеточных организмов, чтобы ограничить репликацию ДНК темным временем суток и тем самым защитить ее от повреждений, вызванных ультрафиолетовым излучением солнца [14]. У многоклеточных организмов, включая млекопитающих, суточные ритмы поддерживаются на клеточном уровне благодаря ритмической экспрессии часовых генов, а системные сигналы позволяют синхронизировать ритмы клеток, тканей и целого организма с окружающей средой.

Суточный, или циркадианный (от латинского *circa diem* – около суток), ритм предполагает, что некий процесс (а) имеет собственный период примерно в 24 часа; (б) может регулироваться адекватными внешними стимулами; (в) проявляет температурную компенсацию [190]. Следует подчеркнуть, что циркадианные ритмы являются эндогенными, поэтому сохраняются, если организм поместить в постоянные условия. Впервые это было показано в XVIII веке французским ученым де Мейреном, описавшим суточный ритм движения листьев растения,

которое поместили в темную комнату. Такой ритм, лишенный внешних факторов синхронизации, называют свободнотекущим. Интересно, что период такого ритма практически никогда не равен 24 часам. Еще в 1960-х гг. XX века Колин Питтендрих и Юрген Ашофф, которых считают основателями хронобиологии, показали, что это позволяет организму ежедневно подстраивать биологические часы под астрономическое время [20]. И если в постоянных лабораторных условиях биологические часы постепенно «уйдут вперед» или «отстанут», то в естественных условиях смена дня и ночи определяет 24-часовой период. Было показано, что у человека и других дневных животных в постоянной темноте циркадианный период удлиняется, а у ночных, напротив, сокращается [159]. Эта закономерность называется «правилом Ашоффа».

Физиологический «центр управления» суточными ритмами был обнаружен несколько позже. В 1972 году две группы американских физиологов выяснили, что разрушение ядра мозга, лежащего над оптической хиазмой, вызывает нарушение суточных ритмов у мышей [90]. Трансплантация супрахиазматического ядра (СХЯ), как было показано позже, восстанавливает суточную ритмичность [221]. СХЯ работает как мультифункциональный таймер, регулируя ритмы периферических осцилляторов через нейроэндокринную систему. Нейронные проекции из СХЯ идут в различные области мозга, включая эпифиз [105].

При наличии светового стимула, нейроны СХЯ подают ингибирующие стимулы пинеалоцитам (железистым клеткам эпифиза), в то время как в течение темного периода стимуляция СХЯ светом отсутствует и происходит синтез и секреция мелатонина клетками эпифиза. Мелатонин эволюционно появляется значительно раньше, чем собственно эпифиз, и обнаруживается уже у одноклеточных эукариотов. Этот гормон синтезируется из триптофана преимущественно в ночной период у видов с дневной и ночной активностью. Поскольку стимуляция СХЯ светом блокирует синтез мелатонина, его часто называют «гормоном

темноты». Мелатонин способствует синхронизации периферических осцилляторов с центральным. Кроме того, мелатонин обладает прямым антиоксидантным действием и нейтрализует активные формы кислорода и азота [5, 184].

В организмах млекопитающих существуют множественные периферические осцилляторы, частично независимые от центрального. Каждая ткань реализует собственные механизмы синхронизации функционирования отдельных единиц через паракринное и межклеточное взаимодействие [120, 223]. Например, функционирование печени как ткани с высокой метаболической активностью ограничено временем поступления питательных веществ; одновременно выводятся токсичные компоненты. У лабораторных грызунов, помещенных в условия ограниченного кормления, когда питание доступно только 1-2 часа в день, печень устанавливает свои молекулярные часы в зависимости от времени кормления, а ритм СХЯ регулируется светом, как и в обычных условиях [153]. Таким образом, центральный осциллятор не является строгим регулятором для периферических. Периферические ткани имеют собственный ритм, когда как СХЯ синхронизирует их.

Различные стимулы способны синхронизировать биологические часы включая температуру, время приема пищи, физические нагрузки и некоторые фармакологические препараты. Тем не менее, самым значимым является естественное или искусственное освещение [201].

Таким образом, циркадианные ритмы присущи практически всем живым организмам; смена дня и ночи необходима для «подстройки» биологических часов. У млекопитающих основную роль в регуляции суточных ритмов играет СХЯ; «гормон темноты» мелатонин выполняет функцию синхронизации центрального и периферических осцилляторов.

1.1.2. Молекулярные механизмы функционирования клеточных «часов»

1.1.2.1. Биологические «часы» на клеточном уровне

На клеточном уровне суточные ритмы поддерживаются с помощью осциллирующей экспрессии часовых генов и их белковых продуктов. У млекопитающих часовые гены включают несколько семейств генов-паралогов: *Bmal1,2*, *Clock* и *Npas2*, *Per1–3*, *Cry1, 2* [172]. Между экспрессией часовых генов и действием их белковых продуктов (далее – часовые белки) можно выделить несколько транскрипционно-трансляционных контуров обратной связи. *BMAL1* и *CLOCK* (или *NPAS2*) являются активаторами транскрипции. Эти белки включают в себя домены PAS (Period-ARNT-single-minded), необходимые для белок-белковых взаимодействий, и домены bHLH (basic helix-loop-helix), позволяющие белкам взаимодействовать с ДНК. *Bmal* и *Clock* (или *Npas2*) в цитоплазме клетки образуют гетеродимеры, кроме того, показано, что молекулы *Bmal1* могут формировать гомодимеры [252]. Белки в составе таких комплексов активируются, транслоцируются в ядро и связываются со специфической последовательностью ДНК из 6 нуклеотидов (E-box). *BMAL1* и *CLOCK* привлекают ацетилтрансферазы и метилтрансферазы гистонов к сайтам связывания с ДНК, что ведет к ремоделированию хроматина и разборке нуклеосом [236]. Таким образом, энхансерные и кодирующие последовательности генов становятся доступны для других транскрипционных факторов, коактиваторов транскрипции, РНК-полимеразного комплекса [155]. В результате запускается транскрипция ряда генов, включая часовые. Когда в цитоплазме образуется достаточно молекул белков *Per* и *Cry*, они образуют комплексы, которые транслоцируются в ядро, связываются с комплексами *CLOCK-BMAL1*-ДНК и подавляют транскрипцию [224]. Кроме того, *PER* и *CRY* привлекают гистон-деацетилазы и деметилазы, которые возвращают хроматин в неактивное состояние [40]. *Per* и *Cry* подвергаются

фосфорилированию, что ведет к протеасомной деградации [241]. Таким образом, комплекс BMAL1-CLOCK освобождается от репрессоров и может запустить новый суточный цикл экспрессии генов.

У мышей активация BMAL1-CLOCK происходит в дневное время, что ведет к транскрипции и накоплению белковых продуктов генов *Per* и *Cry* к началу темновой фазы [130].

Активация транскрипции собственных репрессоров белками *Bmal* и *Clock* является основным контуром обратной связи. В клетке есть несколько дополнительных регуляторных механизмов, необходимых для более точной подстройки «часового механизма».

Димер BMAL1-CLOCK индуцирует транскрипцию генов *Nr1d1* и *Nr1d2*, белковые продукты которых обозначаются как RORa и REV-ERBa, соответственно. Эти белки являются транскрипционными факторами, которые конкурентно связываются со специфической последовательностью RORE в промоторах различных генов, включая *Bmal1* [260]. Кроме того, в регуляции суточных ритмов транскрипции генов участвуют белки, взаимодействующие с последовательностью D-box в промоторах. Эти транскрипционные факторы включают активаторы DBP (D-box binding protein), TEF (thyrotroph embryonic factor), HLF (hepatic leukemia factor) и репрессор NFIL3 (Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated) или E4BP4, которые формируют дополнительный транскрипционно-трансляционный контур обратной связи [116].

Посттрансляционные модификации часовых белков являются еще одним важным механизмом регуляции суточного цикла в клетке. К таким модификациям относятся фосфорилирование казеин-киназами гликоген-синтазы ($GSK3\alpha/\beta$) и дефосфорилирование [241].

Фосфорилирование разных сайтов часовых белков регулирует их внутриклеточную локализацию, стабильность и активность; гиперфосфорилирование ведет к убиквитин-зависимой протеасомной деградации белков [44].

Таким образом, биологические часы на клеточном уровне реализуются через несколько транскрипционно-трансляционных контуров обратной связи, которые возникают вследствие ритмической транскрипции генов *Bmal1,2*, *Clock* и *Npas2*, *Per1–3*, *Cry1, 2*. В результате осцилляций в системе часовых генов и белков в клетке с суточной периодичностью происходит транскрипция многих генов, ремоделирование хроматина [145], пост-транскрипционный процессинг мРНК [117, 154] и трансляция [98].

1.1.2.2. Регуляция суточных ритмов экспрессии генов на уровне организма

Экспрессия часовых генов обнаружена практически во всех тканях организма. Соответственно, в различных периферических тканях описан суточный ритм экспрессии часовых и многих других генов. Считается, что экспрессия генов синхронизирована в пределах тканей и органов. СХЯ является центральным осциллятором и передает периферическим тканям информацию об освещенности, но периферические осцилляторы сохраняют определенную степень автономии и в некоторых случаях могут синхронизироваться другими стимулами.

Часовые гены у млекопитающих ритмически экспрессируются в большинстве тканей, включая мозг, сердце, печень, тимус, эндокринные железы [259]. Более того, при культивировании *ex vivo* многие ткани сохраняют ритмическую экспрессию часовых генов в течение нескольких циркадианных циклов. Этот вопрос был подробно изучен на крысах, несущих трансген *Period1*-люцифераза, у которых экспрессия люциферазы находится под контролем промотора *Period* и имеет такую же цикличность. Циркадианный ритм биолюминесценции сохранял устойчивость как минимум до 6 дня культивирования тканей СХЯ *ex vivo* в среде, содержащей люциферин, хотя амплитуда сигнала несколько снижалась со временем [20]. Ткани скелетной мышцы, легкого и печени,

культивируемые *ex vivo*, также сохраняли циркадианные ритмы экспрессии на протяжении 2-7 суточных циклов. Эти исследования подтвердили факт существования нескольких осцилляторов у млекопитающих. Было обнаружено, что циркадный ритм экспрессии генов в СХЯ быстро подстраивался к новому циклу свет-темнота, в то время как ритмы периферических тканей вовлекались в новый цикл смены «дня» и «ночи» только через несколько дней [253]. Важным фактом также является то, что скорость подстройки различных периферических органов к новому циклу может варьировать.

Есть данные о том, что до 10 % транскриптома в пределах какой-либо ткани имеет суточный ритм экспрессии [154, 259]. При анализе суточных изменений в транскриптоме была обнаружена цикличность экспрессии более половины всех генов, по крайней мере в пределах одной ткани; важным является то, что многие из ритмически экспрессирующихся генов кодируют биологические мишени различных лекарственных препаратов [259]. Интересно, что в различных периферических тканях значительно различается набор генов, имеющих суточный ритм экспрессии, хотя все они регулируются системой часовых генов и белков. К примеру, в бета-клетках островков Лангерганса поджелудочной железы и печени мышей было обнаружено совпадение 40% генов, идентифицированных как прямые мишени связывания BMAL1. По-видимому, в разных органах мышей связывание часовых белков с ДНК локализуется в регуляторных областях различных генов, что подтверждает наличие тканеспецифичной регуляции циркадных ритмов [174].

Многочисленные исследования подтверждают, что для поддержания гомеостаза периферических тканей в них должен сохраняться «часовой механизм». Так, тканеспецифическое выключение гена *Bmal1* в различных тканях ведет к нарушению их нормального функционирования, несмотря на сохранение системных ритмических сигналов. Например, у мышей, с тканеспецифическим нокаутом *Bmal1* в сетчатке глаза, также как у полных

нокаутов по *Bmal1*, нарушена обработка зрительных сигналов и отсутствует циркадианный ритм электрического отклика на свет во внутреннем ядерном слое сетчатки. Это свидетельствует о том, что локальные клеточные часы регулируют восприятие света глазами млекопитающих [216].

Также описаны разнообразные нарушения обмена веществ у мышей с тканеспецифичным нокаутом *Bmal1* в органах, ответственных за метаболизм: в печени [127], скелетных мышцах [81], поджелудочной железе [144]. Вероятно, наиболее тяжелые последствия наблюдаются у мышей с тканеспецифическим выключением *Bmal1* в кардиомиоцитах, которые характеризуются укороченной продолжительностью жизни [257].

Вопрос о независимости периферических осцилляторов от центрального был изучен на различных моделях. На моделях повреждения СХЯ и тканеспецифического нокаута *Bmal1* в головном мозге (затрагивающего в том числе СХЯ) подтверждена гипотеза о том, что СХЯ координирует фазы периферических осцилляторов. Суточный ритм экспрессии часовых генов в периферических тканях сохранялся, но амплитуда колебаний снижалась; кроме того, наблюдались сдвиги фаз ритмов периферических тканей по сравнению с контрольными животными [97, 222]. Было доказано, что роль в поддержании суточного ритма экспрессии генов в печени играют и СХЯ, и локальные клеточные часы. С использованием мышей, у которых экспрессия гена *RevErb* в печени зависела от доксициклина (в отсутствие антибиотика нарушалось функционирование часовых генов в гепатоцитах) было показано, что экспрессия большей части циркадианного транскриптома зависит от локальных молекулярных «часов». При этом ритмическая экспрессия 31 гена, в число которых входил *Per2* (порядка 10 % циркадианного транскриптома), сохранялась при выключении клеточных часов в печени [123]. Вышеприведенные факты убедительно свидетельствуют о том, что

молекулярные часы периферических тканей лишь частично зависят от системных сигналов.

Таким образом, клеточные часы в периферических тканях находятся под контролем центрального осциллятора, что необходимо для согласованной работы различных систем в пределах организма в соответствии с ритмическими изменениями параметров окружающей среды. При этом они сохраняют определенную степень автономии, что, вероятно, позволяет осуществлять более точную настройку «часов» и включение тканеспецифических генов.

1.1.3. Роль света в регуляции часовых генов и циркадианных ритмов

Свет является важнейшим стимулом для синхронизации суточных ритмов организма и окружающей среды. Свет регулирует активность нейронов СХЯ и синтез мелатонина, который является одним из основных факторов, координирующих биологические часы в различных тканях и органах с суточным ритмом освещенности.

Для оценки уровня освещенности в сетчатке, помимо палочек и колбочек, существуют специальные светочувствительные ганглионарные клетки, не участвующие в визуальном восприятии. Данная популяция клеток несет особый фотопигмент меланопсин, с помощью которого они воспринимают свет с длиной волны 460 – 484 нм (синий свет) [175, 200]. СХЯ через ретиногипоталамический тракт получает импульсы от сетчатки, которые способны сбросить настройки системных биологических часов вне зависимости от текущей фазы цикла. Показано, что мутантные мыши $math5^{-/-}$, у которых нарушено развитие ганглионарных клеток сетчатки и наблюдается гипоплазия зрительного нерва, не способны синхронизировать суточные ритмы с циклами освещения-темноты [247]. Помимо ганглионарных клеток в синхронизации суточных ритмов участвуют палочки и колбочки сетчатки, т.к. было показано, что мыши с

дефектным геном меланопсина все еще способны «подстраивать» биологические часы, но мыши, мутантные по меланопсину с дисфункцией палочек и колбочек, теряют эту способность [83].

Когда стимулы от сетчатки достигают нейронов СХЯ, на их мембранах активируются рецепторы, связанные с G-белками и различные ионные каналы. В результате в нейронах запускаются сигнальные каскады, включая активацию протеинкиназ PKA, PKC и PKG, Ca⁺-кальмодулин-зависимой протеинкиназы (CaM) и митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK) [84, 152]. Эти сигнальные пути сходятся на цАМФ-зависимом транскрипционном факторе (CREB), который фосфорилируется по Ser133 и Ser142. Фосфорилирование активирует CREB, который транслоцируется в ядро и связывается с цАМФ-чувствительными элементами (CRE), расположенными в промоторах часовых генов, а также генов, кодирующих пептиды AVP и VIP, которые участвуют в регуляции циркадианных ритмов [84, 129].

Каждый отдельный нейрон в СХЯ способен генерировать свой 24-часовой ритм экспрессии часовых генов, однако эти ритмы могут быть синхронизированы изменениями. Нейроны в СХЯ координируют свою активность посредством паракринной секреции нейропептидов [82].

Было показано, что нарушение активности нейропептидных сигналов приводит к потере ритмичности СХЯ. Так, мыши, нокаутные по VIP или его рецептору 2 типа (VPAC2), имеют аритмичный фенотип [82].

СХЯ подразделяется морфологически и функционально на две части – «ядро», расположенное в дорсомедиальной части СХЯ и «оболочку» - вентролатеральную часть СХЯ [157]. «Ядро» является фоторецептиентной структурой, т.к. большинство проекций ретиногипоталамического тракта идет именно в него. Нейроны «ядра» передают сигнал об уровне освещенности в эпифиз, в результате чего блокируется синтез мелатонина, и в «оболочку». Нейроны «оболочки» более синхронизированы между собой и более ритмичны, чем нейроны «ядра», а также медленнее

отвечают на сдвиг фазы ритма освещенности [202]. Таким образом, изменения уровня освещенности детектируются и обрабатываются дорсомедиальной частью СХЯ, затем сигнал передается в вентролатеральную часть СХЯ, что необходимо для адаптивного ответа всей нейронной сети СХЯ.

Нервные импульсы из СХЯ идут в базальные ядра переднего мозга, таламус и гипоталамус [105]. Из переднего мозга и таламуса сигнал передается в кору больших полушарий, лимбическую систему, гиппокамп, базальные ганглии; таким образом СХЯ регулирует суточные изменения внимания, сенсомоторные и психомоторные процессы, память, эмоции [215]. Импульсы, идущие через гипоталамус, далее передаются в эпифиз, гипофиз и ретикулярную формацию; в результате СХЯ участвует в регуляции суточных ритмов синтеза различных гормонов, включая мелатонин, температуры тела, метаболизма, циклов сна-бодрствования [213]. Таким образом, изменения режима освещения влияют на различные физиологические и психические функции организма. Точные механизмы передачи сигналов от СХЯ подчиненным осцилляторам, расположенным в других тканях, остаются до сих пор не до конца понятными. Известно, что кроме нервных импульсов в регуляции ритмов периферических тканей принимают участие гормоны и другие гуморальные факторы, важнейшим из которых является мелатонин [150].

Хроническое нарушение суточных ритмов из-за нарушения режима освещения негативно сказывается на функционировании всех систем организма. У человека такое нарушение ритмов, как правило, возникает вследствие работы в ночные смены и частой смены часовых поясов (джет-лаг). Также риску подвержены жители крупных городов и высоких широт; кроме того, использование электронных устройств в темное время суток также способно провоцировать нарушение суточных ритмов. В лабораторных условиях нарушение суточных ритмов моделируют с использованием различных протоколов: постоянное освещение, тусклый

свет ночью, хронический джет-лаг и отличные от 24 часов циклы освещенности. Многие исследования подтверждают, что нарушение режима освещения не только изменяет ритм сна-бодрствования и локомоторной активности, но и влияет на экспрессию генов, метаболизм, синтез и секрецию различных гормонов. К примеру, при постоянном ярком освещении у мышей нарушается ритм локомоторной активности, температуры тела, снижается пик секреции кортизола, снижается чувствительность к инсулину и наблюдается прибавка массы тела [34, 52, 159]. Содержание мышей при постоянном освещении вызывает десинхронизацию электрической активности нейронов СХЯ [161] и нарушение ритма экспрессии гена *Per2* и его белкового продукта [220]. У крыс постоянное освещение, вызывающее подавление синтеза мелатонина, ведет к нарушению ритма активности, а также вызывает снижение активности СХЯ. На поведенческом уровне у этих животных были выявлены маркеры депрессивного и тревожного поведения [232]. Тусклое освещение (5 Лк или 20 Лк) ночью у мышей слабо влияет на ритм локомоторной активности, но вызывает изменение ритма экспрессии часовых генов в гипоталамусе и периферических тканях [53, 208]. У сибирских хомячков хроническое воздействие тусклого света ночью вызывает снижение амплитуды суточного ритма секреции кортизола и экспрессии часовых генов в СХЯ и гипоталамусе [11]. Хронический джет-лаг у крыс приводит к нарушению не только локомоторной активности, но и снижению противоопухолевого иммунного ответа и изменению экспрессии часовых генов в НК-клетках [139]. У мышей хронический джет-лаг приводит к сдвигу фазы ритма экспрессии ЧГ в СХЯ и периферических тканях [96]; у старых мышей, подвергнутых таким условиям содержания, увеличивается смертность [39]. Отличные от 24-часовых циклы освещения также влияют на ритмы локомоторной активности, температуры тела, экспрессии циркадианных генов, метаболизм и поведение лабораторных животных [108, 162].

Таким образом, свет является важнейшим фактором синхронизации циркадианных ритмов у млекопитающих, а нарушение режима освещения негативным образом сказывается не только на поддержании суточных ритмов активности, но и на поведении, метаболизме, синтезе и секреции различных гормонов. Такие нарушения различных физиологических функций ускоряют инициацию, прогрессию и метастазирование злокачественных новообразований (подробно в разделе 1.2.1).

1.1.4. Роль мелатонина в регуляции часовых генов и циркадианных ритмов

Мелатонин (N-Ацетил-5-метокситрипрамин, Cas № 73-31-4) – индольный гормон, который продуцируется в эпифизе млекопитающих в темное время суток. Кроме того, мелатонин синтезируется в таких органах как желудочно-кишечный тракт, кожа, сетчатка, костный мозг [33, 121]. Уровень синтеза данного гормона, помимо светового режима, зависит от возраста, пола, времени года и физиологического состояния организма. Мелатонин отвечает за регуляцию суточного ритма, а также имеет иммуномодуляторный, противовоспалительный, антиоксидантный и онкостатический эффекты [5, 185].

Влияние мелатонина на клеточный сигналинг реализуется с помощью специфических мембранных рецепторов, связанных с G-белками. У млекопитающих имеется два гена, кодирующих рецепторы к мелатонину MT1 и MT2 (гены MTNR1 и MTNR2, соответственно), тогда как у птиц и рептилий данное семейство генов включает также MT3 [41]. Связывание мелатонина с MT1 или MT2 запускает два сигнальных пути в клетке – ингибирование аденилат-циклазы и активацию фосфолипазы C. Это вызывает открытие и закрытие различных ионных каналов, активацию протеин-киназ и изменения в экспрессии генов.

Ранее предполагалось, что мелатонин имеет также ядерные рецепторы из суперсемейства ретиноидных рецепторов, семейств ROR и

RZR. На эту тему было опубликовано множество противоречивых работ, но позже было показано, что ни RORa, ни RORg не связывают мелатонин [211, 212]. Влияние мелатонина на транскрипционную активность ROR может быть обусловлено непрямым действием через мембранные рецепторы и регулируемые ими сигнальные каскады или же другие, еще не изученные сигнальные пути.

Также был обнаружен сайт связывания мелатонина у фермента хинонредуктазы 2, однако этот белок нельзя считать рецептором мелатонина, поскольку их связывание не запускает никаких сигнальных каскадов [142]. Есть данные о связывании мелатонина с кальретикулином, кальмодулином и комплексом кальмодулин-кальмодулинкиназа2 [75, 239]. На сегодняшний день физиологическое значение взаимодействия мелатонина с этими белками остается неясным.

Рецепторы к мелатонину обнаружены в СХЯ, других отделах мозга и многих периферических тканях [42]. Описано два механизма воздействия мелатонина на центральный осциллятор – ингибирование электрической активности нейронов и сдвиг фазы суточных ритмов. Ингибирование электрической активности клеток СХЯ происходит в результате активации G-белок-связанных калиевых каналов внутреннего выпрямления и обусловлено главным образом активацией рецептора MT1 [76, 136]. MT2, в свою очередь, отвечает за сдвиг фазы активности нейронов СХЯ [94]. Так, у мышей, нокаутных по рецептору MT1, мелатонин не оказывает ингибирующего эффекта на активность нейронов СХЯ, хотя вызванный введением мелатонина сдвиг фазы активности у таких мышей наблюдается [136]. У мышей, нокаутных по MT2, наблюдается противоположная картина [102]. Введение мелатонина сдвигает фазу экспрессии часовых генов, но, в отличие от сдвига фазы активности нейронов, фаза экспрессии генов изменяется не сразу.

Существует ряд исследований, в основу которых положена гипотеза о том, что СХЯ чувствительно к мелатонину во время субъективных

сумерек. В исследованиях *ex vivo* на срезах СХЯ крыс, содержащихся при режиме освещения 12/12, показано, что кратковременное воздействие мелатонина на выделенные ткани СХЯ приводит к повышению пика электрохимической активности клеток, полученных от доноров в течение позднего субъективного дня и субъективной ночи, но не в течение светового дня [149]. Использование мелатонина на препаратах СХЯ крыс в период субъективных сумерек (около 10 часов после включения света, ZT10), существенно увеличивает экспрессию *Per1* и *Per2*, но не влияет на экспрессию *Bmal1*. При обработке мелатонином препаратов СХЯ, полученных в период субъективного дня (ZT 6) подобный эффект не наблюдался. Также в данном исследовании было показано, что индуцированная мелатонином перезагрузка молекулярных часов в сумерки подавлялась при предварительной обработке срезов мозга антисмысловыми олигодезоксинуклеотидами (α ODN) к *Per1* и *Per2*. [106]. В основе этого явления, вероятнее всего, лежит суточный ритм экспрессии генов рецепторов к мелатонину и уровня содержания соответствующих белков в нейронах СХЯ. Имеются данные, что плотность рецептора MT1 на мембранах нейронов СХЯ достигает максимума именно в период сумерек [242]. Мелатонин изменяет фазу клеточных часов путем активирования протеинкиназы С (PKC) [150]. Показано, что специфический ингибитор PKC, хелеритрина хлорид (CC), блокирует индуцированные мелатонином изменения в *Per1* и *Per2* мРНК [106]. Следовательно, мелатонин, активация рецептора MT1, активация PKC и индукция мРНК *Per1* и *Per2* через E-box представляют собой сигнальный каскад, реализация которого приводит к изменению фазы циркадианного ритма в сумерки (ZT10).

Показано, что применение мелатонина может модулировать экспрессию часовых генов в сетчатке у мышей [87], в *pars tuberalis* гипофиза у мышей [62], в сердце у крыс [258].

Следует отметить, что хотя у лабораторных мышей описаны циркадианные ритмы, у большинства линий отсутствует выработка мелатонина в эпифизе [109]. При этом функциональные рецепторы к мелатонину у этих животных экспрессируются во многих тканях [103]. Кроме того, показано, что у мышей мелатонин может вырабатываться в других тканях, таких как костный мозг, и, таким образом, компенсировать дефицит эпифизарного мелатонина [69]. Также показано, что введение экзогенного мелатонина вызывает сдвиг суточных ритмов у мышей [12].

Таким образом, мелатонин является важнейшим гормональным фактором для синхронизации суточных ритмов в большинстве тканей организма млекопитающих.

1.2. Нарушение циркадианных ритмов и опухолевый процесс

1.2.1. Взаимосвязь часовых генов и ключевых характеристик рака

Опухолевые клетки и ткани фундаментальным образом отличаются от нормальных. Концепция ключевых признаков злокачественных опухолей (hallmarks of cancer) была впервые отражена в работе Д. Ханаана и Р. Вайнберга в 2000 г., в 2011 г. она была дополнена и пересмотрена [79].

Выделяют 10 отличительных особенностей рака:

- 1) Самоподдержание пролиферации;
- 2) Избегание факторов, угнетающих опухолевый рост;
- 3) Подавление апоптоза;
- 4) Репликативное бессмертие;
- 5) Индукция ангиогенеза;
- 6) Активация инвазии и метастазирования;
- 7) Геномная нестабильность и мутации;
- 8) Изменения клеточного метаболизма;
- 9) Избегание противоопухолевого иммунного ответа;
- 10) Воспаление, промотирующее опухолевый рост.

Система часовых генов и белков участвует в регуляции пролиферации, апоптоза, репарации ДНК, экспрессии теломеразы, клеточного метаболизма, транскрипции многих генов, в т. ч. ответственных за ангиогенез, инвазию, метастазирование, воспаление и иммунный ответ [70, 128, 207, 224]. Нарушение клеточных часов является либо одной из причин, либо следствием злокачественной трансформации клеток. Некоторые исследователи предлагают добавить в список ключевых признаков рака выход из циркадианного контроля [45].

Часовые гены и белки не являются прямыми регуляторами пролиферации, но связь между временем циркадианного цикла и временем клеточного цикла была показана в нескольких исследованиях [15, 50]. Обнаружены молекулярные связи между этими двумя осцилляторами, включая циркадианную регуляцию транскрипции ключевых факторов

клеточного цикла Wee1, p21, циклинов B1 и D1) [73, 147]. Транскрипция Wee1 может прямо активироваться белками BMAL1 и CLOCK и подавляться белками семейства PER или CRY [147]. Циркадианные часы также могут иметь опосредованное влияние на регуляцию клеточного цикла путем модулирования сигнальных каскадов, активируемых PI3K (фосфатидилинозитол 3-киназами), которые влияют на динамику клеточного цикла [3]. Генно-инженерные модификации часовых генов, как правило, приводят к изменению уровня пролиферации опухолевых клеток, однако, результаты подобных экспериментов не вполне согласуются друг с другом и не позволяют отнести часовые гены к промоторам или супрессорам опухолевого роста [122, 218, 230].

Избегание факторов, угнетающих опухолевый рост, как правило, происходит за счет выключения анти-онкогенов (p53, Rb, Pten и др.) в опухолях, потери чувствительности к контактному ингибированию, нарушению сигнала от TGF-beta [79, 180]. PER2 напрямую взаимодействует с белком p53 и предотвращает его посттрансляционное преобразование с помощью убиквитинлигазы E3 (MDM2), в результате чего данный транскрипционный фактор сохраняет стабильность в клетках с высоким уровнем экспрессии PER2. Кроме того, предполагается, что PER2 модулирует транслокацию p53 в ядро. [71]. Показано, что клеточные часы регулируют TGF-beta-опосредованный сигналинг [28], а TGF-beta влияет на экспрессию часовых генов [63].

Избегание апоптоза опухолевыми клетками реализуется в основном путем сверхэкспрессии молекул, препятствующих апоптозу (Bcl-2 и Birc5/survivin) [17]. К примеру, было показано, что в перевиваемой ОМЖ MA13/C, в отличие от нормальных тканей мышей, отсутствует ритм экспрессии анти-апоптотического белка Bcl-2 [72]. Выключение гена Per2, экспрессия которого часто утрачивается в опухолях, ведет к повышению экспрессии гена Bcl-2 и повышению экспрессии Bax [218]. Уменьшение экспрессии Clock снижает уровень содержания белков c-MYC и

CYCLINB1 и увеличивает уровень P53 в клетках глиомы, таким образом увеличивая уровень апоптоза. [244] Анти-апоптотический фактор Birc5/survivin имеет суточный ритм экспрессии в нормальном эпителии толстой кишки мышей; его выключение с помощью si-РНК в клетках карциномы толстой кишки сенситизирует их к противоопухолевым препаратам – ингибиторам циклин-зависимых киназ [209].

Репликативное бессмертие злокачественных клеток предполагает активацию экспрессии генов, кодирующих субъединицы теломеразы, и ее ферментативную активность [79, 205]. Известно, что экспрессия гена Tert находится под контролем CLOCK/BMAL1 и имеет суточный ритм в нормальных тканях млекопитающих [27]. При этом нарушение циркадианных ритмов (сменная работа у человека или выключение гена Clock у мышей) приводит к потере ритма экспрессии Tert [24, 27].

Индукция ангиогенеза является одним из важнейших факторов прогрессии опухолей [79]. Показано, что функционирование системы часовых генов и белков необходимо для поддержания ритмической экспрессии VEGF в ходе нормального ангиогенеза [100]. Выключение часовых генов Per2 и Bmal1 приводит к нарушению формирования сосудов клетками-предшественниками эндотелиоцитов [4, 243]. Выключение Per2 в клеточной линии плоскоклеточного рака человека и сверхэкспрессия Clock в клетках рака толстой кишки приводят к повышению уровня экспрессии VEGF [218, 246]. Интересно, что некоторые опухоли сохраняют ритмичность ангиогенеза. В работах на модели перевиваемых опухолей у мышей (саркома 180, карцинома Льюиса и меланома B16) и на клетках рака толстой кишки человека показан суточный ритм экспрессии VEGF [59, 124].

Инвазия и метастазирование опухолей происходят за счет эпителиально-мезенхимального перехода, при котором клетки приобретают способность к миграции [79, 226]. Сверхэкспрессия Bmal1 в клетках рака молочной железы человека увеличивает активность

матриксной металлопротеиназы 9 и способность клеток к миграции [245]. В другом исследовании было показано, что выключение гена *Vmall* увеличивает способность к инвазии раковой клеточной линии, но не нормальных клеток молочной железы [122]. При исследовании роли *Vmall* в клетках рака поджелудочной железы, напротив, было показано, что сверхэкспрессия данного гена снижает пролиферацию и инвазию, а его выключение вызывает увеличение скорости пролиферации [101]. Интересно, что при исследовании роли *Clock* в инвазии и метастазировании различных линий клеток рака толстой кишки также были получены противоречивые результаты. Сверхэкспрессия этого гена в клетках рака толстой кишки линии SW480 приводила к увеличению инвазивной способности, а его инактивация в клетках линии SW620 увеличивала их метастатический потенциал [246]. По-видимому, влияние системы часовых генов и белков на инвазию и метастазирование опухолевых клеток зависит от молекулярного «контекста», типа клеток и других факторов.

Геномная нестабильность в опухолевых клетках ведет к возникновению большого числа мутаций, в том числе и в онкогенах, и является одним из важнейших факторов прогрессии опухолей [79]. Репарация ДНК в нормальных клетках находится под контролем клеточных часов; помимо этого, существуют циркадианные ритмы чувствительности ДНК к различным типам повреждения [128]. Так, кожа и волосяные фолликулы мыши проявляют максимальную чувствительность к повреждению ДНК, вызванному ультрафиолетовым или ионизирующим излучением, в ночной период. При этом ритмы чувствительности к повреждению утрачиваются у мышей с выключенным *Vmall* в кератоцитах или у двойных нокаутов по *Cry1* и *Cry2* [67, 178]. Помимо этого, в нескольких исследованиях продемонстрирован суточный ритм содержания в клетках активных форм кислорода, которые могут быть причиной повреждения ДНК [67, 111, 118]. Часовые гены вовлечены в

регуляцию ответа на повреждение ДНК [67, 107, 178, 244]. В частности, повышение экспрессии генов Per сенситизирует раковые клетки к ионизирующей радиации и замедляет их рост [57, 65].

Клеточный метаболизм в опухолях часто сдвигается в сторону анаэробного гликолиза (эффект Варбурга) вследствие повышения экспрессии транскрипционных факторов HIF1 и c-Myc [37, 79]. Часовые гены регулируют экспрессию данных факторов, а также многих генов, ответственных за метаболизм [70, 166]. Показано, что онкоген Myc конкурирует с часовыми белками за связывание с E-боксами, поэтому нарушает работу клеточных «часов» и суточный ритм метаболизма на клеточном уровне [1, 188]. Обнаружено, что выключение гена Bmal1 в клетках рака толстой кишки ведет к повышению уровня гликолиза и изменению экспрессии генов, ответственных за метаболизм глюкозы [58]. В другом исследовании показано, что в клетках рака легкого с мутацией в гене Per2 наряду с повышением экспрессии c-Myc повышается уровень захвата глюкозы и глутамина, а также секреции лактата [166].

Связь между часовыми генами и двумя последними ключевыми признаками рака (избегание противоопухолевого иммунного ответа и воспаление, промотирующее опухолевый рост) пока недостаточно хорошо изучена. При этом хорошо известны суточные ритмы функционирования иммунной системы в физиологических условиях. Показано, что в течение суток у лабораторных животных и человека осциллируют содержание различных клеток иммунной системы в крови, уровень многих цитокинов, пролиферация и мобилизация клеток-предшественников из костного мозга, активность фагоцитоза и др. [197]. В последние годы показано, что часовые гены необходимы для сохранения суточного ритма и антиоксидантной функции клеток иммунной системы [112].

Таким образом, доказана связь между ключевыми признаками рака и нарушением клеточных «часов».

1.2.2. Нарушение экспрессии часовых генов в опухолях

Система часовых генов и белков необходима для согласованной регуляции экспрессии множества генов, в т. ч. ответственных за клеточный цикл, апоптоз, метаболизм и другие ключевые признаки рака. Предполагается, что избегание циркадианного контроля промотирует размножение, рост и инвазию клеток опухоли [45]. Экспрессия часовых генов в опухолях человека и лабораторных животных изучается на протяжении последних двух десятилетий, и этой теме посвящено несколько тысяч публикаций [265].

В солидных опухолях человека различных локализаций часто наблюдается aberrантная экспрессия часовых генов, при этом паттерна, общего для всех опухолей и даже для опухолей одной локализации, не наблюдается [255]. В таблице (Таблица 1) приведены данные об изменениях уровня экспрессии часовых генов в опухолях человека. В большинстве исследований описано снижение экспрессии генов семейств *Per* и *Cry*, белковые продукты которых являются репрессорами транскрипции [26, 134, 255]. Эти гены часто позиционируют как опухолевые репрессоры по нескольким причинам. Известно, что выключение этих генов в опухолевых клетках в экспериментальных условиях промотирует их пролиферацию и инвазивные свойства [65, 166]. Напротив, сверхэкспрессия генов *Per* в опухолевых клетках подавляет их рост, индуцирует апоптоз и сенситизирует клетки к терапевтическим воздействиям [57, 65]. Помимо этого, животные, нокаутные по генам *Per* и *Cry*, более склонны к канцерогенезу [110, 128]. Гены *Bmal1* и *Clock*, белковые продукты которых активируют транскрипцию генов, содержащих E-бокс в промоторе, теоретически могут промотировать опухолевый рост. В литературе есть данные как о повышении, так и о снижении их экспрессии в опухолях различных локализаций [19, 134]. Известно, что во многих случаях репрессия транскрипции часовых генов в опухолях происходит вследствие гиперметилирования промоторов [26,

126, 135, 256]. Также были установлены связи между некоторыми полиморфизмами в часовых генах и риском возникновения рака молочной железы и других локализаций [13, 261]. Помимо этого, есть данные о корреляции между уровнем экспрессии некоторых часовых генов и клинико-патологическими характеристиками опухолей молочной железы и толстой кишки [54, 134].

Поскольку провести оценку суточных ритмов экспрессии часовых генов в опухолях человека можно только в прижизненном материале, получение которого ограничено лечебно-диагностическими манипуляциями, вопрос о наличии таких ритмов долгое время оставался открытым. Кроме того, сравнение опухолевой ткани с нормальной может быть корректным, если фазы экспрессии часовых генов в них совпадают.

Таблица 1 – Исследования изменения экспрессии часовых генов в опухолях человека (по: А. В. Панченко, Е. А. Губарева, 2016 [272], с изменениями и дополнениями)

Локализация	ЧГ и изменение экспрессии	Авторы
Рак молочной железы	Per1, 2, 3 ↓	(Chen et al. 2005) [26]
	Bmal1 ↓, Clock =-	(Broadberry et al. 2018) [19]
	Per1, 2↓	(Winter et al. 2007) [248]
	Clock ↑	(Hoffman et al. 2010) [88]
Рак предстательной железы	Bmal1 ↑, Clock, Per 2↓	(Jung-Hynes et al. 2010) [104]
	Per1↓	(Cao et al. 2009) [23]
Рак легкого (немелкоклеточный)	Per1↓	(Gery et al. 2007) [66]
Рак эндометрия	Per1↓	(Yeh et al. 2005) [256]
Рак яичника	Per1, per2, Cry2, Clock ↓, Cry1↑	(Tokunaga et al. 2008) [235]
Рак толстой кишки	Per1, 2, 3 ↓	(Fonnes et al. 2015) [54]
Рак желудка	Per2 ↑	(Hu et al. 2014) [92]
Рак поджелудочной железы	Per1↓	(Parker et al. 2008) [170]
	Per1, 2, 3, Cry1, 2, Bmal1, Clock ↓	(Relles et al. 2013) [187]
	Per1, 2, 3, Cry1, 2, Bmal1 ↓	(Tavano et al. 2015) [233]
Рак почки	Per2↓	(Mazzoccoli et al. 2012) [148]
Рак печени	Per1, 2, 3, Cry2 ↓	(Lin et al. 2008) [135]
Меланома, пигментный невус	Per1, 2, Clock, Cry1 ↓	(Lengyel et al. 2013) [132]
Плоскоклеточный рак головы и шеи	Per1, 2, 3, Cry1, 2, Bmal1 ↓	(Hsu et al. 2012) [91]
Глиома	Clock ↑ в опухолях III, IV стадии	(Chen et al. 2013) [29]
	Per1, 2↓	(Xia et al. 2010) [250]
	Cry1, 2 ↓	(Luo et al. 2012) [141]
	Per2 ↓	(Fan et al.) [48]
Диффузная В-клеточная лимфома	Per2 ↓	(Thoennissen et al. 2012) [234]

Чтобы преодолеть эти сложности анализа часовых генов в опухолях, в последние годы был разработан новый подход к анализу транскриптома, в основе которого лежит оценка корреляции уровня экспрессии генов между собой. Существенное снижение корреляции уровня экспрессии ключевых часовых генов в опухолевых тканях по сравнению с нормальными тканями показано в нескольких работах [206, 255].

На нескольких экспериментальных моделях *in vivo* была показана потеря суточного ритма генов в опухолях по сравнению с соответствующими нормальными тканями [8, 93, 214]. Однако результаты, полученные в других исследованиях, показывают, что ритмические колебания часовых генов в опухолевых тканях могут сохраняться [229, 254]. Кроме того, на модели мышей с острым миелоидным лейкозом было продемонстрировано, что гены *Clock* и *Bmal1* необходимы для роста стволовых клеток лейкоза *in vitro* и *in vivo* [182]. Различия в результатах опытов *in vivo*, вероятнее всего, обусловлены использованием экспериментальных моделей опухолей разных локализаций, степени их дифференцировки и другими факторами.

Молекулярные механизмы нарушения экспрессии часовых генов в опухолях активно исследуются в последние годы. Доказано влияние белкового продукта онкогена *c-Myc* на экспрессию часовых генов. Онкоген *c-Myc* кодирует транскрипционный фактор MYC, который связывается с той же последовательностью ДНК, что и часовые белки. Показано, что при высоком уровне MYC в клетках снижается экспрессия гена *Per1* [188]. Кроме того, в другом исследовании было установлено, что MYC нарушает экспрессию часовых генов в клетках путем индукции экспрессии *Rev-Erba* – фактора, подавляющего экспрессию *Bmal1* [1].

Таким образом, установлено, что в различных опухолях человека нарушается согласованная экспрессия часовых генов; во многих случаях экспрессия репрессоров транскрипции *Per* и *Cry* снижается, а экспрессия

активаторов транскрипции *Bmal* и *Clock* повышается. При этом экспериментальные данные о ритме экспрессии часовых генов в опухолях не позволяют выявить общих тенденций.

1.2.3. Нарушение циркадианных ритмов как канцерогенный фактор

МАИР официально признало сменную работу, вызывающую нарушение суточных ритмов, вероятным канцерогенным фактором (группа 2А) для человека [95]. Такое решение было вынесено на основании эпидемиологических и экспериментальных исследований на клеточных линиях и лабораторных животных. У людей, работающих в ночные смены, повышен риск рака молочной железы, эндометрия, яичников, толстой кишки, легкого и других локализаций. Известно, что сменная ночная работа негативным образом сказывается на суточных ритмах организма и циклах сна-бодрствования [18].

У людей, работающих в ночные смены, выявлено снижение уровня синтеза и секреции мелатонина [21, 43]. На лабораторных животных показано, что нарушение светового режима, которое вызывает нарушение суточных ритмов, негативно сказывается и на других физиологических функциях организма. К примеру, у мышей линии СВА/Н хронический джет-лаг вызывает сдвиг фазы экспрессии часовых генов в СХЯ и печени, активацию экспрессии *p53* и *c-Myc* и снижение экспрессии мелатонинового рецептора 1 и глюкокортикоидного рецептора [96]. У крыс LJO постоянное освещение или естественный режим освещения за Полярным кругом ускоряют старение, негативно влияют на метаболизм, уменьшают продолжительность жизни и увеличивают частоту спонтанных опухолей [240]. Нарушение суточных ритмов, вызванное дисфункцией часовых генов, приводит к ускоренному старению и раннему проявлению различных патологических состояний. К примеру, мыши, мутантные по гену *Clock* (*Clock*^{Δ19/Δ19}), имеют фенотип, имитирующий нарушения обмена

веществ, включая ожирение, гиперфагию, гиперлипидемию, гиперлептинемию, гипергликемию, гипоинсулинемию и стеатоз печени, а также нарушение цикла питания и снижение расхода энергии [16, 238]. Мыши, нокаутные по *Bmal1*, демонстрируют признаки преждевременного старения, включая раннюю смерть, метаболические нарушения, стерильность, артропатию и остеопороз, а также отсутствие некоторых типичных суточных ритмов, например, в уровнях глюкозы и триглицеридов. Одновременное выключение генов *Per1* и *Per2* приводит к отсутствию суточных ритмов, неконтролируемой пролиферации остеобластов и в результате – к возраст-зависимому увеличению костной массы [16].

Многочисленные экспериментальные исследования подтверждают, что нарушение суточных ритмов влияет на рост спонтанных, перевиваемых, химически индуцированных опухолей и ксенографтов у лабораторных животных (Таблица 2).

Показано, что в условиях постоянного освещения или хронического джет-лага наблюдается более быстрый рост химически индуцированных опухолей [85, 262], перевиваемых опухолей [51], опухолей-ксенографтов [38, 203] и опухолей у генетически модифицированных животных [167]. Нарушение суточных ритмов, вызванное выключением часовых генов, также способно влиять на канцерогенез. Показано, что делеция или мутация *Per2* и сама по себе, и в комбинации с делецией *Per1* во всех случаях увеличивает частоту образования опухолей при использовании различных моделей генетически или радиационно-индуцированного канцерогенеза [57, 74, 110, 131, 167]. В то же время, в нескольких исследованиях сообщается о различном влиянии выключения генов *Cry1* и *Cry2* на канцерогенез. В нескольких работах показано, что у двойных нокаутов по *Cry* повышена частота спонтанных опухолей печени, а также повышена частота опухолей, вызванных гамма-облучением или индуцированных канцерогеном [110, 131, 158]. В то же время, в другой

публикации описано отсутствие влияния выключения генов *Cry1* и *Cry2* на канцерогенез [64]. Кроме того, у мышей, мутантных по *p53*, выключение генов *Cry1* и *Cry2* продлевает латентный период развития опухолей (преимущественно лимфом) и вследствие этого увеличивает продолжительность жизни [164]. Что касается гена *Clock*, мутация в обеих его копиях не влияет на частоту спонтанных и вызванных гамма-облучением опухолей [7]. Для гена *Bmal1* также не описано повышение уровня спонтанного канцерогенеза. Это может быть объяснено тем, что мыши с дисфункциональными *Bmal1* и *Clock* имеют сниженную продолжительность жизни и погибают от различных заболеваний, ассоциированных с возрастом [7, 16, 118]. При этом системное выключение гена *Bmal1* у мышей, мутантных по *K-ras* и *p53* промотирует канцерогенез легкого, вызванный инъекцией вирусного вектора, экспрессирующего Cre-рекомбиназу [167]. Также сообщается, что тканеспецифическое выключение гена *Bmal1* в печени у мышей ведет к повышению частоты спонтанных гепатокарцином [110].

Таким образом, нарушение суточных ритмов вследствие нарушения режима освещения или экспрессии часовых генов является фактором, способным промотировать опухолевый рост.

Таблица 2 – Экспериментальные исследования влияния нарушения циркадианных ритмов на канцерогенез

Вид и линия животных	Модель опухолевого роста	Модель нарушения ЦР	Влияние нарушения ЦР на канцерогенез	Авторы
Мыши Balb/c	Перевиваемая ОМЖ 4Т1	LL	↑ скорости роста опухолей	(Schwimmer et al. 2014) [203]
Мыши B6D2F(1)	Перевиваемая остеосаркома Глазго	LL	=	(Filipski et al. 2004) [51]
		Хронический джет-лаг	↑ скорости роста опухолей	
Мыши C57BL/6J, мутантные по p53	Спонтанные опухоли	Per2 ^m	↑ частоты лимфом, сарком и опухолей печени	(Gu et al. 2012) [74]
Мыши C57BL/6J	Спонтанные опухоли печени	Per1 ^{-/-} ;Per2 ^{-/-}	↑ частоты спонтанных гепатокарцином	(Kettner et al. 2016) [110]
		Cry1 ^{-/-} ;Cry2 ^{-/-}		
		Bmal ^{-/-} в печени		
Мыши C57BL/6	Спонтанные опухоли; Сублетальное гамма-облучение	Bmal1 ^{+/-} ,	↑ частоты спонтанных опухолей различных локализаций; ↑ частоты опухолей после гамма-облучения	(Fu et al. 2002; S. Lee et al. 2010) [57, 131]
		Cry1 ^{-/-} ;Cry2 ^{-/-}		
		Per1 ^{-/-} ;Per2 ^{m/m} или Per2 ^{-/-}		
Мыши C57BL/6J, мутантные по p53	Спонтанные опухоли	Cry1 ^{-/-} Cry2 ^{-/-}	↑ латентного периода развития опухолей	(Ozturk et al. 2009) [164]
Мыши C57BL/6J	Спонтанные опухоли; Сублетальное гамма-облучение	Clock ^{m/m}	-	(Antoch et al. 2008) [7]

Таблица 2 (продолжение) – Экспериментальные исследования влияния нарушения циркадианных ритмов на канцерогенез

Мыши C57BL/6J	Сублетальное гамма-облучение	Cry1 ^{-/-} Cry2 ^{-/-}	-	(Gauger & Sancar 2005) [64]
Мыши, мутантные по K-ras и p53	Индукция опухолей легкого путем интратрахеальной инъекции вирусного вектора, экспрессирующего Cre-рекомбиназу	Джет-лаг	↑ площади опухолей, ↑ злокачественности опухолей	(Papagiannakopoulos et al. 2016) [167]
		Выключение гена Per2 или Bmal1	↑ площади опухолей, ↑ злокачественности опухолей	
Мыши C57BL/6	Индукция опухолей печени ДЭНА*	Cry1 ^{-/-} ;Cry2 ^{-/-}	↑ частоты гепато- и холангиокарцином	(Mteyrek et al. 2017) [158]
Крысы	Перевиваемая ОМЖ MCF-7	LL	↑ скорости роста опухолей, резистентность к ХТ	(Dauchy et al. 2014) [38]
Крысы	Индукция опухолей печени ДЭНА*	LL	↑ частоты и множественности опухолей	(van den Heiligenberg et al. 1999) [85]

* ДЭНА - диэтилнитрозамин

1.2.4. Анतिकанцерогенные свойства мелатонина

Антиканцерогенное действие мелатонина реализуется через множественные механизмы, опосредованные и не опосредованные мембранными рецепторами к этому гормону [226]. Мелатонин влияет на все ключевые характеристики рака: участвует в поддержании целостности генома, снижает уровень пролиферации и индуцирует апоптоз опухолевых клеток различного происхождения, тормозит ангиогенез, влияет на метаболизм, препятствует эпителиально-мезенхимальному переходу и метастазированию опухолевых клеток, усиливает противоопухолевый иммунный ответ и т.д. [217].

Мелатонин подавляет пролиферацию опухолевых клеток различного генеза. На сегодняшний день выявлено несколько механизмов воздействия данного гормона на клеточный цикл. Во-первых, мелатонин влияет на прохождение клетки через стадии клеточного цикла. Показано, что мелатонин ингибирует некоторые циклины и циклин-зависимые киназы [32, 176]. В нескольких исследованиях показано, что мелатонин ингибирует в раковых клетках сигнальный каскад PI3K/AKT/mTOR [114, 181]. Также показано, что комбинация мелатонина и сорафениба снижает экспрессию онкогена Мус в клетках гепатокарциномы [140].

Показано увеличение экспрессии анти-онкогенов - факторов, угнетающих опухолевый рост, в том числе генов p53, Bca1 и Bca2, в клеточных линиях рака молочной железы после их обработки мелатонином [86]. Дальнейший анализ влияния мелатонина выявил способность этого гормона индуцировать фосфорилирование p53 по остатку Ser-15, вызывая ингибирование пролиферации и предотвращение накопления повреждений ДНК [195].

Мелатонин может влиять на резистентность к апоптозу у раковых клеток. Показано, что обработка раковых клеток мелатонином ведет к изменению баланса про- и антиапоптотических белков, в частности, уровни каспазы-3

и Вах повышаются, а Bcl-2 и Birc5/survivin - снижаются [113, 251]. Кроме того, мелатонин индуцирует экспрессию *p53* в клетках рака простаты [113]. Точные механизмы индукции апоптоза раковых клеток с помощью мелатонина не до конца ясны, но показано, что для этого не обязательно необходимы мембранные рецепторы MT1 и MT2 [192].

Исследовалось влияние мелатонина на теломеразную активность в клетках MCF-7, перевитых бестимусным мышам. Было выявлено дозозависимое снижение этой активности *in vivo* и *in vitro* [133]. У бестимусных мышей, которым была перевита меланома, введение мелатонина усиливало эффект ингибитора BRAF вемурафениба путем снижения ядерной транслокации NF-κB (транскрипционного фактора, одним из мишеней которого является ген каталитической субъединицы теломеразы). В результате наблюдалось снижение экспрессии теломеразы, а также повышения уровня апоптоза и миграции опухолевых клеток [80]. Синергетический противоопухолевый эффект мелатонина и химиотерапевтического препарата (цисплатина) был показан также на модели культивируемых клеточных линий рака яичника. Кроме того, в одной из исследованных в данной работе клеточных линий наблюдалось снижение теломеразной активности [60].

Влияние мелатонина на миграцию эндотелиальных клеток, инвазию и образование сосудов оценивалось во многих исследованиях. Мелатонин снижает экспрессию VEGF опухолевыми клетками [36], а также активацию рецептора к VEGF в присутствии данного фактора роста и тормозит миграцию эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC [25]. Обработка клеток HUVEC мелатонином приводила к замедлению их миграции на 32% и снижению формирования сосудов на 50% [2]. У бестимусных мышей с перевитой опухолью рака молочной железы человека MDA-MB-231, получавших мелатонин, было обнаружено уменьшение уровня экспрессии VEGFR-2, а также наблюдалось снижение плотности капилляров в опухолях [99]. Нарушения формирования сосудов

в опухоли при применении мелатонина также было показано на модели почечной аденокарциномы у мышей [115].

Показано, что мелатонин снижает инвазивный потенциал раковых клеток путем влияния на белки плотных контактов и адгезии, экспрессия которых снижена в инвазивных опухолях. В исследовании на клетках рака молочной железы MCF-7 выявлено, что при обработке мелатонином существенно снижается их потенциал к инвазии преимущественно из-за увеличения экспрессии E-кадгерина (белка, образующего плотные межклеточные контакты) и молекулы клеточной адгезии интегрин бета-1 [35]. Кроме того, существуют данные о том, что мелатонин ингибирует эпителиально-мезенхимальный переход регуляцией сигнального пути NF-κB [99].

Предполагается, что мелатонин защищает ДНК от неблагоприятных воздействий благодаря антиоксидантным свойствам [186]. Показано, что профилактическое применение мелатонина у крыс перед облучением может уменьшить окислительное повреждение, вызываемое ионизирующим излучением [68]. Также показано снижение числа хромосомных аберраций и аномальных головок спермиев, вызванных различными цитостатиками, при применении мелатонина у мышей [160]. Подобный защитный эффект мелатонина *in vivo* наблюдался в отношении повреждений ДНК, вызванных бисфенолом А [249], и фенитоином [46]. В исследованиях *in vitro* показано, что мелатонин усиливает способность к репарации ДНК в клеточных линиях MCF-7 (рак молочной железы) и HCT-15 (рак толстой кишки), воздействуя на гены, участвующие в системах репарации ДНК [138]. Активация репарации ДНК *in vitro* также наблюдалась при воздействии мелатонина при повреждении ДНК перекисью водорода [210].

Мелатонин оказывает ингибирующее действие на транскрипционный фактор HIF1, который регулирует экспрессию большинства гликолитических ферментов и переносчиков глюкозы [36,

169]. В качестве другого регуляторного фактора метаболизма раковых клеток рассматривают онкоген MYC. Сверхэкспрессия MYC в раковых клетках способствует повышению экспрессии многих генов, включая кодирующие гликолитические ферменты, киназу PDK1, лактатдегидрогеназу и переносчики глюкозы [1]. В опухолевых клетках при их обработке мелатонином наблюдается ингибирование лактатдегидрогеназы и снижение содержания лактата [193].

Показано, что мелатонин активирует противоопухолевый иммунный ответ несколькими путями. Применение мелатонина снижает количество регуляторных Т-клеток (субпопуляция лимфоцитов, подавляющих противоопухолевый ответ) на модели перевиваемой опухоли желудка у мышей; кроме того, в данной работе показано снижение объема опухоли у мышей, получавших мелатонин, по сравнению с контролем [137]. На модели перевиваемой опухоли молочной железы у мышей, получавших мелатонин, наряду со снижением объема опухоли, выявлено повышение гамма-интерферона в сыворотке крови [227].

Таким образом, мелатонин влияет на различные ключевые характеристики рака через множественные механизмы. *In vivo* торможение роста опухолей у лабораторных животных показано на различных моделях, таких как спонтанные опухоли молочной железы [219], химически индуцированные опухоли яичника [30], легкого [267], кожи [125, 268], молочной железы [228], перевиваемые сингенные опухоли молочной железы [227], печени [31], почки [115], желудка [137], а также опухоли-ксенографты [38, 78, 99, 133, 143]. Данные о влиянии мелатонина на опухолевый рост *in vivo* суммированы в таблице (Таблица 3).

Таблица 3 - Экспериментальные исследования влияния введения мелатонина на канцерогенез

Животные	Модель опухолевого роста	Эффект МТ	Авторы
Мыши СЗН/А	Перевиваемая ОМЖ РСМ	Торможение роста опухолей	(Анисимов и др., 1973) [263]
Бестимусные мыши	Перевиваемая ОМЖ SKBR-3 MCF-7Her2.1	↓ инвазии и метастазирования	(Mao et al. 2016) [143]
Бестимусные мыши	Перевиваемая холангиокарцинома Mz-ChA-1	↓ скорости роста опухолей	(Han et al. 2011) [78]
Бестимусные мыши	Перевиваемая ОМЖ MCF-7	↓ объема опухолей и метастазирования	(Leon-Blanco et al. 2003) [133]
Бестимусные мыши	Перевиваемая ОМЖ MDA-MB-231	↓ объема опухолей и уровня пролиферации	(Jardim-Perassi et al. 2014) [99]
Бестимусные мыши	Перевиваемый рак простаты LNCaP	↓ скорости роста опухолей	(Paroni et al. 2014) [171]
Мыши Balb/c	Перевиваемый рак почки RENCA	↓ скорости роста опухолей	(Kim et al. 2013) [115]
Мыши 615□(H□2Kk)	Перевиваемый рак желудка MFC	↓ объема опухолей	(Liu et al. 2011) [137]
мыши Balb/c	Перевиваемая ОМЖ EMT6/P	↓ объема опухолей	(Talib & Saleh 2015) [227]
Мыши СЗН/Jax	Спонтанные ОМЖ	↓ частоты опухолей	(Subramanian & Kothari 1991) [219]
Аутбредные мыши SHR	Индукция опухолей легкого уретаном	↓ множественности опухолей	(Веснушкин и др. 2006) [267]
Аутбредные мыши Swiss	Индукция опухолей кожи ДМБА	↓ частоты и множественности опухолей	(Kumar et al. 2000) [125]
Крысы	Перевивка клеток гепатомы	↓ скорости роста опухолей	(Cini et al. 1998) [31]
Крысы	Перевивка клеток ОМЖ MCF-7	↓ скорости роста опухолей, ↑ чувствительность к ХТ	(Dauchy et al. 2014) [38]
Крысы Sprague-Dawley	Индукция ОМЖ	↓ частоты опухолей	(Tamarkin et al. 1981) [228]
Крысы	Индукция карциномы яичника ДМБА	↑ апоптоза опухолевых клеток	(Chuffa et al. 2016) [30]

Отдельного упоминания заслуживают работы, посвященные изучению влияния мелатонина на опухолевый рост *in vivo* при нарушении ЦР. Такой экспериментальный дизайн использовался при исследовании спонтанных и перевиваемых опухолей молочной железы [10, 203] и перевиваемой меланомы [163] у мышей, спонтанных опухолей различной локализации [271], химически индуцированных опухолей молочной железы [204, 228] и толстой кишки [262], а также опухолей-ксенографтов [38] у крыс.

В некоторых из них показано, что нарушение ЦР промотирует канцерогенез, а применение экзогенного мелатонина приводит к ингибированию опухолевого роста при сохранных и нарушенных циркадианных ритмах [38, 203, 204, 228].

Но в исследованиях, выполненных на мышах C57/Bl с перевивной меланомой B16 и на трансгенных по мышах HER2/neu с множественными спонтанными опухолями молочной железы, результаты отличаются от вышеописанных [10, 163].

В обоих случаях авторы наблюдали стимуляцию опухолевого роста при постоянном освещении (LL). При этом введение мелатонина ингибировало канцерогенез только у животных, содержащихся при стандартном освещении (группы LD + мелатонин). Более того, Otalora et al (2008) наблюдали повышение скорости роста меланомы B16 у мышей группы LLMT по сравнению с LL. На основании оценки суточных ритмов температуры тела, которое проводилось с использованием подкожных датчиков, авторы сделали вывод, что при постоянном освещении у мышей сдвигается фаза суточных ритмов, и введение экзогенного мелатонина в вечерние часы приходится на «неправильную» фазу, что ведет к еще большему сбою «часов» в организме.

Таблица 4 – Экспериментальные исследования влияния мелатонина на опухолевый рост при нарушении циркадианных ритмов

Животные	Модель опухолевого роста	Модель нарушения ЦР	Влияние нарушения ЦР на канцерогенез	Влияние МТ на канцерогенез	Авторы
Мыши Balb/c	Перевиваемая ОМЖ 4Т1	LL	↑ скорости роста опухолей	↓ скорости роста опухолей	(Schwimmer et al. 2014) [203]
Мыши C57/bl	Перевиваемая меланома B16	LL	↑ скорости роста опухолей и метастазирования	↓ скорости роста опухолей при LD, ↑ скорости роста при LL	(Otálora et al. 2008) [163]
Мыши FVB/N, трансгенные по HER2/neu	Спонтанные ОМЖ	LL	↑ множественности опухолей	↓ частоты и размеров опухолей при LD	(Baturin et al. 2001) [10]
Крысы	Перевиваемая ОМЖ MCF-7	LL	↑ скорости роста опухолей, резистентность к ХТ	↓ скорости роста опухолей, ↑ чувствительность к ХТ	(Dauchy et al. 2014) [38]
Крысы-самки LIO	Спонтанные опухоли различных локализаций	LL, NL	↑ число крыс с опухолями при NL	↓ число крыс с опухолями при NL	(И.А. Виноградова 2012) [271]
Крысы-самцы LIO	Спонтанные опухоли различных локализаций	LL, NL	-	↓ число крыс с опухолями при LD, ↓ число крыс со злокачественными опухолями при LD и LL	
Крысы Sprague-Dawley	Индукцированные ДМБА ОМЖ	Пинеалэктомия	↑ частоты опухолей	↓ частоты опухолей	(Tamarkin et al. 1981) [228]
Крысы Holtzman	Индукцированные ДМБА ОМЖ	LL	↑ частоты опухолей	↓ частоты опухолей	(Shah et al. 1984) [204]
Крысы	Индукцированные ДМГ опухоли толстой кишки	LL	Тенденция к ↑ множественности опухолей	↓ частоты и множественности опухолей при LL	(А.В.Панченко и др. 2008) [262]

Несмотря на большое число экспериментальных исследований, посвященных частным аспектам изучения взаимосвязи циркадианных ритмов и опухолевого процесса, имеет место недостаток комплексных исследований, в которых бы оценивались одновременно влияние нарушения суточных ритмов и введения мелатонина на систему часовых генов и белков. Кроме того, результаты работ, посвященных изучению суточных ритмов экспрессии часовых генов в опухолях, носят противоречивый характер, и данный вопрос нуждается в дальнейшем изучении.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Препараты

Мелатонин чистотой $\geq 99\%$ (Sigma, США) добавляли в питьевую воду из расчета 20 мг/л. Навеску мелатонина растворяли в 100-200 мкл этилового спирта, полученный раствор вносили в воду.

2.2. Животные

Все эксперименты были проведены с использованием мышей, содержащихся в виварии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

В опытах использовали линии мышей:

- 1) аутбредных альбиносов SHR;
- 2) мышей FVB/N собственной разводки;
- 3) мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu, собственной разводки.

Мыши SHR были получены из питомника лабораторных животных Рапполово (Ленинградская область, Россия). Данный сток мышей происходит от аутбредных белых мышей Swiss, завезенных в СССР из Европы в 1950х гг. Это хорошо изученная модель, характеризующаяся низким уровнем спонтанного канцерогенеза

Мыши линии FVB/N/N (Friend Virus B-type susceptible) были получены в Джексоновской лаборатории, США, в конце 1970х гг. Мышей отбирали по признаку чувствительности к вирусу мышинной лейкемии, открытому Ш. Френд в 1957г. Далее линию поддерживали без селекции. С 1990х гг. мышей FVB/N/N стали использовать для получения трансгенных мышей благодаря плодовитости, крупному пронуклеусу и высокому уровню выживаемости зигот после микроинъекций [225].

Мыши линии FVB/N/N, трансгенные по HER2/neu, были получены из питомника Charles River, США, Итальянским Национальным Центром Исследования Старения и затем переданы в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» [165]. Мыши этой линии несут амплифицированный

крысиный ген HER2/neu. HER2/neu (ERBB2) входит в семейство рецепторных тирозинкиназ, которое включает рецептор к эпидермальному фактору роста (EGFR), однако данный белок для активации не требует связывания лиганда. Мишенями HER2/neu являются сигнальные каскады PKB/Akt и MAPK, активация которых ведет к повышению уровня пролиферации, метаболизма и клеточной миграции [56]. Сверхэкспрессия белка HER2/neu наблюдается в 30% случаев рака молочной железы у человека [191]. Мыши линии FVB/N/N, трансгенные по HER2/neu, характеризуются 100% частотой развития аденокарцином молочной железы. Опухоли развиваются начиная с 5-месячного возраста и приводят к гибели животных в возрасте 10 месяцев (средняя продолжительность жизни - 278 ± 5 дней) [165]. Данная модель опухолей молочной железы является удобной для исследования и клинически релевантной.

Все животные содержались в специально оборудованных помещениях вивария в полипропиленовых клетках при температуре 22-23°C.

Животные получали водопроводную воду в стеклянных поилках и лабораторный корм (ПК-120, ООО «Лабораторкорм», Россия) *ad libitum*. Мыши содержались при автоматизированном искусственном режиме освещения 12:12 (свет включен с 08:00 до 20:00 MSK) при искусственном освещении (500 Лк в светлое время суток) в помещениях без окон. За животными велось ежедневное наблюдение. Мыши в состоянии крайней слабости подвергались эвтаназии путем ингаляции CO₂. Все манипуляции с животными были согласованы с локальным этическим комитетом (Протокол заседания ЛЭК №2 от 16.01.2017).

2.3. Дизайн экспериментов

2.3.1. Исследование влияния режима освещения и введения мелатонина на канцерогенез легкого

В опыте использовали 120 мышей-самцов SHR в возрасте 3 мес., с массой тела 25-30 г. Для индукции опухолей легкого был использован уретан (Fluka)

Канцероген вводили мышам на 0 сутки опыта в дозе 1 г/кг в 0,9% стерильном растворе NaCl внутрибрюшинно. На 1 сутки опыта мышей рандомизировали в 4 группы (Таблица 5).

Таблица 5 - Экспериментальные группы животных в опыте с канцерогенезом легкого

Шифр группы	Мыши	n	Режим освещения	Препараты
LD	SHR	30	12:12 (LD)	-
LL	SHR	30	Постоянное (LL)	-
LDMT	SHR	30	12:12 (LD)	мелатонин
LLMT	SHR	30	Постоянное (LL)	мелатонин

Группы LL и LLMT после рандомизации поместили в помещения с круглосуточным искусственным освещением (500 Лк). Группы LDMT и LLMT с 1 суток эксперимента в ночное время (с 20.00 ч. до 08.00 ч.) получали раствор мелатонина (LDMT, LLMT) в питьевой воде. Раствор мелатонина наливали в непрозрачные стеклянные поилки для предотвращения его фотодеструкции. За мышами велось ежедневное (по рабочим дням) наблюдение. Всех павших в течение опыта животных подвергали аутопсии.

Через 45 недель после введения канцерогена эксперимент был остановлен. Все мыши были подвергнуты эвтаназии путем цервикальной дислокации и немедленной аутопсии. На каждое животное был заведен индивидуальный бланк, где указывали шифр группы, номер животного, дату и причину смерти, регистрировали наличие/отсутствие опухолевых

узлов в легких и патологические изменения внутренних органов. Легкие с опухолями, а также ткани и органы, подозрительные на наличие новообразований, фиксировали в 10 % нейтральном формалине.

Была проведена оценка частоты и множественности опухолей легкого, индуцированных уретаном, у мышей при разном режиме освещения, получающих и не получающих мелатонин. На фиксированных формалином легких под лупой подсчитывали число и размеры опухолевых узлов. На основании размеров новообразований их разделили на 3 группы: малые (≤ 1 мм), средние (1,1–2 мм) и крупные (> 2 мм). Фрагменты легких с опухолевыми узлами, а также ткани и органы, подозрительные на наличие новообразований и фиксировали в 10 % нейтральном формалине. После традиционной гистологической обработки кусочки органов заливали в парафин, готовили микротомные срезы толщиной 3-5 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Выявленные новообразования классифицировали согласно рекомендациям МАИР.

2.3.2. Исследование влияния режима освещения и введения мелатонина на химически индуцированный канцерогенез кожи мышей

В опыте использовали 102 самцов мышей SHR в возрасте 14 мес. массой тела 25-30 г.

Для индукции множественных опухолей кожи была использована модель двухстадийного канцерогенеза, которая включает использование сначала канцерогена диметилбензантрацена (ДМБА, Sigma), а затем промотора опухолевого роста О-тетрадеканоилфорболового эфира (ТФА, Sigma) [269]. Для того, чтобы наносить вещества непосредственно на кожу, перед началом опыта мышам выбривали участок кожи на спинке размером 1x1 см с помощью машинки для стрижки волос. Мышей рандомизировали в 6 экспериментальных групп. Дизайн опыта приведен в таблице (Таблица 6).

Таблица 6 – Экспериментальные группы животных в опыте с канцерогенезом кожи

Шифр группы	Воздействие	n	Режим освещения	Препараты
κLD	ацетон	10	12:12 (LD)	
κLL	ацетон	10	Постоянное (LL)	
LD	ДМБА+ТФА	22	12:12 (LD)	-
LL	ДМБА+ТФА	21	Постоянное (LL)	-
LDMT	ДМБА+ТФА	21	12:12 (LD)	мелатонин
LLMT	ДМБА+ТФА	22	Постоянное (LL)	мелатонин

С первых суток эксперимента мышам опытных групп на выбритый участок кожи спины начинали наносить канцерогенный агент - диметилбензантрацен (ДМБА, 100 нмоль/100 мкл ацетона). ДМБА наносили в течение 2 недель (всего 4 нанесения), после чего до конца опыта дважды в неделю наносили ТФА (17 нмоль/100 мкл ацетона). На одну мышь 100 мкл раствора ДМБА или ТФА в ацетоне тщательно распределяли по выбритому участку спинки. Животным контрольных групп наносили только ацетон (100 мкл) дважды в неделю.

Животные из опытных групп LDMT и LLMT получали мелатонин с питьевой водой в ночное время (20 мг/л, с 20:00 до 08:00 ч.) начиная с первых суток опыта. За животными велось ежедневное (по рабочим дням) наблюдение. 1 раз в 2 недели проводили регистрацию массы тела, а также числа и размеров опухолей.

Для оценки канцерогенеза кожи с помощью фотоаппарата Canon PowerShot A540 проводили фотосъемку участка спины, на который наносили канцероген и промотор. Фотоаппарат был установлен на штативе на фиксированной высоте для того, чтобы получать изображения одинакового масштаба, пригодные для дальнейшего сравнительного анализа количества и размеров опухолей. Данный анализ проводили с помощью компьютерного программного обеспечения ImageJ.

Рассчитывали следующие параметры канцерогенеза: частота мышей с опухолями, общее количество опухолей, среднее количество опухолей на

мышь среди мышей с опухолями, средняя площадь опухолей и средняя общая площадь опухолей на мышь. Для определения последнего параметра, рассчитывали общую площадь всех опухолей у одного животного, и усредняли на группу. Все новообразования кожи прослеживали индивидуально и при расчете средних показателей канцерогенеза не учитывали случаи развития рака кожи, поскольку в таких случаях множественные опухолевые узлы сливались. Всех животных, павших в течение эксперимента и подвергнутых эвтаназии в конце опыта (129 сутки опыта), подвергали аутопсии, брали материал кожи спины, основные органы (печень, почки, селезенку, легкое) и органы, подозрительные на наличие новообразований для проведения гистологического исследования. Выявленные новообразования классифицировали согласно рекомендациям МАИР.

2.3.3. Изучение суточных колебаний экспрессии часовых генов и белков и пролиферации кишечного эпителия у мышей линии FVB, трансгенных по HER2/neu

В опыте использовали 16 самок мышей FVB/N и 32 самки мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu.

Мыши FVB/N были выведены из эксперимента в возрасте 6 месяцев в 08:00 (ZT0), 14:00 (ZT6), 20:00 (ZT12) и 02:00 (ZT18), мыши линии FVB/N, трансгенные по HER2/neu - в возрасте 6 и 9 месяцев в 08:00 (ZT0), 14:00 (ZT6), 20:00 (ZT12) и 02:00 (ZT18), (по 4 мыши в каждой группе). Эвтаназию проводили путем цервикальной дислокации. Немедленно после эвтаназии проводили аутопсию. Кишечник, жировые подушечки с молочными железами и опухоли молочных желез фиксировали в 10% формалине для патоморфологического и иммуногистохимического анализа. Фрагмент мозга, содержащий СХЯ, печень, жировые подушечки с молочными железами и фрагменты опухолей замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °С до оценки экспрессии часовых генов.

2.4. Оценка экспрессии часовых генов

Экспрессию часовых генов оценивали методом ПЦР в режиме реального времени с обратной транскрипцией.

Для выделения тотальной РНК из замороженных образцов кусочек ткани (50-100 мг) помещали в пробирку типа эппендорф с керамическими шариками (Minilys, Bertin Instruments), в которую был внесен 1 мл реагента TRIzol (ThermoFisher Scientific). Затем пробирку плотно закрывали и помещали в гомогенизатор. Гомогенат центрифугировали при 10000g 10 минут. Далее к гомогенату добавляли 0,3 мл хлороформа, инкубировали 2-3 минуты, затем центрифугировали при 10000g 20 мин при температуре 5°C. Затем отделяли верхнюю водную фазу, в которой содержится РНК, и переносили в чистую маркированную пробирку. Для преципитации РНК к каждому образцу добавляли 500 мкл изопропилового спирта, инкубировали 30 мин и затем центрифугировали при 10000g 20 мин при температуре 5°C. Затем супернатант удаляли, преципитат промывали этиловым спиртом (1 мл). Спирт удаляли, преципитат растворяли водой.

Полученную мРНК использовали для проведения обратной транскрипции. Реагенты и их объем указаны в таблице (Таблица 7).

Таблица 7 - Реакционная смесь для проведения обратной транскрипции в реакции ПЦР

Реагент	Объем, мкл
РНК	10
Буфер для ПЦР	4
10мМ Нуклеозидтрифосфаты	2,5
25mM MgCl ₂	6
Случайные праймеры	1
Обратная транскриптаза	0,5
РНКаза	0,2
H ₂ O	3,3

Обратную транскрипцию проводили в термостатируемом амплификаторе 10 мин при 25°C, затем 1 час при 42°C. Затем кДНК

денатурировали при 95 °С и помещали образцы в морозильную камеру с температурой -20 °С для хранения. Полученные образцы кДНК использовали для проведения ПЦР в режиме реального времени. Праймеры к часовым генам Clock, Bmal1, Cry1, и гену В-актина (референтный ген) были синтезированы в лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Для проведения ПЦР заранее готовили смесь реагентов (ПЦР-микс), содержащую буфер для ПЦР, нуклеозидтрифосфаты, ионы магния. Далее с использованием ПЦР-микса готовили реакционную смесь, в которую входили прямой и обратный праймеры, Taq полимеразы, флуоресцентная метка (Sybr) и ионы магния. Реакцию проводили в объеме 20 мкл. Объем реагентов указан в таблице (Таблица 8). Смесь вносили в лунки планшета, добавляли кДНК, затем в лунки вносили минеральное масло, и планшет заклеивали пленкой для предотвращения испарения. Планшет помещали в амплификатор Biogad. Реакцию проводили в течение 45 циклов: 30 секунд денатурация при 95°С, 45 секунд отжиг праймеров при 58°С, 60 секунд элонгация при 72°С.

ПЦР с каждой пробы проводили как минимум в двух повторностях.

Таблица 8 – Реакционная смесь для проведения полимеразной цепной реакции

Реагент	Объем, мкл
кДНК	1
ПЦР-микс	10
Полимераза	0,2
Праймеры	0,8
SYBR	0,2
25mM MgCl ₂	0,2
H ₂ O	7,6

По окончании реакции для референтного и изучаемого генов записывали C_q – количество циклов амплификации, необходимых для наработки детектируемого уровня продукта реакции. Относительный

уровень экспрессии вычисляли по формуле: $E_{\text{target}} = 2^{-(Cq_{\text{reference}} - Cq_{\text{target}})}$, где $Cq_{\text{reference}}$ и Cq_{target} – Cq для референтного и изучаемого генов, соответственно.

2.5. Гистологическое исследование

Материал, полученный от животных, фиксировали в формалине 24-48 часов, затем проводили вырезку. Кусочки органов и новообразований помещали в пронумерованные биопсийные кассеты (ООО «Биовитрум», Россия), после чего подвергали стандартной гистологической проводке с использованием гистопроектора АТ-4 (Россия) и термостата BD53, установленного на 60°C (Binder, Германия). Протокол проводки приведен в таблице (Таблица 9).

Таблица 9 - Протокол гистологической проводки материала

Станция	Реагент	Экспозиция
1	50%-ный водный раствор изопропилового спирта	1 час.
2	Абсолютированный изопропанол	30 мин.
3	Абсолютированный изопропанол	30 мин.
4	Абсолютированный изопропанол	30 мин.
5	Абсолютированный изопропанол	1 час.
6	Абсолютированный изопропанол	1 час.
7	Абсолютированный изопропанол	2 час.
8	Абсолютированный изопропанол	3 час.
9	Абсолютированный изопропанол	3 час.
10	Парафин	1 час.
11	Парафин	3 час.
12	Парафин	4 час.
Итого		20 час.30 мин.

Далее проводили заливку материала в парафиновые блоки с помощью заливочной станции (АТМ-практика, Россия) и охлаждающего модуля (Lipshaw, США).

С охлажденных блоков на санном микротоме (Reichert, Австрия) изготавливали срезы толщиной 3-5 мкм и помещали на стандартные предметные стекла (Biovitrum, Россия) для рутинной окраски или на заряженные предметные стекла Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific, Россия) для иммуногистохимической окраски.

2.6. Окраска гематоксилином-эозином

Для патоморфологических исследований из материала, полученного во всех экспериментах, изготавливали срезы, окрашенные гематоксилином-эозином (Г-Э). Срезы с парафиновых блоков окрашивали по следующей методике:

1. Депарафинизация (2 смены ксилола по 5 минут, 2-3 смены спирта по 3-5 минут, проточная вода 3-5 минут) в вытяжном шкафу.
2. Окраска гематоксилином Майера (BioOptica, Италия) 7-10 минут.
3. Промывка в воде 5 минут.
4. Промывка раствором NaHCO_3 для подсинивания срезов.
5. Окраска водным раствором эозина (Biovitrum, Россия) 0,5-1 минуту.
6. Промывка в дистиллированной воде для удаления избытка эозина.
7. Дегидратация (2-3 смены спирта по 3-5 минут, 2 смены ксилола по 5 минут).
8. Заключение срезов в синтетическую среду Biomount (BioOptica, Италия).

2.7. Иммуногистохимическое окрашивание

Для проведения иммуногистохимического окрашивания использовали парафиновые срезы, помещенные на заряженные предметные стекла. Окраску проводили по следующему протоколу:

1. Депарафинизация (2 смены ксилола по 5 минут, 2-3 смены спирта по 3-5 минут, проточная вода 3-5 минут) в вытяжном шкафу.

2. Демаскировка антигенов. Использовали готовый 10-кратный буфер Epitope Retrieval Solution, pH 9,0 (Dako, Дания). Буфер разводили дистиллированной водой, демаскировку антигенов проводили в бытовой мультиварке (Redmond) при 95°C в течение 30 мин.
3. Промывка в дистиллированной воде 3-5 мин.
4. Блокирование эндогенной пероксидазной активности (15 мин. 3% раствор H₂O₂ в непрозрачной посуде)
5. Промывка в трис-солевом буфере (ТСБ, pH=7,5) с добавлением детергента 3-5 мин.
6. Нанесение раствора первичных антител. Аликвоты антител размораживали и добавляли растворитель (1% раствор бычьего сывороточного альбумина в ТСБ с добавлением консерванта азида натрия) в необходимой пропорции. Инкубацию проводили при КТ в течение 1 часа. Используемые в работе первичные антитела и их разведение указаны в таблице (Таблица 10).
7. 3 промывки в ТСБ по 5 мин на шейкере
8. Нанесение вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой (Anti-Rabbit EnVision System, Dako, Дания). Инкубацию проводили при КТ в течение 1 часа.
9. 3 промывки в ТСБ по 5 мин на шейкере
10. Нанесение раствора хромогена - диаминобензидина (ДАБ,) 1:50 в буфере (Liquid Dab+ Substrate Chromogen System, Dako, Дания). инкубация 5 мин, промывка в проточной воде 1-2 мин
11. Докрашивание гематоксилином Майера 3-5 мин
12. Дегидратация (2-3 смены спирта по 3-5 минут, 2 смены ксилола по 5 минут).
13. Заключение в Biomount (BioOptica, Италия)

Таблица 10 – Используемые первичные антитела и их разведение

Антитело	Производитель	Разведение
Анти-BMAL1	NovusBiologicals, NB100-2288	1:300
Анти-CLOCK	NovusBiologicals NB100-92284	1:200
Анти-CRY1	NovusBiologicals, NBP1-69080	1:100
Анти-PER2	ThermoFisher Scientific, PA5-23339	1:100

С помощью КМОП-камеры MMC-31C-M (MMCSOFT, Россия) получали микрофотографии опухолевой и нормальной ткани. Обработку и анализ изображений проводили в программе ImageJ (NIH, США) с использованием модуля Colour deconvolution, позволяющего отдельно оценивать окрашивание гематоксилином и ДАБ.

2.8. Оценка часовых белков

2.8.1. Оценка содержания часовых белков в опухолевой и нормальной ткани легкого

Для оценки содержания BMAL 1 в опухолях легкого и нормальных альвеолоцитах на микрофотографиях срезов, подвергнутых иммуногистохимической окраске, проводили операцию Colour Deconvolution для разделения синего и коричневого цветов (гематоксилин и ДАБ, соответственно) по отдельным каналам. На полученном изображении, соответствующем окрашиванию ДАБ, измеряли оптическую плотность альвеолоцитов, и опухолевых клеток, далее подсчитывали отношение между оптической плотностью опухолевой ткани и фона. Таким образом, значение данного показателя выше 1 указывало на повышение относительного уровня содержания белка BMAL1 в опухолевой ткани по сравнению с нормальной. Окраску антителами к CLOCK оценивали в аденомах и аденокарциномах полуколичественно в

баллах от 1 до 3 (1 – слабое окрашивание, 3 - интенсивное). В каждой группе было оценено не менее 10 опухолей.

2.8.2. Оценка содержания часовых белков в коже и опухолях кожи

Для оценки содержания часовых белков BMAL1, CLOCK и CRY1 в коже и опухолях кожи на микрофотографиях препаратов подсчитывали процент позитивно окрашенных ядер в базальном слое. Для анализа изображений использовали программу ImageJ. Сначала на микрофотографии участка кожи/опухоли подсчитывали все ядра базального слоя. Затем проводили операцию Colour Deconvolution для определения числа позитивно окрашенных ядер. Далее вычисляли долю позитивно окрашенных ядер. Данный показатель оценивали только в базальном слое кожи и папиллом кожи, поскольку количество слоев клеток в папилломах и гиперплазированной коже отличается от нормальной.

2.8.3. Оценка содержания часовых белков в молочной железе и спонтанных опухолях молочной железы мышей линии FBV, трансгенных по HER2/neu

Для оценки содержания белка BMAL1 определяли отношение интенсивности окрашивания ДАБ ткани молочной железы/опухоли и фона (соединительная ткань, дающая неспецифическое окрашивание) аналогично тому, как оценивали данный показатель в опухолях легкого.

Для оценки содержания белка CLOCK в программе ImageJ на микрофотографиях участков опухолевой ткани и протоков молочной железы подсчитывали процент иммунопозитивных ядер.

2.9. Изучение суточных колебаний митотической активности спонтанных опухолей молочной железы мышей линии FBV, трансгенных по HER2/neu

Для оценки пролиферативной активности опухолей молочной железы на срезах опухолей, окрашенных Г-Э, подсчитывали митотический индекс (МИ) – процент делящихся опухолевых клеток. Для этого при увеличении $\times 400$ получали микрофотографии срезов, на которых в программе ImageJ подсчитывали митотические фигуры и общее число клеток. Митотический индекс вычисляли по формуле $M = N_{mit}/N * 100$, где N_{mit} – число клеток, претерпевающих митоз, N – общее число клеток.

2.10. Изучение суточных колебаний пролиферации и апоптоза в кишечном эпителии мышей линии FBV, трансгенных по HER2/neu

Для оценки пролиферативной активности кишечного эпителия использовали поперечные срезы тощей кишки, окрашенные Г-Э по стандартной методике. Для анализа в материале от каждого животного выбирали 50 продольно срезанных крипт, в которых подсчитывали число митозов. Затем вычисляли среднее число митозов на 1 крипту в каждой группе. Средне число апоптотических клеток на крипту подсчитывали на препаратах тощей кишки по той же методике.

2.11. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ MS Excel 2007, GraphPad Prism 6.0. Для представления экспериментальных данных использовали следующие описательные статистики: среднее значение, среднеквадратическое (стандартное) отклонение, ошибка среднего.

Определение статистической значимости наблюдаемых различий в группах по средним значениям количественной переменной проводили с помощью t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна—Уитни (в зависимости от характера распределения, которое определяли по критерию Шапиро—Уилка). Для межгрупповых сравнений проводили дисперсионный анализ с применением апостериорного теста Тьюки.

Для анализа частотных величин использовали таблицы сопряженности, анализ которых проводили с помощью точного теста Фишера. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

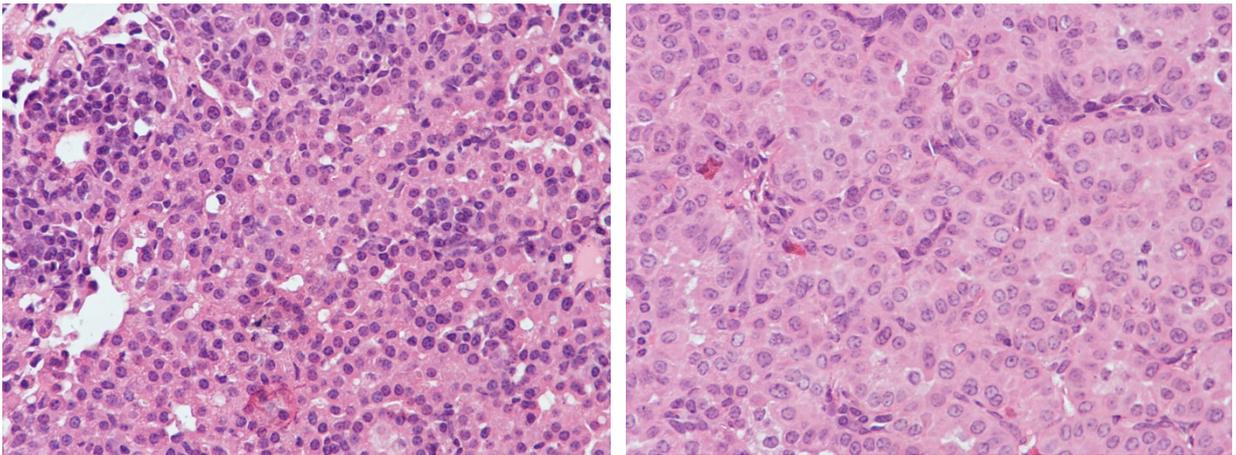
3.1. Влияние режима освещения и введения мелатонина на канцерогенез легких, индуцированный уретаном у мышей

В опыте была использована модель опухолей легкого, индуцированных однократной инъекцией уретана благодаря ее чувствительности к различным факторам, модифицирующим канцерогенез. В данном случае изучалось влияние режима освещения (экспериментальные группы LD – освещение 12:12 и LL – постоянное освещение) и введения мелатонина при стандартном режиме освещения (экспериментальная группа LDMT) и при постоянном свете (экспериментальная группа LLMT).

У всех мышей, получивших инъекцию уретана, развивались множественные опухоли легкого. Опухоли имели вид серо-розовых округлых узлов, выступающих над поверхностью долей легкого (Рисунок 1, Рисунок 2). При гистологическом исследовании все опухоли представляли собой бронхоальвеолярные аденомы и аденокарциномы легкого. Результаты оценки основных показателей канцерогенеза и распределение доброкачественных/ злокачественных опухолей приведены в таблице (Таблица 11).



Рисунок 1 – Препарат легкого мыши самца SHR с опухолями, индуцированными уретаном (фиксация 10% формалином)



А

Б

Рисунок 2 – Микрофотографии опухолей легкого, индуцированных уретаном у мышей SHR. А – аденома (Г-Э, ув. ×400), Б – аденокарцинома (Г-Э, ув. ×400)

Таблица 11 - Показатели индуцированного уретаном канцерогенеза легкого у мышей самцов SHR при различных режимах освещения и введении мелатонина

Показатели		Группа			
		LD	LDMT	LL	LLMT
Число эффективных животных		27	23	28	24
Число животных с опухолями легкого (%)		27 (100%)	21 (91%)	25 (89%)	23 (96%)
Частота животных с аденомой/аденокарциномой легкого		48% / 52%	48% / 43%	36% / 53%	50% / 46%
Среднее количество опухолей у животных с опухолью (медиана)		15,0±2,75 (12)	11,3±1,45 (11)	12,4±1,36 (12)	13,9±1,76 (11)
Общее количество выявленных опухолей легкого		405	236	294	320
в том числе, с наибольшим диаметром	менее 0,5 мм	136 (33,6%)	92 (39,0%)	90 (30,6%)	162 (50,6%)
	0,6 – 1,0 мм	111 (27,4%)	64 (27,1%)	77 (26,2%)	77 (24,1%)
	1,1 – 2,0 мм	99 (24,4%)	53 (22,5%)	65 (22,1%)	53 (16,6%)
	более 2,0 мм	59 (14,6%)	27 (11,4%)	62 (21,1%) *p=0,0245	28 (8,8%) #p=0,0001
Число животных, доживших до конца опыта		22 (81,5%)	17 (74%)	24 (86%)	16 (67%)
Среднее количество опухолей у животных с опухолью, доживших до конца опыта (медиана)		13,2±1,62 (12)	9,5±0,72 (9,5)	12,1±1,33 (12)	10,4±0,98 (10)
Общее количество выявленных опухолей легкого у животных, доживших до конца опыта		291	162	275	166
в том числе, с наибольшим диаметром	менее 0,5 мм	87 (29,9%)	49 (30,2%)	83 (30,2%)	63 (38,0%)
	0,6 – 1,0 мм	75 (25,8%)	44 (27,2%)	66 (24,0%)	49 (29,5%)
	1,1 – 2,0 мм	76 (26,1%)	48 (29,6%)	72 (26,2%)	38 (22,9%)
	более 2,0 мм	53 (18,2%)	21 (13,0%)	54 (19,6%)	16 (9,6%) # p=0,054

* сравнение с группой LD (точный тест Фишера),

сравнение с группой LL (точный тест Фишера)

Количество эффективных животных (доживших до первого случая обнаружения опухоли легкого) составило в группе LD – 27, LDMT – 23, LL – 28 и LLMT – 24. Частота животных с опухолями легкого была примерно равной во всех группах и составила 27/27 (100%) в группе LD, 21/23 (91%) в группе LDMT, 25/28 (89%) в группе LL и 23/24 (96%) в группе LLMT. Статистически значимых различий между группами по данному показателю не наблюдалось (точный тест Фишера).

Среди опухолей легкого были выявлены аденомы тубулярного и трабекулярного строения и аденокарциномы, чаще всего папиллярного строения. Частота развития доброкачественных и злокачественных новообразований статистически значимо не различалась между группами (точный тест Фишера). В группе LD частота аденом и аденокарцином легкого составила 48% и 52%, соответственно, в группе LDMT – 48% и 43%, в группе LL – 36% и 53%, и в группе LLMT в 50% случаев опухоли были идентифицированы как аденомы и в 46% - как аденокарциномы.

Среднее число опухолей на одно животное-опухоленоситель в группе LD составило $15 \pm 2,75$, в группе LDMT – $11,3 \pm 1,45$, в группе LL – $12,4 \pm 1,36$ и в группе LLMT – $13,9 \pm 1,76$ (статистически значимые различия между группами по U-критерию Манна-Уитни не обнаружены).

При анализе частоты опухолей различного размера выявлено, что частоты опухолей малого и среднего размеров также были сходными во всех группах (Таблица 11). Однако опухоли крупного размера чаще выявлялись у животных группы LL, содержащейся при постоянном освещении (62 опухоли из 294, 21,1%), по сравнению с группой LD (28 опухолей из 320, 14,6%, $p=0,0245$, точный тест Фишера).

Введение экзогенного мелатонина не влияло на частоту крупных опухолей в группе стандартного освещения (LDMT – 11,4%), а при постоянном освещении существенно уменьшало их частоту (LLMT – 8,8%, $p<0,001$, точный тест Фишера) по сравнению аналогичным показателем в группе LL.

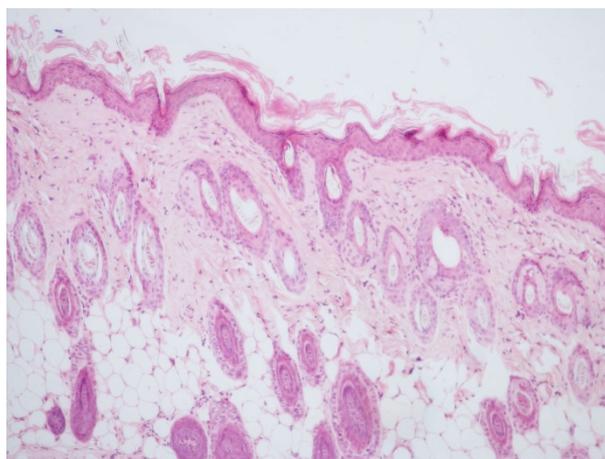
Таким образом, антиканцерогенный эффект мелатонина проявляется при нарушении режима освещения и выражается либо в задержке появления опухолей, либо в торможении их роста, что суммарно выражается в меньшей частоте крупных опухолей [273].

3.2. Влияние режима освещения и введения мелатонина на канцерогенез кожи, индуцированный ДМБА и ТФА у мышей SHR возрастом 14 месяцев

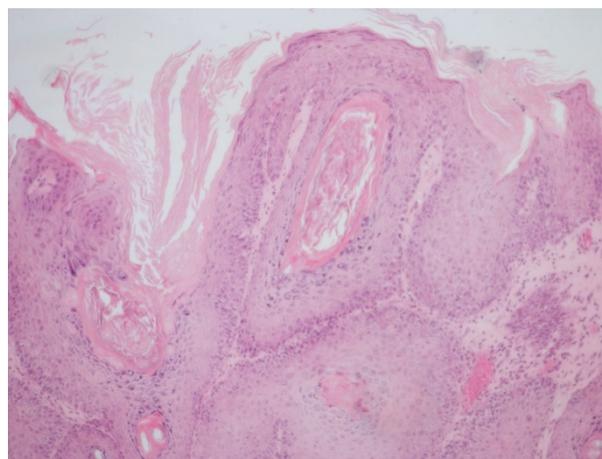
Для индукции опухолей кожи была использована модель двухстадийного канцерогенеза с применением ДМБ и ТФА. Как и в опыте по изучению канцерогенеза легкого, задачей эксперимента было оценить влияние режима освещения и введения мелатонина на канцерогенез. В ходе наблюдения за животными на 97, 111, и 125 сутки опыта проводилась фотосъемка кожи на месте аппликации канцерогена для оценки числа и площади опухолей (Рисунок 3). Эксперимент завершили на 128 сутки. Опухоли и кожа с места аппликации канцерогена были подвергнуты патоморфологическому анализу (Рисунок 4 Б). Практически все опухоли кожи представляли собой папилломы, также были выявлены несколько случаев плоскоклеточного рака. В коже с места аппликации наблюдались гиперкератоз, гиперплазия эпидермиса и придатков кожи, хроническая воспалительная инфильтрация. Данные по числу эффективных животных в группах, числу животных с опухолями, общему числу опухолей в каждой группе, срокам выявления первой опухоли и по числу опухолей других локализаций представлены в таблице (Таблица 12).



Рисунок 3 - Опухоли кожи, индуцированные ДМБА и ТФА у мышей SHR. Группа LD, 125 сутки опыта



А



Б

Рисунок 4 – Микрофотографии кожи с места аппликации ДМБА и ТФА (А) и папилломы кожи, индуцированной ДМБА и ТФА у мышей SHR (Б)

Таблица 12 - Основные показатели индуцированного ДМБА и ТФА канцерогенеза у мышей SHR

Показатели	Группа					
	LDk	LLk	LD	LL	LDMT	LLMT
Количество эффективных животных	10	10	22	18	19	20
Количество животных с папилломами кожи	0	0	13 (59%)	16 (89%)	14 (74%)	12 (60%)
			*p=0,038			*p=0,048
Количество выявленных папиллом кожи при аутопсии	0	0	72	90	55	44
Время выявления первой опухоли кожи (сутки опыта)	—	—	82,7±6,74	70,8±4,86	80,2±6,15	81,3±5,43
			#p = 0,14			#p = 0,15
Количество выявленных злокачественных опухолей кожи и опухолей прочих локализаций						
Рак кожи	0	0	0	1 (5,5%)	0	1 (5%)
Злокачественная лимфома	0	1 (10%)	2 (9%)	1 (5,5%)	1 (5%)	0
Аденома легкого	0	1 (10%)	1 (4,5%)	2 (11%)	2 (10,5%)	0
Аденокарцинома легкого	0	0	0	1 (5,5%)	2 (10,5%)	0

* по сравнению с LL, точный тест Фишера

по сравнению с LL, t-критерий Стьюдента

У 10 животных контрольной группы опухоли кожи не обнаруживались. Наибольшее количество животных с папилломами наблюдалось в группе постоянного освещения LL: опухоли кожи развились у 16 животных из 18 (89%), в то время как в группе стандартного освещения LD папилломы были обнаружены только у 13 животных из 22 (59%). Это различие между группами было статистически значимым (p=0,038, точный тест Фишера). Число животных с папилломами кожи в группе LLMT составило 12/20 (60%), что статистически значимо ниже, чем в группе LL, животные в которой не получали мелатонин (p=0,048, точный тест Фишера). При этом количество

животных с папилломами в группах стандартного освещения было примерно равным независимо от приема мелатонина и составило 13/22 (59%) в группе стандартного освещения без мелатонина (LD) и 14/18 (74%) при использовании мелатонина (LDMT). Статистических различий между этими группами не наблюдалось. Похожая тенденция была выявлена для такого показателя, как время выявления первой опухоли, но в данном случае различия не достигали уровня статистической значимости.

Наблюдалось увеличение абсолютного числа папиллом в группе животных, содержащихся при постоянном освещении LL (по сравнению с группой стандартного освещения LD), а при введении мелатонина при постоянном освещении (группа LLMT) этот показатель снижался на 51% по сравнению с группой LL. Введение мелатонина в группе стандартного освещения (LDMT) приводило к 24% снижению частоты папиллом в данной группе по сравнению с группой, не получавшей мелатонин (LD).

Динамика среднего числа папиллом кожи на животное статистически значимо не различалась (

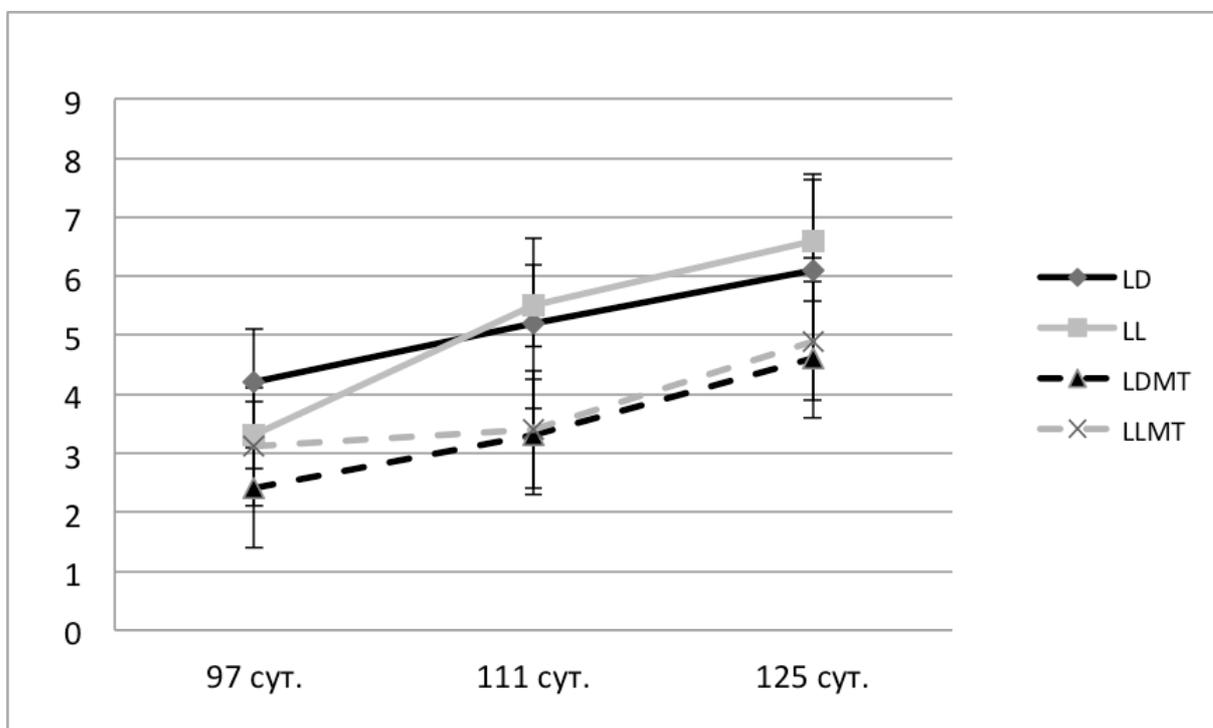


Рисунок 5, Рисунок 6), однако наблюдалась тенденция к снижению числа опухолей в группах, получавших мелатонин. Так, использование

мелатонина у животных, содержащихся при стандартном освещении, на 125 день опыта приводило к 26% снижению среднего числа папиллом от $6,11 \pm 2,06$ у животных группы LD к $4,61 \pm 1,54$ у животных группы LDMT ($p=0,098$, t-тест Стьюдента) и к 33% снижению показателя у животных, содержащихся при постоянном освещении: от $6,64 \pm 1,71$ у животных группы LL до $4,91 \pm 1,08$ в группе LLMT ($p=0,098$, t-тест Стьюдента).

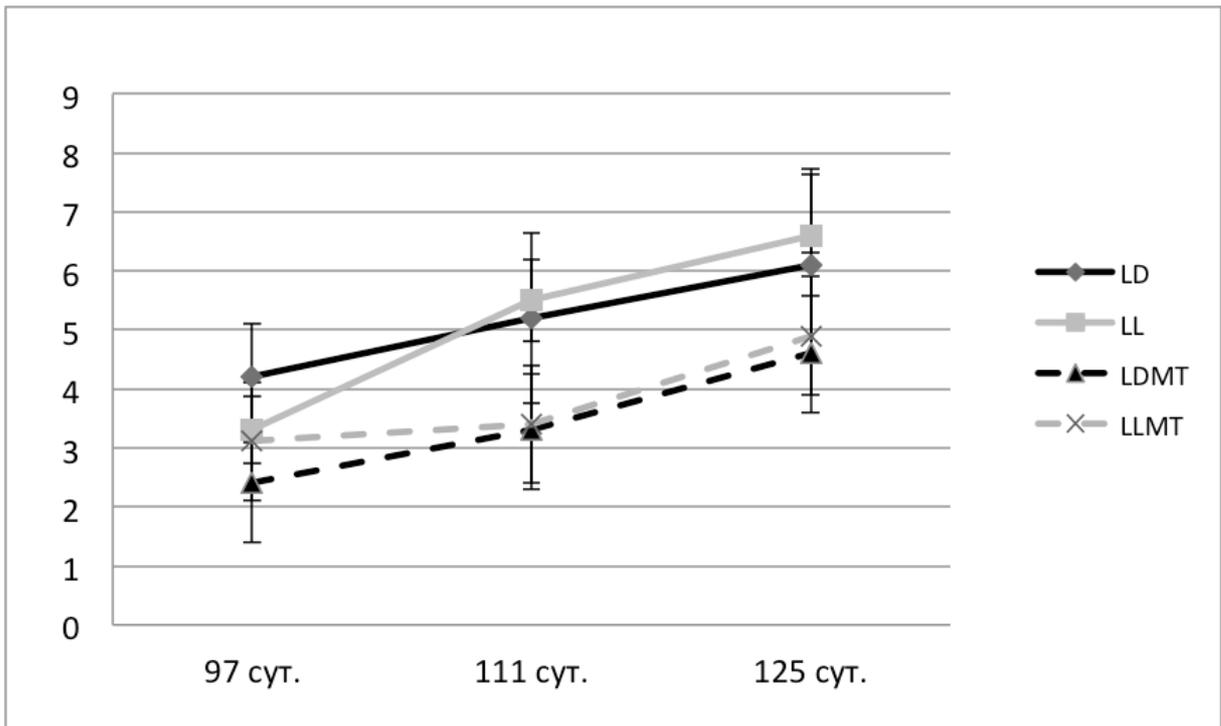


Рисунок 5 – Динамика среднего числа папиллом кожи на животное в опыте с индуцированным ДМБА и ТФА канцерогенезом у мышей SHR, $M \pm m$

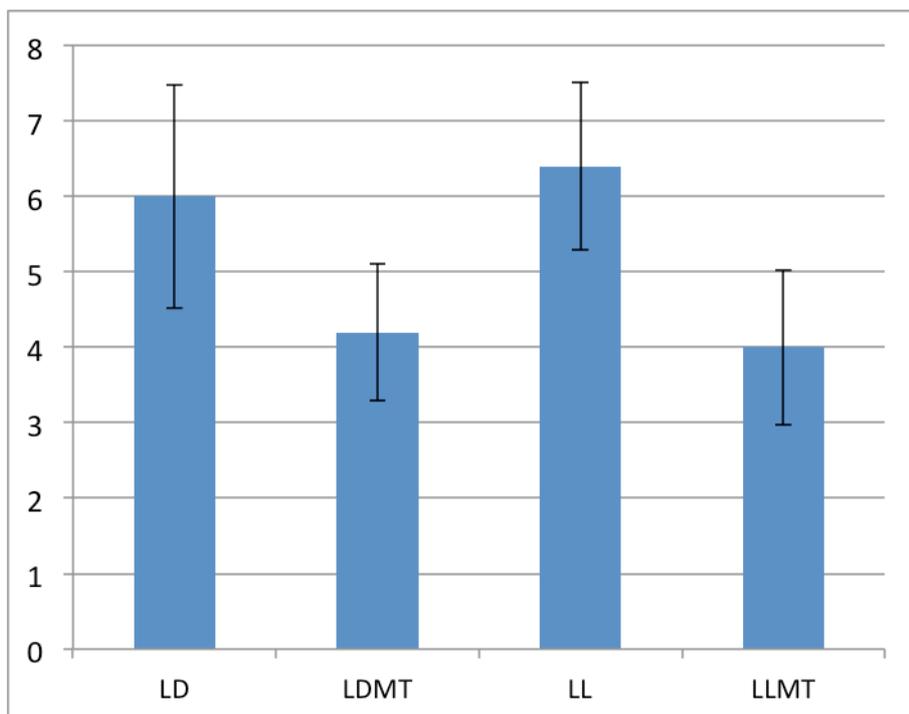


Рисунок 6 - Среднее число папиллом на животное при аутопсии в опыте с индуцированным ДМБА и ТФА канцерогенезом у мышей SHR, $M \pm m$

Средняя площадь папиллом в конце опыта на 125 сутки и при аутопсии всех животных, включая погибших до завершения опыта, была статистически значимо ($p < 0,05$, t-тест Стьюдента) ниже в группе LLMT ($4,6 \pm 0,85 \text{ мм}^2$) по сравнению с LL ($7,6 \pm 1,1 \text{ мм}^2$) (Рисунок 7, Рисунок 8).

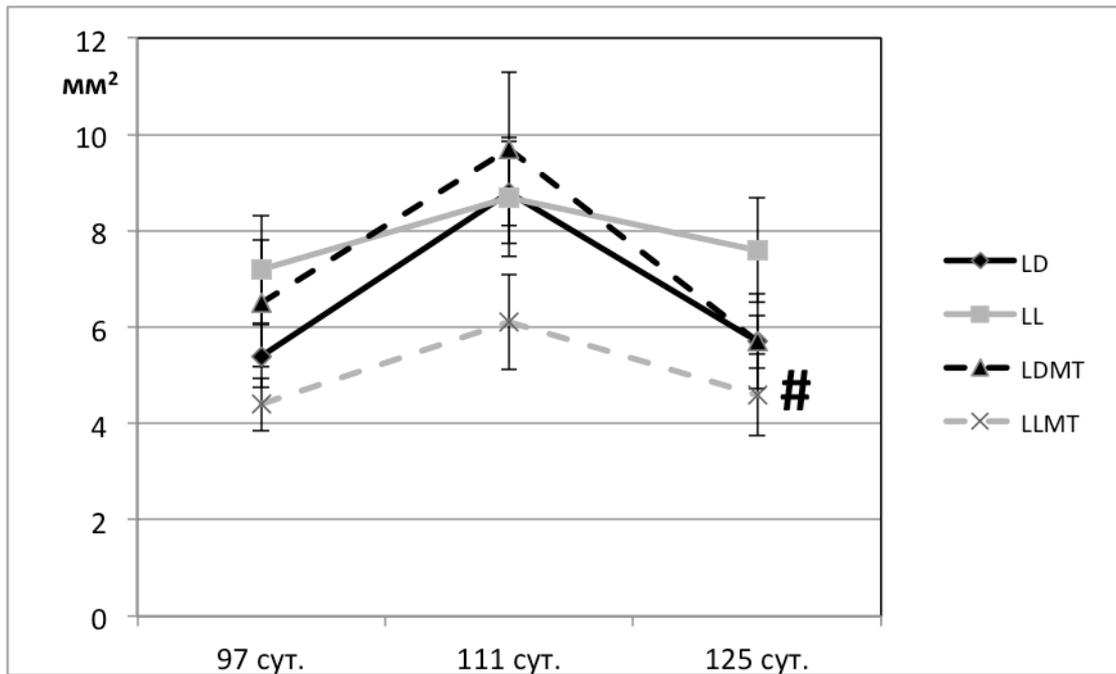


Рисунок 7 - Динамика средней площади папиллом кожи у животных в опыте с индуцированным ДМБА и ТФА канцерогенезом у мышей SHR, $M \pm m$

$p \leq 0.05$ по сравнению с LL, t-тест Стьюдента

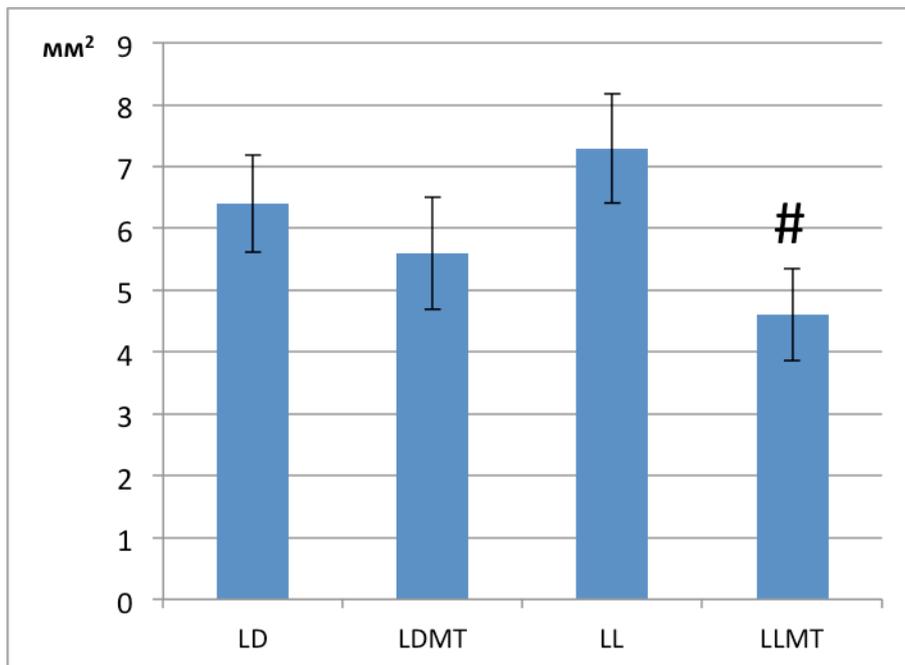


Рисунок 8 - Средняя площадь папиллом при аутопсии животных в опыте с индуцированным ДМБА и ТФА канцерогенезом у мышей SHR, $M \pm m$

$p \leq 0.05$ при сравнении с LL, t-тест Стьюдента

Средняя общая площадь папиллом также была статистически значимо ($p < 0,05$, t-тест Стьюдента) меньше у животных группы LLMT ($23,3 \pm 6,9 \text{ мм}^2$) по сравнению с LL ($49,9 \pm 22,5 \text{ мм}^2$) на 125 сутки и по данным аутопсии (Рисунок 9, Рисунок 10).

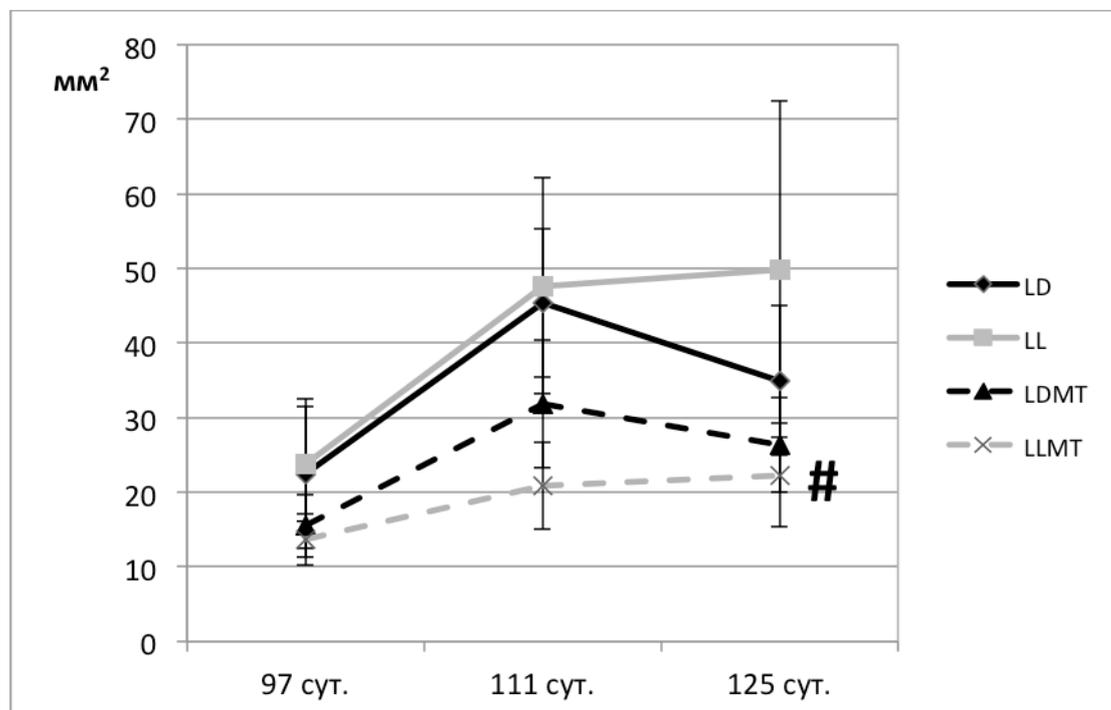


Рисунок 9 - Динамика средней общей площади папиллом у животных в опыте с индуцированным ДМБА и ТФА канцерогенезом у мышей SHR, $M \pm m$

$p \leq 0,05$ при сравнении с LL, t-тест Стьюдента

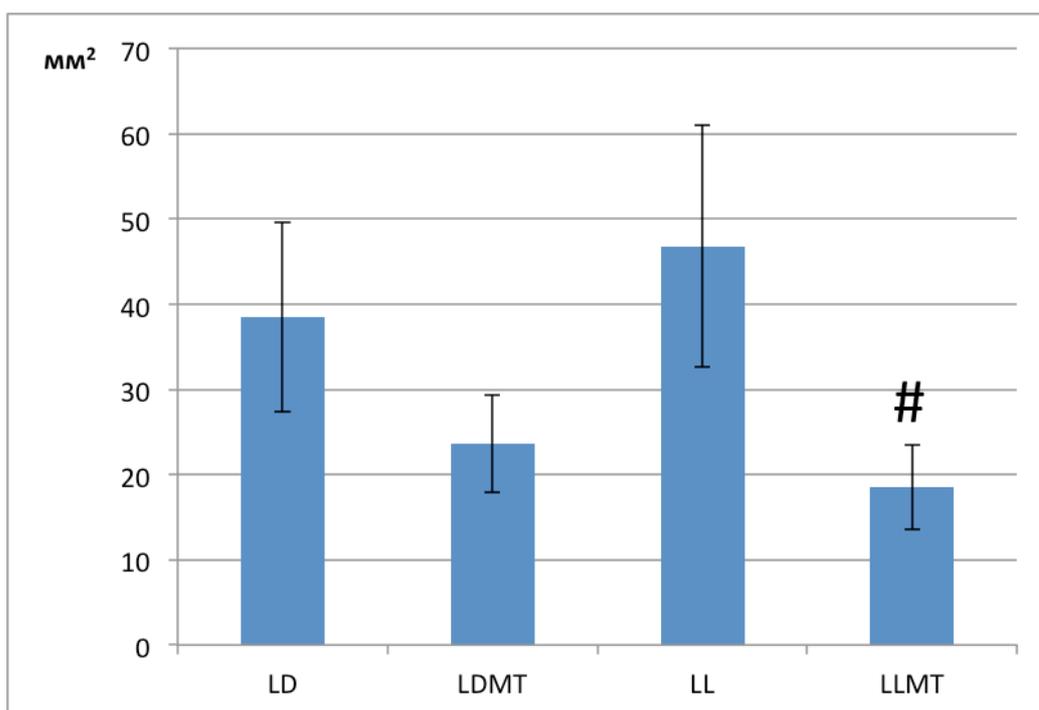


Рисунок 10 - Средняя общая площадь папиллом при аутопсии животных в опыте с индуцированным ДМБА и ТФА канцерогенезом у мышей SHR, $M \pm m$

$p < 0.05$ при сравнении с LL, t-тест Стьюдента

Таким образом, постоянное освещение, вызывающее нарушение синтеза мелатонина и суточных ритмов, промотирует химический канцерогенез кожи. Введение экзогенного мелатонина в ночное время ингибирует канцерогенез кожи.

3.3. Экспрессия часовых генов в опухолях легких, индуцированных уретаном у мышей

Была проведена оценка экспрессии часовых генов *Bmal1*, *Clock* и *Cry1* в образцах нормальной и опухолевой ткани легкого методом ПЦР в режиме реального времени. Во всех случаях, полученные значения относительного уровня экспрессии исследуемого гена по отношению к уровню экспрессии гена бета-актина были невелики и находились в диапазоне значений E от 0,002 до 0,01. При анализе данных использовали

попарное сравнение уровней экспрессии генов в различных тканях у животных одной группы с помощью U-критерия Манна-Уитни; при оценке межгрупповых различий использовали апостериорный тест Тьюки.

Относительная экспрессия гена *Bmal1* в опухолевой ткани легкого у животных группы LL была в 2,6 раз ниже, чем в нормальной ткани ($p=0,0345$, U-критерий Манна-Уитни); для группы LD подобная тенденция (снижение относительной экспрессии в 1,4 раза в опухолевой ткани легкого по сравнению с нормальной) не достигала уровня статистической значимости (Рисунок 11).

При анализе данных с использованием дисперсионного многофакторного анализа выявлено, что относительные уровни экспрессии *Bmal1* в опухолях у животных всех групп статистически не различаются (Рисунок 11). В нормальной ткани легкого животных, содержащихся в условиях постоянного освещения (группа LL), уровень относительной экспрессии данного гена в 3,1 раза превышал значения аналогичного показателя для животных при обычном режиме (LD) ($p=0,02$, тест Тьюки). Для групп животных, получавших мелатонин, обнаружена подобная тенденция: уровень относительной экспрессии *Bmal1* в группе LLMT был 2,5 раза выше, чем в группе LDMT; различия не достигают уровня статистической значимости ($p=0,15$, тест Тьюки).

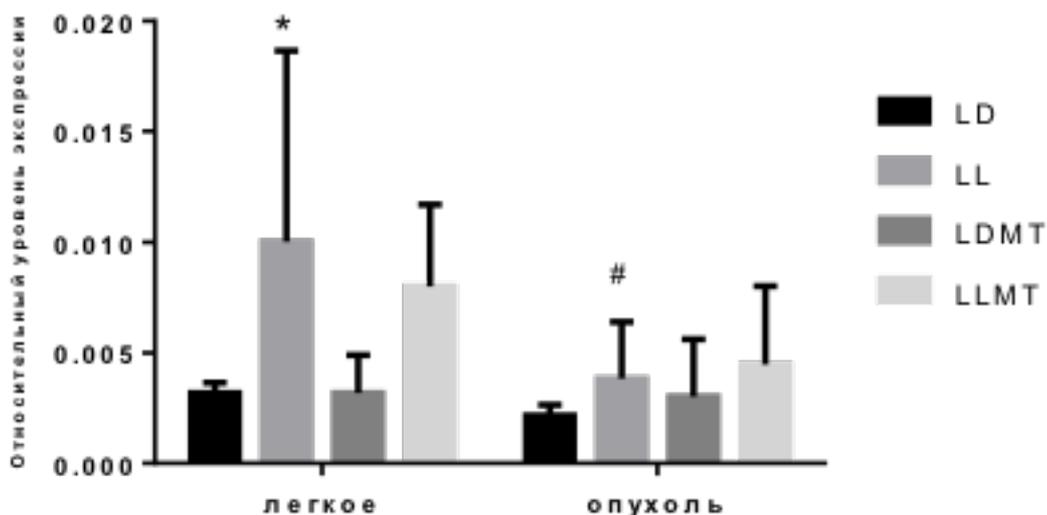


Рисунок 11 – Экспрессия гена Bmal1 в образцах нормальной и опухолевой ткани легкого у животных в опыте с индуцированным уретаном канцерогенезом у мышей SHR ($M \pm m$)

* - $p=0,02$, апостериорный тест Тьюки при сравнении группы с группой LD,

- $p=0,0345$, U-критерий Манна-Уитни при сравнении с нормальной тканью легкого в той же группе.

Относительная экспрессия гена Clock статистически значимо не различалась ни между группами, ни между нормальной и опухолевой тканью (Рисунок 12).

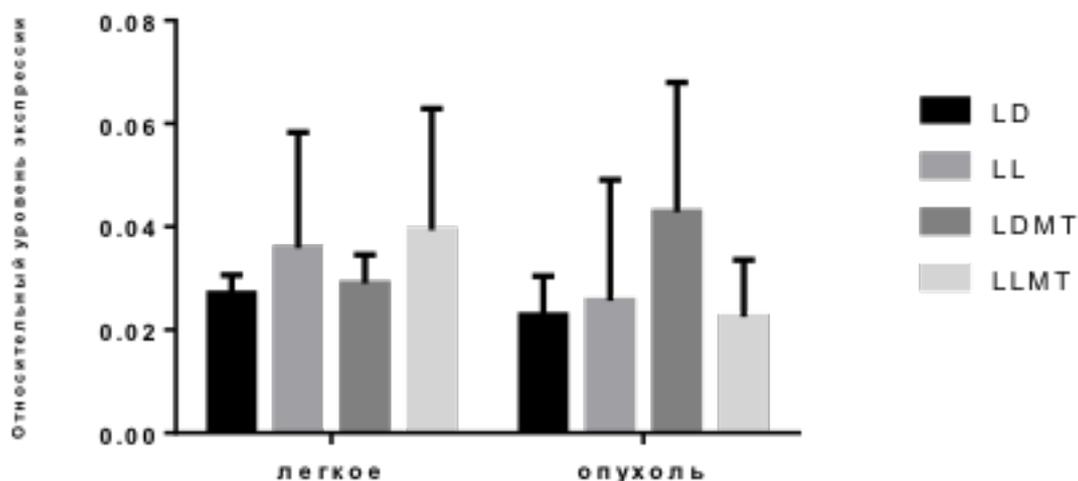


Рисунок 12 – Экспрессия гена Clock в образцах нормальной и опухолевой ткани легкого у животных в опыте с индуцированным уретаном канцерогенезом у мышей SHR ($M \pm m$)

Экспрессия гена *Cry1* в опухолевой ткани легкого в группе LL была в 2,9 раза ниже, чем в нормальной ткани ($p=0,0005$, U-критерий Манна-Уитни, Рисунок 13).

Опухоли животных всех групп характеризовались сходной относительной экспрессией гена *Cry1*, тогда как в здоровой ткани легкого уровень экспрессии данного гена был выше в 3,61 раз у животных, содержащихся в условиях постоянного освещения (LL) по сравнению с группой стандартного освещения (LD) ($p=0,0002$, тест Тьюки, Рисунок 13).

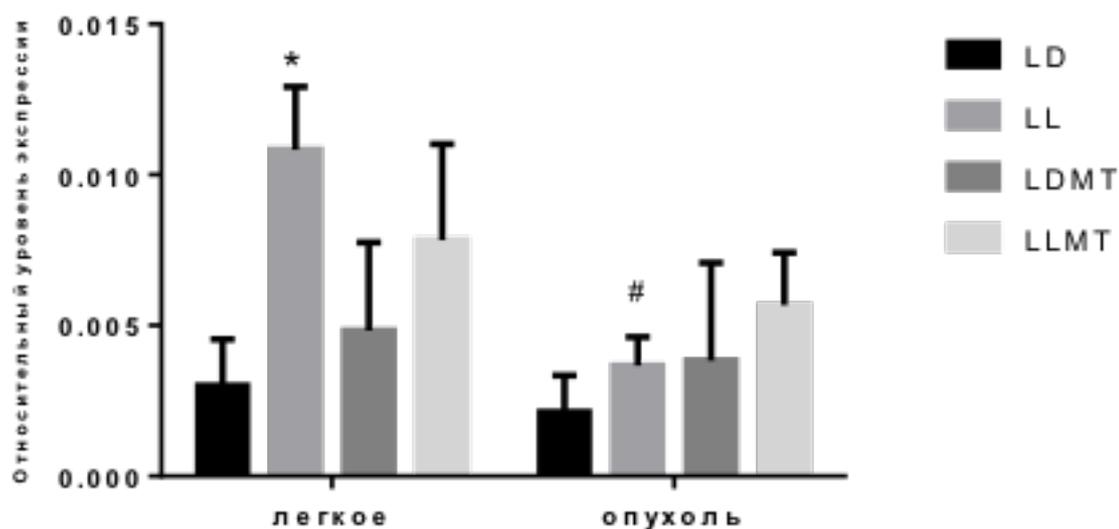


Рисунок 13 – Экспрессия гена *Cry1* в образцах нормальной и опухолевой ткани легкого у животных в опыте с индуцированным уретаном канцерогенезом у мышей SHR ($M \pm m$)

* - $p=0,0002$, апостериорный тест Тьюки при сравнении группы с группой LD,

- $p=0,0005$, U-критерий Манна-Уитни при сравнении с нормальной тканью легкого в той же группе.

Таким образом, наблюдается влияние режима освещения на экспрессию часовых генов *Bmal1* и *Cry1* в нормальной, но не опухолевой ткани легкого. В группе мышей, содержащихся при постоянном освещении (LL), было показано статистически значимое повышение экспрессии *Bmal1* и *Cry1* в легком по сравнению с LD, а в опухолях в той же группе их экспрессия была значимо ниже по сравнению с нормальной тканью.

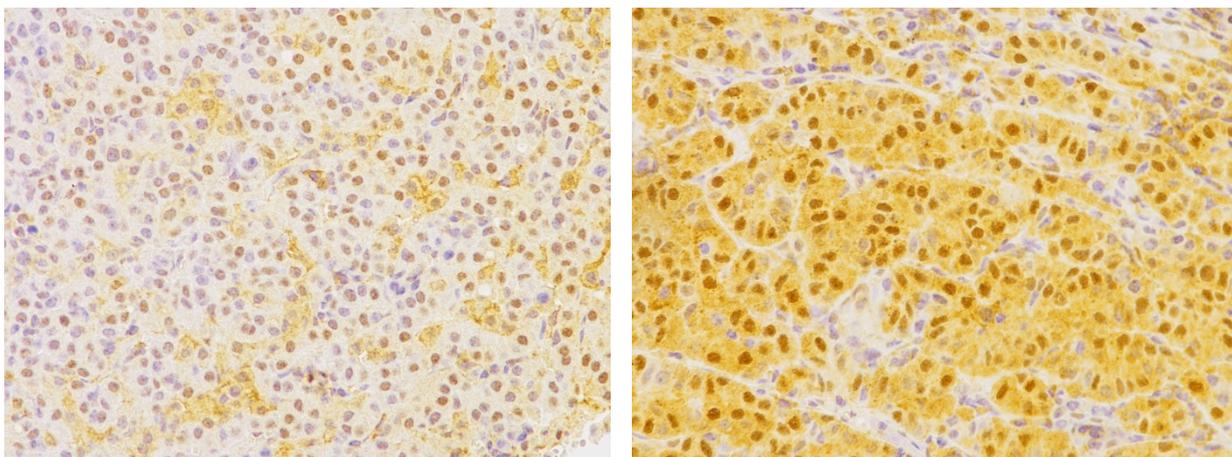
3.4. Содержание часовых белков в опухолях легких, индуцированных уретаном у мышей SHR

В опухолях легких методом иммуногистохимии было оценено содержание белков BMAL1 и CLOCK. Антитела к CRY1 и PER2 при окрашивании нормальной и опухолевой ткани легкого давали слабое окрашивание, не позволяющее провести анализ. Данные представлены в виде средних значений соответствующих показателей (относительной интенсивности окраски BMAL1 или оценки CLOCK в баллах); погрешности представлены в виде ошибок средних ($M \pm m$).

При анализе данных использовали попарное сравнение относительного содержания белков в различных тканях у животных одной группы с помощью U-критерия Манна-Уитни; при оценке межгрупповых различий использовали апостериорный тест Тьюки.

Относительное содержание белка BMAL1

При окрашивании антителами к BMAL1 нормальной ткани легкого наблюдалось слабое окрашивание ядер и цитоплазмы альвеолоцитов, интенсивное окрашивание ядер и цитоплазмы ядер альвеолярных макрофагов и переменное окрашивание клеток бронхиального эпителия. В опухолевых клетках окрашивание цитоплазмы было слабым или умеренным, ядер – интенсивным. С помощью оценки оптической плотности срезов была проведена относительная количественная оценка содержания данного белка в опухолевой и нормальной ткани легкого.



А

Б

Рисунок 14 – Микрофотографии опухолей легкого, индуцированных уретаном у мышей SHR, окрашенных антителами к BMAL1 (×400). А – аденома, Б – аденокарцинома

Значения интенсивности окрашивания нормальной ткани легкого принимали за единицу и вычисляли относительный уровень содержания белка в опухолевых тканях. Для опухолевых тканей в данном опыте была получена интенсивность окраски, в 2,5 – 3 раза превышавшая интенсивность окрашивания нормального легочного эпителия.

Как видно на рисунке (Рисунок 15), во всех опытных группах содержание белка BMAL1 было выше в аденомах (1,13-2,08) и аденокарциномах (2,58-2,98), чем в нормальной ткани легкого (1).

Статистически значимые различия в относительном содержании белка BMAL1 между аденомами и аденокарциномами наблюдались в группах LD (в 2 раза, $p=0,0048$, U-критерий Манна-Уитни) и LDMT (в 2,4 раза, $p=0,0437$, U-критерий Манна-Уитни).

Относительное содержание белка BMAL1 в пределах одной ткани не различалось в различных группах (тест Тьюки).

Таким образом, у животных в данном опыте количество белка BMAL1 выше в аденомах, чем в нормальной ткани легкого, и в аденокарциномах по сравнению с аденомами. Эти различия достигают уровня статистической значимости при содержании мышей в условиях стандартного освещения.

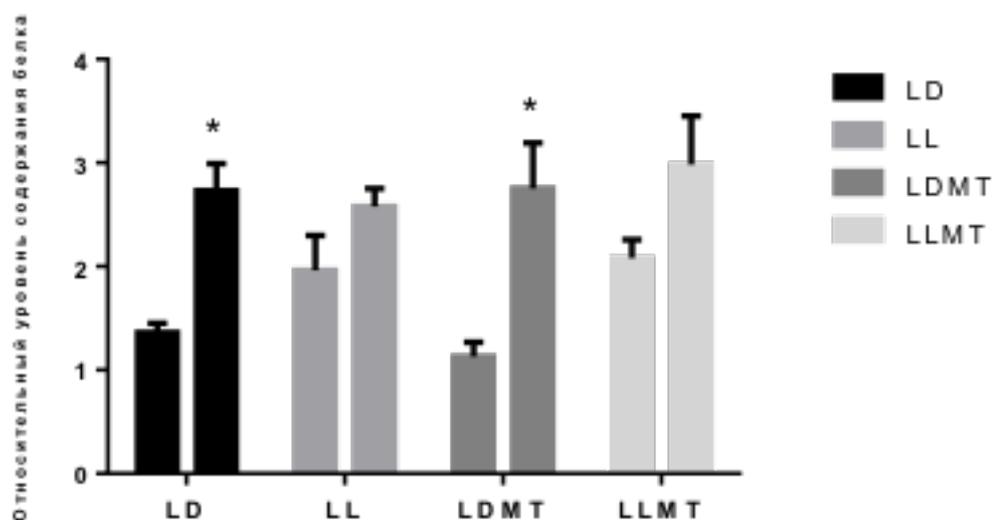


Рисунок 15 - Интенсивность окрашивания аденом (левый столбец) и аденокарцином (правый столбец) легкого, индуцированных уретаном у мышей SHR, антителами к BMAL1 ($M \pm m$)

* $p \leq 0,05$ при сравнении с аденомами в той же группе, U-критерий Манна-Уитни

Относительное содержание белка CLOCK

На срезах, окрашенных антителами к CLOCK, наблюдалось слабое фоновое окрашивание нормальной ткани, окрашивание опухолевой ткани было более интенсивным, но неравномерным. Окрашивание ядер было вариабельным (Рисунок 16).

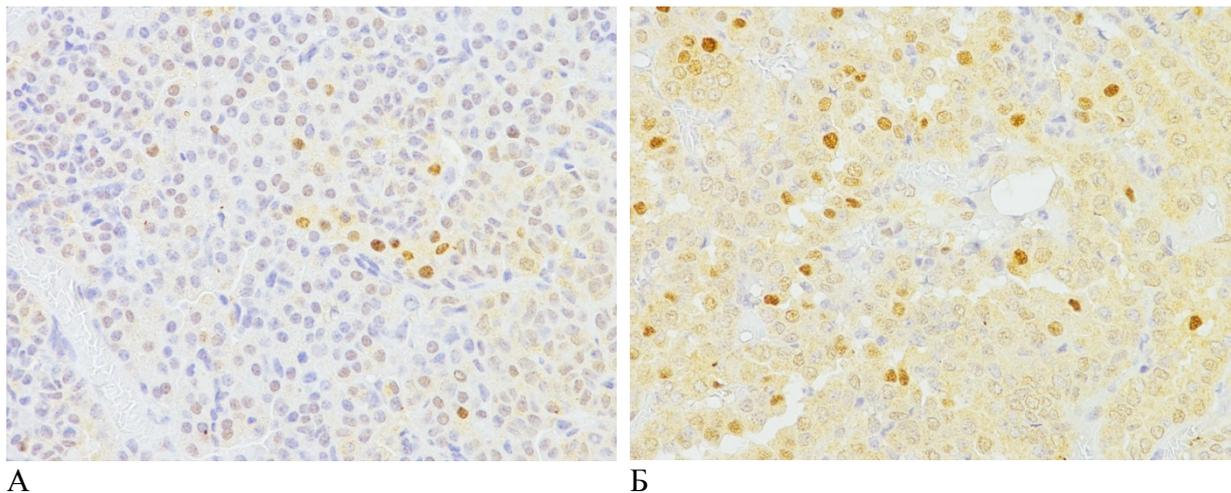


Рисунок 16 – Микрофотографии опухолей легкого, индуцированных уретаном у мышей SHR, окрашенных антителами к CLOCK (×400). А – аденома, Б – аденокарцинома

Оценку проводили полуколичественным методом с использованием 3-балльной шкалы (1 балл – слабое окрашивание, 2 балла – умеренное, 3 балла - интенсивное). Оценивали каждую опухоль легких целиком при увеличении ×200. Далее сравнивалась средняя интенсивность окрашивания доброкачественных и злокачественных опухолей. Данные представлены на рисунке (Рисунок 17).

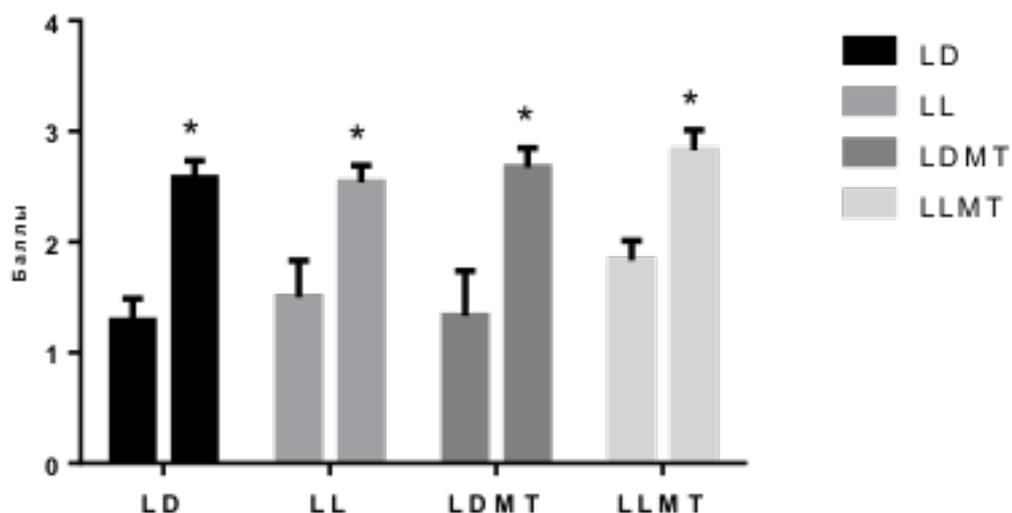


Рисунок 17 – Интенсивность окрашивания аденом (левый столбец) и аденокарцином (правый столбец) легкого, индуцированных уретаном у мышей SHR, антителами к CLOCK ($M \pm m$)

* $p \leq 0,05$ при сравнении с аденомами в той же группе, U-критерий Манна-Уитни

В данном эксперименте не обнаружено статистически значимых различий между опытными группами (тест Тьюки). В то же время, интенсивность окрашивания аденокарцином во всех группах была статистически значимо выше, чем в аденомах. Так, в группе LD интенсивность окрашивания аденом составляла в среднем $1,29 \pm 0,20$ баллов, аденокарцином – $2,58 \pm 0,16$ баллов ($p=0,0001$, U-критерий Манна-Уитни). Для группы LL эти значения составили $1,50 \pm 0,33$ и $2,54 \pm 0,15$, соответственно ($p=0,0053$, U-критерий Манна-Уитни). Введение мелатонина не влияло на данный показатель: так, для группы LDMT получены значения в $1,33 \pm 0,41$ балла для аденом и $2,67 \pm 0,18$ для аденокарцином ($p=0,0018$, U-критерий Манна-Уитни), а для группы LLMT – $1,83 \pm 0,18$ и $2,83 \pm 0,18$, соответственно ($p=0,0085$, U-критерий Манна-Уитни).

Таким образом, в злокачественных опухолях легкого по сравнению с доброкачественными новообразованиями повышается уровень содержания белков-активаторов транскрипции BMAL1 и CLOCK.

3.5. Содержание часовых белков в опухолях кожи, индуцированных ДМБА и ТФА у мышей

Было проведено иммуногистохимическое окрашивание образцов кожи и папиллом кожи антителами к часовым белкам BMAL1, CLOCK и CRY1. Оценку окрашивания проводили путем подсчета доли позитивно окрашенных ядер базального слоя кожи и папиллом. Окрашивание антителами к PER2 не проводили, поскольку наблюдалось неспецифическая реакция антител на образцах кожи. Результаты подсчета позитивно окрашенных ядер клеток базального слоя эпидермиса приведены на графиках (Рисунок 19, Рисунок 21, Рисунок 23). На рисунках представлены средние значения (содержание окрашенных ядер, выраженное в процентах от всех ядер); погрешности представлены в виде стандартных отклонений. В тексте значения приведены в формате $M \pm m$ (ошибка среднего). При анализе данных использовали попарное сравнение относительного содержания белков в различных тканях у животных одной группы с помощью t-критерия Стьюдента; при оценке межгрупповых различий в пределах одной ткани использовали апостериорный тест Тьюки.

Относительное содержание белка BMAL1

В эпидермисе наблюдалось ядерное окрашивание антителами к BMAL1 в базальном и шиповатом слоях кожи, в опухолях также выявлялось большое число позитивно окрашенных ядер (Рисунок 18).

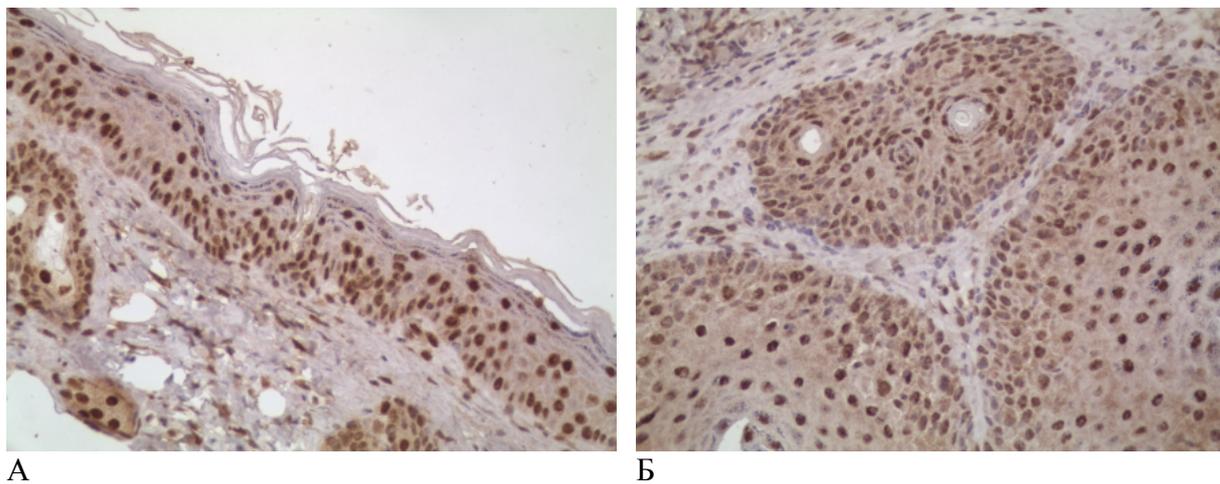


Рисунок 18 – Окрашивание антителами к VMAL1 кожи мышей SHR с места аппликации ДМБА и ТФА (А) и папилломы кожи (Б) ($\times 400$)

Процент ядер базального слоя, позитивно окрашенных антителами к VMAL1 (ПЯ), во всех группах был снижен в коже с места введения канцерогена по сравнению с соответствующим контролем (Рисунок 19). Статистически значимые различия получены для процента ПЯ в коже животных контрольной группы ($81,1 \pm 1,4$) и коже с зоны аппликации канцерогена от животных групп LD ($62,2 \pm 2,1$, $p=0,00006$, тест Тьюки) и LL ($69,2 \pm 1,9$, $p=0,0085$, тест Тьюки).

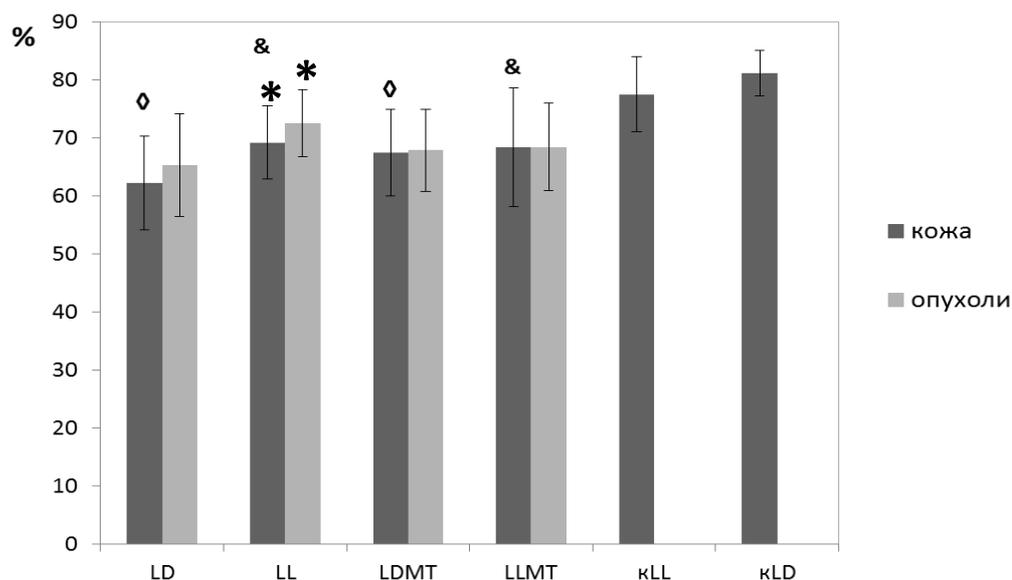


Рисунок 19 - Доля ядер базального слоя эпидермиса кожи мышей, экспрессирующих BMAL1 в опыте с ДМБА и ТФА индуцированным канцерогенезом кожи, M(SD)

- * $p \leq 0,05$ при сравнении с LD, тест Тьюки;
- # $p \leq 0,05$ при сравнении с LL, тест Тьюки;
- $p \leq 0,05$ при сравнении с LDMT, тест Тьюки;
- & $p \leq 0,05$ при сравнении с kLL, тест Тьюки;
- ◇ $p \leq 0,05$ при сравнении с kLD, тест Тьюки

Процент позитивно окрашенных ядер в коже с места аппликации канцерогена у животных в группе стандартного освещения (LD) составил $62,2 \pm 2,1$, а в группе постоянного освещения (LL) значение данного показателя было статистически значимо выше – $69,2 \pm 2,0$ ($p=0,025$, тест Тьюки). Аналогично, процент ПЯ в опухолях животных группы LD был статистически значимо ниже, чем в опухолях животных группы LL: получены значения $65,3 \pm 2,3$ и $72,5 \pm 1,8$ для групп LD и LL, соответственно ($p=0,024$, тест Тьюки). При этом между группами LDMT и LLMT значимых различий по данному показателю выявлено не было.

Значимых различий в относительном содержании белка BMAL1 между кожей с места аппликации канцерогена и опухолями кожи в данном эксперименте выявлено не было (t-тест Стьюдента).

Относительное содержание белка CLOCK

В коже ядерное окрашивание антителами к CLOCK наблюдалось только в базальном слое, при этом в папилломах иммунопозитивные ядра обнаруживались в нескольких слоях клеток, прилежащих к базальной мембране (Рисунок 20).

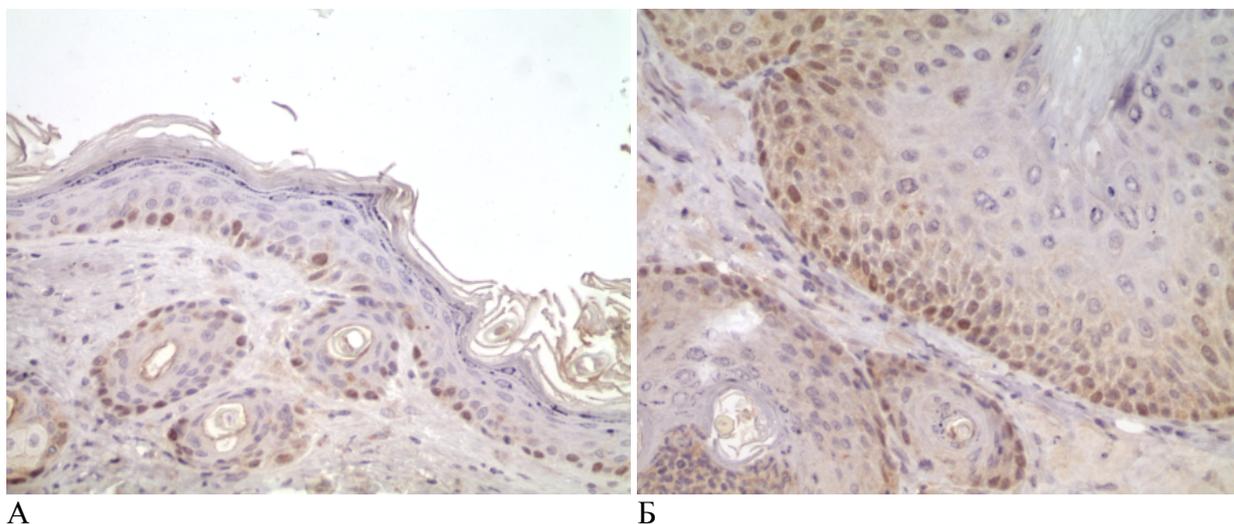


Рисунок 20 – Окрашивание кожи мышей SHR с места аппликации ДМБА и ТФА (А) и папилломы кожи (Б) антителами к CLOCK ($\times 400$)

При анализе окрашивания антителами к CLOCK не было выявлено значимых различий между образцами кожи от животных из контрольных и опытных групп (Рисунок 21). Процент позитивно окрашенных ядер в опухолях составил $44,1 \pm 4,2$ в группе LD, а в группе постоянного освещения LL достигал значений $62,8 \pm 2,2$ и был статистически значимо выше ($p=0,024$, тест Тьюки). В группах, получавших мелатонин, значения данного показателя были $64,0 \pm 2,6$ и $71,1 \pm 1,3$ в группах LDMT и LLMT, соответственно, что статистически значимо превышало значения у животных, не получавших мелатонин ($p=0,002$; $p=0,004$ для различий между LDMT и LD; LLMT и LL, соответственно, тест Тьюки).

В группах LDMT, LL, LLMT были обнаружены статистически значимые различия между процентом окрашенных ядер в образцах опухолей и кожи в той же группе, причем во всех случаях интенсивнее

были окрашены опухоли (Оп), чем кожа (К). Так, для группы LDMT были получены значения $Оп=64,0\pm 2,6$ и $К=50,2\pm 1,8$ ($p=0,0003$, t-тест Стьюдента), для группы LL – $Оп=62,8\pm 2,2$ и $К=53,0\pm 3,4$ ($p=0,0106$, t-тест Стьюдента) и для группы LLMT – $Оп=71,1\pm 1,3$ и $К=51,6\pm 1,9$ ($p<0,000001$, t-тест Стьюдента).

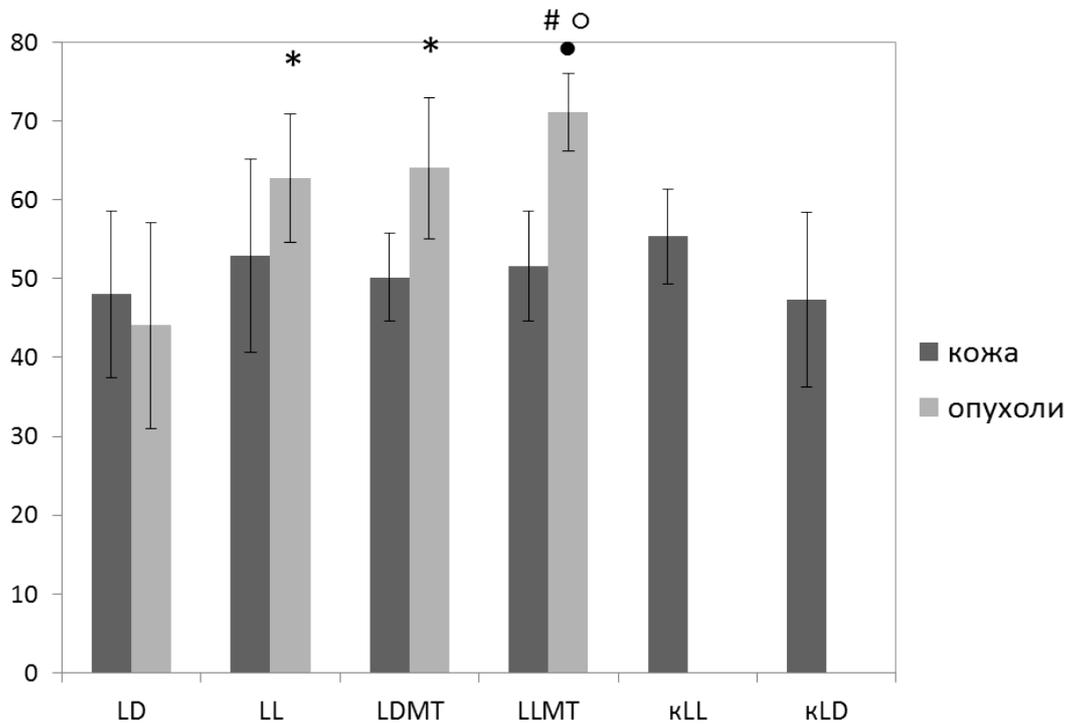


Рисунок 21 – Доля ядер базального слоя эпидермиса кожи мышей, экспрессирующих CLOCK в опыте с ДМБА и ТФА индуцированным канцерогенезом кожи, M(SD)

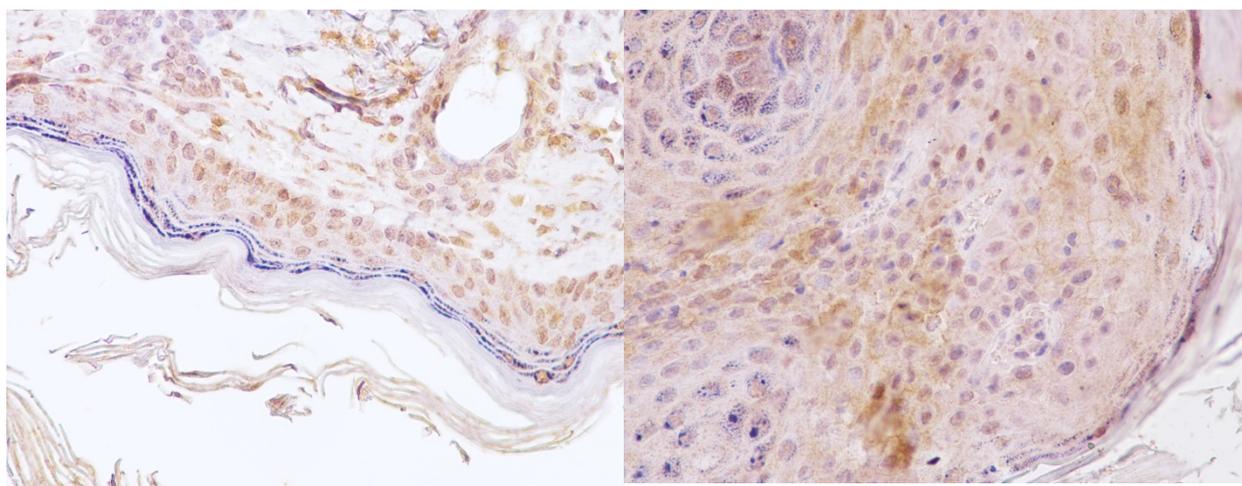
* - $p\leq 0,05$ при сравнении тканей в той же группе, t-тест Стьюдента;

- $p\leq 0,05$ при сравнении с LL, тест Тьюки;

o - $p\leq 0,05$ при сравнении с LDMT, тест Тьюки

Относительно содержание белка CRY1

Позитивное окрашивание антителами к CRY1 наблюдалось в небольшой части ядер эпидермиса (Рисунок 22).



А

Б

Рисунок 22 – Окрашивание кожи мышей SHR с места аппликации ДМБА и ТФА (А) и папилломы кожи (Б) антителами к CRY1 ($\times 400$)

При оценке CRY1 (Рисунок 23) было обнаружено, что во всех опытных группах процент позитивно окрашенных ядер статистически значимо снижался по сравнению с контролем при соответствующем режиме освещения. Так, в группах стандартного освещения LD и LDMT значения данного показателя для кожи составили $25,0 \pm 0,9$ и $29,3 \pm 1,3$, соответственно, в то время как у контрольных животных группы kLD были получены значения $41,0 \pm 2,1$ ($p=0,0002$; $p=0,001$ при сравнении групп LD и LDMT, соответственно, с группой контроля, тест Тьюки). В коже животных, содержащихся при постоянном освещении, обнаружены следующие значения: $28,3 \pm 0,8$ (LL), $24,4 \pm 0,8$ (LLMT) и $39,0 \pm 1,6$ (kLL); различия между животными, получавшими и не получавшими канцероген, статистически значимы ($p=0,001$ и $p=0,004$ при сравнении групп LL и LLMT, соответственно, с контролем, тест Тьюки).

Помимо этого, в образцах кожи с места аппликации канцерогена в группе LLMT наблюдалось значимое снижение данного показателя по сравнению с LDMT и LL ($p=0,0038$ и $p=0,0024$, соответственно, тест Тьюки).

Опухоли животных всех опытных групп характеризовались сниженным на 27-34% содержанием CRY1 по сравнению с образцами кожи с места аппликации канцерогена у животных той же группы (Рисунок 22) ($p < 0,005$ для групп, получавших мелатонин, и $p < 0,001$ для групп, не получавших мелатонин, t-тест Стьюдента).

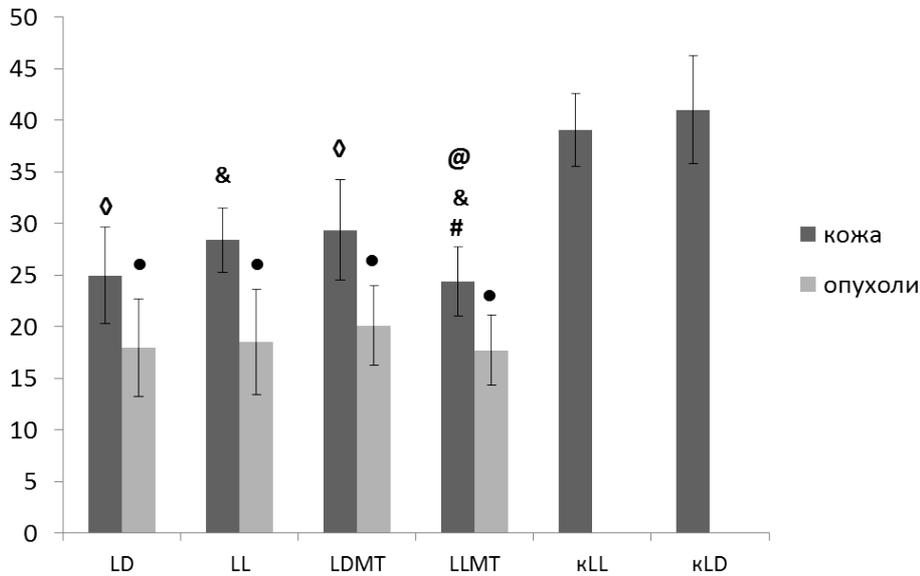


Рисунок 23 – Доля ядер базального слоя эпидермиса кожи мышей, экспрессирующих CRY1 в опыте с ДМБА и ТФА индуцированным канцерогенезом кожи, M(SD)

- * $p \leq 0,05$ при сравнении с LD, тест Тьюки;
- # $p \leq 0,05$ при сравнении с LL, тест Тьюки;
- $p \leq 0,05$ при сравнении с LDMT, тест Тьюки;
- & $p \leq 0,05$ при сравнении с kLL, тест Тьюки;
- ◇ $p \leq 0,05$ при сравнении с kLD, тест Тьюки;
- @ $p \leq 0,05$ при сравнении с LDMT, тест Тьюки;
- - $p \leq 0,05$ при сравнении тканей в той же группе, t-тест Стьюдента

Таким образом, в коже, подвергнутой воздействию ДМБА и ТФА, а также в папилломах кожи уровень содержания часовых белков BMAL1 и CRY1 снижается по сравнению с кожей мышей контрольной группы. В случае белка CLOCK наблюдается повышение уровня его содержания в опухолях кожи.

3.6. Суточные изменения экспрессии часовых генов и белков в нормальных тканях и спонтанных опухолях молочной железы мышей линии FBV и линии FBV, трансгенных по HER2/neu

Анализ экспрессии часовых генов Bmal1, Clock, Cry1

Был проведен анализ экспрессии генов Bmal1, Clock, Cry1 методом RT-PCR в образцах мозга, печени, опухолевой и нормальной ткани молочной железы, взятых в 08:00 (ZT0), 14:00 (ZT6), 20:00 (ZT12) и 02:00 (ZT18). Данные представлены в виде средних значений; погрешности представлены в виде ошибок среднего ($M \pm m$).

При анализе данных использовали попарное сравнение относительного уровня экспрессии генов в различных временных точках у животных одной группы с помощью U-критерия Манна-Уитни; при оценке межгрупповых различий использовали апостериорный тест Тьюки.

В образцах мозга, содержащих СХЯ (Рисунок 24, Рисунок 25, Рисунок 26), у мышей дикого типа наблюдался выраженный пик экспрессии Bmal1 ($E = 0,137 \pm 0,034$), Clock ($E = 1,715 \pm 0,58$), и Cry1 ($E = 0,211 \pm 0,069$) в середине темновой фазы (ZT18). У 6-месячных мышей, трансгенных по HER2/neu, значение уровня экспрессии в данной временной точке оказалось достоверно снижено: $E_{Bmal1} = 0,016 \pm 0,004$ ($p < 0,0001$, тест Тьюки), $E_{Clock} = 0,25 \pm 0,11$ ($p = 0,0009$, тест Тьюки), $E_{Cry1} = 0,16 \pm 0,005$ ($p = 0,033$, тест Тьюки). У мышей группы HER2/neu 9 месяцев экспрессия часовых генов в СХЯ характеризовалась большим разбросом данных, чем в группе HER2/neu 6 месяцев, и статистически значимые различия с FVB/N в точке ZT18 выявлены только для гена Clock ($E_{Clock} = 0,65 \pm 0,40$, $p = 0,029$, тест Тьюки). В случае гена Bmal1 в точке ZT18 получены значимые различия между группами HER2/neu 6 месяцев ($E_{Bmal1} = 0,016 \pm 0,004$) и HER2/neu 9 месяцев ($E_{Bmal1} = 0,079 \pm 0,03$, $p = 0,04$, тест Тьюки). В СХЯ у мышей всех

групп значение уровня экспрессии часовых генов в точках ZT0, ZT6, ZT12, было низким, и значимых различий между группами не выявлено.

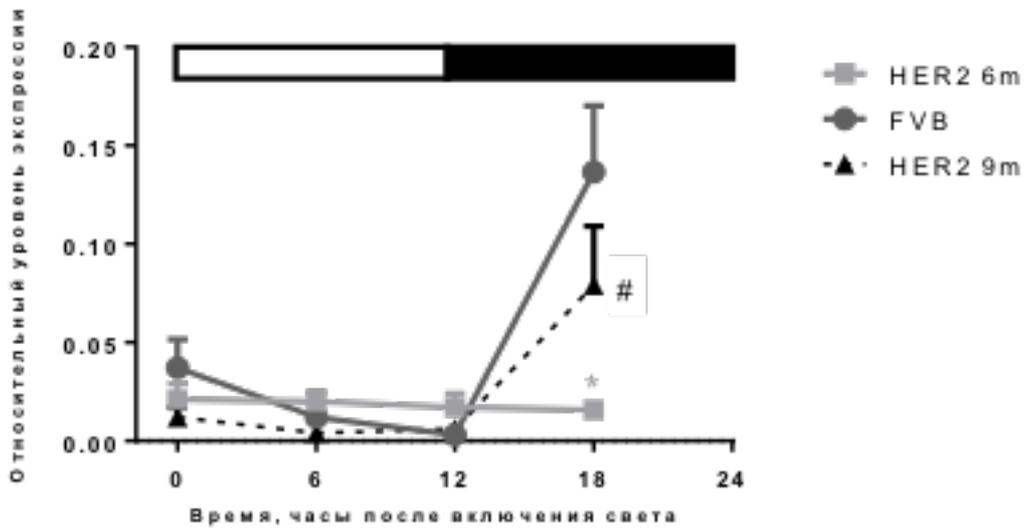


Рисунок 24 - Суточные изменения экспрессии гена Bmal1 в СХЯ у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu

* - $p \leq 0,05$ при сравнении с FVB/N, тест Тьюки

- $p \leq 0,05$ при сравнении с HER2/neu 6 месяцев, тест Тьюки

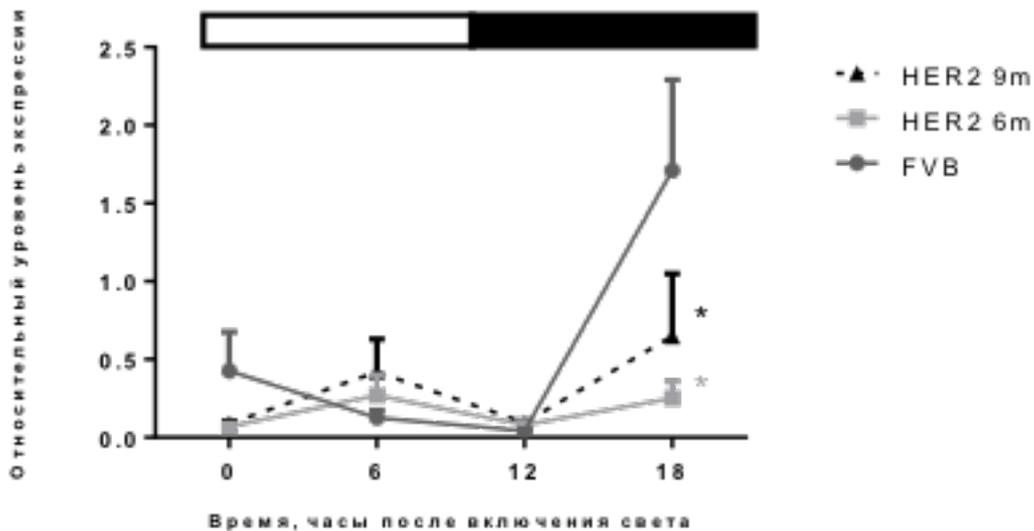


Рисунок 25 - Суточные изменения экспрессии гена Clock в СХЯ у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu

* - $p \leq 0,05$ при сравнении с FVB/N, тест Тьюки

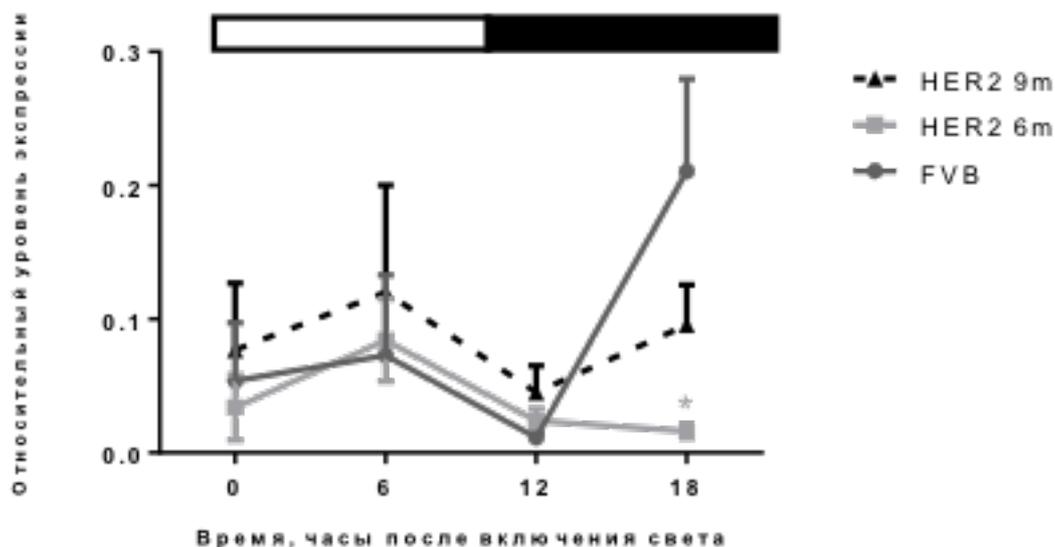


Рисунок 26 - Суточные изменения экспрессии гена *Cry1* в СХЯ у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по *HER2/neu*

* $-p \leq 0,05$ при сравнении с FVB/N, тест Тьюки

В печени у мышей всех групп значение уровня экспрессии часовых генов, как и в СХЯ, в точках ZT0, ZT6, ZT12, было низким, и различий между группами не наблюдалось. У мышей FVB/N значение этого показателя составило: $E_{Bmal1} = 0,038 \pm 0,015$, $E_{Clock} = 1,01 \pm 0,049$, $E_{Cry1} = 0,188 \pm 0,07$.

Статистически значимое снижение экспрессии часовых генов *Clock* и *Cry1* в точке ZT18 наблюдалось в печени у мышей, трансгенных по *HER2/neu*, 6 месяцев по сравнению с FVB/N: $E_{Clock} = 0,07 \pm 0,02$ ($p < 0,0001$, тест Тьюки), $E_{Cry1} = 0,016 \pm 0,004$ ($p = 0,0002$, тест Тьюки).

У мышей *HER2/neu*, 9 месяцев выявлено снижение экспрессии гена *Clock* в точке ZT18 по сравнению с FVB/N: $E_{Clock} = 0,41 \pm 0,30$ ($p = 0,0067$, тест Тьюки).

В случае гена *Bmal1* в точке ZT18 не было выявлено различий между группами FVB/N ($E_{Bmal1} = 0,038 \pm 0,015$) и *HER2/neu* 9 месяцев ($E_{Bmal1} = 0,0096 \pm 0,004$). При этом значение, полученное для мышей *HER2/neu*, 9 месяцев, значимо превышало значение уровня экспрессии в

других группах: $E_{V_{mal1}}=0,247\pm 0,15$ ($p=0,021$ по сравнению с FVB/N, $p=0,006$ по сравнению с HER2/neu 6 месяцев).

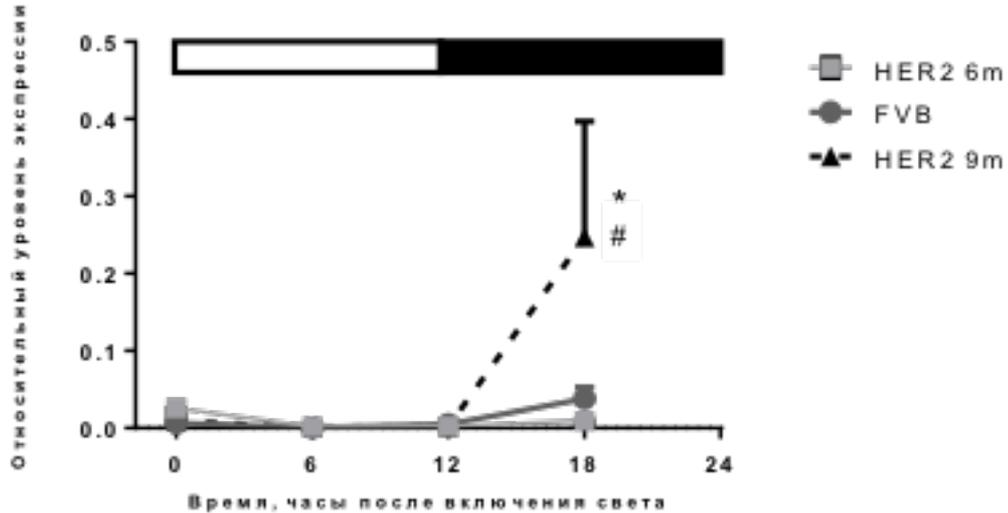


Рисунок 27 - Суточные изменения экспрессии гена Vmal1 в печени у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu

* - $p\leq 0,05$ при сравнении с HER2/neu 6 месяцев, тест Тьюки

- $p\leq 0,05$ при сравнении с HER2/neu 9 месяцев, тест Тьюки

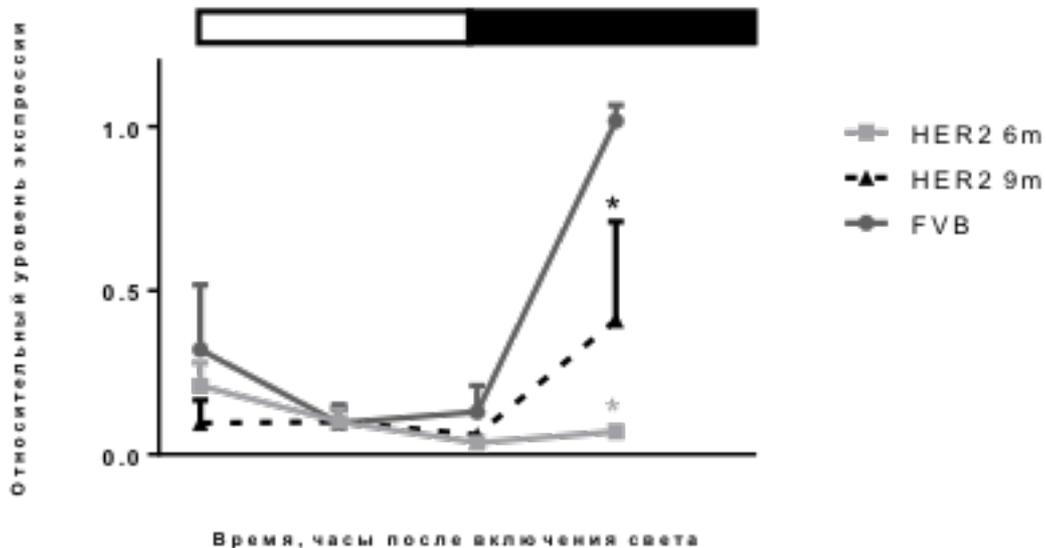


Рисунок 28 – Суточные изменения экспрессии гена Clock в печени у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu

* - $p\leq 0,05$ при сравнении с FVB/N, тест Тьюки

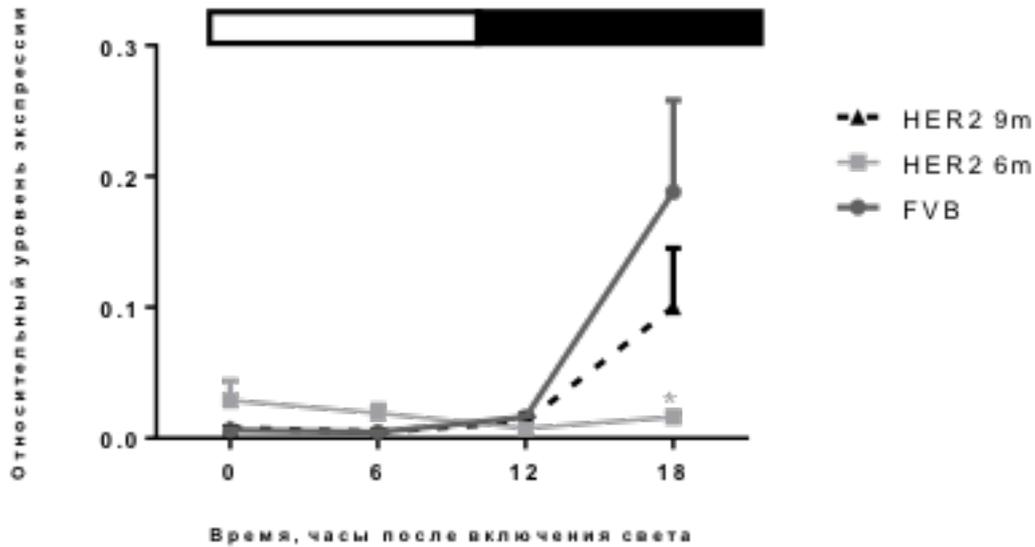


Рисунок 29 - Суточные изменения экспрессии гена *Cry1* в печени у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по *HER2/neu*

* $-p \leq 0,05$ при сравнении с FVB/N, тест Тьюки

В образцах ткани молочной железы статистически значимых различий в случае *Vm11* между группами выявлено не было. Причиной был относительно низкий уровень экспрессии и большой разброс данных (Рисунок 30)

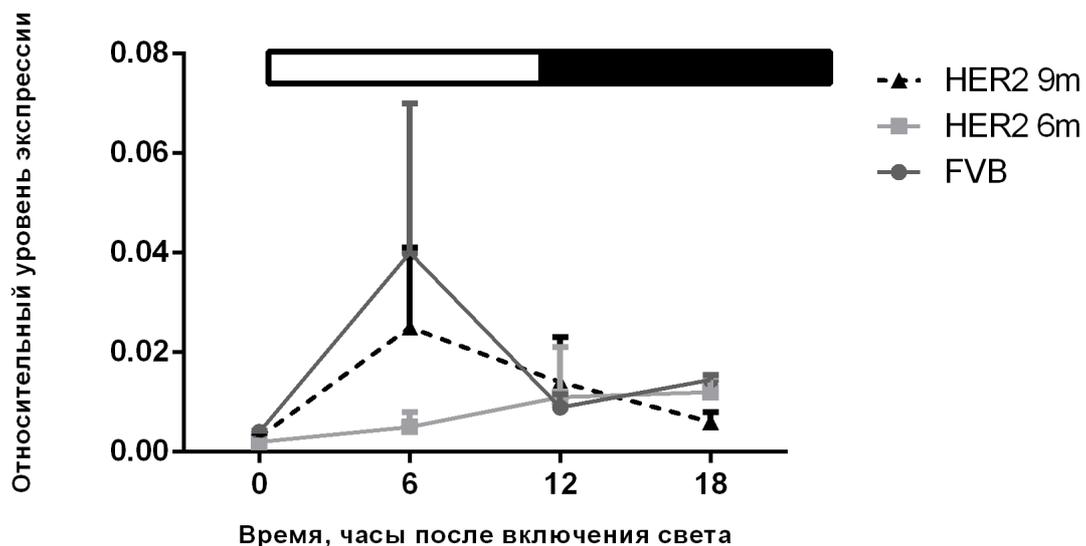


Рисунок 30 - Суточные изменения экспрессии гена *Vm11* в молочной железе у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по *HER2/neu*

Уровень экспрессии гена *Clock* в ткани молочной железы мышей FVB/N был выше, чем в обеих группах мышей HER2/neu в точках ZT6 и ZT18, однако различия достигали уровня статистической значимости только в точке ZT18 ($E_{\text{Clock}}=2,78\pm 1,71$, $p=0,018$ по сравнению с HER2/neu 6 месяцев, $p=0,015$ - с HER2/neu 9 месяцев, тест Тьюки, Рисунок 31).

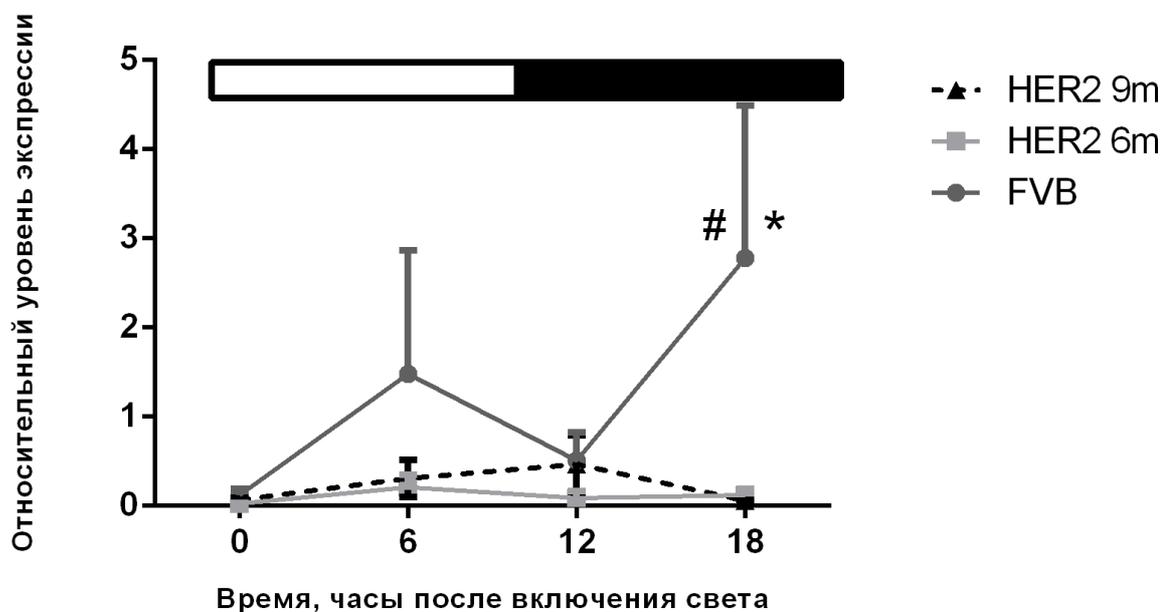


Рисунок 31 – Суточные изменения экспрессии гена *Clock* в молочной железе у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu

* - $p \leq 0,05$ при сравнении с HER2/neu 6 месяцев, тест Тьюки

- $p \leq 0,05$ при сравнении с HER2/neu 9 месяцев, тест Тьюки

Уровень экспрессии гена *Cry1* в ткани молочной железы мышей FVB/N был выше, чем у мышей HER2/neu в точке ZT6 и составил $0,473\pm 0,30$ ($p=0,023$ по сравнению с HER2/neu 6 месяцев, $p=0,029$ - с HER2/neu 9 месяцев, тест Тьюки, Рисунок 32).

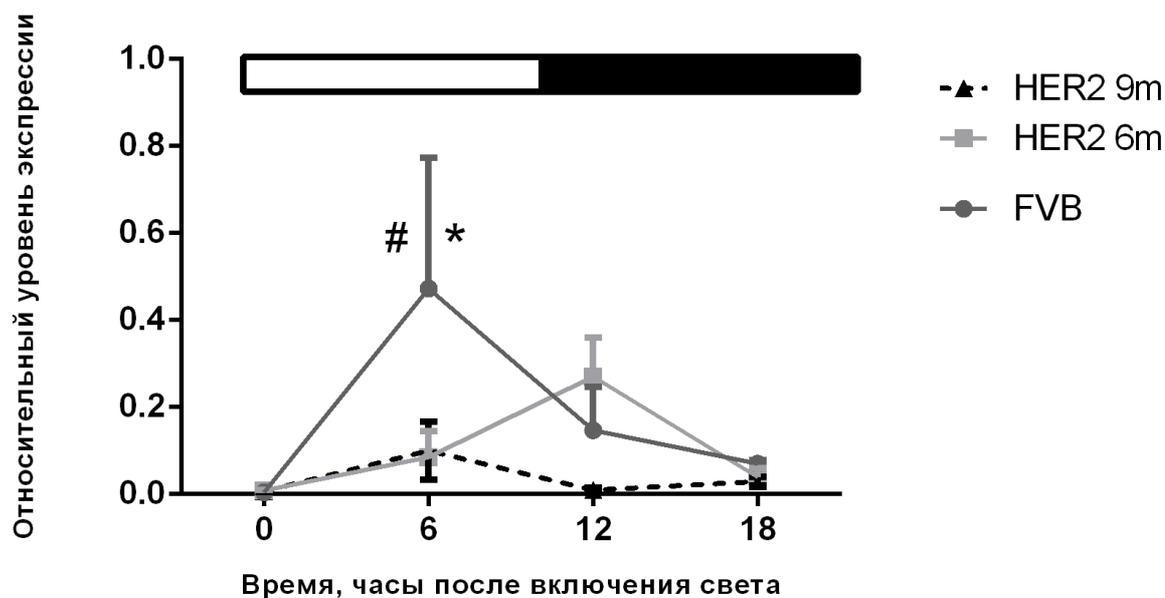


Рисунок 32 - Суточные изменения экспрессии гена *Cry1* в молочной железе у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по *HER2/neu*

* - $p \leq 0,05$ при сравнении с *HER2/neu* 6 месяцев, тест Тьюки

- $p \leq 0,05$ при сравнении с *HER2/neu* 9 месяцев, тест Тьюки

Анализ экспрессии генов *Bmal1*, *Clock* и *Cry1b* образцах опухолей молочной железы мышей *HER2/neu* показал, что эти гены в опухолевой ткани имеют относительно низкий уровень экспрессии, и его суточные колебания не наблюдаются (Рисунок 33, Рисунок 34, Рисунок 35).

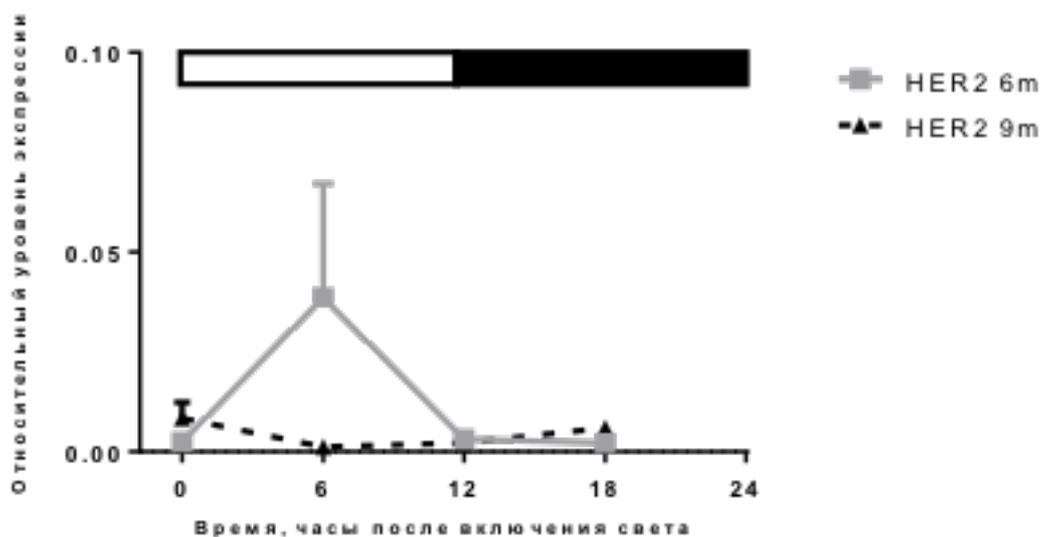


Рисунок 33 - Суточные изменения экспрессии гена *Bmal1* в опухолях молочной железы мышей FVB/N, трансгенных по *HER2/neu*

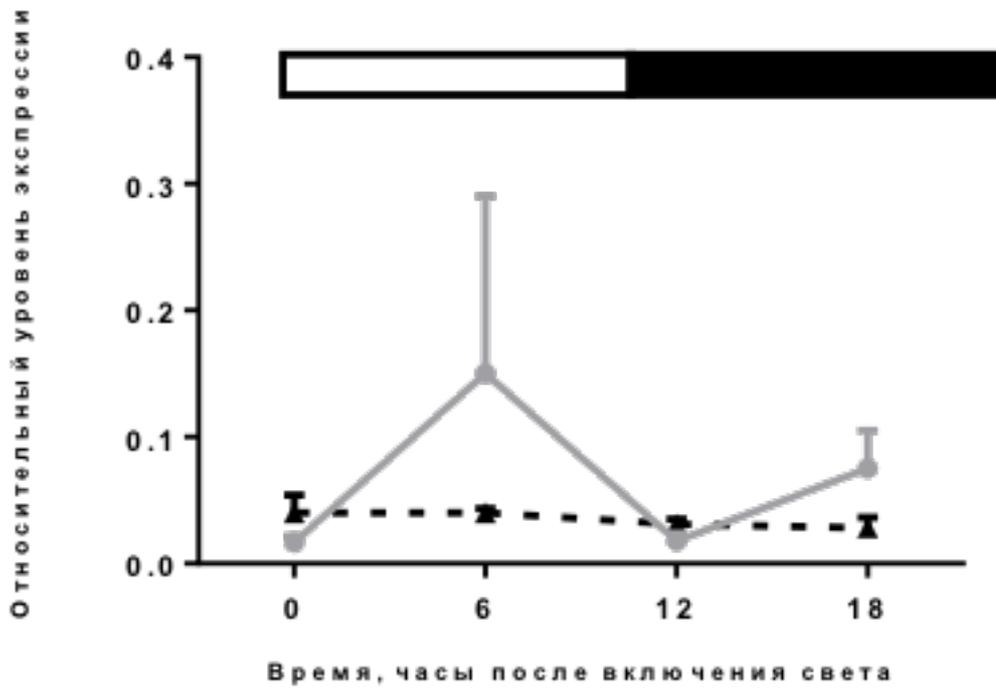


Рисунок 34 - Суточные изменения экспрессии гена Clock в опухолях молочной железы мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu

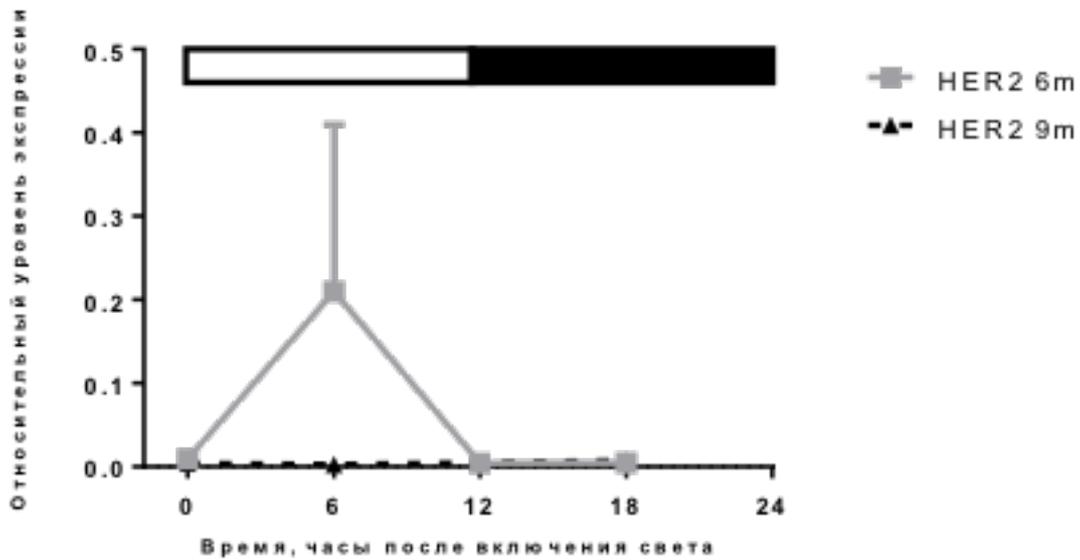
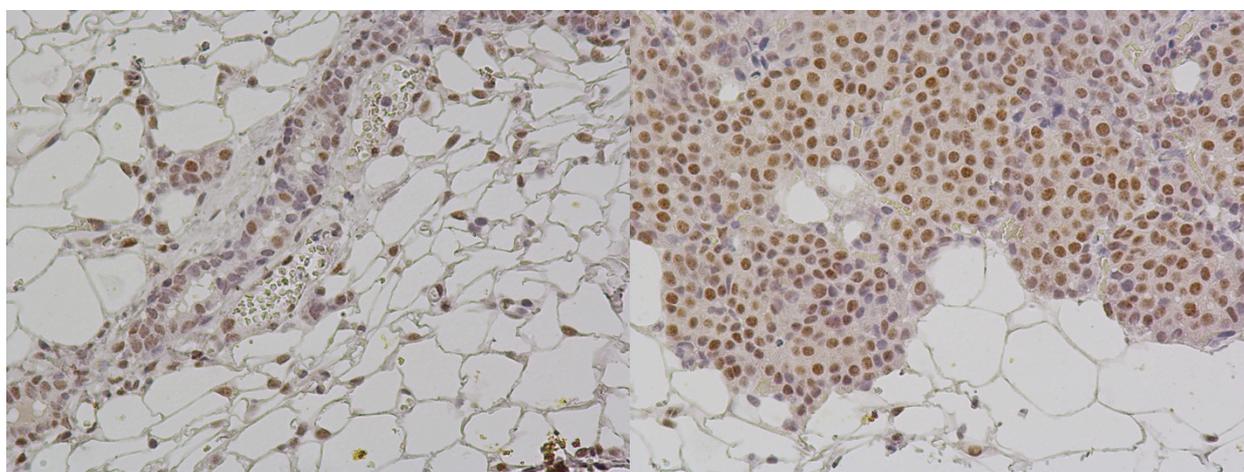


Рисунок 35 - Суточные изменения экспрессии гена Cry1 в опухолях молочной железы мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu

Оценка содержания белков BMAL1 и CLOCK

На образцах опухолевой и нормальной ткани молочной железы мышей, взятых в разное время суток, была проведена оценка интенсивности специфического окрашивания ДАБ с помощью программы ImageJ. Суточной динамики содержания данного белка выявлено не было ни в нормальной, ни в опухолевой ткани, поэтому данные от всех временных точек для дальнейшего анализа были объединены в пределах групп. Интенсивность окрашивания статистически значимо не различалась между тканью МЖ мышей линии FBV ($1,26 \pm 0,02$), и трансгенных мышей ($1,23 \pm 0,02$). При этом у мышей, трансгенных по HER2/neu различия между тканью и опухолями МЖ носили значимый характер, в опухолях интенсивность окрашивания в относительных единицах составляла $1,30 \pm 0,02$ ($p=0,0002$, t-тест Стьюдента).



А

Б

Рисунок 36 - Микрофотографии нормальной и опухолевой ткани молочной железы мышей, трансгенных по HER2/neu, окрашенных антителами к BMAL1 (x400). А – проток молочной железы, Б – аденокарцинома молочной железы (x400)

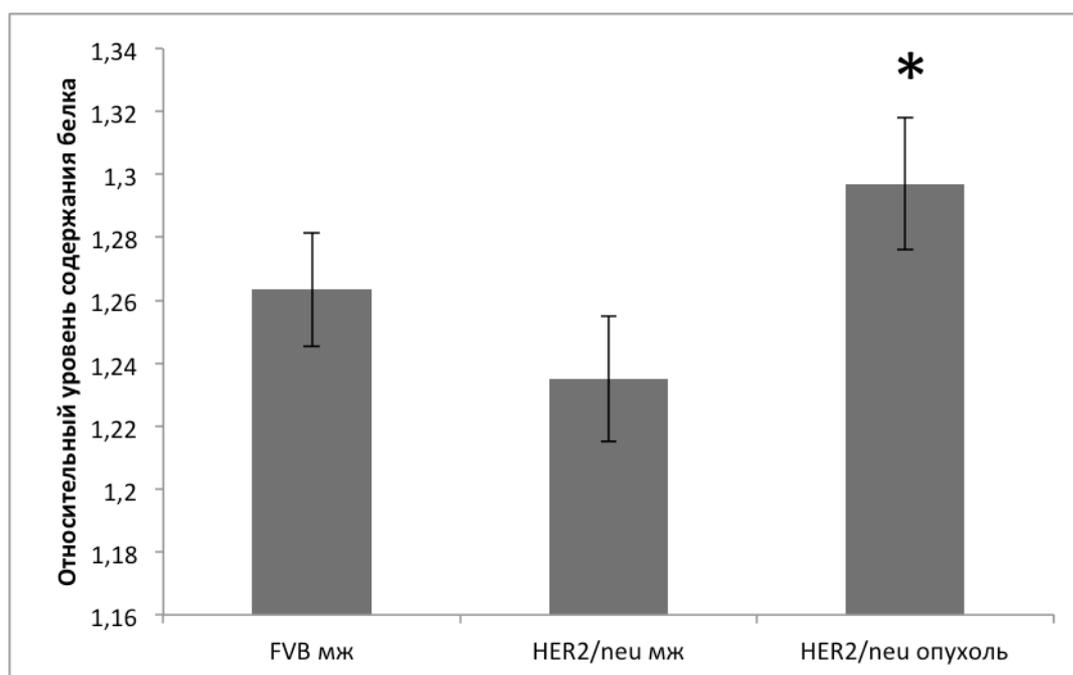


Рисунок 37 – Относительный уровень содержания белка VMAL1 в молочной железе и опухолях молочной железы мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu

* - $p=0,0002$ при сравнении с тканью молочной железы мышей HER2/neu, t-тест Стьюдента

При окрашивании антителами к белку CLOCK протоков и опухолей молочной железы мышей, трансгенных по HER2/neu, наблюдалось ядерное окрашивание части клеток. В образцах опухолевой и нормальной ткани молочной железы оценивали процент иммунопозитивных ядер (ПЯ) в эпителии протоков и опухолевых клетках. В протоках молочной железы в точке ZT12 этот показатель составлял $9,31 \pm 0,89\%$ и был статистически значимо выше, чем в точке ZT 18 ($4,08 \pm 0,71\%$, $p=0,0012$, тест Тьюки). В опухолях не было выявлено значимых различий ПЯ между различными временными точками. При этом в опухолях во всех временных точках ПЯ был выше, чем в протоках: в опухолях и протоках в точке ZT0 значение данного показателя составило, соответственно $22,11 \pm 1,03\%$ и $5,21 \pm 1,44\%$ ($p < 0,0001$, U-критерий Манна-Уитни), в точке ZT6 – $23,8 \pm 1,88\%$ и $6,24 \pm 1,17\%$ ($p < 0,0001$, U-критерий Манна-Уитни), в точке ZT12 – $24,62 \pm 1,44\%$ и $9,31 \pm 0,89\%$ ($p < 0,0001$, U-критерий Манна-Уитни), в точке

ZT18 – $25,77 \pm 1,39\%$ и $4,08 \pm 0,71\%$ ($p < 0,0001$, U-критерий Манна-Уитни). Таким образом, в опухолях выявлено не только повышение уровня синтеза активатора транскрипции CLOCK, но и потеря суточных колебаний синтеза и/или деградации этого белка.

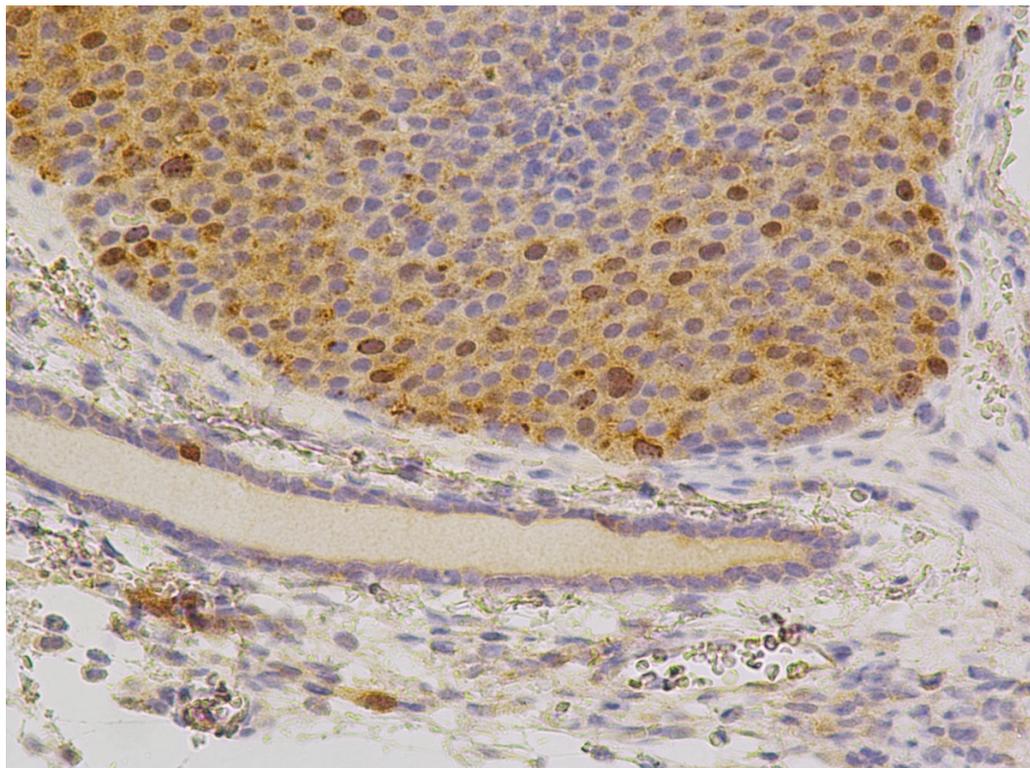


Рисунок 38 - Микрофотография нормальной и опухолевой ткани молочной железы мышей, трансгенных по HER2/neu, окрашенных антителами к CLOCK (x400)

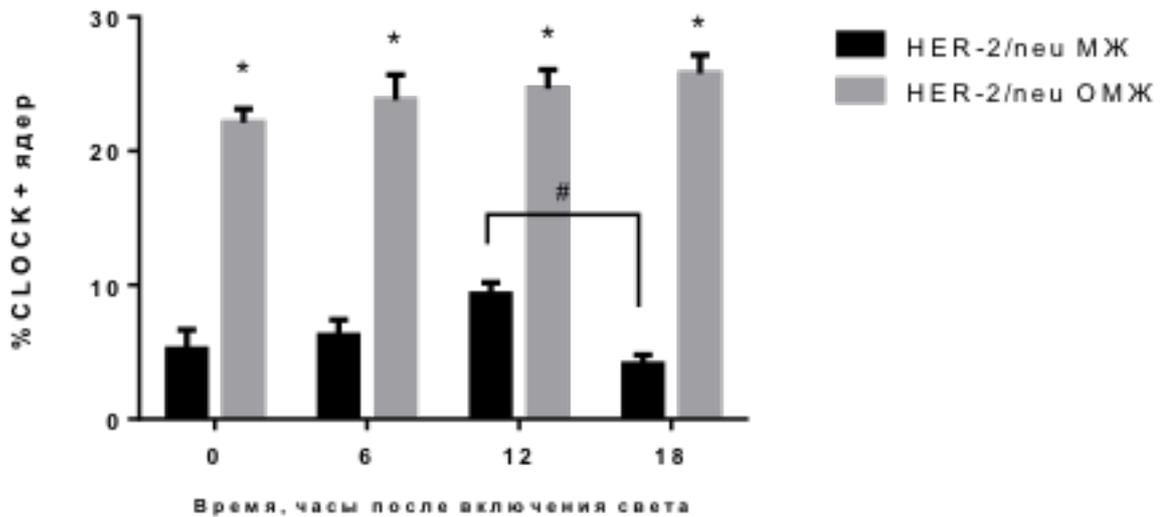


Рисунок 39 – Суточные изменения доли ядер, позитивно окрашенных антителами к CLOCK в молочной железе и опухолях молочной железы мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu

- $p=0,0012$, апостериорный тест Тьюки при сравнении между ZT12 и ZT18,

*- $p<0,0001$, U-критерий Манна-Уитни при сравнении с протоками молочной железы в той же временной точке

Оценка относительного содержания белков PER2 и CRY

В опухолях и эпителии молочной железы белковых продуктов генов PER2 и CRY выявлено не было. В случае PER2 специфическое окрашивание наблюдалось только в нейронах СХЯ мозга, причем только в середине темновой фазы суток (Рисунок 40).

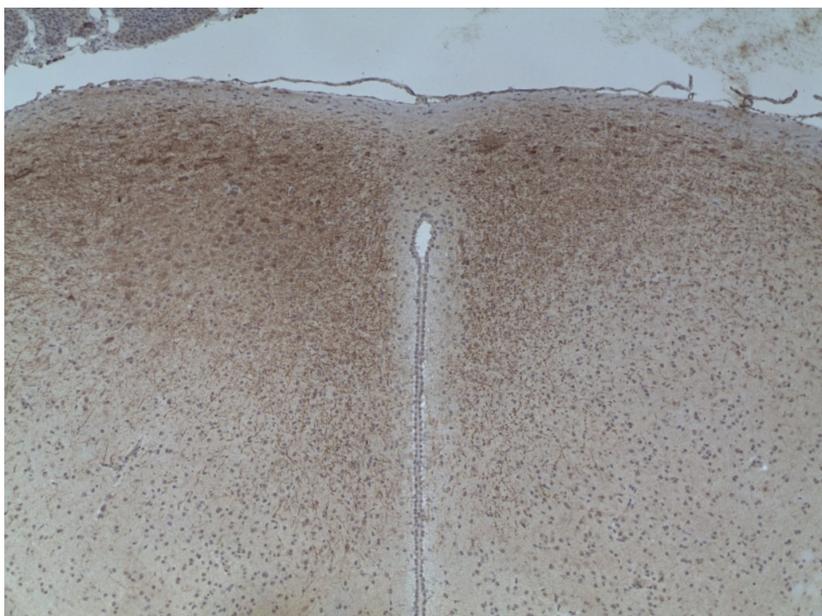


Рисунок 40 - Окрашивание СХЯ мыши линии FVB/N, трансгенной по HER2/neu, антителами к Per2 (группа 6 месяцев, ЦВ18) (×400).

3.7. Суточные изменения митотической активности спонтанных опухолей молочной железы мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu

Для оценки наличия или отсутствия суточной динамики пролиферации опухолей молочной железы был взят материал от животных, подвергнутых эвтаназии в разное время суток. На препаратах, окрашенных гематоксилином-эозином, подсчитывали индекс митотической активности опухолей (Таблица 13).

Таблица 13 – Митотический индекс в опухолях молочной железы мышей линии FVB/N, трансгенных по HER2/neu

№	Шифр группы	Время суток, час			
		14:00 (ZT6)	20:00 (ZT12)	02:00(ZT18)	08:00(ZT0)
1	HER-2/6м	1,35±0,06 *p<0,0001	1,41±0,13 *p<0,0001	0,73±0,06	1,29±0,07 *p<0,0001
2	HER-2/9м	1,41±0,08 #p=0,0063	1,28±0,11	1,01±0,06	1,38±0,08 #p=0,0128

*- p<0,05 по сравнению с FVB/N/6м ZT18,

- p<0,05 по сравнению с FVB/N/9м, ZT18

В группах мышей в 6 месяцев в опухолях наблюдался статистически значимый спад митотической активности в точке ZT18 по сравнению со всеми другими временными точками. В группах мышей в 9 месяцев также наблюдалось снижение индекса митотической активности в ZT18, но значимые различия наблюдались только между группами ZT6– ZT18 и ZT0– ZT18 (Рисунок 41).

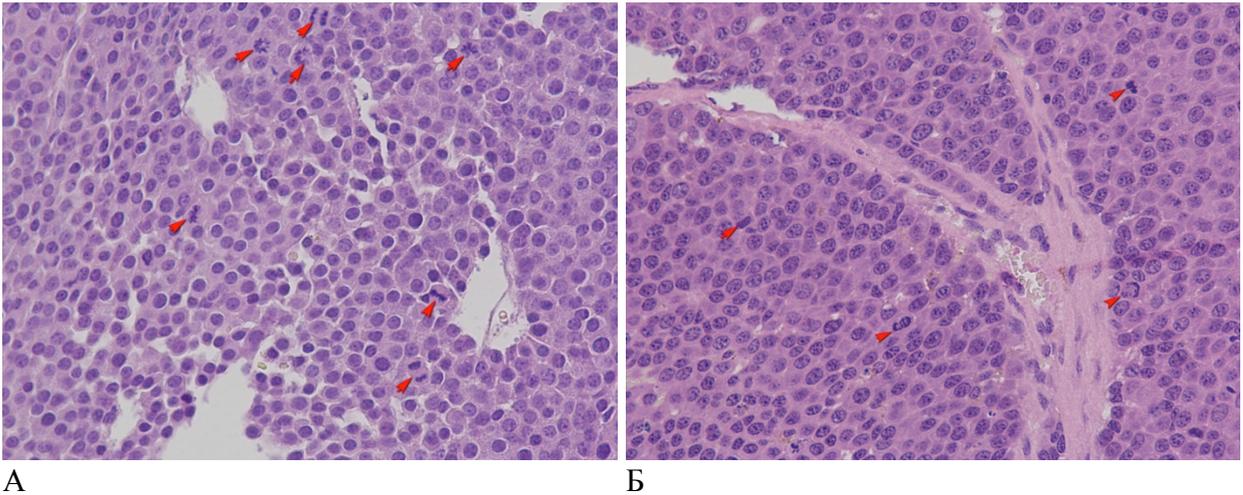


Рисунок 41 - Опухоли молочной железы мышей линии FVB/N/N, трансгенных по HER-2/neu (митотические фигуры обозначены стрелками): А - HER-2/6м, 14:00; Б - HER-2/6м, 02:00 (×400)

3.8. Суточные изменения пролиферации и апоптоза в кишечном эпителии мышей FVB, трансгенных по HER2/neu

На препаратах тощей кишки мышей FVB/N дикого типа и трансгенных по HER2/neu, подвергнутых эвтаназии в разное время суток, было подсчитано среднее число митозов (

Таблица 14) и апоптотических клеток на крипту (Таблица 15).

Таблица 14 – Среднее число митотических фигур в криптах тощей кишки мышей линии FVB/N и линии FVB/N, трансгенных по HER-2/neu

№	Шифр группы	Время суток, час			
		14:00 (ZT6)	20:00 (ZT12)	02:00(ZT18)	08:00(ZT0)
1	FVB/N/6м	1,49±0,09 *p<0,0001	1,28±0,09 *p<0,0001	1,39±0,09 *p<0,0001	2,05±0,09
2	HER-2/6м	1,54±0,1	1,32±0,08 #p=0,0029	1,42±0,08 #p=0,0346	1,76±0,11
3	HER-2/9м	1,28±0,09	1,27±0,09	1,39±0,09	1,46±0,08 ^a p<0,0001

*- p<0,05 по сравнению с FVB/N/6м 08:00,

- p<0,05 по сравнению с FVB/N/6м 08:00

^a - p<0,05 по сравнению с FVB/N/6м

У мышей FVB/N, которые служили контролем, наибольший уровень пролиферации в кишечном эпителии наблюдался в начале световой фазы (точка ZT0, 2,05±0,09 митозов на крипту). Значения данного показателя были статистически значимо ниже во временных точках ZT6 (1,49±0,09, p<0,0001), ZT12 (1,28±0,09, p<0,0001) и ZT18 (1,39±0,09, p<0,0001). У мышей HER2/neu в возрасте 6 месяцев наибольшее число митозов на крипту также было выявлено в точке ZT0 (1,76±0,11). Значимые различия с этим значением получены для временных точек ZT12 (1,32±0,08, p=0,0029) и ZT18 (1,42±0,08, p=0,0346), но не для 08:00. У мышей HER2/neu в возрасте 9 месяцев значимых различий между временными точками не обнаружено; значение в точке ZT0 значимо ниже по сравнению с группой FVB/N/6м/К (1,46±0,08, p<0,0001). Таким образом, у мышей HER2/neu в возрасте 6 месяцев, имевших по 2-3 небольших опухоли молочной железы

на момент эвтаназии, незначительно изменяется суточная динамика пролиферации в кишечном эпителии, тогда как у 9-месячных мышей, имевших на момент эвтаназии множественные крупные опухоли, суточные колебания пролиферации в кишечных криптах отсутствуют [270].

Таблица 15 – Среднее число апоптотических клеток в криптах тощей кишки мышей линии FVB/N и линии FVB/N, трансгенных по HER-2/neu

№	Шифр группы	Время суток, час			
		14:00 (ZT6)	20:00 (ZT12)	02:00(ZT18)	08:00(ZT0)
1	FVB/N/6м	0,33±0,03	0,31±0,03	0,34±0,04	0,31±0,04
2	HER-2/6м	0,35±0,03	0,36±0,03	0,40±0,03	0,33±0,05
3	HER-2/9м	0,36±0,05	0,38±0,03	0,39±0,04	0,36±0,05

Среднее число апоптотических клеток в криптах тощей кишки не различалось между группами мышей. Кроме того, не выявлено суточных изменений данного показателя

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. Влияние режима освещения и введения мелатонина на канцерогенез легких, индуцированный уретаном у мышей

В опыте по исследованию влияния режима освещения и введения мелатонина на химически индуцированный канцерогенез легкого у мышей была подтверждена гипотеза о том, что постоянное освещение будет промотировать канцерогенез легкого, а введение экзогенного мелатонина – тормозить канцерогенез и нивелировать влияние постоянного освещения.

Такие опыты с опухолями других локализаций проводились ранее, но их результаты противоречивы.

Экспериментальные исследования подтверждают, что нарушение суточных ритмов может играть роль в прогрессировании рака легкого. В частности, на модели опухолей легкого, индуцированных путем интратрахеальной инъекции вирусного вектора, несущего ген Cre-рекомбиназы у мышей, мутантных по K-ras и p53, было показано, что и хронический джет-лаг, и выключение часовых генов Per2 или Bmal1 приводят к увеличению площади опухолей и повышению их злокачественности [167].

По результатам нашего исследования, частота и множественность новообразований легкого, а также соотношение доброкачественных/злокачественных опухолей статистически значимо не различались между группами LD и LL. При этом частота крупных (более 2 мм в диаметре) опухолей была статистически значимо выше в группе LL по сравнению с LD. Таким образом, мы наблюдали либо ускорение роста опухолей, либо более раннее их появление у мышей, подвергнутых влиянию постоянного освещения.

Число работ, посвященных влиянию мелатонина на канцерогенез легкого *in vivo*, невелико [156, 267]. Показано, что у мышей с перевитой

карциномой легкого Льюиса применение мелатонина ведет к уменьшению частоты метастазирования только в условиях стресса [156].

В нашем опыте получение мышами мелатонина при нормальном освещении не оказывало статистически значимого влияния на параметры канцерогенеза. Эффект от введения мелатонина наблюдался в группе LLMT, в которой число крупных опухолей было значимо ниже, чем в группе LL. Таким образом, результаты опыта подтверждают выдвинутую гипотезу.

На модели опухолей легкого, индуцированных уретаном у мышей SHR/ц, Веснушкиным Г.М. и соавт. было проведено исследование влияния мелатонина на канцерогенез [267]. Авторы наблюдали выраженный антиканцерогенный эффект мелатонина при стандартном режиме освещения. Возможно, различия в полученных результатах обусловлены дивергенцией между популяциями мышей SHR, особенностями условий содержания и другими внешними факторами.

Полученные нами результаты в целом согласуются с данными, описанными в мировой литературе. Показано, что сменная работа, которая ведет к нарушению суточных ритмов и продукции мелатонина, увеличивает частоту различных типов рака легкого у человека [168]. Помимо этого, показано, что мелатонин угнетает рост некоторых клеточных линий рака легкого [47] и повышает чувствительность раковых клеток к воздействию химиотерапевтических препаратов [119, 177]

4.2. Влияние режима освещения и введения мелатонина на канцерогенез кожи, индуцированный ДМБА и ТФА у мышей SHR

Постоянное освещение, вызывающее нарушение синтеза мелатонина и суточных ритмов, промотировало химический канцерогенез кожи. Введение экзогенного мелатонина в ночное время ингибировало канцерогенез кожи.

Опыт, в котором одновременно исследовалось влияние нарушения суточных ритмов и введения экзогенного мелатонина на канцерогенез кожи, был проведен впервые [269]. Других работ, в которых описано влияние режима освещения на канцерогенез кожи, в доступной литературе не обнаружено. При этом связь между циркадианными ритмами и канцерогенезом кожи представляется очевидной. Хорошо описаны суточные ритмы чувствительности эпидермиса к повреждающему воздействию УФ лучами [179]. Установлено, что часовые гены участвуют в поддержании ритма чувствительности кожи к УФ излучению [67]. Также показано, что облучение лишенных шерсти мышей SKH-1 в ночное время приводит к уменьшению латентного периода и увеличению множественности опухолей по сравнению с облучением в дневное время [61]. Таким образом, циркадианные ритмы играют важную роль в канцерогенезе кожи, что согласуется с наблюдаемым в нашем исследовании повышением частоты опухолей и уменьшением латентного периода их появления при постоянном освещении.

У человека связь между нарушением суточных ритмов из-за сменной работы и канцерогенезом в коже не выявлена [168, 198]. Вместе с тем показано, что медсестры, регулярно работающие в ночные смены не менее 10 лет, меньше подвержены риску развития опухолей кожи, включая меланомы [199]. Это может быть связано с тем, что при такой работе люди меньше подвергаются действию прямых солнечных лучей.

Влияние мелатонина на канцерогенез кожи в нашем исследовании было выявлено только при постоянном освещении. При стандартном освещении параметры канцерогенеза не различались у мышей, получавших и не получавших мелатонин. В то же время в работах [125, 268] описано угнетающее влияние мелатонина на канцерогенез кожи при стандартном освещении.

Полученные в данном опыте результаты хорошо согласуются с результатами предыдущего опыта, а также с данными других исследователей, полученными с использованием моделей химически индуцированных опухолей молочной железы [204, 228], печени [85], толстой кишки [262], перевиваемых опухолей молочной железы [38, 203].

4.3. Экспрессия часовых генов в опухолях легких, индуцированных уретаном у мышей SHR

Исходя из многочисленных данных об изменении экспрессии часовых генов в опухолях человека, включая рак легкого, мы предполагали, что экспрессия этих генов будет изменена в опухолях легкого у мышей.

Предположение подтвердилось в случае содержания животных при постоянном освещении: у мышей группы LL обнаружено значимое снижение экспрессии *Bmal1* и *Cry1* в опухолевой ткани легкого по сравнению с нормальной. При этом экспрессия этих генов в ткани легкого была значимо выше, чем при стандартном освещении. Вероятно, при постоянном освещении произошел сдвиг пика экспрессии *Bmal1* и *Cry1* в ткани легкого. Это согласуется с результатами эксперимента, в котором наблюдали изменения экспрессии основных часовых генов в ткани легкого в условиях хронического джет-лага [77].

Мы не обнаружили различий в экспрессии гена *Clock* между нормальной и опухолевой тканью, а также не выявили влияния постоянного освещения или мелатонина на его экспрессию. В

злокачественных опухолях легкого человека повышенная экспрессия гена Clock описана [167].

Данных об экспрессии часовых генов в экспериментальных опухолях легкого в литературе пока нет, однако известно, что выключение генов Per2 или Bmal1 у мышей с генетически индуцированными аденокарциномами легкого промотирует канцерогенез [167]. Кроме этого, на другой модели химически индуцированных опухолей (опухоль толстой кишки) показано, что уровень экспрессии Bmal1, Per1, Per2 и Rev-Erba снижен в опухолях по сравнению с окружающей нормальной тканью по крайней мере в некоторых временных точках [214]

Известно, что в злокачественных опухолях легкого человека экспрессия часовых генов нарушается, причем уровень их экспрессии коррелирует с прогнозом пациентов [167, 183]. Кроме того показано, что согласованная ритмическая экспрессия часовых и многих других генов нарушается в опухолях легкого по сравнению с нормальной тканью [206].

Таким образом, найденное нами снижение экспрессии Bmal1 и Cry1 в опухолевой ткани легкого по сравнению с нормальной у мышей группы LL может быть объяснено как снижением общего уровня экспрессии, так и сдвигом суточного ритма экспрессии данных генов в опухолях.

4.4. Экспрессия часовых белков в опухолях легкого, индуцированных уретаном у мышей SHR

После оценки иммуногистохимического окрашивания препаратов легких с опухолями, индуцированными введением уретана, была подтверждена гипотеза о том, что в опухолях по сравнению с нормальной тканью будет повышено содержание белков-активаторов транскрипции BMAL1 и CLOCK.

На уровне экспрессии генов существенного повышения Bmal1 и Clock не обнаружено, тогда как иммуногистохимическое окрашивание

позволило выявить повышение содержания этих белков в аденомах по сравнению с нормальной тканью, а также в аденокарциномах по сравнению с аденомами. Вероятно, механизмы пост-трансляционных модификаций, которые приводят к деградации белков, изменены в опухолевых клетках по сравнению с нормальными. *Bmal1* и *Clock* активируют экспрессию многих генов, в том числе участвующих в регуляции клеточного цикла и пролиферации. Возможно, что наблюдаемое нами накопление этих транскрипционных факторов в ядрах опухолевых клеток способствует поддержанию высокого уровня пролиферации.

Для гена *Cry1* и соответствующего белка ситуация обратная – при наличии экспрессии гена окрашивание антителами к белку *CRY1* не позволило выявить детектируемого его количества. Наиболее вероятно, что отбор образцов в единственной временной точке не позволяет выявить некоторые часовые белки.

4.5. Экспрессия часовых белков в опухолях кожи, индуцированных ДМБА и ТФА у мышей SHR

Исходно предполагалось, что, как и в предыдущем опыте, в ходе канцерогенеза будет выявлено более высокое содержание белков-активаторов транскрипции, а именно *BMAL1* и *CLOCK*, и сниженное содержание *CRY1*. Однако доля *BMAL1*-позитивных ядер в базальном слое кожи с места аппликации канцерогена (в гиперпластическом эпидермисе) была значимо снижена по сравнению с нормальной кожей, а доля *CLOCK*-позитивных ядер статистически значимо не изменялась. Только в случае белка *CRY1* наблюдалась закономерное снижение его содержания в коже с места аппликации канцерогена и в папилломах кожи по сравнению с гиперпластическим эпидермисом.

Осцилляция экспрессии часовых генов в нормальной коже мышей [179, 231] и крыс [194] описана. Также известно, что белковый продукт гена *Per2* обнаруживается в кератоцитах и эпителии волосяных

фолликулов только в ночные часы [231]. Показано, что данный осциллятор зависит от системных сигналов, т.к. при разрушении СХЯ ритмическая экспрессия часовых генов в коже нарушается [231].

Экспрессия часовых генов и белков в экспериментальных опухолях кожи пока остается мало изученной. При этом роль клеточных «часов» в развитии опухолей, происходящих из плоского эпителия, представляется весьма важной. Здесь следует вторично упомянуть работы [61, 67], процитированные в разделе 4.2. Кроме этого, показано, что выключение гена *Per2* в клеточной линии плоскоклеточного рака приводит к более быстрому росту опухолей при перевивке бестимусным мышам и повышению уровня экспрессии некоторых генов, промотирующих опухолевый рост (*Ki-67*, *MDM2*, *c-Myc*, *Bcl-2*, *MMP2*, *VEGF*) [218].

Таким образом, полученные в нашем опыте результаты позволяют расширить представление о роли часовых генов и белков в канцерогенезе кожи.

4.6. Экспрессия часовых генов в опухолях молочной железы и неопухолевых тканях мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu

В ходе данного эксперимента была проведена оценка наличия/отсутствия суточных колебаний экспрессии часовых генов и пролиферации в аденокарциномах молочной железы у мышей и оценка влияния опухолевого процесса на экспрессию часовых генов в тканях, не затронутых опухолями.

Полученные данные об отсутствии суточных колебаний экспрессии часовых генов *Bmal1*, *Clock* и *Cry1* в опухолях молочной железы у мышей частично согласуются с результатами других исследований циркадианных ритмов в опухолях. Так, в работе Sotak et al. (2013) было показано, что амплитуда ритма экспрессии *Per1*, *Per2*, *Rev-Erba* и *Dbp* снижена в опухолях кишечника у мышей, индуцированных 1,2-диметилдiazен 1-

оксидом (азоксиметаном) по сравнению с нормальными тканями кишечника, а ритм *Bmal1* полностью отсутствует. Huisman et al. (2015) обнаружили в печеночных метастазах рака кишечника C26 у мышей ритмичную экспрессию *Cry1*, в то время как для *Rev-Erba*, и *Bmal1* ритм отсутствовал [93]. В клетках меланомы B16 у мышей описаны ритмичные изменения экспрессии *Per1* и *Bmal1*, хотя в данном исследовании относительная экспрессия была значительно снижена в большинстве временных точек по сравнению с нормальной кожей, в том числе прилегающей к опухоли [8].

Нарушения в системе часовых генов в опухоли могут происходить под влиянием экспрессии онкогенов, в частности, *Myc*. Было показано, что эктопическая экспрессия *Myc* в синхронизированной культуре клеток остеосаркомы вызывает нарушение ритма часовых генов [1]. В то же время, существуют данные о сохранении ритмов в опухолевых клетках. Так, исследования на модели карциномы слизистой оболочки щеки, индуцированной диметилбензантраценом (ДМБА) у золотистых хомячков, показали ритмичность генов *Per1* и *Per2*, а также некоторых генов, находящихся под контролем часовых (*VEGF*, *C-MYC*, *P53*, *Cyclin D1* and *CDK1*), в опухолевых и предраковых тканях. По мере прогрессирования процесса малигнизации ритм *Per1*, *Per2* и *p53* ослабляется; отсутствие ритма было показано для *Ki67* и *CyclinB1* [229, 254]. Такие неоднозначные результаты могут объясняться различиями между моделями опухолей, использованными в исследованиях. Химически индуцированные аутохтонные опухоли кишечника и слизистой оболочки щеки являются медленно прогрессирующими и могут сохранять автономно или системно регулирующую ритмичность экспрессии часовых генов. В противоположность этому, штаммы перевиваемых опухолей и модель рака молочной железы, использованная в нашем исследовании, являются низкокодифференцированными [8, 93]. Спонтанные опухоли у трансгенных мышей линии *HER2-neu* фактически не имеют стадии «предрака» и

микроскопически выглядят как солидные аденокарциномы с момента появления видимого узла.

Но в целом, полученные нами и описанные в литературе данные поддерживают гипотезу о нарушении регуляции клеточных «часов» в злокачественных опухолях.

Далее, в нашем исследовании было выявлено изменение суточных колебаний экспрессии часовых генов в СХЯ, печени и молочной железе мышей с опухолями. Мы наблюдали пики *Bmal1*, *Clock* и *Cry1* в точках ZT18 или ZT6у контрольных мышей, тогда как у мышей с опухолями такие пики отсутствовали. В работе [8] сообщалось о том, что ритм *Per1* в СХЯ у мышей с меланомой B16 не изменялся, экспрессия *Per1* во временной точке ZT 14 в печени животных с опухолью превышала таковую у нормальных животных, а в легких – была ниже. Также отмечалась потеря пика *Bmal1* в СХЯ, печени и легких во временной точке ZT2. Hojo et al. (2017) показали, что перевивка карциномы молочной железы 4T1 животным вызывает существенные изменения в экспрессии часовых генов. Эти изменения выражались в снижении пиковых значений и некотором сдвиге фазы для *Rev-Erba*, *Bmal1* и *Per2*; при этом паттерн экспрессии *Clock* изменялся полностью [89].

Противоположные закономерности описаны в исследовании Sotak et al. (2013): более выраженные пики экспрессии были зафиксированы в печени мышей с опухолью кишечника, индуцированной азоксиметаном; при этом ритмы *Bmal1*, *RevErba*, *Dbp* и *Wee1* были смещены по фазе, но сохраняли амплитуду [214]. Другие авторы (Huisman et al.) также сообщают о смещении фазы в печени и легких мышей в опухолью [93].

В наших экспериментах оценка часовых генов и белков проводилась 4 раза в течение суток, как и в исследовании [8], тогда как в опытах Huisman et al. и Sotak et al использовалось 6 точек отбора. Четырех временных точек может быть недостаточно для выявления некоторых пиков экспрессии генов. В отличие от всех вышеупомянутых работ и

наших результатов, Masri et al. не обнаружили различий в ритме двигательного и пищевого поведения у мышей с аденокарциномой легкого и интактных животных. Интересно, что в этой работе было показано влияние опухолей легких на циркадный ритм транскриптома и метаболизма печени [146]. Также имеются сведения о перепрограммировании транскриптомов дистальных тканей (печени, почек, легких и сердца) при опухолевом процессе [89]. Следует отметить, что у онкологических пациентов выявлены нарушения суточных ритмов сна-бодрствования и секреции некоторых гормонов [173]. Вероятно, описанные в экспериментах изменения транскрипции генов в неопухолевых тканях постепенно ведут к системному нарушению работы циркадианной системы.

Нами выявлено отсутствие суточных колебаний экспрессии часовых генов в опухолях молочной железы. Эти данные согласуются с результатами других экспериментальных работ [8, 93, 214]. Описано [89, 93] негативное влияние опухоли на ритм экспрессии генов в других тканях, что подтверждено в нашей работе. Поскольку нарушения суточных ритмов происходят у онкологических пациентов [173], изучение ритма экспрессии часовых генов и возможностей их коррекции на моделях опухолей у животных имеет практическое значение.

4.7. Суточная динамика пролиферации в опухолях молочной железы и кишечном эпителии мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu

У мышей была проведена оценка суточных изменений пролиферации в опухолях молочной железы и оценка влияния опухолевого процесса на суточную динамику пролиферации кишечного эпителия.

Было показано, что в опухолях молочной железы количество клеток, проходящих митоз, значимо снижено в ночное время по сравнению с другими точками. История изучения суточных ритмов пролиферации в

различных опухолях насчитывает несколько десятилетий. Известно, что суточная динамика пролиферации многих опухолей имеет вид двухвершинной кривой [266], тогда как другие опухоли не имеют такого ритма [22]. Мы полагаем, что спонтанные опухоли молочной железы мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu, выраженного ритма пролиферации не имеют, а спад в ночное время вызван системными сигналами.

Суточная динамика пролиферации эпителия тонкого кишечника у мышей показана в нашем исследовании и описана во многих работах [9, 22]. При этом влияние опухолевого процесса на динамику пролиферации кишечного эпителия описано лишь в единичных публикациях; в частности, показано, что перевиваемая гепатокарцинома вызывает сдвиг фазы ритма пролиферации энтероцитов [189]. Вместе с тем описано негативное влияние опухоли на суточный ритм содержания различных транскриптов и метаболитов в тканях, непосредственно не затронутых опухолью [89, 93, 146]. Полученные нами данные о негативном влиянии опухоли на динамику пролиферации в кишечнике согласуются с описанным в предыдущем разделе снижением суточных колебаний экспрессии часовых генов в печени и СХЯ, а также с результатами, описанными в мировой литературе.

Вопрос о влиянии опухолевого процесса на интенсивно пролиферирующие ткани остается недостаточно изученным, несмотря на то, что сдвиг фазы или потеря ритма пролиферации могут повлиять на чувствительность таких тканей к противоопухолевым препаратам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературных данных и полученные результаты свидетельствуют о взаимосвязи нарушения суточных ритмов и опухолевого процесса, а также об антиканцерогенном эффекте мелатонина. В эксперименте выявлено, что постоянное освещение промотирует развитие химически индуцированных опухолей легкого и кожи, а введение мелатонина тормозит канцерогенез только при постоянном освещении.

Установлено, что в опухолях легкого и молочной железы содержание белков-активаторов транскрипции BMAL1 и CLOCK возрастает по сравнению с нормальной тканью, тогда как повышения уровня экспрессии соответствующих генов в опухолях не было выявлено. Таким образом, нельзя ограничиваться только анализом уровня экспрессии часовых генов в опухолях. Вопрос об активности данных транскрипционных факторов в опухолях требует дальнейшего изучения.

У мышей HER-2/neu обнаружено нарушение суточной динамики экспрессии часовых генов в спонтанных опухолях молочной железы, СХЯ и печени. Таким образом, подтверждено негативное влияние опухолей на циркадианные ритмы всего организма. Вопрос о возможностях и целесообразности фармакологической коррекции циркадианных ритмов в экспериментах и у онкологических пациентов нуждается в дальнейшем изучении.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что постоянное освещение промотирует индуцированный уретаном канцерогенез легкого у мышей SHR. Так, частота крупных опухолей в группе LL была на 12% выше, чем в LD ($p=0,0245$). Введение мелатонина угнетает канцерогенез легкого только при постоянном освещении, частота крупных опухолей в группе LLMT на 6,5% ниже, чем в LL ($p=0,0001$).

2. Показано промотирующее влияние постоянного освещения на развитие химически индуцированных опухолей кожи у мышей SHR (частота животных с опухолями в группе LL выше, чем в LD, на 30%, $p=0,038$). Торможение канцерогенеза кожи с помощью мелатонина наблюдалось только в условиях постоянного освещения (частота животных с опухолями в группе LLMT на 29% ниже, чем в LL, $p=0,048$).

3. Выявлено повышение уровня экспрессии часовых генов *Bmal1* и *Cry1* в нормальной ткани легкого у мышей, содержащихся при постоянном освещении по сравнению с контролем (LD) в 3,1 ($p=0,02$) и 3,6 ($p=0,0002$) раза, соответственно. Опухоли легкого у животных этой группы характеризовались сниженной экспрессией *Bmal1* (в 2,6 раза, $p=0,0345$) и *Cry1* (в 2,9 раза, $p=0,0005$) по сравнению с нормальной тканью. Содержание часового белка *BMAL1* существенно повышалось в аденокарциномах легкого по сравнению с аденомами в группах животных, содержащихся в условиях постоянного освещения (в LD – в 2 раза, $p=0,0048$, в LDMT – в 2,4 раза, $p=0,0437$). Содержание белка *CLOCK* было значимо выше в аденокарциномах по сравнению с аденомами во всех группах (2,54 – 2,83 балла и 1,29 – 1,83 балла, соответственно, $p<0,005$).

4. На модели канцерогенеза кожи выявлены разнонаправленные изменения содержания часовых белков *BMAL1*, *CLOCK* и *CRY1* в гиперпластическом эпителии и в опухолях кожи по сравнению с нормальной тканью. При этом содержание *BMAL1* и *CLOCK* в опухолях повышалось под влиянием постоянного освещения на 7% ($p=0,024$) и 19%

($p=0,024$). В опухолях кожи во всех группах животных, кроме LD, выявлено повышение содержания белка CLOCK на 10 – 21% ($p<0,05$) а содержание CRY1 на 27-34% ниже в опухолях, чем в эпидермисе, во всех группах мышей ($p<0,005$).

5. На модели спонтанного канцерогенеза у мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu, выявлено, что наибольший уровень экспрессии часовых генов Bmal1, Clock и Cry1 в супрахиазматическом ядре и печени контрольных животных (мыши FVB/N) наблюдается в середине темного периода (ZT18). У животных с опухолями в супрахиазматическом ядре и печени такой пик не определяется, а экспрессия часовых генов в данной точке снижена в 2,6 – 14,4 раза ($p<0,05$). В молочной железе мышей FVB/N наивысший уровень экспрессии Clock выявлен в ZT18, Cry1 – в ZT6; у мышей HER2/neu в этих точках экспрессия Clock и Cry1 снижена в 5,8 – 23,2 раза ($p<0,05$). В спонтанных аденокарциномах молочной железы суточных колебаний экспрессии часовых генов и содержания часовых белков не обнаружено. В опухолях молочной железы выявлено повышение содержания белка BMAL1 на 0,07 относительных единиц ($p=0,0002$) и доли CLOCK-позитивных ядер в 2,6 - 6,3 раза ($p<0,0001$).

6. В спонтанных аденокарциномах у мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu, выявлено снижение митотического индекса в 1,38 ($p<0,05$) – 1,93 ($p<0,0001$) раза в середине темного периода по сравнению с другими точками. При этом в кишечнике мышей с опухолями наблюдается потеря суточной динамики митотической активности; у мышей с крупными опухолями в точке ZT0 (пик митотической активности у контрольной группы) число митозов на крипту в тощей кашке снижено на 29,9% по сравнению с контролем ($p<0,0001$).

СОКРАЩЕНИЯ И УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

Г-Э – гематоксилин-эозин

ДАБ – диаминобензидин

ДМБА – диметилбензантрацен

ДМГ - диметилгидразин

ДЭНА - диэтилнитрозамин

МАИР - международная ассоциация по изучению рака

МТ – мелатонин

ОМЖ – опухоль молочной железы

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СХЯ – супрахиазматическое ядро

ТФА - О-тетрадеcanoилфорболовый эфир

ЧБ – часовые белки

ЧГ – часовые гены

LD – стандартное освещение (12:12)

LL – постоянное освещение

M – среднее значение показателя

m – стандартная ошибка среднего

n – число животных в группе

SD – среднеквадратичное (стандартное) отклонение

ZT - zeitgeber time, время (в часах) после начала светового дня

СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ

Таблицы

Таблица 1 – Исследования изменения экспрессии часовых генов в опухолях человека (по: А. В. Панченко, Е. А. Губарева, 2016 [273], с изменениями и дополнениями)	36
Таблица 2 – Экспериментальные исследования влияния нарушения циркадианных ритмов на канцерогенез.....	41
Таблица 3 - Экспериментальные исследования влияния введения мелатонина на канцерогенез.....	47
Таблица 4 – Экспериментальные исследования влияния мелатонина на опухолевый рост при нарушении циркадианных ритмов.....	49
Таблица 5 - Экспериментальные группы животных в опыте с канцерогенезом легкого	53
Таблица 6 – Экспериментальные группы животных в опыте с канцерогенезом кожи	55
Таблица 7 - Реакционная смесь для проведения обратной транскрипции в реакции ПЦР	57
Таблица 8 – Реакционная смесь для проведения полимеразной цепной реакции	58
Таблица 9 - Протокол гистологической проводки материала.....	59
Таблица 10 – Использованные первичные антитела и их разведение.....	62
Таблица 11 - Показатели индуцированного уретаном канцерогенеза легкого у мышей самцов SHR при различных режимах освещения и введении мелатонина.....	68
Таблица 12 - Основные показатели индуцированного ДМБА и ТФА канцерогенеза у мышей SHR.....	72
Таблица 13 – Митотический индекс в опухолях молочной железы мышей линии FVB/N, трансгенных по HER2/neu	107
Таблица 14 – Среднее число митотических фигур в крипах тощей кишки мышей линии FVB/N и линии FVB/N, трансгенных по HER-2/neu ..	109

Таблица 15 – Среднее число апоптотических клеток в крипах тощей кишки мышей линии FVB/N и линии FVB/N, трансгенных по HER-2/neu	110
---	-----

Рисунки

Рисунок 1 – Препарат легкого мыши самца SHR с опухолями, индуцированными уретаном (фиксация 10% формалином)	67
Рисунок 2 – Микрофотографии опухолей легкого, индуцированных уретаном у мышей SHR. А – аденома (Г-Э, ув. $\times 400$), Б – аденокарцинома (Г-Э, ув. $\times 400$)	67
Рисунок 3 - Опухоли кожи, индуцированные ДМБА и ТФА у мышей SHR. Группа LD, 125 сутки опыта.....	71
Рисунок 4 – Микрофотографии кожи с места аппликации ДМБА и ТФА (А) и папилломы кожи, индуцированной ДМБА и ТФА у мышей SHR (Б)	71
Рисунок 5 – Динамика среднего числа папиллом кожи на животное в опыте с индуцированным ДМБА и ТФА канцерогенезом у мышей SHR, $M \pm m$	74
Рисунок 6 - Среднее число папиллом на животное при аутопсии в опыте с индуцированным ДМБА и ТФА канцерогенезом у мышей SHR, $M \pm m$	75
Рисунок 7 - Динамика средней площади папиллом кожи у животных в опыте с индуцированным ДМБА и ТФА канцерогенезом у мышей SHR, $M \pm m$	76
Рисунок 8 - Средняя площадь папиллом при аутопсии животных в опыте с индуцированным ДМБА и ТФА канцерогенезом у мышей SHR, $M \pm m$	76

Рисунок 9 - Динамика средней общей площади папиллом у животных в опыте с индуцированным ДМБА и ТФА канцерогенезом у мышей SHR, $M \pm m$	77
Рисунок 10 - Средняя общая площадь папиллом при аутопсии животных в опыте с индуцированным ДМБА и ТФА канцерогенезом у мышей SHR, $M \pm m$	78
Рисунок 11 – Экспрессия гена <i>Bmal1</i> в образцах нормальной и опухолевой ткани легкого у животных в опыте с индуцированным уретаном канцерогенезом у мышей SHR ($M \pm m$).....	80
Рисунок 12 – Экспрессия гена <i>Clock</i> в образцах нормальной и опухолевой ткани легкого у животных в опыте с индуцированным уретаном канцерогенезом у мышей SHR ($M \pm m$).....	81
Рисунок 13 – Экспрессия гена <i>Cry1</i> в образцах нормальной и опухолевой ткани легкого у животных в опыте с индуцированным уретаном канцерогенезом у мышей SHR ($M \pm m$).....	82
Рисунок 14 – Микрофотографии опухолей легкого, индуцированных уретаном у мышей SHR, окрашенных антителами к <i>BMAL1</i> ($\times 400$). А – аденома, Б – аденокарцинома.....	84
Рисунок 15 - Интенсивность окрашивания аденом (левый столбец) и аденокарцином (правый столбец) легкого, индуцированных уретаном у мышей SHR, антителами к <i>BMAL1</i> ($M \pm m$).....	85
Рисунок 16 – Микрофотографии опухолей легкого, , индуцированных уретаном у мышей SHR, окрашенных антителами к <i>CLOCK</i> ($\times 400$). А – аденома, Б – аденокарцинома.....	86
Рисунок 17 – Интенсивность окрашивания аденом (левый столбец) и аденокарцином (правый столбец) легкого, индуцированных уретаном у мышей SHR, антителами к <i>CLOCK</i> ($M \pm m$).....	87
Рисунок 18 – Окрашивание антителами к <i>BMAL1</i> кожи мышей SHR с места аппликации ДМБА и ТФА (А) и папилломы кожи (Б) ($\times 400$)...	89

Рисунок 19 - Доля ядер базального слоя эпидермиса кожи мышей, экспрессирующих Bmal1 в опыте с ДМБА и ТФА индуцированным канцерогенезом кожи, M(SD).....	90
Рисунок 20 – Окрашивание кожи мышей SHR с места аппликации ДМБА и ТФА (А) и папилломы кожи (Б) антителами к CLOCK (×400).....	91
Рисунок 21 – Доля ядер базального слоя эпидермиса кожи мышей, экспрессирующих CLOCK в опыте с ДМБА и ТФА индуцированным канцерогенезом кожи, M(SD).....	92
Рисунок 22 – Окрашивание кожи мышей SHR с места аппликации ДМБА и ТФА (А) и папилломы кожи (Б) антителами к CRY1 (×400).....	93
Рисунок 23 – Доля ядер базального слоя эпидермиса кожи мышей, экспрессирующих CRY1 в опыте с ДМБА и ТФА индуцированным канцерогенезом кожи, M(SD).....	94
Рисунок 24 - Суточные изменения экспрессии гена Bmal1 в СХЯ у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu.....	96
Рисунок 25 - Суточные изменения экспрессии гена Clock в СХЯ у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu.....	96
Рисунок 26 - Суточные изменения экспрессии гена Cry1 в СХЯ у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu.....	97
Рисунок 27 - Суточные изменения экспрессии гена Bmal1 в печени у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu	98
Рисунок 28 – Суточные изменения экспрессии гена Clock в печени у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu	98
Рисунок 29 - Суточные изменения экспрессии гена Cry1 в печени у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu.....	99
Рисунок 30 - Суточные изменения экспрессии гена Bmal1 в молочной железе у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu	99
Рисунок 31 – Суточные изменения экспрессии гена Clock в молочной железе у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu	100

- Рисунок 32 - Суточные изменения экспрессии гена *Cry1* в молочной железе у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu 101
- Рисунок 33 - Суточные изменения экспрессии гена *Bmal1* в опухолях молочной железы мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu 101
- Рисунок 34 - Суточные изменения экспрессии гена *Clock* в опухолях молочной железы мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu 102
- Рисунок 35 - Суточные изменения экспрессии гена *Cry1* в опухолях молочной железы мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu 102
- Рисунок 36 - Микрофотографии нормальной и опухолевой ткани молочной железы мышей, трансгенных по HER2/neu, окрашенных антителами к BMAL1(x400). А – проток молочной железы, Б – аденокарцинома молочной железы (x400) 103
- Рисунок 37 – Относительный уровень содержания белка BMAL1 в молочной железе и опухолях молочной железы мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu..... 104
- Рисунок 38 - Микрофотография нормальной и опухолевой ткани молочной железы мышей, трансгенных по HER2/neu, окрашенных антителами к CLOCK (x400) 105
- Рисунок 39 – Суточные изменения доли ядер, позитивно окрашенных антителами к CLOCK в молочной железе и опухолях молочной железы мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu 106
- Рисунок 40 - Окрашивание СХЯ мыши линии FVB/N, трансгенной по HER2/neu, антителами к Per2 (группа 6 месяцев, ЦВ18) (x400). 107
- Рисунок 41 - Опухоли молочной железы мышей линии FVB/N/N, трансгенных по HER-2/neu (митотические фигуры обозначены стрелками): А - HER-2/6м, 14:00; Б - HER-2/6м, 02:00 (x400) 108

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Altman B.J. [и др.]. MYC Disrupts the Circadian Clock and Metabolism in Cancer Cells / B.J. Altman, A.L. Hsieh, A. Sengupta [и др.]. // *Cell metabolism*. – 2015. – Т. 22. – № 6. – С. 1009.
2. Alvarez-García V. [и др.]. Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. / V. Alvarez-García, A. González, C. Alonso-González [и др.]. // *Microvascular research*. – 2013. – Т. 87. – . – С. 25–33.
3. Alvarez B. [и др.]. Phosphoinositide 3-kinase activation regulates cell division time by coordinated control of cell mass and cell cycle progression rate. / B. Alvarez, E. Garrido, J.A. Garcia-Sanz [и др.]. // *The Journal of biological chemistry*. – 2003. – Т. 278. – № 29. – С. 26466–73.
4. Anea C.B. [и др.]. Increased superoxide and endothelial NO synthase uncoupling in blood vessels of Bmal1-knockout mice. / C.B. Anea, B. Cheng, S. Sharma [и др.]. // *Circulation research*. – 2012. – Т. 111. – № 9. – С. 1157–65.
5. Anisimov V.N. [и др.]. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. / V.N. Anisimov, I.G. Popovich, M.A. Zabezhinski [и др.]. // *Biochimica et biophysica acta*. – Т. 1757. – № 5–6. – С. 573–89.
6. Anisimov V.N. [и др.]. Light-at-night-induced circadian disruption, cancer and aging. / V.N. Anisimov, I.A. Vinogradova, A. V Panchenko [и др.]. // *Current aging science*. – 2012. – Т. 5. – № 3. – С. 170–7.
7. Antoch M.P. [и др.]. Disruption of the circadian clock due to the Clock mutation has discrete effects on aging and carcinogenesis. / M.P. Antoch, V.Y. Gorbacheva, O. Vykhovanets [и др.]. // *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. – 2008. – Т. 7. – № 9. – С. 1197–204.
8. Assis L. de [и др.]. Non-Metastatic Cutaneous Melanoma Induces Chronodisruption in Central and Peripheral Circadian Clocks / L. de Assis, M. Moraes, K. Magalhães-Marques [и др.]. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Т. 19. – № 4. – С. 1065.
9. Balakrishnan A. [и др.]. MicroRNA mir-16 is anti-proliferative in

enterocytes and exhibits diurnal rhythmicity in intestinal crypts. / A. Balakrishnan, A.T. Stearns, P.J. Park [и др.]. // *Experimental cell research*. – 2010. – Т. 316. – № 20. – С. 3512–21.

10. Baturin D.A. [и др.]. The effect of light regimen and melatonin on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice is related to a downregulation of HER-2/neu gene expression. / D.A. Baturin, I.N. Alimova, V.N. Anisimov [и др.]. // *Neuro endocrinology letters*. – 2001. – Т. 22. – № 6. – С. 441–7.

11. Bedrosian T.A. [и др.]. Light at Night Alters Daily Patterns of Cortisol and Clock Proteins in Female Siberian Hamsters / T.A. Bedrosian, A. Galan, C.A. Vaughn [и др.]. // *Journal of Neuroendocrinology*. – 2013. – Т. 25. – № 6. – С. 590–596.

12. Benloucif S., Dubocovich M.L. Melatonin and Light Induce Phase Shifts of Circadian Activity Rhythms in the C3H/HeN Mouse / S. Benloucif, M.L. Dubocovich // *Journal of Biological Rhythms*. – 1996. – Т. 11. – № 2. – С. 113–125.

13. Benna C. [и др.]. Genetic variation of clock genes and cancer risk: a field synopsis and meta-analysis. / C. Benna, C. Helfrich-Förster, S. Rajendran [и др.]. // *Oncotarget*. – 2017. – Т. 8. – № 14. – С. 23978–23995.

14. Bhadra U. [и др.]. Evolution of circadian rhythms: from bacteria to human / U. Bhadra, N. Thakkar, P. Das [и др.]. // *Sleep Medicine*. – 2017. – Т. 35. – . – С. 49–61.

15. Bieler J. [и др.]. Robust synchronization of coupled circadian and cell cycle oscillators in single mammalian cells. / J. Bieler, R. Cannavo, K. Gustafson [и др.]. // *Molecular systems biology*. – 2014. – Т. 10. – № 7. – С. 739.

16. Birky T.L., Bray M.S. Critical Review Understanding Circadian Gene Function: Animal Models of Tissue-Specific Circadian Disruption / T.L. Birky, M.S. Bray // *IUBMB Life*. – 2014. – Т. 66. – № 1. – С. 34–41.

17. Block K.I. [и др.]. Designing a broad-spectrum integrative approach

for cancer prevention and treatment / K.I. Block, C. Gyllenhaal, L. Lowe [и др.]. // *Seminars in Cancer Biology*. – 2015. – Т. 35. – . – С. S276–S304.

18. Boivin D.B., Boudreau P. Impacts of shift work on sleep and circadian rhythms / D.B. Boivin, P. Boudreau // *Pathologie Biologie*. – 2014. – Т. 62. – № 5. – С. 292–301.

19. Broadberry E. [и др.]. Disrupted circadian clocks and altered tissue mechanics in primary human breast tumours. / E. Broadberry, J. McConnell, J. Williams [и др.]. // *Breast cancer research : BCR*. – 2018. – Т. 20. – № 1. – С. 125.

20. Brown A.J. [и др.]. Peripheral Circadian Oscillators. / A.J. Brown, J.S. Pendergast, S. Yamazaki // *The Yale journal of biology and medicine*. – 2019. – Т. 92. – № 2. – С. 327–335.

21. Burch J. [и др.]. Melatonin, sleep, and shift work adaptation. / J. Burch, M. Yost, W. Johnson [и др.]. // *Journal of occupational and environmental medicine*. – 2005. – Т. 47. – № 9. – С. 893–901.

22. Camplejohn R.S., Nias A.H. A study of diurnal proliferative activity in tumour and small intestine of C3H mice bearing a transplanted mammary carcinoma. / R.S. Camplejohn, A.H. Nias // *Virchows Archiv. B, Cell pathology including molecular pathology*. – 1983. – Т. 44. – № 2. – С. 163–71.

23. Cao Q. [и др.]. A role for the clock gene *per1* in prostate cancer. / Q. Cao, S. Gery, A. Dashti [и др.]. // *Cancer research*. – 2009. – Т. 69. – № 19. – С. 7619–25.

24. Carugno M. [и др.]. Night Shift Work, DNA Methylation and Telomere Length: An Investigation on Hospital Female Nurses / M. Carugno, C. Maggioni, E. Crespi [и др.]. // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2019. – Т. 16. – № 13. – С. 2292.

25. Cerezo A. [и др.]. Inhibition of VEGF-Induced VEGFR-2 Activation and HUVEC Migration by Melatonin and Other Bioactive Indolic Compounds / A. Cerezo, R. Hornedo-Ortega, M. Álvarez-Fernández [и др.]. // *Nutrients*. – 2017. – Т. 9. – № 3. – С. 249.

26. Chen S.-T. [и др.]. Deregulated expression of the PER1 , PER2 and PER3 genes in breast cancers / S.-T. Chen, K.-B. Choo, M.-F. Hou [и др.]. // *Carcinogenesis*. – 2005. – Т. 26. – № 7. – С. 1241–1246.

27. Chen W.-D. [и др.]. The circadian rhythm controls telomeres and telomerase activity / W.-D. Chen, M.-S. Wen, S.-S. Shie [и др.]. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2014. – Т. 451. – № 3. – С. 408–414.

28. Chen Y. [и др.]. Panaxadiol Saponin and Dexamethasone Improve Renal Function in Lipopolysaccharide-Induced Mouse Model of Acute Kidney Injury. / Y. Chen, Y. Du, Y. Li [и др.]. // *PloS one*. – 2015. – Т. 10. – № 7. – С. e0134653.

29. Chen Z. [и др.]. Deregulated expression of the clock genes in gliomas. / Z. Chen, P. Liu, C. Li [и др.]. // *Technology in cancer research & treatment*. – 2013. – Т. 12. – № 1. – С. 91–7.

30. Chuffa L.G.A. [и др.]. Apoptosis is triggered by melatonin in an in vivo model of ovarian carcinoma / L.G.A. Chuffa, M.S. Alves, M. Martinez [и др.]. // *Endocrine-Related Cancer*. – 2016. – Т. 23. – № 2. – С. 65–76.

31. Cini G. [и др.]. Melatonin's growth-inhibitory effect on hepatoma AH 130 in the rat. / G. Cini, M. Coronello, E. Mini [и др.]. // *Cancer letters*. – 1998. – Т. 125. – № 1–2. – С. 51–9.

32. Cini G. [и др.]. Antiproliferative activity of melatonin by transcriptional inhibition of cyclin D1 expression: a molecular basis for melatonin-induced oncostatic effects / G. Cini, B. Neri, A. Pacini [и др.]. // *Journal of Pineal Research*. – 2005. – Т. 39. – № 1. – С. 12–20.

33. Claustrat B., Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. / B. Claustrat, J. Leston // *Neuro-Chirurgie*. – Т. 61. – № 2–3. – С. 77–84.

34. Coomans C.P. [и др.]. Detrimental effects of constant light exposure and high-fat diet on circadian energy metabolism and insulin sensitivity / C.P. Coomans, S.A.A. van den Berg, T. Houben [и др.]. // *The FASEB Journal*. – 2013. – Т. 27. – № 4. – С. 1721–1732.

35. Cos S. [и др.]. Influence of Melatonin on Invasive and Metastatic Properties of MCF-7 Human Breast Cancer Cells1 / S. Cos, R. FernÃ, E.J. Sã // CANCER RESEARCH. – 1998. – Т. 58. – . – С. 4383–4390.

36. Dai M. [и др.]. Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 α induced by CoCl₂ in cultured cancer cells / M. Dai, P. Cui, M. Yu [и др.]. // Journal of Pineal Research. – 2008. – Т. 44. – № 2. – С. 121–126.

37. Dang C. V. [и др.]. The interplay between MYC and HIF in cancer / C. V. Dang, J. Kim, P. Gao [и др.]. // Nature Reviews Cancer. – 2008. – Т. 8. – № 1. – С. 51–56.

38. Dauchy R.T. [и др.]. Circadian and Melatonin Disruption by Exposure to Light at Night Drives Intrinsic Resistance to Tamoxifen Therapy in Breast Cancer / R.T. Dauchy, S. Xiang, L. Mao [и др.]. // Cancer Research. – 2014. – Т. 74. – № 15. – С. 4099–4110.

39. Davidson A. [и др.]. CHRONIC JET-LAG INCREASES MORTALITY IN AGED MICE / A. Davidson, M. Sellix, J. Daniel [и др.]. // Curr Biol. – 2006. – Т. 16. – № 21. – С. 914–916.

40. DiTacchio L. [и др.]. Histone Lysine Demethylase JARID1a Activates CLOCK-BMAL1 and Influences the Circadian Clock / L. DiTacchio, H.D. Le, C. Vollmers [и др.]. // Science. – 2011. – Т. 333. – № 6051. – С. 1881–1885.

41. Dubocovich M.L. [и др.]. Nomenclature , Classification , and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors / M.L. Dubocovich, P. Delagrange, D.N. Krause [и др.]. // Pharmacological Reviews. – 2010. – Т. 62. – № 3. – С. 343–380.

42. Dubocovich M.L. [и др.]. International Union of Basic and Clinical Pharmacology . LXXV . Nomenclature , Classification , and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors / M.L. Dubocovich, P. Delagrange, D.N. Krause [и др.]. 2010. – Т. 62. – № 3. – С. 343–380.

43. Dumont M. [и др.]. Melatonin production and light exposure of rotating night workers. / M. Dumont, V. Lanctôt, R. Cadieux-Viau [и др.]. //

Chronobiology international. – 2012. – Т. 29. – № 2. – С. 203–10.

44. Eide E.J. [и др.]. Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. / E.J. Eide, M.F. Woolf, H. Kang [и др.]. // Molecular and cellular biology. – 2005. – Т. 25. – № 7. – С. 2795–807.

45. El-Athman R., Relógio A. Escaping Circadian Regulation: An Emerging Hallmark of Cancer? / R. El-Athman, A. Relógio // Cell Systems. – 2018. – Т. 6. – № 3. – С. 266–267.

46. Erenberk U. [и др.]. Melatonin attenuates phenytoin sodium-induced DNA damage / U. Erenberk, R. Dundaroz, O. Gok [и др.]. // Drug and chemical toxicology. – 2014. – Т. 37. – № 2. – С. 233–9.

47. Fan C. [и др.]. HDAC1 inhibition by melatonin leads to suppression of lung adenocarcinoma cells via induction of oxidative stress and activation of apoptotic pathways / C. Fan, Y. Pan, Y. Yang [и др.]. // Journal of Pineal Research. – 2015. – Т. 59. – № 3. – С. 321–333.

48. Fan W. [и др.]. The analysis of deregulated expression and methylation of the PER2 genes in gliomas. / W. Fan, X. Chen, C. Li [и др.]. // Journal of cancer research and therapeutics. – Т. 10. – № 3. – С. 636–40.

49. Favero G. [и др.]. Promising Antineoplastic Actions of Melatonin / G. Favero, E. Moretti, F. Bonomini [и др.]. // Frontiers in Pharmacology. – 2018. – Т. 9. – . – С. 1086.

50. Feillet C. [и др.]. Phase locking and multiple oscillating attractors for the coupled mammalian clock and cell cycle / C. Feillet, P. Krusche, F. Tamanini [и др.]. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – Т. 111. – № 27. – С. 9828–9833.

51. Filipski E. [и др.]. Effects of Chronic Jet Lag on Tumor Progression in Mice / E. Filipski, F. Delaunay, V.M. King [и др.]. // Cancer Research. – 2004. – Т. 64. – № 21. – С. 7879–7885.

52. Fonken L.K. [и др.]. Light at night increases body mass by shifting the time of food intake / L.K. Fonken, J.L. Workman, J.C. Walton [и др.]. //

Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2010. – Т. 107. – № 43. – С. 18664–18669.

53. Fonken L.K. [и др.]. Mice exposed to dim light at night exaggerate inflammatory responses to lipopolysaccharide / L.K. Fonken, Z.M. Weil, R.J. Nelson // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2013. – Т. 34. – . – С. 159–163.

54. Fonnes S. [и др.]. Expression of core clock genes in colorectal tumour cells compared with normal mucosa: a systematic review of clinical trials / S. Fonnes, A.M. Donatsky, I. Gögenur // *Colorectal Disease*. – 2015. – Т. 17. – № 4. – С. 290–297.

55. Froy O. Circadian Rhythms, Aging, and Life Span in Mammals / O. Froy // *Physiology*. – 2011. – Т. 26. – № 4. – .

56. Fry E.A. [и др.]. Oncogenic and tumor-suppressive mouse models for breast cancer engaging HER2/neu. / E.A. Fry, P. Taneja, K. Inoue // *International journal of cancer*. – 2017. – Т. 140. – № 3. – С. 495–503.

57. Fu L. [и др.]. The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. / L. Fu, H. Pelicano, J. Liu [и др.]. // *Cell*. – 2002. – Т. 111. – № 1. – С. 41–50.

58. Fuhr L. [и др.]. The Circadian Clock Regulates Metabolic Phenotype Rewiring Via *HKDC1* and Modulates Tumor Progression and Drug Response in Colorectal Cancer. / L. Fuhr, R. El-Athman, R. Scrima [и др.]. // *EBioMedicine*. – 2018. – Т. 33. – . – С. 105–121.

59. Fujita S. [и др.]. Regulation of Circadian Rhythm of Human Vascular Endothelial Growth Factor by Circadian Rhythm of Hypoxia Inducible Factor-1 α : Implication for Clinical Use as Anti-Angiogenic Therapy / S. Fujita, Y. Koyama, M. Higashimoto [и др.]. // *Annals of Cancer Research and Therapy*. – 2010. – Т. 18. – № 1. – С. 28–36.

60. Futagami M. [и др.]. Effects of Melatonin on the Proliferation and cis-Diamminedichloroplatinum (CDDP) Sensitivity of Cultured Human Ovarian Cancer Cells / M. Futagami, S. Sato, T. Sakamoto [и др.]. // *Gynecologic Oncology*. – 2001. – Т. 82. – № 3. – С. 544–549.

61. Gaddameedhi S. [и др.]. Control of skin cancer by the circadian rhythm / S. Gaddameedhi, C.P. Selby, W.K. Kaufmann [и др.]. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2011. – Т. 108. – № 46. – С. 18790–18795.

62. GALL C. VON [и др.]. Melatonin Plays a Crucial Role in the Regulation of Rhythmic Clock Gene Expression in the Mouse Pars Tuberalis / C. VON GALL, D.R. WEAVER, J. MOEK [и др.]. // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2005. – Т. 1040. – № 1. – С. 508–511.

63. Gast H. [и др.]. Transforming growth factor-beta inhibits the expression of clock genes / H. Gast, S. Gordic, S. Petrzilka [и др.]. // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2012. – Т. 1261. – № 1. – С. 79–87.

64. Gauger M.A., Sancar A. Cryptochrome, circadian cycle, cell cycle checkpoints, and cancer. / M.A. Gauger, A. Sancar // Cancer research. – 2005. – Т. 65. – № 15. – С. 6828–34.

65. Gery S. [и др.]. The Circadian Gene Per1 Plays an Important Role in Cell Growth and DNA Damage Control in Human Cancer Cells / S. Gery, N. Komatsu, L. Baldjyan [и др.]. // Molecular Cell. – 2006. – Т. 22. – № 3. – С. 375–382.

66. Gery S. [и др.]. Epigenetic Silencing of the Candidate Tumor Suppressor Gene Per1 in Non-Small Cell Lung Cancer / S. Gery, N. Komatsu, N. Kawamata [и др.]. // Clinical Cancer Research. – 2007. – Т. 13. – № 5. – С. 1399–1404.

67. Geyfman M. [и др.]. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1) controls circadian cell proliferation and susceptibility to UVB-induced DNA damage in the epidermis / M. Geyfman, V. Kumar, Q. Liu [и др.]. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – Т. 109. – № 29. – С. 11758–11763.

68. Ghobadi A. [и др.]. Melatonin Ameliorates Radiation-Induced Oxidative Stress at Targeted and Nontargeted Lung Tissue. / A. Ghobadi, A. Shirazi, M. Najafi [и др.]. // Journal of medical physics. – Т. 42. – № 4. – С.

241–244.

69. Gómez-Corvera A. [и др.]. Evidence of immune system melatonin production by two pineal melatonin deficient mice, C57BL/6 and Swiss strains / A. Gómez-Corvera, I. Cerrillo, P. Molinero [и др.]. // *Journal of Pineal Research*. – 2009. – Т. 47. – № 1. – С. 15–22.

70. Gonze D., Altman B.J. Cancer Clocks Out for Lunch: Disruption of Circadian Rhythm and Metabolic Oscillation in Cancer INTRODUCTION: THE CIRCADIAN CLOCK CONTROLS GENE EXPRESSION AND METABOLISM / D. Gonze, B.J. Altman // *Frontiers in Cell and Developmental Biology Front. Cell Dev. Biol.* – 2016. – Т. 4. – № 4. – .

71. Gotoh T. [и др.]. Model-driven experimental approach reveals the complex regulatory distribution of p53 by the circadian factor Period 2 / T. Gotoh, J.K. Kim, J. Liu [и др.]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2016. – Т. 113. – № 47. – С. 13516–13521.

72. Granda T.G. [и др.]. Circadian regulation of cell cycle and apoptosis proteins in mouse bone marrow and tumor / T.G. Granda, X.-H. Liu, R. Smaaland [и др.]. // *The FASEB Journal*. – 2005. – Т. 19. – № 2. – С. 304–306.

73. Gréchez-Cassiau A. [и др.]. The Circadian Clock Component BMAL1 Is a Critical Regulator of p21 WAF1/CIP1 Expression and Hepatocyte Proliferation / A. Gréchez-Cassiau, B. Rayet, F. Guillaumond [и др.]. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Т. 283. – № 8. – С. 4535–4542.

74. Gu X. [и др.]. The circadian mutation PER2(S662G) is linked to cell cycle progression and tumorigenesis. / X. Gu, L. Xing, G. Shi [и др.]. // *Cell death and differentiation*. – 2012. – Т. 19. – № 3. – С. 397–405.

75. Guglielmelli P. [и др.]. Calreticulin: a new horizon for the testing and treatment of myeloproliferative neoplasms / P. Guglielmelli, N. Bartalucci, G. Rotunno [и др.]. // *Expert Review of Hematology*. – 2014. – Т. 7. – № 4. – С. 423–425.

76. Hablitz L.M. [и др.]. GIRK Channels Mediate the Nonphotic Effects

of Exogenous Melatonin / L.M. Hablitz, H.E. Molzof, K.E. Abrahamsson [и др.]. // *Journal of Neuroscience*. – 2015. – Т. 35. – № 45. – С. 14957–14965.

77. Hadden H. [и др.]. Circadian disruption alters mouse lung clock gene expression and lung mechanics / H. Hadden, S.J. Soldin, D. Massaro // *Journal of Applied Physiology*. – 2012. – Т. 113. – № 3. – С. 385–392.

78. Han Y. [и др.]. Melatonin exerts by an autocrine loop antiproliferative effects in cholangiocarcinoma: its synthesis is reduced favoring cholangiocarcinoma growth. / Y. Han, S. Demorrow, P. Invernizzi [и др.]. // *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. – 2011. – Т. 301. – № 4. – С. G623-33.

79. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation / D. Hanahan, R.A. Weinberg // *Cell*. – 2011. – Т. 144. – № 5. – С. 646–674.

80. Hao J. [и др.]. Melatonin synergizes BRAF-targeting agent vemurafenib in melanoma treatment by inhibiting iNOS/hTERT signaling and cancer-stem cell traits / J. Hao, W. Fan, Y. Li [и др.]. // *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. – 2019. – Т. 38. – № 1. – .

81. Harfmann B.D. [и др.]. Muscle-specific loss of Bmal1 leads to disrupted tissue glucose metabolism and systemic glucose homeostasis / B.D. Harfmann, E.A. Schroder, M.T. Kachman [и др.]. // *Skeletal Muscle*. – 2016. – Т. 6. – № 1. – С. 12.

82. Hastings M.H. [и др.]. Circadian pacemaking in cells and circuits of the suprachiasmatic nucleus. / M.H. Hastings, M. Brancaccio, E.S. Maywood // *Journal of neuroendocrinology*. – 2014. – Т. 26. – № 1. – С. 2–10.

83. Hattar S. [и др.]. Melanopsin and rod–cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice / S. Hattar, R.J. Lucas, N. Mrosovsky [и др.]. // *Nature*. – 2003. – Т. 424. – № 6944. – С. 75–81.

84. Hegazi S. [и др.]. A Symphony of Signals: Intercellular and Intracellular Signaling Mechanisms Underlying Circadian Timekeeping in Mice and Flies / S. Hegazi, C. Lowden, J. Rios Garcia [и др.]. // *International*

Journal of Molecular Sciences. – 2019. – Т. 20. – № 9. – С. 2363.

85. Heiligenberg S. van den [и др.]. The tumor promoting effect of constant light exposure on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. / S. van den Heiligenberg, P. Deprés-Brummer, H. Barbason [и др.]. // Life sciences. – 1999. – Т. 64. – № 26. – С. 2523–34.

86. Hill S.M. [и др.]. Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects. / S.M. Hill, T. Frasch, S. Xiang [и др.]. // Integrative cancer therapies. – 2009. – Т. 8. – № 4. – С. 337–46.

87. Hiragaki S. [и др.]. Melatonin signaling modulates clock genes expression in the mouse retina. / S. Hiragaki, K. Baba, E. Coulson [и др.]. // PloS one. – 2014. – Т. 9. – № 9. – С. e106819.

88. Hoffman A.E. [и др.]. CLOCK in Breast Tumorigenesis: Genetic, Epigenetic, and Transcriptional Profiling Analyses / A.E. Hoffman, C.-H. Yi, T. Zheng [и др.]. // Cancer Research. – 2010. – Т. 70. – № 4. – С. 1459–1468.

89. Hojo H. [и др.]. Remote reprogramming of hepatic circadian transcriptome by breast cancer / H. Hojo, S. Enya, M. Arai [и др.]. // Oncotarget. – 2017. – Т. 8. – № 21. – С. 34128–34140.

90. Honma S. [и др.]. Suprachiasmatic nucleus 2012. – 129–141 с.

91. Hsu C.-M. [и др.]. Altered expression of circadian clock genes in head and neck squamous cell carcinoma. / C.-M. Hsu, S.-F. Lin, C.-T. Lu [и др.]. // Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. – 2012. – Т. 33. – № 1. – С. 149–55.

92. Hu M.-L. [и др.]. Deregulated expression of circadian clock genes in gastric cancer. / M.-L. Hu, K.-T. Yeh, P.-M. Lin [и др.]. // BMC gastroenterology. – 2014. – Т. 14. – № 1. – С. 67.

93. Huisman S.A. [и др.]. Colorectal liver metastases with a disrupted circadian rhythm phase shift the peripheral clock in liver and kidney / S.A. Huisman, M. Oklejewicz, A.R. Ahmadi [и др.]. // International Journal of Cancer. – 2015. – Т. 136. – № 5. – С. 1024–1032.

94. Hunt A.E. [и др.]. Activation of MT 2 melatonin receptors in rat suprachiasmatic nucleus phase advances the circadian clock / A.E. Hunt, W.M. Al-Ghoul, M.U. Gillette [и др.]. // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. – 2001. – Т. 280. – № 1. – С. C110–C118.

95. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Painting, firefighting, and shiftwork. / IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans // *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. – 2010. – Т. 98. – . – С. 9–764.

96. Iwamoto A. [и др.]. Effects of chronic jet lag on the central and peripheral circadian clocks in CBA/N mice / A. Iwamoto, M. Kawai, M. Furuse [и др.]. // *Chronobiology International*. – 2014. – Т. 31. – № 2. – С. 189–198.

97. Izumo M. [и др.]. Differential effects of light and feeding on circadian organization of peripheral clocks in a forebrain *Bmal1* mutant / M. Izumo, M. Pejchal, A.C. Schook [и др.]. // *eLife*. – 2014. – Т. 3. – . – .

98. Janich P. [и др.]. Ribosome profiling reveals the rhythmic liver translome and circadian clock regulation by upstream open reading frames / P. Janich, A.B. Arpat, V. Castelo-Szekely [и др.]. // *Genome Research*. – 2015. – Т. 25. – № 12. – С. 1848–1859.

99. Jardim-Perassi B.V. [и др.]. Effect of Melatonin on Tumor Growth and Angiogenesis in Xenograft Model of Breast Cancer / B.V. Jardim-Perassi, A.S. Arbab, L.C. Ferreira [и др.]. // *PLoS ONE*. – 2014. – Т. 9. – № 1. – С. e85311.

100. Jensen L.D. [и др.]. Opposing Effects of Circadian Clock Genes *Bmal1* and *Period2* in Regulation of VEGF-Dependent Angiogenesis in Developing Zebrafish / L.D. Jensen, Z. Cao, M. Nakamura [и др.]. // *Cell Reports*. – 2012. – Т. 2. – № 2. – С. 231–241.

101. Jiang W. [и др.]. The circadian clock gene *Bmal1* acts as a potential anti-oncogene in pancreatic cancer by activating the p53 tumor suppressor pathway / W. Jiang, S. Zhao, X. Jiang [и др.]. // *Cancer Letters*. – 2016. – Т. 371. – № 2. – С. 314–325.

102. Jin X. [и др.]. Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor. / X. Jin, C. von Gall, R.L. Pieschl [и др.]. // *Molecular and cellular biology*. – 2003. – Т. 23. – № 3. – С. 1054–60.

103. Jockers R. [и др.]. Update on Melatonin Receptors. IUPHAR Review; Update on Melatonin Receptors. IUPHAR Review / R. Jockers, P. Delagrange, M. Dubocovich [и др.]. // *Update on Melatonin Receptors. IUPHAR Review.: Melatonin Receptors. British Journal of Pharmacology*. – 2016. – .

104. Jung-Hynes B. [и др.]. Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells. / B. Jung-Hynes, W. Huang, R.J. Reiter [и др.]. // *Journal of pineal research*. – 2010. – Т. 49. – № 1. – С. 60–8.

105. Kalsbeek A. [и др.]. SCN Outputs and the Hypothalamic Balance of Life / A. Kalsbeek, I.F. Palm, S.E. La Fleur [и др.]. // *Journal of Biological Rhythms*. – 2006. – Т. 21. – № 6. – С. 458–469.

106. Kandalepas P.C. [и др.]. Melatonin Signal Transduction Pathways Require E-Box-Mediated Transcription of Per1 and Per2 to Reset the SCN Clock at Dusk / P.C. Kandalepas, J.W. Mitchell, M.U. Gillette // *PLOS ONE*. – 2016. – Т. 11. – № 6. – С. e0157824.

107. Kang T.-H. [и др.]. Circadian control of XPA and excision repair of cisplatin-DNA damage by cryptochrome and HERC2 ubiquitin ligase. / T.-H. Kang, L.A. Lindsey-Boltz, J.T. Reardon [и др.]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Т. 107. – № 11. – С. 4890–5.

108. Karatsoreos I.N. [и др.]. Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior / I.N. Karatsoreos, S. Bhagat, E.B. Bloss [и др.]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – Т. 108. – № 4. – С. 1657–1662.

109. Kennaway D.J. Melatonin research in mice: a review / D.J. Kennaway // *Chronobiology International*. – 2019. – Т. 36. – № 9. – С. 1167–

1183.

110. Kettner N.M. [и др.]. Circadian Homeostasis of Liver Metabolism Suppresses Hepatocarcinogenesis / N.M. Kettner, H. Voicu, M.J. Finegold [и др.]. // *Cancer Cell*. – 2016. – Т. 30. – № 6. – С. 909–924.

111. Khapre R. V. [и др.]. Circadian clock protein BMAL1 regulates cellular senescence in vivo / R. V. Khapre, A.A. Kondratova, O. Susova [и др.]. // *Cell Cycle*. – 2011. – Т. 10. – № 23. – С. 4162–4169.

112. Kiessling S. [и др.]. The circadian clock in immune cells controls the magnitude of Leishmania parasite infection / S. Kiessling, G. Dubeau-Laramée, H. Ohm [и др.]. // *Scientific Reports*. – 2017. – Т. 7. – № 1. – С. 10892.

113. Kim C.H., Yoo Y.-M. Melatonin Induces Apoptotic Cell Death via p53 in LNCaP Cells / C.H. Kim, Y.-M. Yoo // *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2010. – Т. 14. – № 6. – С. 365.

114. Kim H.S. [и др.]. Melatonin Combined with Endoplasmic Reticulum Stress Induces Cell Death via the PI3K/Akt/mTOR Pathway in B16F10 Melanoma Cells / H.S. Kim, T.-J. Kim, Y.-M. Yoo // *PLoS ONE*. – 2014. – Т. 9. – № 3. – С. e92627.

115. Kim K.-J. [и др.]. Melatonin suppresses tumor progression by reducing angiogenesis stimulated by HIF-1 in a mouse tumor model. / K.-J. Kim, J.-S. Choi, I. Kang [и др.]. // *Journal of pineal research*. – 2013. – Т. 54. – № 3. – С. 264–70.

116. Koike N. [и др.]. Transcriptional Architecture and Chromatin Landscape of the Core Circadian Clock in Mammals / N. Koike, S.-H. Yoo, H.-C. Huang [и др.]. // *Science*. – 2012. – Т. 338. – № 6105. – С. 349–354.

117. Kojima S. [и др.]. Circadian control of mRNA polyadenylation dynamics regulates rhythmic protein expression / S. Kojima, E.L. Sher-Chen, C.B. Green // *Genes & Development*. – 2012. – Т. 26. – № 24. – С. 2724–2736.

118. Kondratov R. V [и др.]. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. / R. V

Kondratov, A.A. Kondratova, V.Y. Gorbacheva [и др.]. // *Genes & development*. – 2006. – Т. 20. – № 14. – С. 1868–73.

119. Kontek R., Nowicka H. The modulatory effect of melatonin on genotoxicity of irinotecan in healthy human lymphocytes and cancer cells / R. Kontek, H. Nowicka // *Drug and Chemical Toxicology*. – 2013. – Т. 36. – № 3. – С. 335–342.

120. Konturek P.C. [и др.]. Gut clock: implication of circadian rhythms in the gastrointestinal tract. / P.C. Konturek, T. Brzozowski, S.J. Konturek // *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*. – 2011. – Т. 62. – № 2. – С. 139–50.

121. Korf H.W., Gall C. von Mice, melatonin and the circadian system / H.W. Korf, C. von Gall // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2006. – Т. 252. – № 1–2. – С. 57–68.

122. Korkmaz T. [и др.]. Opposite Carcinogenic Effects of Circadian Clock Gene BMAL1 / T. Korkmaz, F. Aygenli, H. Emisoglu [и др.]. // *Scientific Reports*. – 2018. – Т. 8. – № 1. – С. 16023.

123. Kornmann B. [и др.]. System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock / B. Kornmann, O. Schaad, H. Bujard [и др.]. // *PLoS Biology*. – 2007. – Т. 5. – № 2. – С. 0179–0189.

124. Koyanagi S. [и др.]. A molecular mechanism regulating circadian expression of vascular endothelial growth factor in tumor cells. / S. Koyanagi, Y. Kuramoto, H. Nakagawa [и др.]. // *Cancer research*. – 2003. – Т. 63. – № 21. – С. 7277–83.

125. Kumar A. [и др.]. Effect of melatonin on two stage skin carcinogenesis in Swiss mice / A. Kumar, C.A. Kumar, U.N. Das // *Med Sci Monit*. – 2000. – Т. 6. – № 3. – С. 471–475.

126. Kuo S.-J. [и др.]. Disturbance of circadian gene expression in breast cancer / S.-J. Kuo, S.-T. Chen, K.-T. Yeh [и др.]. // *Virchows Archiv*. – 2009. – Т. 454. – № 4. – С. 467–474.

127. Lamia K.A. [и др.]. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock / K.A. Lamia, K.-F. Storch, C.J. Weitz // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Т. 105. – № 39. – С. 15172–15177.

128. Lamia K.A. Ticking time bombs: connections between circadian clocks and cancer. / K.A. Lamia // *F1000Research*. – 2017. – Т. 6. – . – С. 1910.

129. Lee B. [и др.]. CREB Influences Timing and Entrainment of the SCN Circadian Clock / B. Lee, Aiqing Li, K.F. Hansen [и др.]. // *Journal of Biological Rhythms*. – 2010. – Т. 25. – № 6. – С. 410–420.

130. Lee C. [и др.]. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. / C. Lee, J.P. Etchegaray, F.R. Cagampang [и др.]. // *Cell*. – 2001. – Т. 107. – № 7. – С. 855–67.

131. Lee S. [и др.]. Disrupting circadian homeostasis of sympathetic signaling promotes tumor development in mice. / S. Lee, L.A. Donehower, A.J. Herron [и др.]. // *PloS one*. – 2010. – Т. 5. – № 6. – С. e10995.

132. Lengyel Z. [и др.]. Altered expression patterns of clock gene mRNAs and clock proteins in human skin tumors. / Z. Lengyel, C. Lovig, S. Kommedal [и др.]. // *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. – 2013. – Т. 34. – № 2. – С. 811–9.

133. Leon-Blanco M.M. [и др.]. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro. / M.M. Leon-Blanco, J.M. Guerrero, R.J. Reiter [и др.]. // *Journal of pineal research*. – 2003. – Т. 35. – № 3. – С. 204–11.

134. Lesicka M. [и др.]. Altered circadian genes expression in breast cancer tissue according to the clinical characteristics. / M. Lesicka, E. Jabłońska, E. Wiczorek [и др.]. // *PloS one*. – 2018. – Т. 13. – № 6. – С. e0199622.

135. Lin Y.-M. [и др.]. Disturbance of circadian gene expression in hepatocellular carcinoma / Y.-M. Lin, J.H. Chang, K.-T. Yeh [и др.]. //

Molecular Carcinogenesis. – 2008. – Т. 47. – № 12. – С. 925–933.

136. Liu C. [и др.]. Molecular Dissection of Two Distinct Actions of Melatonin on the Suprachiasmatic Circadian Clock / C. Liu, D.R. Weaver, X. Jin [и др.]. // *Neuron*. – 1997. – Т. 19. – № 1. – С. 91–102.

137. Liu H. [и др.]. Role of CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Melatonin-Mediated Inhibition of Murine Gastric Cancer Cell Growth In Vivo and In Vitro / H. Liu, L. Xu, J.-E. Wei [и др.]. // *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. – 2011. – Т. 294. – № 5. – С. 781–788.

138. Liu R. [и др.]. Melatonin enhances DNA repair capacity possibly by affecting genes involved in DNA damage responsive pathways / R. Liu, A. Fu, A.E. Hoffman [и др.]. // *BMC Cell Biology*. – 2013. – Т. 14. – № 1. – С. 1.

139. Logan R.W. [и др.]. Chronic Shift-Lag Alters the Circadian Clock of NK Cells and Promotes Lung Cancer Growth in Rats / R.W. Logan, C. Zhang, S. Murugan [и др.]. // *The Journal of Immunology*. – 2012. – Т. 188. – № 6. – С. 2583–2591.

140. Long F. [и др.]. Melatonin enhances the anti-tumor effect of sorafenib via AKT/p27-mediated cell cycle arrest in hepatocarcinoma cell lines / F. Long, C. Dong, K. Jiang [и др.]. // *RSC Advances*. – 2017. – Т. 7. – № 34. – С. 21342–21351.

141. Luo Y. [и др.]. Deregulated expression of Cry1 and Cry2 in human gliomas / Y. Luo, F. Wang, L.A. Chen [и др.]. // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2012. – Т. 13. – № 11. – С. 5725–5728.

142. Mailliet F. [и др.]. Characterization of the melatonergic MT3 binding site on the NRH:quinone oxidoreductase 2 enzyme / F. Mailliet, G. Ferry, F. Vella [и др.]. // *Biochemical Pharmacology*. – 2005. – Т. 71. – № 1–2. – С. 74–88.

143. Mao L. [и др.]. Melatonin Represses Metastasis in Her2-Positive Human Breast Cancer Cells by Suppressing RSK2 Expression / L. Mao, W. Summers, S. Xiang [и др.]. // *Molecular Cancer Research*. – 2016. – Т. 14. –

№ 11. – С. 1159–1169.

144. Marcheva B. [и др.]. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. / B. Marcheva, K.M. Ramsey, E.D. Buhr [и др.]. // *Nature*. – 2010. – Т. 466. – № 7306. – С. 627–31.

145. Martelot G. Le [и др.]. Genome-Wide RNA Polymerase II Profiles and RNA Accumulation Reveal Kinetics of Transcription and Associated Epigenetic Changes During Diurnal Cycles / G. Le Martelot, D. Canella, L. Symul [и др.]. // *PLoS Biology*. – 2012. – Т. 10. – № 11. – С. e1001442.

146. Masri S. [и др.]. Lung Adenocarcinoma Distally Rewires Hepatic Circadian Homeostasis / S. Masri, T. Papagiannakopoulos, K. Kinouchi [и др.]. // *Cell*. – 2016. – Т. 165. – № 4. – С. 896–909.

147. Matsuo T. [и др.]. Control Mechanism of the Circadian Clock for Timing of Cell Division in Vivo / T. Matsuo, S. Yamaguchi, S. Mitsui [и др.]. // *Science*. – 2003. – Т. 302. – № 5643. – С. 255–259.

148. Mazzocchi G. [и др.]. Altered expression of the clock gene machinery in kidney cancer patients. / G. Mazzocchi, A. Piepoli, M. Carella [и др.]. // *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. – 2012. – Т. 66. – № 3. – С. 175–9.

149. McArthur A.J. [и др.]. Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro / A.J. McArthur, M.U. Gillette, R.A. Prosser // *Brain Research*. – 1991. – Т. 565. – № 1. – С. 158–161.

150. McArthur A.J. [и др.]. Melatonin Action and Signal Transduction in the Rat Suprachiasmatic Circadian Clock: Activation of Protein Kinase C at Dusk and Dawn* / A.J. McArthur, A.E. Hunt, M.U. Gillette // *Endocrinology*. – 1997. – Т. 138. – № 2. – С. 627–634.

151. Megdal S.P. [и др.]. Night work and breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis / S.P. Megdal, C.H. Kroenke, F. Laden [и др.]. // *European Journal of Cancer*. – 2005. – Т. 41. – № 13. – С. 2023–2032.

152. Mendoza-Viveros L. [и др.]. Molecular modulators of the circadian

clock: lessons from flies and mice / L. Mendoza-Viveros, P. Bouchard-Cannon, S. Hegazi [и др.]. // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2017. – Т. 74. – № 6. – С. 1035–1059.

153. Mendoza J. [и др.]. Feeding Cues Alter Clock Gene Oscillations and Photic Responses in the Suprachiasmatic Nuclei of Mice Exposed to a Light/Dark Cycle / J. Mendoza, C. Graff, H. Dardente [и др.]. // Journal of Neuroscience. – 2005. – Т. 25. – № 6. – С. 1514–1522.

154. Menet J.S. [и др.]. Nascent-Seq reveals novel features of mouse circadian transcriptional regulation / J.S. Menet, J. Rodriguez, K.C. Abruzzi [и др.]. // eLife. – 2012. – Т. 1. – . – .

155. Menet J.S. [и др.]. CLOCK:BMAL1 is a pioneer-like transcription factor / J.S. Menet, S. Pescatore, M. Rosbash // Genes & Development. – 2014. – Т. 28. – № 1. – С. 8–13.

156. Mocchegiani E. [и др.]. Melatonin administration in tumor-bearing mice (intact and pinealectomized) in relation to stress, zinc, thymulin and IL-2. / E. Mocchegiani, L. Perissin, L. Santarelli [и др.]. // International journal of immunopharmacology. – 1999. – Т. 21. – № 1. – С. 27–46.

157. Moore R.Y. [и др.]. Suprachiasmatic nucleus organization. / R.Y. Moore, J.C. Speh, R.K. Leak // Cell and tissue research. – 2002. – Т. 309. – № 1. – С. 89–98.

158. Mteyrek A. [и др.]. Critical cholangiocarcinogenesis control by cryptochrome clock genes / A. Mteyrek, E. Filipski, C. Guettier [и др.]. // International Journal of Cancer. – 2017. – Т. 140. – № 11. – С. 2473–2483.

159. Muñoz M. [и др.]. Long-Term Constant Light Induces Constitutive Elevated Expression of mPER2 Protein in the Murine SCN: A Molecular Basis for Aschoff's Rule? / M. Muñoz, S.N. Peirson, M.W. Hankins [и др.]. // Journal of Biological Rhythms. – 2005. – Т. 20. – № 1. – С. 3–14.

160. Musatov S.A. [и др.]. [The influence of melatonin on mutagenicity and antitumor action of cytostatic drugs in mice]. / S.A. Musatov, S. V Rosenfeld, E.F. Togo [и др.]. // Voprosy onkologii. – 1997. – Т. 43. – № 6. –

C. 623–7.

161. Ohta H. [и др.]. Constant light desynchronizes mammalian clock neurons / H. Ohta, S. Yamazaki, D.G. McMahon // *Nature Neuroscience*. – 2005. – Т. 8. – № 3. – С. 267–269.

162. Oishi K. [и др.]. Disrupted light–dark cycle abolishes circadian expression of peripheral clock genes without inducing behavioral arrhythmicity in mice / K. Oishi, S. Higo-Yamamoto, S. Yamamoto [и др.]. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2015. – Т. 458. – № 2. – С. 256–261.

163. Otálora B.B. [и др.]. Effects of exogenous melatonin and circadian synchronization on tumor progression in melanoma-bearing C57BL6 mice. / B.B. Otálora, J.A. Madrid, N. Alvarez [и др.]. // *Journal of pineal research*. – 2008. – Т. 44. – № 3. – С. 307–15.

164. Ozturk N. [и др.]. Loss of cryptochrome reduces cancer risk in p53 mutant mice. / N. Ozturk, J.H. Lee, S. Gaddameedhi [и др.]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Т. 106. – № 8. – С. 2841–6.

165. Panchenko A. V. [и др.]. Biomarkers of aging, life span and spontaneous carcinogenesis in the wild type and HER-2 transgenic FVB/N female mice / A. V. Panchenko, I.G. Popovich, A.P. Trashkov [и др.]. // *Biogerontology*. – 2016. – Т. 17. – № 2. – С. 317–324.

166. Papagiannakopoulos T. [и др.]. Circadian Rhythm Disruption Promotes Lung Tumorigenesis Cell Metabolism Circadian Rhythm Disruption Promotes Lung Tumorigenesis / T. Papagiannakopoulos, M.R. Bauer, S.M. Davidson [и др.]. // *Cell Metabolism*. – 2016. – Т. 24. – . – С. 324–331.

167. Papagiannakopoulos T. [и др.]. Circadian Rhythm Disruption Promotes Lung Tumorigenesis. / T. Papagiannakopoulos, M.R. Bauer, S.M. Davidson [и др.]. // *Cell metabolism*. – 2016. – Т. 24. – № 2. – С. 324–31.

168. Parent M.-E. [и др.]. Night Work and the Risk of Cancer Among Men / M.-E. Parent, M. El-Zein, M.-C. Rousseau [и др.]. // *American Journal*

of Epidemiology. – 2012. – Т. 176. – № 9. – С. 751–759.

169. Park S.-Y. [и др.]. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 α stabilization under hypoxia. / S.-Y. Park, W.-J. Jang, E.-Y. Yi [и др.]. // Journal of pineal research. – 2010. – Т. 48. – № 2. – С. 178–84.

170. Parker K.P. [и др.]. Sleep/Wake Patterns of Individuals With Advanced Cancer Measured by Ambulatory Polysomnography / K.P. Parker, D.L. Bliwise, M. Ribeiro [и др.]. // Journal of Clinical Oncology. – 2008. – Т. 26. – № 15. – С. 2464–2472.

171. Paroni R. [и др.]. Antitumour activity of melatonin in a mouse model of human prostate cancer: relationship with hypoxia signalling / R. Paroni, L. Terraneo, F. Bonomini [и др.]. // Journal of Pineal Research. – 2014. – Т. 57. – № 1. – С. 43–52.

172. Partch C.L. [и др.]. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. / C.L. Partch, C.B. Green, J.S. Takahashi // Trends in cell biology. – 2014. – Т. 24. – № 2. – С. 90–9.

173. Payne J.K. Altered Circadian Rhythms and Cancer-Related Fatigue Outcomes / J.K. Payne // Integrative Cancer Therapies. – 2011. – Т. 10. – № 3. – С. 221–233.

174. Perelis M. [и др.]. Pancreatic β cell enhancers regulate rhythmic transcription of genes controlling insulin secretion / M. Perelis, B. Marcheiva, K.M. Ramsey [и др.]. // Science. – 2015. – Т. 350. – № 6261. – .

175. Pickard G.E., Sollars P.J. Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. – 59–90 с.

176. Pizarro J.G. [и др.]. The antiproliferative activity of melatonin in B65 rat dopaminergic neuroblastoma cells is related to the downregulation of cell cycle-related genes / J.G. Pizarro, M. Yeste-Velasco, J.L. Esparza [и др.]. // Journal of Pineal Research. – 2008. – Т. 45. – № 1. – С. 8–16.

177. Plaimée P. [и др.]. Melatonin potentiates cisplatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells / P. Plaimée, N.

Weerapreeyakul, S. Barusrux [и др.]. // *Cell Proliferation*. – 2015. – Т. 48. – № 1. – С. 67–77.

178. Plikus M. V. [и др.]. Local circadian clock gates cell cycle progression of transient amplifying cells during regenerative hair cycling / M. V. Plikus, C. Vollmers, D. de la Cruz [и др.]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – Т. 110. – № 23. – С. E2106–E2115.

179. Plikus M. V. [и др.]. The circadian clock in skin: Implications for adult stem cells, tissue regeneration, cancer, aging, and immunity // *Journal of Biological Rhythms*. 2015. Т. 30. № 3. 163–182 с.

180. Pomerantz J.H., Blau H.M. Tumor suppressors: enhancers or suppressors of regeneration? / J.H. Pomerantz, H.M. Blau // *Development*. – 2013. – Т. 140. – № 12. – С. 2502–2512.

181. Proietti S. [и др.]. Melatonin and vitamin D3 synergistically down-regulate Akt and MDM2 leading to TGF β -1-dependent growth inhibition of breast cancer cells / S. Proietti, A. Cucina, F. D'Anselmi [и др.]. // *Journal of Pineal Research*. – 2010. – Т. 50. – № 2. – С. no-no.

182. Puram R. V [и др.]. Core Circadian Clock Genes Regulate Leukemia Stem Cells in AML. / R. V Puram, M.S. Kowalczyk, C.G. de Boer [и др.]. // *Cell*. – 2016. – Т. 165. – № 2. – С. 303–16.

183. Qiu M. [и др.]. Research on circadian clock genes in non-small-cell lung carcinoma / M. Qiu, Y. Bing Chen, S. Jin [и др.]. // *Chronobiology International*. – 2019. – Т. 36. – № 6. – С. 739–750.

184. Reiter R.J. [и др.]. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. / R.J. Reiter, D.-X. Tan, J.C. Mayo [и др.]. // *Acta biochimica Polonica*. – 2003. – Т. 50. – № 4. – С. 1129–46.

185. Reiter R.J. [и др.]. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. / R.J. Reiter, S.A. Rosales-Corral, D.-X. Tan [и др.]. // *International journal of molecular sciences*. – 2017. – Т. 18. – № 4. – .

186. Reiter R.J. [и др.]. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas / R.J. Reiter, S. Rosales-Corral, D.X. Tan [и др.]. // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2017. – Т. 74. – № 21. – С. 3863–3881.

187. Relles D. [и др.]. Circadian Gene Expression and Clinicopathologic Correlates in Pancreatic Cancer / D. Relles, J. Sendeki, G. Chipitsyna [и др.]. // Journal of Gastrointestinal Surgery. – 2013. – Т. 17. – № 3. – С. 443–450.

188. Repouskou A., Prombona A. c-MYC targets the central oscillator gene Per1 and is regulated by the circadian clock at the post-transcriptional level / A. Repouskou, A. Prombona // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms. – 2016. – Т. 1859. – № 4. – С. 541–552.

189. Reyna J.C. [и др.]. [Mitotic activity of duodenal-crypt enterocytes in mice with hepatocarcinoma]. / J.C. Reyna, C.G. Barbeito, A.F. Badrán [и др.]. // Medicina. – 1997. – Т. 57. – № 6. – С. 708–12.

190. Roenneberg T., Merrow M. The circadian clock and human health // Current Biology. 2016. Т. 26. № 10. R432–R443 с.

191. Roskoski R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer / R. Roskoski // Pharmacological Research. – 2014. – Т. 79. – . – С. 34–74.

192. Rubio S. [и др.]. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by melatonin in human myeloid HL-60 cells / S. Rubio, F. Estévez, J. Cabrera [и др.]. // Journal of Pineal Research. – 2007. – Т. 42. – № 2. – С. 131–138.

193. Sanchez-Sanchez A.M. [и др.]. Melatonin Cytotoxicity Is Associated to Warburg Effect Inhibition in Ewing Sarcoma Cells / A.M. Sanchez-Sanchez, I. Antolin, N. Puente-Moncada [и др.]. // PLOS ONE. – 2015. – Т. 10. – № 8. – С. e0135420.

194. Sandu C. [и др.]. Circadian clocks in rat skin and dermal fibroblasts: differential effects of aging, temperature and melatonin. / C. Sandu, T. Liu, A. Malan [и др.]. // Cellular and molecular life sciences : CMLS. – 2015. – Т. 72.

– № 11. – С. 2237–48.

195. Santoro R. [и др.]. Melatonin triggers p53Ser phosphorylation and prevents DNA damage accumulation. / R. Santoro, M. Marani, G. Blandino [и др.]. // *Oncogene*. – 2012. – Т. 31. – № 24. – С. 2931–42.

196. Savvidis C., Koutsilieris M. Circadian rhythm disruption in cancer biology. / C. Savvidis, M. Koutsilieris // *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*. – 2012. – Т. 18. – . – С. 1249–60.

197. Scheiermann C. [и др.]. Circadian control of the immune system. / C. Scheiermann, Y. Kunisaki, P.S. Frenette // *Nature reviews. Immunology*. – 2013. – Т. 13. – № 3. – С. 190–8.

198. Schernhammer E.S. [и др.]. Night-Shift Work and Risk of Colorectal Cancer in the Nurses' Health Study / E.S. Schernhammer, F. Laden, F.E. Speizer [и др.]. // *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. – 2003. – Т. 95. – № 11. – С. 825–828.

199. Schernhammer E.S. [и др.]. Rotating Night Shifts and Risk of Skin Cancer in the Nurses' Health Study / E.S. Schernhammer, P. Razavi, T.Y. Li [и др.]. // *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. – 2011. – Т. 103. – № 7. – С. 602–606.

200. Schmidt T.M. [и др.]. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions / T.M. Schmidt, S.-K. Chen, S. Hattar // *Trends in Neurosciences*. – 2011. – Т. 34. – № 11. – С. 572–580.

201. Schroeder A.M., Colwell C.S. How to fix a broken clock / A.M. Schroeder, C.S. Colwell // *Trends Pharmacol Sci*. – 2013. – Т. 34. – № 11. – .

202. Schwartz M.D. [и др.]. Dissociation of circadian and light inhibition of melatonin release through forced desynchronization in the rat. / M.D. Schwartz, C. Wotus, T. Liu [и др.]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Т. 106. – № 41. – С. 17540–5.

203. Schwimmer H. [и др.]. Light at night and melatonin have opposite effects on breast cancer tumors in mice assessed by growth rates and global

DNA methylation / H. Schwimmer, A. Metzger, Y. Pilosof [и др.]. // *Chronobiology International*. – 2014. – Т. 31. – № 1. – С. 144–150.

204. Shah P.N. [и др.]. Effect of melatonin on mammary carcinogenesis in intact and pinealectomized rats in varying photoperiods. / P.N. Shah, M.C. Mhatre, L.S. Kothari // *Cancer research*. – 1984. – Т. 44. – № 8. – С. 3403–7.

205. Shay J.W., Wright W.E. Telomeres and telomerase: three decades of progress / J.W. Shay, W.E. Wright // *Nature Reviews Genetics*. – 2019. – Т. 20. – № 5. – С. 299–309.

206. Shilts J. [и др.]. Evidence for widespread dysregulation of circadian clock progression in human cancer / J. Shilts, G. Chen, J.J. Hughey // *PeerJ*. – 2018. – Т. 6. – . – С. e4327.

207. Shostak A. Human Clock Genes and Cancer / A. Shostak // *Current Sleep Medicine Reports*. – 2018. – Т. 4. – № 1. – С. 65–73.

208. Shuboni D., Yan L. Nighttime dim light exposure alters the responses of the circadian system / D. Shuboni, L. Yan // *Neuroscience*. – 2010. – Т. 170. – № 4. – С. 1172–1178.

209. Siffroi-Fernandez S. [и др.]. Functional genomics identify Birc5 / Survivin as a candidate gene involved in the chronotoxicity of cyclin-dependent kinase inhibitors / S. Siffroi-Fernandez, S. Dulong, X.-M. Li [и др.]. // *Cell Cycle*. – 2014. – Т. 13. – № 6. – С. 984–991.

210. Sliwinski T. [и др.]. Protective action of melatonin against oxidative DNA damage: chemical inactivation versus base-excision repair. / T. Sliwinski, W. Rozej, A. Morawiec-Bajda [и др.]. // *Mutation research*. – 2007. – Т. 634. – № 1–2. – С. 220–7.

211. Slominski A.T. [и др.]. ROR α and ROR γ are expressed in human skin and serve as receptors for endogenously produced noncalcemic 20-hydroxy- and 20,23-dihydroxyvitamin D / A.T. Slominski, T.-K. Kim, Y. Takeda [и др.]. // *The FASEB Journal*. – 2014. – Т. 28. – № 7. – С. 2775–2789.

212. Slominski A.T. [и др.]. ROR α is not a receptor for melatonin

(response to DOI 10.1002/bies.201600018). / A.T. Slominski, M.A. Zmijewski, A.M. Jetten // *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. – 2016. – Т. 38. – № 12. – С. 1193–1194.

213. Sollars P.J., Pickard G.E. Vasoactive Intestinal Peptide Efferent Projections of the Suprachiasmatic Nucleus in Anterior Hypothalamic Transplants: Correlation with Functional Restoration of Circadian Behavior / P.J. Sollars, G.E. Pickard // *Experimental Neurology*. – 1995. – Т. 136. – № 1. – С. 1–11.

214. Soták M. [и др.]. An association between clock genes and clock-controlled cell cycle genes in murine colorectal tumors. / M. Soták, L. Polidarová, P. Ergang [и др.]. // *International journal of cancer*. – 2013. – Т. 132. – № 5. – С. 1032–41.

215. Stiller J.W., Postolache T.T. Sleep-wake and Other Biological Rhythms: Functional Neuroanatomy / J.W. Stiller, T.T. Postolache // *Clinics in Sports Medicine*. – 2005. – Т. 24. – № 2. – С. 205–235.

216. Storch K.-F. [и др.]. Intrinsic Circadian Clock of the Mammalian Retina: Importance for Retinal Processing of Visual Information / K.-F. Storch, C. Paz, J. Signorovitch [и др.]. // *Cell*. – 2007. – Т. 130. – № 4. – С. 730–741.

217. Su S.C. [и др.]. Cancer metastasis: Mechanisms of inhibition by melatonin // *Journal of Pineal Research*. 2017. Т. 62. № 1.

218. Su X. [и др.]. The circadian clock gene PER2 plays an important role in tumor suppression through regulating tumor-associated genes in human oral squamous cell carcinoma / X. Su, D. Chen, K. Yang [и др.]. // *Oncology Reports*. – 2017. – Т. 38. – № 1. – С. 472–480.

219. Subramanian A., Kothari L. Melatonin, a suppressor of spontaneous murine mammary tumors. / A. Subramanian, L. Kothari // *Journal of pineal research*. – 1991. – Т. 10. – № 3. – С. 136–40.

220. Sudo M. [и др.]. Constant light housing attenuates circadian rhythms of mPer2 mRNA and mPER2 protein expression in the suprachiasmatic nucleus of mice. / M. Sudo, K. Sasahara, T. Moriya [и др.]. // *Neuroscience*. –

2003. – Т. 121. – № 2. – С. 493–9.

221. Sujino M. [и др.]. Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice. / M. Sujino, K. Masumoto, S. Yamaguchi [и др.]. // *Current biology: CB.* – 2003. – Т. 13. – № 8. – С. 664–8.

222. Tahara Y. [и др.]. In Vivo Monitoring of Peripheral Circadian Clocks in the Mouse / Y. Tahara, H. Kuroda, K. Saito [и др.]. // *Current Biology.* – 2012. – Т. 22. – № 11. – С. 1029–1034.

223. Tahara Y. [и др.]. The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise / Y. Tahara, S. Aoyama, S. Shibata // *The Journal of Physiological Sciences.* – 2017. – Т. 67. – № 1. – С. 1–10.

224. Takahashi J.S. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock / J.S. Takahashi // *Nature reviews. Genetics.* – 2017. – Т. 18. – № 3. – С. 164.

225. Taketo M. [и др.]. FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. / M. Taketo, A.C. Schroeder, L.E. Mobraaten [и др.]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 1991. – Т. 88. – № 6. – С. 2065–9.

226. Talib W. Melatonin and Cancer Hallmarks / W. Talib // *Molecules.* – 2018. – Т. 23. – № 3. – С. 518.

227. Talib W.H., Saleh S. Propionibacterium acnes Augments Antitumor, Anti-Angiogenesis and Immunomodulatory Effects of Melatonin on Breast Cancer Implanted in Mice. / W.H. Talib, S. Saleh // *PloS one.* – 2015. – Т. 10. – № 4. – С. e0124384.

228. Tamarkin L. [и др.]. Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat. / L. Tamarkin, M. Cohen, D. Roselle [и др.]. // *Cancer research.* – 1981. – Т. 41. – № 11 Pt 1. – С. 4432–6.

229. Tan X.-M. [и др.]. Circadian variations of clock gene Per2 and cell cycle genes in different stages of carcinogenesis in golden hamster buccal

mucosa / X.-M. Tan, H. Ye, K. Yang [и др.]. // *Scientific Reports*. – 2015. – Т. 5. – № 1. – С. 9997.

230. Tang Q. [и др.]. Circadian Clock Gene Bmal1 Inhibits Tumorigenesis and Increases Paclitaxel Sensitivity in Tongue Squamous Cell Carcinoma / Q. Tang, B. Cheng, M. Xie [и др.]. // *Cancer Research*. – 2017. – Т. 77. – № 2. – С. 532–544.

231. Tanioka M. [и др.]. Molecular clocks in mouse skin / M. Tanioka, H. Yamada, M. Doi [и др.]. // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2009. – Т. 129. – № 5. – С. 1225–1231.

232. Tapia-Osorio A. [и др.]. Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat / A. Tapia-Osorio, R. Salgado-Delgado, M. Angeles-Castellanos [и др.]. // *Behavioural Brain Research*. – 2013. – Т. 252. – . – С. 1–9.

233. Tavano F. [и др.]. SIRT1 and circadian gene expression in pancreatic ductal adenocarcinoma: Effect of starvation / F. Tavano, V. Paziienza, A. Fontana [и др.]. // *Chronobiology International*. – 2015. – Т. 32. – № 4. – С. 497–512.

234. Thoennissen N.H. [и др.]. Transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein alpha and critical circadian clock downstream target gene PER2 are highly deregulated in diffuse large B-cell lymphoma. / N.H. Thoennissen, G.B. Thoennissen, S. Abbassi [и др.]. // *Leukemia & lymphoma*. – 2012. – Т. 53. – № 8. – С. 1577–85.

235. Tokunaga H. [и др.]. Clinicopathological significance of circadian rhythm-related gene expression levels in patients with epithelial ovarian cancer / H. Tokunaga, Y. Takebayashi, H. Utsunomiya [и др.]. // *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. – 2008. – Т. 87. – № 10. – С. 1060–1070.

236. Trott A.J., Menet J.S. Regulation of circadian clock transcriptional output by CLOCK:BMAL1. / A.J. Trott, J.S. Menet // *PLoS genetics*. – 2018. – Т. 14. – № 1. – С. e1007156.

237. Tsoummtsa L.L. [и др.]. Circadian Control of Antibacterial Immunity:

Findings from Animal Models. / L.L. Tsoumtsa, C. Torre, E. Ghigo // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2016. – Т. 6. – . – С. 54.

238. Turek F.W. [и др.]. Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice / F.W. Turek, C. Joshu, A. Kohsaka [и др.]. // *Science*. – 2005. – Т. 308. – № 5724. – С. 1043–1045.

239. Turjanski A.G. [и др.]. NMR and molecular dynamics studies of the interaction of melatonin with calmodulin / A.G. Turjanski, D.A. Estrin, R.E. Rosenstein [и др.]. // *Protein Science*. – 2008. – Т. 13. – № 11. – С. 2925–2938.

240. Vinogradova I.A. [и др.]. Circadian disruption induced by light-at-night accelerates aging and promotes tumorigenesis in rats. / I.A. Vinogradova, V.N. Anisimov, A. V Bukalev [и др.]. // *Aging*. – 2009. – Т. 1. – № 10. – С. 855–65.

241. Virshup D.M. [и др.]. Reversible Protein Phosphorylation Regulates Circadian Rhythms / D.M. Virshup, E.J. Eide, D.B. Forger [и др.]. // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. – 2007. – Т. 72. – № 1. – С. 413–420.

242. Waly N.E., Hallworth R. Circadian Pattern of Melatonin MT1 and MT2 Receptor Localization in the Rat Suprachiasmatic Nucleus / N.E. Waly, R. Hallworth // *Journal of Circadian Rhythms*. – 2015. – Т. 13. – № 1. – С. 1.

243. Wang C.-Y. [и др.]. Increased vascular senescence and impaired endothelial progenitor cell function mediated by mutation of circadian gene *Per2*. / C.-Y. Wang, M.-S. Wen, H.-W. Wang [и др.]. // *Circulation*. – 2008. – Т. 118. – № 21. – С. 2166–73.

244. Wang F. [и др.]. The Circadian Gene Clock Plays an Important Role in Cell Apoptosis and the DNA Damage Response In Vitro / F. Wang, C. Li, Yongluo [и др.]. // *Technology in Cancer Research & Treatment*. – 2016. – Т. 15. – № 3. – С. 480–486.

245. Wang J. [и др.]. Circadian protein BMAL1 promotes breast cancer cell invasion and metastasis by up-regulating matrix metalloproteinase9

expression. / J. Wang, S. Li, X. Li [и др.]. // *Cancer cell international*. – 2019. – Т. 19. – . – С. 182.

246. Wang Y. [и др.]. Upregulation of circadian gene «hClock» contribution to metastasis of colorectal cancer / Y. Wang, N. Sun, C. Lu [и др.]. // *International Journal of Oncology*. – 2017. – Т. 50. – № 6. – С. 2191–2199.

247. Wee R. [и др.]. Loss of photic entrainment and altered free-running circadian rhythms in *math5*^{-/-} mice. / R. Wee, A.M. Castrucci, I. Provencio [и др.]. // *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. – 2002. – Т. 22. – № 23. – С. 10427–33.

248. Winter S.L. [и др.]. Expression of the Circadian Clock Genes *Per1*, *Per2* in Sporadic, Familial Breast Tumors / S.L. Winter, L. Bosnoyan-Collins, D. Pinnaduwege [и др.]. // *Neoplasia*. – 2007. – Т. 9. – № 10. – С. 797–800.

249. Wu H.-J. [и др.]. Melatonin ameliorates bisphenol A-induced DNA damage in the germ cells of adult male rats. / H.-J. Wu, C. Liu, W.-X. Duan [и др.]. // *Mutation research*. – 2013. – Т. 752. – № 1–2. – С. 57–67.

250. Xia H.C. [и др.]. Deregulated expression of the *Per1* and *Per2* in human gliomas / H.C. Xia, Z.F. Niu, H. Ma [и др.]. // *Canadian Journal of Neurological Sciences*. – 2010. – Т. 37. – № 3. – С. 365–370.

251. Xu C. [и др.]. Melatonin is involved in the apoptosis and necrosis of pancreatic cancer cell line SW-1990 via modulating of Bcl-2/Bax balance / C. Xu, A. Wu, H. Zhu [и др.]. // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2013. – Т. 67. – № 2. – С. 133–139.

252. Xue T. [и др.]. Investigations of the CLOCK and BMAL1 Proteins Binding to DNA: A Molecular Dynamics Simulation Study. / T. Xue, C. Song, Q. Wang [и др.]. // *PloS one*. – 2016. – Т. 11. – № 5. – С. e0155105.

253. Yamazaki S. [и др.]. Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats / S. Yamazaki, R. Numano, M. Abe [и др.]. // *Science*. – 2000. – Т. 288. – № 5466. – С. 682–685.

254. Yang K. [и др.]. Daily rhythm variations of the clock gene *PER1* and cancer-related genes during various stages of carcinogenesis in a golden

hamster model of buccal mucosa carcinoma / K. Yang, H. Ye, X.-M. Tan [и др.]. // *OncoTargets and Therapy*. – 2015. – С. 1419.

255. Ye Y. [и др.]. The Genomic Landscape and Pharmacogenomic Interactions of Clock Genes in Cancer Chronotherapy. / Y. Ye, Y. Xiang, F.M. Ozguc [и др.]. // *Cell systems*. – 2018. – Т. 6. – № 3. – С. 314–328.e2.

256. Yeh K.-T. [и др.]. Abnormal expression of period 1 (PER1) in endometrial carcinoma / K.-T. Yeh, M.-Y. Yang, T.-C. Liu [и др.]. // *The Journal of Pathology*. – 2005. – Т. 206. – № 1. – С. 111–120.

257. Young M.E. [и др.]. Cardiomyocyte-Specific BMAL1 Plays Critical Roles in Metabolism, Signaling, and Maintenance of Contractile Function of the Heart / M.E. Young, R.A. Brewer, R.A. Peliciari-Garcia [и др.]. // *Journal of Biological Rhythms*. – 2014. – Т. 29. – № 4. – С. 257–276.

258. Zeman M. [и др.]. Effect of rhythmic melatonin administration on clock gene expression in the suprachiasmatic nucleus and the heart of hypertensive TGR(mRen2)27 rats / M. Zeman, K. Szántóová, K. Stebelová [и др.]. // *Journal of Hypertension*. – 2009. – Т. 27. – № Suppl 6. – С. S21–S26.

259. Zhang R. [и др.]. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. / R. Zhang, N.F. Lahens, H.I. Ballance [и др.]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014. – Т. 111. – № 45. – С. 16219–24.

260. Zhang Y. [и др.]. Discrete functions of nuclear receptor Rev-erb couple metabolism to the clock / Y. Zhang, B. Fang, M.J. Emmett [и др.]. // *Science*. – 2015. – Т. 348. – № 6242. – С. 1488–1492.

261. Zhu Y. [и др.]. Period3 structural variation: a circadian biomarker associated with breast cancer in young women. / Y. Zhu, H.N. Brown, Y. Zhang [и др.]. // *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. – 2005. – Т. 14. – № 1. – С. 268–70.

262. Панченко А.В. [и др.]. Канцерогенез в толстой кишке крыс в условиях различных режимов освещения / А.В.Панченко, Н.Н.Петрищев,

И.М.Кветной, В.Н. Анисимов // Вопросы онкологии. – 2008. – Т. 54. – № 3. – С. 332–337.

263. Анисимов В.Н. [и др.]. Сопоставление противоопухолевой активности экстрактов эпифиза, гипоталамуса, мелатонина и сигетина у мышей с перевивным раком молочной железы / В.Н. Анисимов, В.Г. Морозов, В.Х. Хавинсон [и др.]. // Вопросы онкологии. – 1973. – Т. 19. – № 10. – С. 99–101.

264. Анисимов В.Н. [и др.]. Световой десинхроноз и риск злокачественных новообразований у человека: состояние проблемы / В.Н. Анисимов, И.А. Виноградова, А.В. Букалев [и др.]. // Вопросы онкологии. – 2013. – Т. 59. – № 3. – С. 302–313.

265. Анисимов В.Н. [и др.]. Роль циркадианных ритмов и часовых генов в старении и развитии ассоциированной с возрастом патологии под ред. С.М. Чибисов [и др.]., Москва: РУДН, 2018. – 207–241 с.

266. Борисенков Ф.М. Хронобиология опухолевого роста / Ф.М. Борисенков // Вопросы онкологии. – 2003. – Т. 49. – № 3. – С. 270–277.

267. Веснушкин Г.М [и др.]. Мелатонин угнетает канцерогенез легких, индуцируемый уретаном у мышей / В.Н. Веснушкин, Г.М. Плотникова, Н.А., Семенченко, А.В. Анисимов // Вопросы онкологии. – 2006. – Т. 52. – № 2. – С. 164–168.

268. Веснушкин Г.М. [и др.]. Угнетающее влияние мелатонина на канцерогенез кожи, индуцируемый бенз(а)пиреном у мышей / Г.М. Веснушкин, Н.А. Плотникова, В.Н. Анисимов // Вопросы онкологии. – 2007. – Т. 53. – № 1. – С. 60–65.

269. Губарева Е.А., Майдин М.А., Тындык М.Л., Виноградова И.А. П.А.В. Роль часовых белков в канцерогенезе кожи у мышей SHR в возрасте 14 месяцев при нарушении светового режима / П.А.В. Губарева Е.А., Майдин М.А., Тындык М.Л., Виноградова И.А. // Вопросы онкологии. – 2016. – Т. 62. – № 5. – С. 666–670.

270. Губарева Е.А. [и др.]. Суточные ритмы пролиферации в

кишечном эпителии и опухолях молочной железы у HER-2/neu трансгенных мышей и мышей FVB/N дикого типа и их коррекция мелатонином / Е.А. Губарева, М.А. Майдин, М.Л. Тындык [и др.]. // Вопросы онкологии. – 2019. – Т. 65. – № 1. – С. 154–158.

271. Виноградова И.А., Анисимов В.Н. Световой режим, препараты эпифиза, старение и продолжительность жизни / Виноградова И.А., Анисимов В.Н. . – Lambert Academic Publishing, 2012. – 432 с.

272. Панченко А.В. [и др.]. Роль циркадных ритмов и «клеточных часов» в старении и развитии онкологических заболеваний / А.В. Панченко, Е.А. Губарева, В.Н. Анисимов // Успехи геронтологии. – 2016. – Т. 29. – № 1. – С. 29–37.

273. Панченко А.В., Губарева Е.А. Влияние светового режима на канцерогенез легких, индуцированный уретаном у мышей / Сборник научных трудов 4 Всероссийского симпозиума с международным участием, Екатеринбург, 24-25 апреля 2013. С. 142-144.