

*Г.С. Киреева, Е.А. Губарева, Н.В. Митюшкина, А.В. Панченко, М.А. Майдин,
М.Л. Тындык, И.В. Гаврилов, С.С. Круглов, Е.В. Харченко, В.Н. Анисимов*

Исследование циркадианных ритмов на модели опухоли яичников у крыс: есть ли связь между развитием опухоли и нарушением ритмичности в интактных тканях?

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

В свете активно появляющихся новых данных о взаимосвязи между нарушениями циркадианных ритмов в организме и развитии злокачественных новообразований, авторы провели экспериментальное исследование с целью установить наличие/отсутствие изменений в ритмичности экспрессии часовых генов в опухоли по сравнению с нормальными тканями, а также изучить, влияет ли опухоль на циркадианные ритмы интактных тканей в организме-опухоленосителе. Исследование выполнено на 75 крысах-самках Вистар, была использована перевиваемая внутрибрюшинно опухоль яичников. Получены данные о фрагментации суточного ритма локомоторной активности у крыс с опухолью яичника по сравнению с животными без опухоли. Выявлено, что ритм пролиферации в клетках опухоли отсутствует, а также установлено нарушение ритма пролиферации неопухолевых клеток (на примере клеток кишечного эпителия) у крыс-опухоленосителей, тогда как у интактных крыс наблюдалась четкая ритмичность пролиферации аналогичных нормальных клеток. Среднесуточный уровень экспрессии часовых генов (*BMAL1*, *CLOCK*, *CRY1*, *PER2*) был существенно снижен в опухоли по сравнению с нормальной тканью. На основании полученных данных были выбраны 2 временные точки для проведения химиотерапии в последующих экспериментах *in vivo*, запланированных для изучения эффектов хронохимиотерапии.

Ключевые слова: циркадианные ритмы, часовые гены, опухоль яичников, крысиная модель, *BMAL1*, *CLOCK*, *CRY1*, *PER2*

Введение

Циркадианные ритмы – универсальное явление в живой природе. У млекопитающих центральным генератором этих ритмов является супрахиазматическое ядро гипоталамуса, которое

в зависимости от времени суток и уровня освещенности передает сигналы на периферические осцилляторы через нейрогуморальные пути [1]. На клеточном уровне циркадианная ритмичность поддерживается за счет экспрессии часовых генов и подконтрольных им генов. «Клеточные часы» включают в себя несколько транскрипционно-трансляционных циклов прямой и обратной связи. Главный саморегулируемый цикл включает в себя 2 активатора (*BMAL1* и *CLOCK*) и 2 репрессора (*PER1-3* и *CRY1,2*) транскрипции [2]. Комплекс *BMAL1-CLOCK* ритмично запускает транскрипцию тысяч генов, в том числе их собственных репрессоров — *PER* и *CRY* [2]. После накопления этих белков происходит подавление транскрипции, запускаемой комплексом *BMAL1-CLOCK*. В свою очередь, после деградации белков *Per* и *Cry* комплекс *BMAL1-CLOCK* высвобождается, чтобы начать новый циркадианный цикл [3]. Известно, что до 43% генов во всем организме имеют суточную ритмичность транскрипции, в том числе гены, вовлеченные в процессы клеточного метаболизма, пролиферации, апоптоза, репликации и репарации ДНК [3].

Нарушения в системе циркадианных ритмов ассоциированы с развитием злокачественных новообразований. Так, Международное Агентство по изучению рака признало сменную работу, ведущую к нарушению суточных ритмов, канцерогенным фактором для человека [4]. В нескольких исследованиях было показано, что частая смена часовых поясов и высокая освещенность в ночное время вносят вклад в развитие опухолей [5-6]. Вслед за этим изменения в системе часовых генов были продемонстрированы для разных типов опухолей человека и животных [3,7]. В нескольких исследованиях авторы наблюдали существенную разницу в ритмичности экспрессии часовых генов в опухолевой ткани и в нормальных (интактных) тканях организма [8-9]. Более того, продемонстрировано наличие взаимосвязи между экспрессией часовых генов в опухоли и прогнозом заболевания [9-10].

На нескольких моделях *in vivo* получены данные, согласно которым в опухолевой ткани утрачивается ритмичность экспрессии часовых генов при сохраненной ритмичности в нормальных тканях [11–12]. В то же время, есть исследования, в которых наблюдалась циркадианная ритмичность в опухоли [13–14]. Таким образом, данные о влиянии опухоли на циркадианные ритмы пораженного ей организма стали появляться недавно, и пока они весьма противоречивы.

В задачи нашего экспериментального исследования (модель опухоли *in vivo*) входило установить наличие/отсутствие изменений в ритмичности экспрессии часовых генов в опухоли по сравнению с нормальными тканями, а также изучить, влияет ли опухоль на циркадианные ритмы интактных тканей в организме-опухоленосителе.

Материалы и методы

Исследование было проведено в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и прочих научных целях (Страсбург, 1986 г.) и было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава

России (Протокол №11 от 21.09.2018). Всего было использовано 75 крыс-самок Вистар (Питомник лабораторных животных «Рапполово»), из которых 60 были включены в эксперименты, а еще 15 были использованы для поддержания штамма опухоли яичников.

Была использована асцитная опухоль яичника, которая перевивалась животным внутрибрюшинно в количестве 1×10^7 в соответствии с методикой, описанной ранее [15].

Было проведено 2 серии экспериментов.

1. Оценка суточных ритмов активности интактных крыс и крыс с опухолью яичников

В исследование были включены 24 крысы-самки линии Вистар в возрасте 4 мес.

За мес. до начала эксперимента животные были помещены в условия содержания с 12-часовой сменой дня и ночи. Искусственное освещение включалось с 8.00 (циркадианное время ЦВ 0 часов) до 20.00 (ЦВ 12 часов), за которым следовал темновой период с 20.00 до 08.00. Через мес. нахождения в указанном режиме животные были рандомизированы в 2 группы:

1. Контрольная (n=12).

2. Крысы с опухолью яичника (n=12).

Животные содержались в клетках по 4 особи из одной группы. Перевивку опухоли в опытной группе выполняли одновременно для 4 животных в течение последовательных трех дней — для сохранения расписания оценки активности животных.

Оценку активности животных проводили непрерывно на протяжении 24 часов, на 7 сутки после перевивки опухоли яичника, после появления асцита (срок выбран по результатам предыдущих исследований [16]). Аналогичное круглосуточное наблюдение за животными контрольной группы осуществляли в период со 2 по 4 день опыта.

Таблица 1. Количество животных в исследуемых группах на каждую временную точку

Группа	Количество животных, подвергнутых эвтаназии			
	09:00 (ЦВ1)	14:00 (ЦВ6)	20:00 (ЦВ12)	02:00 (ЦВ18)
1. Контроль, 10-й день	3	3	3	3
2. Опухоль яичника, 10-й день	3	3	2	2
3. Опухоль яичника + цисплатин, 24-й день	2	2	2	2

Таблица 2. Примеры анализа экспрессии часовых генов у крыс

Определяемый ген	Праймеры
BMAL1	F: TTGCGGAATGTCACAGGCAA R: CATGAAACTGAACCATCGACTT
CLOCK	F: GAGGGAGAACATTCAGAGGT R: CCTCGAAGCATGTGACAAC
CRY1	F: AGCCAGCTGACGTGTTCCGA R: ATGGCCGCATCTCGTTCCTTC
PER2	F: CAAGAAGGCCAAGGGGAAGG R: TGGACATTAGCAGCTGGTAGTA

Таблица 3. Значения уровня экспрессии часовых генов в течение суток в яичниках интактных крыс (контроль), яичниках и опухолевых клетках крыс с опухолью яичника (ОЯ)

Группа/образец	Часовые гены (E_{target})			
	BMAL1	CLOCK	CRY1	PER2
Контроль/яичник	0,00063 $\pm 0,00098$	0,000017 $\pm 0,000018$	0,038 $\pm 0,023$	0,0117 $\pm 0,0107$
ОЯ/яичник	0,00069 $\pm 0,00085$	0,000015 $\pm 0,000008$	0,034 $\pm 0,023$	0,0164 $\pm 0,0109$
ОЯ/опухолевые клетки	0,0003 $\pm 0,00003^{**}$	0,000002 $\pm 0,000001^{**}$	0,014 $\pm 0,007^*$	0,0021 $\pm 0,0014^{**}$

* – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$ по сравнению с нормальными тканями яичника крыс той же группы, точный тест Манна-Уитни. Данные представлены как среднее \pm среднеквадратическое отклонение

Для этого, в течение 24 (ЦВ 0 — 24 часа) часов проводилась непрерывная видеосъемка (в ночное время — при инфракрасной подсветке). Результаты оценивали для каждого 10-минутного интервала в режиме дневной съемки и для каждого 30 минутного интервала — в режиме ночной съемки. Анализ локомоторной активности крыс осуществлялся при помощи регистрации таких параметров, как вертикальные стойки, груминг, горизонтальная активность в виде активного перемещения по клетке, прием корма или воды, дефекация или уринация. Животное считалось активным, если производило какое-либо из указанных действий. Исследуемая группа в целом считалась активной, если как минимум половина животных из группы были активны.

2. Оценка циркадианных ритмов в опухолях и интактных тканях

В исследование были включены 36 крыс-самок линии Вистар в возрасте 4 мес.

За мес. до начала эксперимента животные были помещены в условия содержания с 12-часовой сменой дня и ночи. Через месяц нахождения в указанном режиме животные были рандомизированы на 3 группы:

Группа 1 (контроль) — интактные крысы (N=12);

Группа 2 (ОЯ) — крысы с опухолью яичника (N=12);

Группа 3 (ОЯ+цисплатин) — крысы с опухолью яичника, получавшие цисплатин внутривентриально (в/б) (N=12).

Цисплатин в группе 3 вводился однократно внутривентриально в дозе 4 мг/кг на третий день после перевивки опухоли яичника. Во всех группах осуществляли эвтаназию крыс с последующим взятием биологического материала для анализа по четырем временным точкам в течение суток — 09:00 (ЦВ1), 14:00 (ЦВ6), 20:00 (ЦВ12), 02:00 (ЦВ18). В группах 1 и 2 эвтаназия по указанным точкам проводилась на 10-й день после перевивки опухоли яичника. В группе 3 из-за отложенного развития канцероматоза, обусловленного введением цисплатина, эвтаназия осуществлялась на 24-й день после перевивки опухоли яичника.

В соответствии с дизайном исследования, на каждую временную точку приходилось по 3 крысы. Однако в ходе исследования несколько крыс в группах 2 и 3 не дожили до запланированной эвтаназии в силу плохого общего состояния, обусловленного прогрессированием опухоли яичника. Размер выборки по группам представлен в табл. 1.

В ночное время эвтаназию производили в затемненном помещении при свете настольной люминесцентной лампы, экранированной красным стеклом, после чего перемещали животное для аутопсии в освещенное помещение.

После эвтаназии отбирали следующие биологические образцы:

– все группы — образцы яичников, печени, тонкого кишечника;

– группы 2 и 3 (дополнительно) — дополнительно асцит и опухолевые узлы.

Образцы опухолевых узлов и яичников для анализа часовых генов помещали в стабилизирующий раствор RNeasy Lysis Buffer и далее проводили процедуру выделения РНК.

Экстракцию РНК осуществляли Тризолом с последующим проведением обратной транскрипции. Полученные образцы кДНК использовались для проведения ПЦР в режиме реального времени. В качестве референсного гена использовался бета-актин. Праймеры к крысиным часовым генам BMAL1, CLOCK, CRY1 и PER2 были синтезированы в научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Таблица 2). ПЦР проводилась дважды (брали среднее значение), после чего относительный уровень экспрессии гена рассчитывался по формуле:

$$E_{target} = 2^{-(Cq_{reference} - Cq_{target})}$$

где Cq reference и Cq target — число циклов ПЦР, необходимых для наработки детектируемого уровня продукта реакции, для референсного и определяемого генов соответственно.

Фрагменты нормальной ткани яичников и опухолевых узлов, печень и кишечник были зафиксированы в 10% формалине для гистологического и иммуногистохимического (ИГХ) анализа. Для оценки повреждения кишечного эпителия проведен подсчет митозов и апоптотических телец в крипах тонкого кишечника. Во всех образцах количественно оценивали уровень экспрессии онкогена C-Myc (моноклональное кроличье антитело, ab32072, Abcam).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакетов программ SPSS 16.0 и Graph Pad Prism 6.0. Использовали двухфакторный дисперсионный анализ с критерием наименьшей значимой разности Фишера, а также дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса для множественных сравнений.

Результаты

1. Оценка суточных ритмов активности интактных крыс и крыс с опухолью яичников

Пики активности в контрольной группе интактных крыс в дневное время наблюдались в период с 2.40 до 3.10 часов ЦВ (первый утренний пик), а также на протяжении периода с 8:30 до 12:00 ЦВ (рис. 1А). Пики активности в группе крыс с опухолью яичника в дневное время наблюдались гораздо чаще, и были зафиксированы в нескольких временных промежутках: с 1:30 до 3:30; с 6:30 до 8:00; с 9:30 до 12:00 ЦВ (рис. 1Б). В целом, локомоторная активность крыс с перевитой опухолью яичника в дневное время была повышена в сравнении с локомоторной активностью крыс контрольной группы.

В ночное время пики активности в контрольной группе интактных крыс наблюдались в нескольких промежутках: в период с 13:30 до 15:00; с 19:00 до 22:30 ЦВ с небольшими периодическими спадами активности (рис. 2А). Пики активности в группе крыс с опухолью яичника в ночное время наблюдались чаще, чем у интактных крыс, и регистрировались в нескольких временных промежутках: с 14:00 до 15:00; с 19:30 до 04:00; с 22:30 до 23:30 с периодическими спадами активности, и появлением кратковременных периодов бодрствования и сна (рис. 2Б).

В целом, в ночное время локомоторная активность крыс с перевитой опухолью яичника была сравнима с контрольной группой, однако характеризовалась фрагментацией циклов бодрствования и сна. Ночная активность преобладала над дневной у всех животных; в период «субъективных сумерек» от 10 до 12 ЦВ наблюдался рост активности, а в период «субъективного расцвета» 23-24 ЦВ — спад активности.

2. Оценка циркадианных ритмов в опухолях и интактных тканях

Результаты определения уровня экспрессии часовых генов в опухоли и в тканях яич-

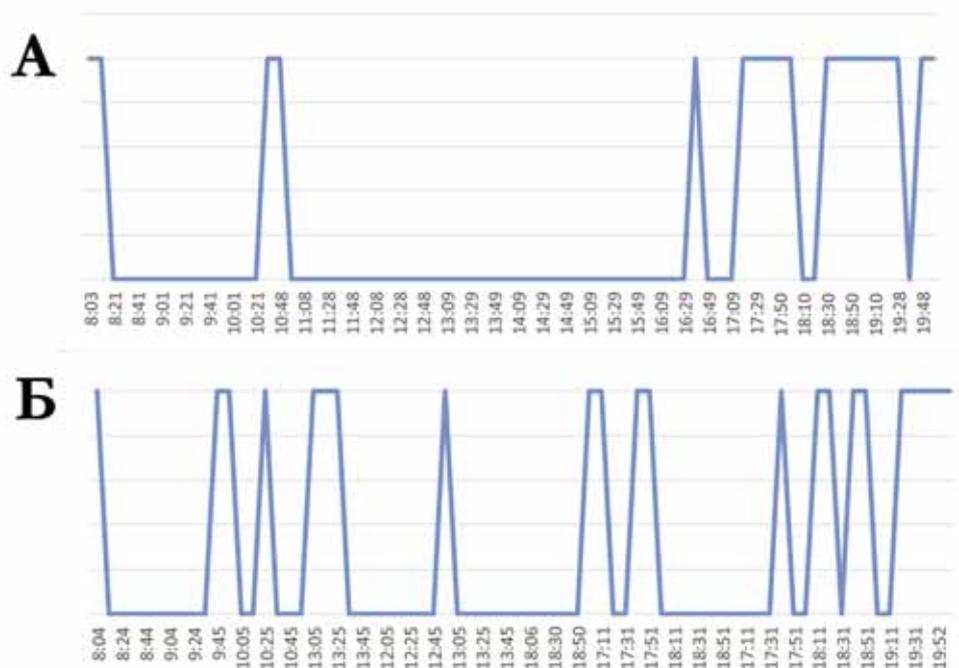


Рис. 1. График локомоторной активности intactных крыс (А) и крыс с опухолью яичника (Б) в дневное время (08:00 — 20:00 или ЦВ0 — ЦВ12)

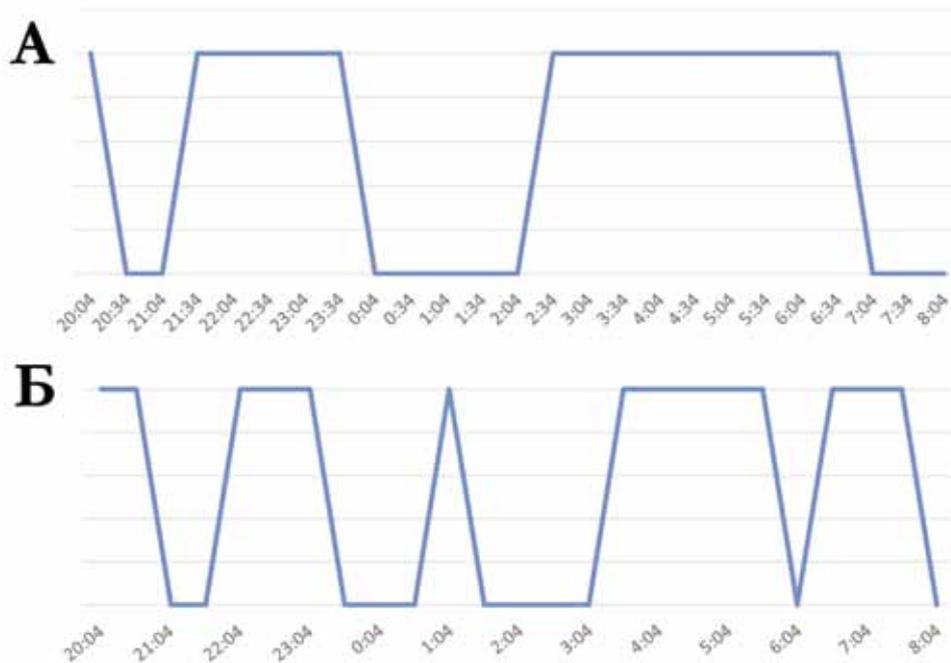


Рис. 2. График локомоторной активности intactных крыс (А) и крыс с опухолью яичника (Б) в ночное время (20:00 — 08:00 или ЦВ12 — ЦВ24)

ника в разные временные точки представлены на рис. 3. Статистически значимых различий между группами и точками отбора не наблюдалось, возможно, из-за малого числа наблюдений в каждой точке. Тем не менее, выявлено, что среднесуточная экспрессия часовых генов в клетках опухоли статистически значимо ниже, чем в клетках яичника здоровых крыс или крыс с опухолью (табл. 3).

Отметим, что при гистологическом исследовании яичников крыс с перевитой опухолью яичников было обнаружено, что образцы покрыты монослоем из опухолевых клеток, а у некоторых животных наблюдалась инвазия опухолевых клеток в яичник. Несмотря на данное обстоятельство, уровень экспрессии часовых генов в тканях яичников не отличался между intactными крысами и животными с переви-

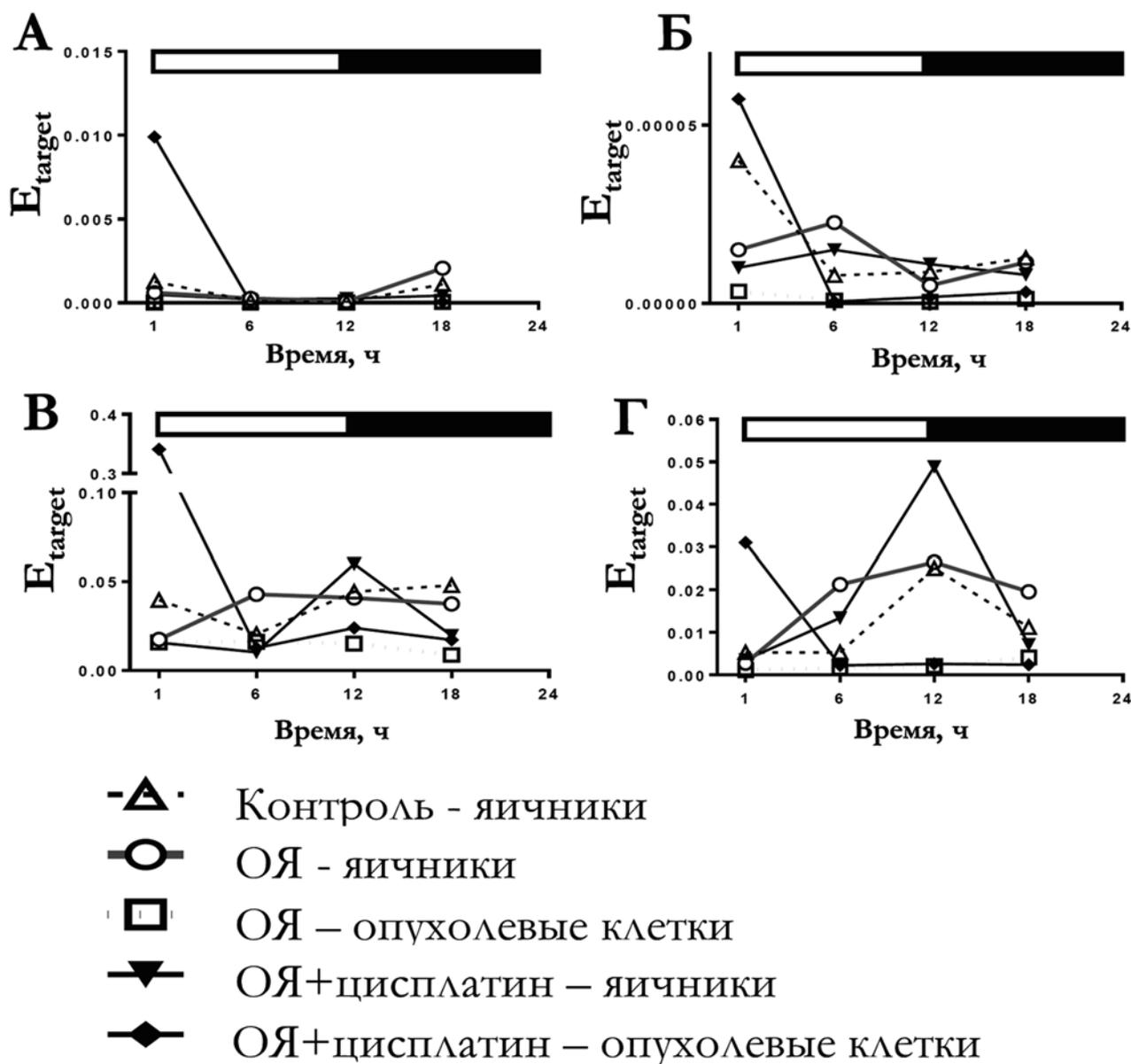


Рис. 3. Циркадианный ритм экспрессии часовых генов BMAL1 (А), CLOCK (Б), CRY1 (В) и PER2 (Г) в опухоли яичника и в нормальной ткани яичника крыс

той опухолью. Введение цисплатина никак не влияло на уровень экспрессии часовых генов ни в ткани яичника, ни в опухолевых клетках по сравнению с животными с опухолью, которым цисплатин не вводили.

Результаты подсчета митозов и апоптотических телец в криптах тонкого кишечника крыс представлены на рис. 4. У крыс контрольной группы интактных зафиксирован пик митотической активности в области ЦВ18-01 (ночное время и время субъективного рассвета). У животных с опухолью яичника, получавших или не получавших цисплатин, наблюдалось сниженное количество митозов в криптах тонкого кишечника, при этом ритмичности процесса не наблюдалось (рис. 4А). Количество апоптотических телец

было закономерно и статистически значимо повышено у животных с канцероматозом (группы ОЯ и ОЯ+цисплатин) (рис. 4Б). Суточные ритмы клеточной гибели не были выявлены ни в одной из групп животных.

В соответствии с полученными данными и с учетом времени смены циклов активности у крыс, были установлены две временные точки для дальнейшего изучения возможной разницы в эффективности и безопасности хроно-химиотерапевтического воздействия: ЦВ 23-0 (максимальная митотическая активность в кишечном эпителии, спад локомоторной активности у животных) и ЦВ 12 (минимальное количество митозов в кишечном эпителии, пик локомоторной активности у животных).

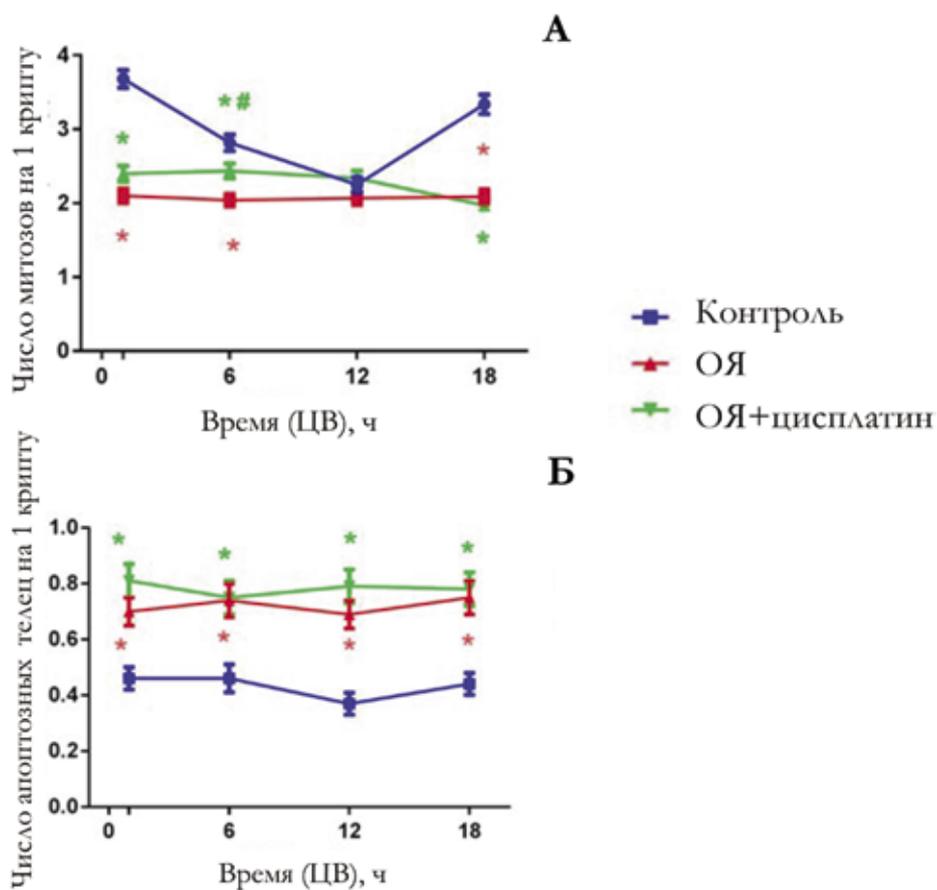


Рис. 4. Циркадианный ритм пролиферации в эпителиальных клетках кишечника у интактных крыс и крыс с опухолью яичников (ОЯ). * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой в ту же временную точку, # – $p < 0,05$ по сравнению с группой ОЯ в ту же временную точку

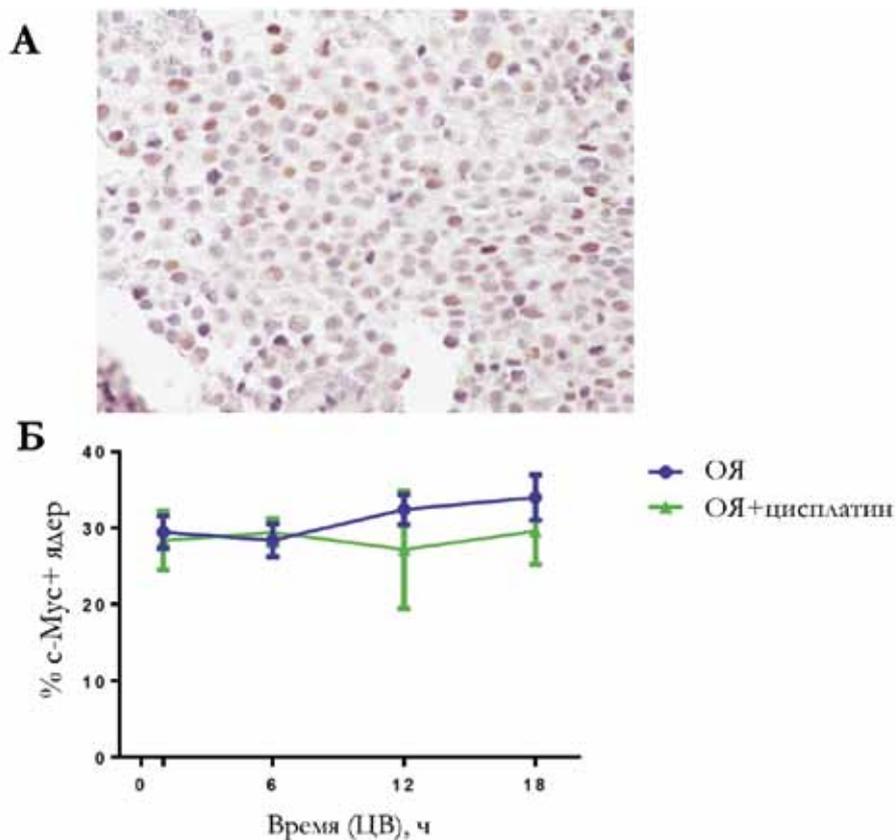


Рис. 5. А – специфическое окрашивание опухолевых клеток, полученных из асцита крыс группы ОЯ (ЦВ1), маркером с-Мус. Б — экспрессия с-Мус в опухолевых асцитных клетках крыс группы ОЯ (ИГХ)

Была проведена оценка уровня экспрессии онкогена С-Мус во всех тканях экспериментальных животных. Обнаружено специфическое окрашивание опухолевых клеток (рис. 5А). Количественная оценка показала, что доля иммунопозитивных клеток составляет около 30% во всех временных точках отбора асцита в обеих группах с опухолью яичника (рис. 5Б), при этом суточного ритма выявлено не было. Высокое содержание данного фактора может являться причиной наблюдаемой сниженной экспрессии часовых генов в опухолевых клетках.

Обсуждение

Целью нашего исследования было установить наличие нарушений циркадианных ритмов пролиферации и экспрессии часовых генов в опухоли, а также оценить влияние опухоли на циркадианные ритмы в нормальных тканях животного-опухоленосителя.

Экспрессия часовых генов в опухоли яичников

Мы не наблюдали циркадианной ритмичности экспрессии часовых генов (BMAL1, CLOCK, CRY1 и PER2) в опухоли яичников, хотя наличие данных ритмов в ткани яичников лабораторных грызунов отмечалось другими авторами [17-18]. Однако мы наблюдали, что уровень экспрессии часовых генов в опухоли в целом был существенно снижен по сравнению с соответствующей нормальной тканью яичника. Эти данные соотносятся с результатами, полученными на других животных моделях. Так, было показано, что экспрессия генов PER1, PER2 и Rev-Erba была снижена в опухолях толстой кишки, индуцированных у мышей азоксиметаном, по сравнению с нормальной тканью толстой кишки, а экспрессия BMAL1 в опухоли и вовсе отсутствовала [19]. Нарушения ритмичности экспрессии генов PER1 и BMAL1 наблюдались на модели опухоли меланомы B16, и для большинства временных точек в течение суток уровень их экспрессии был снижен по сравнению с прилегающей к опухоли кожей [12]. Изменения в экспрессии часовых генов в опухоли могут происходить под воздействием экспрессии онкогенов, в частности Мус. Например, в синхронизированной клеточной культуре остеосаркомы увеличенная экспрессия Мус приводила к нарушению экспрессии часовых генов [20]. При этом в других исследованиях на золотистых хомячках, у которых индуцировали рак слизистой оболочки полости рта диметилбензантраценом, наблюдалась сохраненная ритмичность экспрессии генов PER1, PER2 и некоторых подконтрольных им генов (VEGF, C-MYC, P53, Cyclin D1 и CDK1) в предопухолевых и опухолевых тканях

[13-14]. Такая разрозненность результатов, вероятно, обусловлена разными моделями опухолей, использованными в исследованиях. Химически индуцированные опухоли толстой кишки и слизистой ротовой полости медленно прогрессируют, из-за чего они могут поддерживать нормальные ритм и уровень экспрессии часовых генов автономно или за счет определенных системных факторов. И наоборот, перевиваемые опухоли, как в нашем исследовании или в других работах [12, 21], полностью дедифференцированы, и обладают свойствами аденокарциномы сразу же после перевивки.

Циркадианные ритмы клеточной пролиферации

Среднее количество митотических фигур в контрольной группе интактных крыс в нашем исследовании имело пиковое значение в начале дневной фазы (ЦВ0-12). Ритмичность пролиферации и синтеза ДНК в тонком кишечнике описана в нескольких работах, хотя временной отрезок пика пролиферации варьирует в широких пределах [22-24]. При этом изменения в циркадианной ритмичности пролиферации клеток кишечного эпителия под воздействием опухоли нами было продемонстрировано впервые в данной работе. Эти данные соотносятся с результатами нескольких других исследований, в которых авторы наблюдали нарушения в экспрессии часовых генов в различных здоровых тканях животных-опухоленосителей [12, 19, 21, 25]. Также имеются данные о комплексном повреждении ДНК в клетках эпителия тонкого кишечника мышей, вызванном развитием подкожно перевитых опухолей (меланом B16, саркома MO5076, карцинома COLON26) [26]. Результаты нашего исследования подтверждают предположения о том, что агрессивные низкодифференцированные опухоли имеют десинхронизированные или даже дисфункциональные циркадианные ритмы. Более того, опухоли провоцируют нарушения циркадианной ритмичности в интактных тканях организма через ряд не до конца изученных механизмов.

Заключение

Результаты проведенного исследования указывают на нарушения в циркадианной ритмичности в опухоли яичника у крыс. В свою очередь, опухолевый процесс влияет на суточные ритмы экспрессии часовых генов и пролиферации в интактных тканях (в частности, в тонком кишечнике) у крыс-опухоленосителей. Дальнейшее изучение механизмов и последствий нарушений циркадианных ритмов в опухоли и в здоровых тканях, а также взаимодействия между

этими процессами, поможет предложить рациональные схемы хроно-химиотерапии — более эффективные и менее безопасные по сравнению со стандартными режимами лечения.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-75-10017).

ЛИТЕРАТУРА

- Honma S, Ono D, Suzuki Y, Inagaki N, Yoshikawa T, Nakamura W, Honma K. 2012. Suprachiasmatic nucleus. *Int J Prog Brain Res.* 2012;199:129–141.
- Partch CL, Green CB, Takahashi JS. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol.* 2014;24:90–9.
- Shostak A. 2017. Circadian Clock, Cell Division, and Cancer: From Molecules to Organism. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(4).
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2010. Painting, firefighting, and shift-work. IARC Monogr Eval Carcinog risks to humans. 2010;98:9–764.
- Filipski E, Delaunay F, King VM, Wu M-W, Claustrat B, Gréchez-Cassiau A, Guettier C, Hastings MH, Francis L. Effects of Chronic Jet Lag on Tumor Progression in Mice. *Cancer Res.* 2004;64:7879–7885.
- Anisimov VN, Vinogradova IA, Panchenko A V, Popovich IG, Zabezhinski MA. Light-at-night-induced circadian disruption, cancer and aging. *Curr Aging Sci.* 2012;5:170–7.
- Lamia KA. Ticking time bombs: connections between circadian clocks and cancer. *F1000Research.* 2018;6:1910.
- Shilts J, Chen G, Hughey JJ. Evidence for widespread dysregulation of circadian clock progression in human cancer. *PeerJ.* 2018;6:e4327. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29404219>
- Ye Y, Xiang Y, Ozguc FM, Kim Y, Liu C-J, Park PK, Hu Q, Diao L, Lou Y, Lin C, et al. The Genomic Landscape and Pharmacogenomic Interactions of Clock Genes in Cancer Chronotherapy. *Cell Sys.* 2018; 6:314-328.e2.
- Cadenas C, van de Sandt L, Edlund K, Lohr M, Hellwig B, Marchan R, Schmidt M, Rahnenführer J, Oster H, Hengstler JG. Loss of circadian clock gene expression is associated with tumor progression in breast cancer. *Cell Cycle.* 2014;13:3282–3291.
- Soták M, Polidarová L, Ergang P, Sumová A, Pácha J. An association between clock genes and clock-controlled cell cycle genes in murine colorectal tumors. *Int J Cancer.* 2013;132:1032–1041.
- de Assis L, Moraes M, Magalhães-Marques K, Kinker G, da Silveira Cruz-Machado S, de Lauro Castrucci A. Non-Metastatic Cutaneous Melanoma Induces Chronodisruption in Central and Peripheral Circadian Clocks. *Int J Mol Sci* 2018;19:1065.
- Yang K, Ye H, Tan X-M, Fu X-J, Li H-X. 2015. 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. *Onco Targets Ther.* 2015;13:1419.
- Tan X-M, Ye H, Yang K, Chen D, Wang Q-Q, Tang H, Zhao N-B. Circadian variations of clock gene Per2 and cell cycle genes in different stages of carcinogenesis in golden hamster buccal mucosa. *Sci Rep.* 2015;5:9997.
- Bespalov VG, Kireeva GS, Belyaeva OA, Kalinin OE, Senchik KY, Stukov AN, Gafton GI, Guseynov KD, Belyaev AM Both heat and new chemotherapeutic drug dioxidet in hyperthermic intraperitoneal chemoperfusion improved survival in rat ovarian cancer model. *J Surg Oncol.* 2015;113:438–442
- Киреева ГС, Беляева ОА, Сенчик КЮ, Беспалов ВГ, Стуков АН, Губарева ЕА, Майдин МА. Асцитная опухоль яичников у крыс — адекватная доклиническая модель канцероматоза для изучения ин-траперитонеального химиоперфузионного лечения. *Сибирский онкологический журнал.* 2019;18(1):71-78
- Metz RP, Qu X, Laffin B, Earnest D, Porter WW. Circadian clock and cell cycle gene expression in mouse mammary epithelial cells and in the developing mouse mammary gland. *Dev Dyn.* 2006; 235:263–71.
- Karman BN, Tischkau SA. Circadian Clock Gene Expression in the Ovary: Effects of Luteinizing Hormone1. *Biol Reprod.* 2006;75:624–632.
- Soták M, Polidarová L, Ergang P, Sumová A, Pácha J. An association between clock genes and clock-controlled cell cycle genes in murine colorectal tumors. *Int J cancer.* 2013; 132:1032–41.
- Altman BJ, Hsieh AL, Sengupta A, Krishnanaiah SY, Stine ZE, Walton ZE, Gouw AM, Venkataraman A, Li B, Goraksha-Hicks P, et al. MYC Disrupts the Circadian Clock and Metabolism in Cancer Cells. *Cell Metab.* 2015; 22:1009.
- Huisman SA, Oklejewicz M, Ahmadi AR, Tamanini F, Ijzermans JNM, van der Horst GTJ, de Bruin RWF. Colorectal liver metastases with a disrupted circadian rhythm phase shift the peripheral clock in liver and kidney. *Int J Cancer;* 136:1024–1032.
- Al-Dewachi HS, Wright NA, Appleton DR, Watson AJ. Studies on the mechanism of diurnal variation of proliferative indices in the small bowel mucosa of the rat. *Cell Tissue Kinet.* 1976;9:459–67.
- Camplejohn RS, Nias AH. A study of diurnal proliferative activity in tumour and small intestine of C3H mice bearing a transplanted mammary carcinoma. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1983;44:163–71.
- Balakrishnan A, Stearns AT, Park PJ, Dreyfuss JM, Ashley SW, Rhoads DB, Tavakkolizadeh A. MicroRNA mir-16 is anti-proliferative in enterocytes and exhibits diurnal rhythmicity in intestinal crypts. *Exp Cell Res.* 2010; 316:3512–21.
- Hojo H, Enya S, Arai M, Suzuki Y, Nojiri T, Kangawa K, Koyama S, Kawaoka S. 2017. Remote reprogramming of hepatic circadian transcriptome by breast cancer. *Onco-target.* 2017;8:34128–34140.
- Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Kareva IG, Naf D, Nowshen S, Kryston TB, Bonner WM, Georgakilas AG, Sedelnikova OA. Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:17992–7.

*G.S. Kireeva, E.A. Gubareva, N.V. Mitiushkina,
A.V. Panchenko, M.A. Maydin, M.L. Tyndyk,
I.V. Gavrilov, S.S. Kruglov, V.N. Anisimov*

The study of circadian rhythms in ovarian cancer rat model: is there connection between tumor development and rhythmicity disruption in intact tissues?

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg

Considering emerging yet contradictory data on circadian rhythms disruption and its effects on tumor initiation and progression, we performed in vivo study to evaluate changes (if any) in clock genes expression in tumor compared to intact tissues as well as to see if tumor development affects normal tissues in tumor-bearing animals. The study was performed in 75 female Wistar rats, intraperitoneally transplanted ovarian cancer was used as a tumor model.

Tumor-bearing rats had fragmented circadian rhythmicity of their locomotor activity compared to intact animals. No circadian rhythmicity in proliferation of tumor cells was detected. Precise proliferative rhythmicity was found in normal cells (intestinal epithelium) of intact rats, while significant disruption in such rhythmicity was observed in the same cells of tumor-bearing rats. Average clock genes (BMAL1, CLOCK, CRY1, PER2) expression rate was significantly reduced in tumor cells compared to intact tissues. The data from these experiments let us choosing 2 time points to perform chemotherapy in the following study where effects of chronochemotherapy will be evaluated.

Key words: circadian rhythms, clock genes, ovarian cancer, rat model, BMAL1, CLOCK, CRY1, PER2