

*Е.А. Губарева, А.В. Панченко, М.А. Майдин, Е.И. Федорос, М.Л. Тындык,
Г.А. Янус, В.Н. Анисимов, Г.С. Киреева*

Нарушение суточных колебаний экспрессии часовых генов и содержания часовых белков в опухолях и дистантных тканях у мышей, трансгенных по HER2/neu

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

Резюме. Связь между циркадианными ритмами и раком является двусторонней на уровне организма и клеток. Одним из ее аспектов является негативное влияние развития опухолей на суточные ритмы организма.

Материалы и методы. В опыте использовали 16 самок-мышей FVB/N и 16 самок FVB/N, трансгенных по HER2/neu. По 4 мыши каждой линии были выведены из эксперимента ZT0 (время включения света), ZT6, ZT12 и ZT18. В супрадиагматическом ядре, печени, в ткани и опухолях молочной железы оценивали экспрессию генов *Bmal1*, *Clock* и *Cry1* методом ПЦР в режиме реального времени. В ткани и опухолях молочной железы оценивали содержание часовых белков *BMAL1* и *CLOCK* методом иммуногистохимии.

Результаты. В работе показано, что в спонтанных аденокарциномах молочной железы мышей, трансгенных по HER2/neu, отсутствуют суточные колебания экспрессии часовых генов и содержания часовых белков. Также обнаружено снижение пиковых значений экспрессии часовых генов в супрадиагматическом ядре, печени и молочной железе у животных с опухолями.

Выводы. Полученные данные подтверждают гипотезу о нарушении циркадианных ритмов в опухолях молочной железы и негативном влиянии опухолей на ритмы организма.

Ключевые слова: опухоли молочной железы, часовые гены, часовые белки, циркадианные ритмы, мыши

Введение

Практически все процессы в организме млекопитающих подвержены суточным ритмическим колебаниям. Циркадианные ритмы (ЦР) организма синхронизируются с изменениями внешней среды через супрадиагматическое ядро (СХЯ) — центральный осциллятор организма [1].

Биологические часы на клеточном уровне реализуются через осцилляции транскрипции генов *Bmal1*, *2*, *Clock* и *Npas2*, *Per1–3*, *Cry1*, *2*, возникающими благодаря нескольким транс-

крипционно-трансляционным контурам обратной связи [2, 3]. Доказано, что клеточные часы участвуют в регуляции таких фундаментальных процессов, как пролиферация, репарация ДНК и апоптоз, которые как правило нарушаются при возникновении опухолей [4].

Связь между циркадианными ритмами и раком является двусторонней на уровне организма и клеток. В экспериментах показано, что в условиях постоянного освещения или хронического джет-лага наблюдается более быстрый рост химически индуцированных опухолей [5, 6], перевиваемых опухолей [7], опухолей-ксенографтов [8, 9] и опухолей у генетически модифицированных животных [10]. Сменная работа, вызывающая нарушение ЦР, объявлена вероятным канцерогенным фактором для человека [11].

К настоящему времени на клиническом материале описаны изменения экспрессии основных часовых генов (ЧГ) в опухолях различных локализаций [12, 13]. 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 [14–16], тогда как результаты, полученные на других моделях, свидетельствуют о сохранении суточных ритмов в опухолевых клетках [17–19]. Кроме того, в последние годы опубликовано несколько работ, посвященных влиянию опухолей на суточные ритмы организма или дистантных тканей, не затронутых опухолевым процессом [15, 16].

Целью данной работы была оценка суточных изменений экспрессии часовых генов в опухолевой и нормальной ткани молочной железы, супрадиагматическом ядре (СХЯ) головного мозга и печени мышей FVB/N дикого типа и трансгенных по HER2/neu.

Материалы и методы

В опыте использовали 16 самок FVB/N и 16 самок FVB/N, трансгенных по HER2/neu. По 4 мыши каждой ли-

нии были выведены из эксперимента в 08:00 (ZT0, время включения света), 14:00 (ZT6), 20:00 (ZT12) и 02:00 (ZT18). Этаназию осуществляли путем цервикальной дислокации и немедленно проводили аутопсию. Жировые подушечки с молочными железами и опухоли молочных желез фиксировали в 10% формалине для патоморфологического и иммуногистохимического (ИГХ) анализа. Фрагмент мозга, содержащий СХЯ, печень, жировые подушечки с молочными железами и фрагменты опухолей замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C до оценки экспрессии ЧГ.

Тотальную РНК выделяли из замороженных образцов путем гомогенизации с реагентом TRIzol (ThermoFisherScientific, США). Полученную мРНК использовали для проведения обратной транскрипции в термостабируемом амплификаторе. Образцы кДНК использовали для проведения ПЦР в режиме реального времени. Праймеры к часовым генам Clock (F: AGCCAGCGATGTCTCAAGCT, R: AGCCAGCGATGTCTCAAGCT), Bmal1 (F: TCTATCCGATGACGAACCTGAAACA, R: CCCTCGGTACATCCTACGA), Cry1 (F: CCAACGTGGGATCAACAG, R: CCCGAATCACAACAGACGA) и гену В-актина (F: CTAGGCACCAGGGTGTGAT, R: CATGTCGTCCTCCAGTTGGTA, референтный ген) были синтезированы в лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Реакцию проводили в 96-луночном планшете в объеме 20 мкл, с использованием флуоресцентной метки (Sybr), которая необходима для измерения концентрации ДНК. По окончании реакции для референтного и изучаемого генов фиксировали Cq — количество циклов амплификации, необходимых для наработки детектируемого уровня продукта реакции. Относительный уровень экспрессии вычисляли по формуле: $E_{target} = 2^{-(Cq_{reference} - Cq_{target})}$, где Cq reference и Cq target — Cq для референтного и изучаемого генов, соответственно.

Часовые белки (ЧБ) выявляли методом иммуногистохимии (ИГХ) на парафиновых срезах с фиксированного в 10% формалине материала.

Срезы депарафинировали, затем проводили демаскировку антигенов в трис-ЭДТА буфере (pH 9,0) при 95°C в течение 30 мин. Затем проводили блокирование эндогенной пероксидазной активности с помощью 3% H₂O₂ в течение 15 мин. Далее срезы инкубировали с первичными поликлональными кроличьи антителами в течение 1 часа (к BMAL1 NB1002288, разведение 1:250; к CLOCK NB10092284, разведение 1:200, NovusBiologicals, США).

Далее проводили трехкратную промывку в трис-солевом буфере (ТСБ) по 5 мин, затем срезы инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой (AntiRabbit EnVision System, Dako, Дания). Затем проводили трехкратную промывку в ТСБ по 5 мин. После этого на срезы наносили раствор 3'3'-диаминобензидина (ДАБ, Dako, Дания) и выдерживали 5 минут. Срезы докрашивали в гематоксилине 5-10 мин, затем дегидратировали и заключали в синтетическую среду Biomount.

С помощью микроскопа Nikon Eclipse NiU, **оснащенного камерой Nikon Digital Sight DSFi2, и пакета программного обеспечения NISElements Basic Research** (Nikon Co., Япония) 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.

Для оценки содержания белка BMAL1 на микрофотографиях определяли отношение интенсивности окрашивания ДАБ ткани молочной железы или опухоли к фоновому окрашиванию и выражали в относительных единицах (ОЕ).

Для оценки содержания белка CLOCK на микрофотографиях участков опухолевой ткани и протоков молоч-

ной железы подсчитывали процент иммунопозитивных ядер (ПЯ).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ MS Excel 2007, GraphPad Prism 6.0. Данные представлены в виде среднего значения и ошибки среднего.

Определение статистической значимости наблюдаемых различий в группах проводили с помощью t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна-Уитни. Для межгрупповых сравнений проводили дисперсионный анализ с применением апостериорного теста Тьюки.

Результаты

В образцах мозга, содержащих СХЯ (рис. 1, А-В), 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 мышей, трансгенных по HER2/neu, значение уровня экспрессии в данной временной точке было значимо снижено: $E_{Bmal1}=0,016\pm 0,004$ ($p<0,0001$), $E_{Clock}=0,25\pm 0,11$ ($p=0,0009$), $E_{Cry1}=0,16\pm 0,005$ ($p=0,033$).

В печени максимальное значение уровня экспрессии часовых генов также выявлено в точке ZT18 (рис. 1, Г-Е). У мышей FVB/N значение этого показателя достигло: $E_{Bmal1}=0,038\pm 0,015$, $E_{Clock}=1,01\pm 0,049$, $E_{Cry1}=0,188\pm 0,07$. У животных с опухолями наблюдалось статистически значимое снижение экспрессии часовых генов Clock и Cry1, но не Bmal1, в данной точке: $E_{Clock}=0,07\pm 0,02$ ($p<0,0001$), $E_{Cry1}=0,016\pm 0,004$ ($p=0,0002$).

В ткани молочной железы мышей FVB/N уровень экспрессии гена Clock (рис. 1, 3) был выше, чем у мышей HER2/neu, в точках ZT6 и ZT18, однако различия достигали уровня статистической значимости только в точке ZT18 ($E_{Clock}=2,78\pm 1,71$, $p=0,018$). Уровень экспрессии гена Cry1 (рис. 1, И) в ткани молочной железы мышей FVB/N был выше, чем у мышей HER2/neu, в точке ZT6 и составил $0,473\pm 0,30$ ($p=0,023$). Как и в печени, в образцах молочной железы статистически значимых различий в экспрессии Bmal1 между группами выявлено не было. В опухолях молочной железы наблюдался низкий уровень экспрессии генов Bmal1, Clock и Cry1, суточных изменений не выявлено.

При оценке содержания белка BMAL1 в нормальной и опухолевой ткани молочной железы не было выявлено суточной динамики, поэтому данные от всех временных точек для дальнейшего анализа были объединены в пределах групп (рис. 2, А, В). Интенсивность окрашивания статистически значимо не различалась между тканью молочной железы мышей линии FVB/N ($1,26\pm 0,02$ ОЕ) и мышей HER2/neu ($1,23\pm 0,02$ ОЕ). При этом у мышей, трансгенных по HER2/neu, в опухолях интенсивность окрашивания в относительных единицах была выше, чем в протоках, и составляла $1,30\pm 0,02$ ОЕ ($p=0,0002$).

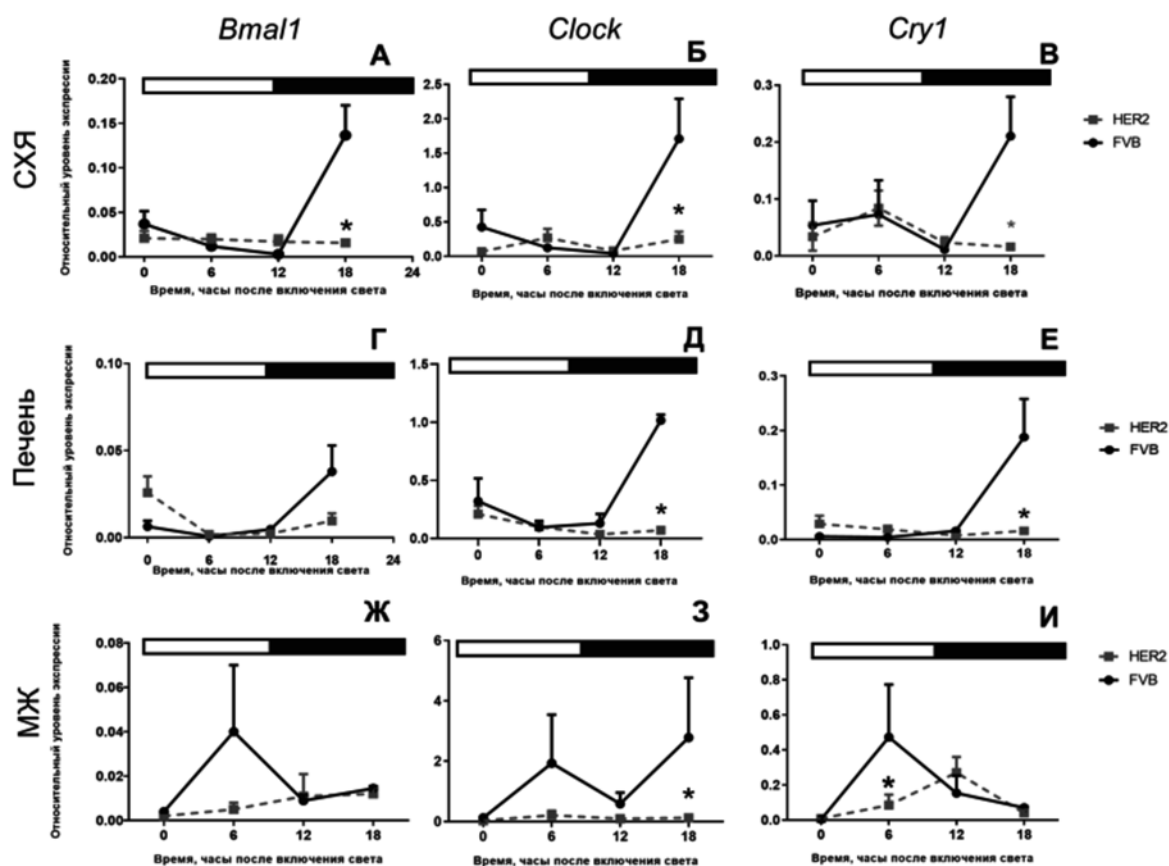


Рис. 1. Экспрессия часовых генов у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по HER2/неу. А – уровень экспрессии Bmal1 в супрахиазматическом ядре (СХЯ), Б – Clock в СХЯ, В – Cry1 в СХЯ, Г – Bmal1 в печени, Д – Clock в печени, Е – Cry1 в печени, Ж – Bmal1 в молочной железе, З – Clock в молочной железе, И – Cry1 в молочной железе

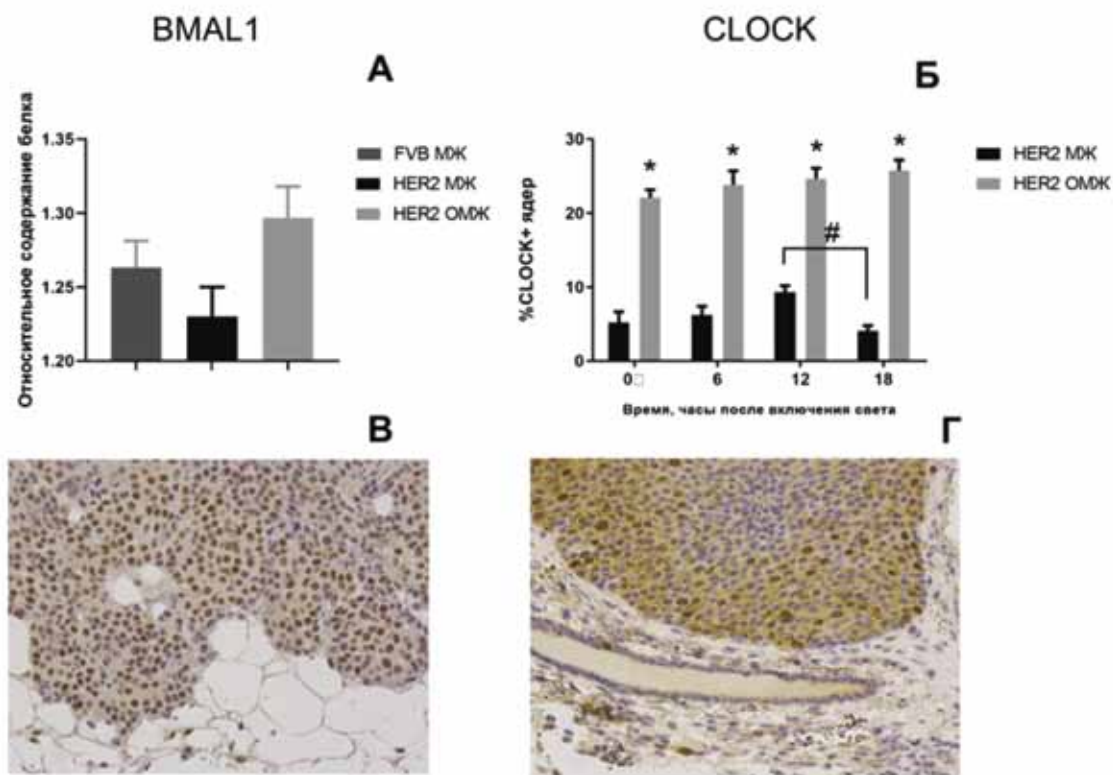


Рис. 2. Содержание часовых белков BMAL1 и CLOCK в молочной железе и опухолях молочной железы у мышей FVB/N и мышей FVB/N, трансгенных по HER2/неу. А – содержание белка BMAL1 в молочной железе и опухолях молочной железы, Б – доля CLOCK-позитивных ядер в молочной железе и опухолях молочной железы, В – иммуногистохимическое окрашивание антителами к BMAL1, Г – окрашивание антителами к CLOCK

При анализе доли CLOCK-иммунопозитивных ядер (ПЯ) в протоках молочной железы у мышей трансгенных по HER2/neu, (рис. 2, Б, Г) наблюдалась суточная динамика с максимумом в точке ZT12 ($9,31 \pm 0,9\%$) и минимумом в точке ZT18 ($4,08 \pm 0,7\%$, $p=0,0012$). В опухолях не было выявлено суточных изменений; во всех временных точках ПЯ был выше, чем в протоках. В опухолях и протоках в точке ZT0 значение данного показателя составило $22,1 \pm 1,0\%$ и $5,21 \pm 1,4\%$, соответственно, ($p < 0,0001$), в точке ZT6 — $23,8 \pm 1,9\%$ и $6,2 \pm 1,2\%$ ($p < 0,0001$), в точке ZT12 — $24,6 \pm 1,4\%$ и $9,3 \pm 0,9\%$ ($p < 0,0001$), в точке ZT18 — $25,8 \pm 1,4\%$ и $4,1 \pm 0,7\%$ ($p < 0,0001$). Таким образом, в опухолях выявлено не только повышение содержания активатора транскрипции CLOCK, но и потеря суточных колебаний синтеза и/или деградации этого белка.

Обсуждение

В ходе эксперимента была проведена оценка наличия/отсутствия суточных колебаний экспрессии часовых генов и содержания часовых белков 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 снижение амплитуды колебаний экспрессии *Per1*, *Per2*, *Rev-Erba* и *Dbp* в химически индуцированных опухолях кишечника у мышей по сравнению с нормальной тканью кишечника, а также отсутствие ритма *Bmal1* [14]. Huisman et al. (2015) обнаружили в печеночных метастазах рака кишечника C26 у мышей ритмичную экспрессию *Cry1*, и потерю ритма экспрессии *Rev-Erba* и *Bmal1* [16]. В клетках меланомы B16 у мышей описаны ритмичные изменения экспрессии *Per1* и *Bmal1*, хотя относительная экспрессия была значительно снижена в большинстве временных точек по сравнению с нормальной кожей, в том числе прилегающей к опухоли [20].

Нарушения в системе ЧГ в опухоли могут происходить под влиянием экспрессии онкогенов, в частности, *Myc*. Было показано, что эктопическая экспрессия *c-Myc* в синхронизированной культуре клеток остеосаркомы вызывает нарушение ритма часовых генов [21]. В то же время, существуют данные о сохранении ритмов в опухолевых клетках. Так, исследования на модели химически индуцированной карциномы слизистой оболочки щеки у золотистых хомячков показали ритмичность ге-

нов *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 опухолей амплитуда колебаний экспрессии *Per1*, *Per2* и *p53* снижается; отсутствие ритма было показано для *Ki67* и *Cyclin B1* [17, 18]. Такие неоднозначные результаты могут объясняться различиями между моделями опухолей, использованными в исследованиях. Химически индуцированные аутохтонные опухоли кишечника и слизистой оболочки щеки являются высокодифференцированными и могут сохранять характерную для нормальных тканей автономно или системно регулирующую ритмичность экспрессии ЧГ. В противоположность этому, штаммы перевиваемых опухолей и модель рака молочной железы, использованная в нашем исследовании, являются низкодифференцированными [16, 20]. Спонтанные опухоли у трансгенных мышей линии HER2-neu фактически не имеют стадии «предрака» и микроскопически выглядят как солидные аденокарциномы с момента появления видимого узла. Возможно, с увеличением злокачественности снижается регуляция клеточных «часов».

Далее, в нашем исследовании было выявлено изменение суточных колебаний экспрессии ЧГ в СХЯ, печени и молочной железе мышей с опухолями по сравнению с животными без опухолей. В работе de Assis et al. (2018) сообщалось о том, что ритм *Per1* в СХЯ у мышей с меланомой B16 не изменялся, экспрессия *Per1* во временной точке ZT14 в печени животных с опухолью превышала таковую у нормальных животных, а в легких была ниже. Также была выявлена потеря пика экспрессии *Bmal1* в СХЯ, печени и легких во временной точке ZT2 [20]. Hojo et al. (2017) показали, что перевивка карциномы молочной железы 4T1 животным вызывает снижение пиковых значений и сдвиг фазы экспрессии *Rev-Erba*, *Bmal1* и *Per2*; паттерн экспрессии *Clock* изменялся полностью [22].

Противоположные закономерности описаны в исследовании Sotak et al. (2013): более выраженные пики экспрессии были обнаружены в печени у мышей с опухолью кишечника, при этом ритмы *Bmal1*, *RevErba*, *Dbp* и *Wee1* были смещены по фазе, но сохраняли амплитуду [14]. Другие авторы (Huisman et al., 2015) также сообщают о сдвиге фазы экспрессии ЧГ в печени и легких мышей с опухолями [16].

Также было выявлено влияние развития опухолей на циркадианные ритмы транскриптома и метаболома печени у мышей с аденокарциномой легкого по сравнению с интактными животными [15]. Имеются сведения о нарушении транскриптомов других тканей (печени, почек, легких и сердца) при опухолевом процессе [22].

У онкологических пациентов наблюдаются нарушения суточных ритмов [23, 24]. Описанные в данной работе изменения экспрессии генов при опухолевом процессе могут вносить вклад в изменение ЦР на уровне всего организма.

Заключение

Нами выявлено отсутствие суточных колебаний экспрессии часовых генов в опухолях молочной железы у мышей линии FVB, трансгенных по HER2/neu. Также в опухолях молочной железы выявлено повышение содержания белков-активаторов транскрипции BMAL1 и CLOCK.

У животных с опухолями мы наблюдали нарушение суточной динамики экспрессии часовых генов в дистантных тканях (СХЯ и печени). Пик экспрессии Bmal1, Clock и Crg, который наблюдался у контрольных мышей в середине темного периода (ZT18), не определялся у мышей с опухолями; экспрессия генов в данной точке была снижена в 2,6 — 14,4 раза.

В молочной железе мышей FVB/N наивысший уровень экспрессии Clock выявлен в ZT18, Crg1 — в ZT6; у мышей HER2/neu в этих точках экспрессия Clock и Crg1 снижена в 5,8 — 23,2 раза. Таким образом, показано влияние опухолевого процесса на экспрессию часовых генов в здоровых тканях.

Изучение ритма экспрессии генов и возможностей их коррекции на моделях опухолей у животных является важной задачей для глубокого понимания нарушений суточных ритмов, наблюдаемых у онкологических пациентов.

Финансирование

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Honma S. The mammalian circadian system: a hierarchical multi-oscillator structure for generating circadian rhythm // J Physiol Sci. — 2018. — Vol. 68. — P. 207–219. — doi:10.1007/s12576-018-0597-5.
- Trott A.J., Menet J.S. Regulation of circadian clock transcriptional output by CLOCK:BMAL1 // PLoS Genet. — 2018 — Vol. 14. — e1007156. — doi:10.1371/journal.pgen.1007156.
- Cox K.H., Takahashi J.S. Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism // J Mol Endocrinol. — 2019. — Vol. 63. — P. R93-R102. — doi:10.1530/JME-19-0153
- Shostak A. Human Clock Genes and Cancer // Curr Sleep Med Reports. — 2018. — Vol. 4. — P. 65–73. — doi:10.1007/s40675-018-0102-y.

- van den Heiligenberg S., Deprés-Brummer P., Barbason H. et al. The tumor promoting effect of constant light exposure on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats // Life Sci. — 1999. — Vol. 64. — P. 2523–2534. — doi:10.1016/s0024-3205(99)00210-6.
- Панченко А.В., Петрищев Н.Н., Кветной И.М., Анисимов В.Н. Канцерогенез в толстой кишке крыс в условиях различных режимов освещения // Вопросы онкологии. — 2008. — Т. 54. — С. 332–337. [Panchenko A.V., Petrishchev N.N., Kvetnoi I.M., Anisimov V.N. Colon carcinogenesis in rat vs. variable light // Voprosy Onkologii. — 2008. — Vol. 54. — P. 332–337 (In Russ.)].
- Filipski E., Delaunay F., King V.M. et al. Effects of Chronic Jet Lag on Tumor Progression in Mice // Cancer Res. — 2004. — Vol. 64. — P. 7879–7885. — doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0674.
- Schwimmer H., Metzger A., Pilosof Y. et al. Light at night and melatonin have opposite effects on breast cancer tumors in mice assessed by growth rates and global DNA methylation // Chronobiol Int. — 2014. — Vol. 31. — P. 144–150. — doi:10.3109/07420528.2013.842925
- Dauchy R.T., Xiang S., Mao L. et al. Circadian and Melatonin Disruption by Exposure to Light at Night Drives Intrinsic Resistance to Tamoxifen Therapy in Breast Cancer // Cancer Res. — 2014. — Vol. 74. — P. 4099–4110. — doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3156.
- Papagiannakopoulos T., Bauer M.R., Davidson S.M. et al. Circadian Rhythm Disruption Promotes Lung Tumorigenesis // Cell Metab. — 2016. — Vol. 24. — P. 324–331. doi:10.1016/j.cmet.2016.07.001.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Painting, firefighting, and shiftwork // IARC Monogr Eval Carcinog risks to humans. — 2010. — Vol. 98. — P. 9–764.
- Панченко А.В., Губарева Е.А., Анисимов В.Н. Роль циркадных ритмов и “клеточных часов” в старении и развитии онкологических заболеваний // Успехи геронтологии. — 2016. — Т.29. — С. 29–37. [Panchenko A.V., Gubareva E.A., Anisimov V.N. Role of circadian rhythms and cellular clock in aging cancer development // Advances in Gerontology. — 2016. — Vol. 29. — P. 29–37. (In Russ.)].
- Savvidis C., Koutsilieris M. Circadian rhythm disruption in cancer biology // Mol Med. — 2012. — Vol. 18. — P. 1249–1260. — doi:10.2119/molmed.2012.00077.
- Soták M., Polidarová L., Ergang P. et al. An association between clock genes and clock-controlled cell cycle genes in murine colorectal tumors // Int J cancer. — 2013. — Vol. 132. — P. 1032–1041. — doi:10.1002/ijc.27760.
- Masri S., Papagiannakopoulos T., Kinouchi K. et al. Lung Adenocarcinoma Distally Rewires Hepatic Circadian Homeostasis // Cell. — 2016. — Vol. 165. — P. 896–909. —doi:10.1016/j.cell.2016.04.039.
- Huisman S.A., Oklejewicz M., Ahmadi A.R. et al. Colorectal liver metastases with a disrupted circadian rhythm phase shift the peripheral clock in liver and kidney // Int J Cancer. — 2015. — Vol. 136. — P. 1024–1032. — doi:10.1002/ijc.29089.
- Tan X.-M., Ye H., Yang K. et al. Circadian variations of clock gene Per2 and cell cycle genes in different stages of carcinogenesis in golden hamster buccal mucosa // Sci Rep. — 2015. — Vol. 5. — P. 9997. — doi:10.1038/srep09997.

18. Ye H., Yang K., Tan X.-M. et al. 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. — Vol. 1419. doi:10.2147/OTT.S83710
19. Puram R.V., Kowalczyk M.S., de Boer C.G. et al. Core Circadian Clock Genes Regulate Leukemia Stem Cells in AML // *Cell.* — 2016. — Vol. 165(2):303-316. — doi:10.1016/j.cell.2016.03.015.
20. de Assis L., Moraes M., Magalhães-Marques K. et al. Non-Metastatic Cutaneous Melanoma Induces Chronodisruption in Central and Peripheral Circadian Clocks // *Int J Mol Sci.* — 2018. — Vol. 19. — P. 1065. — doi:10.3390/ijms19041065.
21. Altman B.J., Hsieh A.L., Sengupta A. et al. MYC Disrupts the Circadian Clock and Metabolism in Cancer Cells // *Cell Metab.* — 2015. — Vol. 22. — P. 1009. — doi:10.1016/j.cmet.2015.09.003.
22. Hojo H., Enya S., Arai M. et al. Remote reprogramming of hepatic circadian transcriptome by breast cancer // *Oncotarget.* — 2017. — Vol. 8. — P. 34128-34140. — doi:10.18632/oncotarget.16699.
23. Payne J.K. Altered Circadian Rhythms and Cancer-Related Fatigue Outcomes // *Integr Cancer Ther.* — 2011. — Vol. 10. — P. 221-233. — doi:10.1177/1534735410392581.
24. Бланк М.А., Корнелиссен Ж., Бланк О.А. Нарушение суточных ритмов у онкологических больных // *Евразийский Союз Ученых.* — 2014. — Т. 7. — С. 21–24. [Blank M.A., Cornelissen J., Blank O.A. Narushenie sutochnych ritmov u onkologicheskich bolnykh // *Evrasiysky Souz Uchenych.* — 2014. — Vol. 7. — P. 21–24. (In Russ.)].

Поступила в редакцию 03.04.2020 г.

*E.A. Gubareva, A.V. Panchenko, M.A. Maydin,
E.I. Fedoros, M.L. Tyndyk, G.A. Yanus, V.N. Anisimov,
G.S. Kireeva*

Disrupted daily oscillations of clock genes expression and clock proteins content in tumors and distant tissues in HER2/neu transgenic mice

N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Saint-Petersburg

Summary. The connection between circadian rhythms and cancer is bilateral at the body and cellular level. Negative impact of tumor development on circadian rhythms represents one of its aspects.

Materials and methods. 16 FVB/N and 16 FVB/N transgenic HER2/neu female mice were used in the experiment. 4 mice of each line were euthanized at ZT0 (light switch-on time), ZT6, ZT12 and ZT18. Bmal1, Clock and Cry1 gene expression was evaluated in the suprachiasmatic nucleus, liver, mammary tissue and tumors by real-time PCR. Content of BMAL1 and CLOCK proteins in mammary tissue and tumors was evaluated by immunohistochemistry.

Results. Absence of clock genes expression and clock proteins content daily oscillations was observed in spontaneous mammary adenocarcinomas of HER2/neu transgenic mice. We also revealed decrease in peak values of clock genes expression in the suprachiasmatic nucleus, liver and mammary gland in tumor-bearing animals.

Conclusions. The obtained data confirm the hypothesis about disruption of circadian rhythms in breast tumors and negative influence of tumors on the rhythms of the whole organism.

Key words: mammary tumors, clock genes, clock proteins, circadian rhythms, mice