

*Е.А. Губарева, М.Н. Юрова, М.Л. Тындык, М.А. Майдин, Г.А. Янус,
П.А. Егормин, А.В. Панченко, В.Н. Анисимов*

Влияние постоянного освещения и мелатонина на канцерогенез легких, индуцированный уретаном у мышей, и экспрессию часовых генов и белков

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Актуальность. Циркадианные ритмы являются механизмом адаптации к смене дня и ночи. На клеточном уровне они поддерживаются за счет осцилляций транскрипции часовых генов *Bmal1*, *2*, *Clock* и *Npas2*, *Per1–3*, *Cry1*, *2*; синхронизация ритмов в организме происходит с участием «гормона темноты» мелатонина. Накоплены надежные данные о том, что нарушения биологических «часов» на клеточном и/или организменном уровне связаны с канцерогенезом, однако экспериментальные исследования в этом направлении остаются недостаточными.

Цель. Оценить влияние постоянного освещения и введения мелатонина на химически индуцированный канцерогенез у мышей и экспрессию часовых генов и белков в нормальной и опухолевой ткани легкого.

Материалы и методы. Опухоли легкого были индуцированы уретаном у 120 мышей-самцов линии SHR. С первых суток опыта животные содержались при постоянном (LL) или стандартном освещении (LD); половина животных при каждом световом режиме получала мелатонин (MT) ежедневно в дозе 20 мг/л в течение 45 нед опыта с питьевой водой ночью. В конце эксперимента оценивали частоту и множественность опухолей легкого различных размеров. Экспрессию часовых генов *Clock*, *Bmal1*, *Cry1* оценивали в образцах опухолей и нормальной ткани легкого с использованием метода ПЦР в режиме реального времени; содержание белков *BMAL1*, *CLOCK*, *CRY1* и *PER2* определяли с помощью иммуногистохимии. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ MS Excel 2007, GraphPad Prism 6.0 с использованием общепринятых статистических критериев.

Результаты. Число животных с опухолями легкого составило от 89 до 100% в различных группах. Опухоли крупного размера (>2 мм) статистически значимо чаще наблюдались у животных группы LL (62 опухоли из 294, 21,1%), чем в группе LD (59 опухолей из 405, 14,6%, $p=0,0245$). Введение экзогенного мелатонина при постоянном освещении статистически значимо уменьшало частоту крупных опухолей (28 опухолей из 320, 8,8%, $p=0,0001$ по сравнению с LL). В нормальной ткани легкого животных, содержащихся при постоянном освещении (LL), было выявлено повышение относительной экспрессии часовых генов по сравнению с группой LD: *Bmal1* в 3,1 раза ($p=0,02$) и *Cry1* в 3,6 раз ($p=0,0002$). Для гена *Clock* таких различий не обнаружено. Относительное содержание белков *BMAL1* и *CLOCK* во всех вариантах опыта было выше в аденомах и аденокарциномах по сравнению с нормальной тканью.

Выводы. Выявлено, что постоянное освещение промотирует развитие химически индуцированных опухолей легкого, а введение мелатонина тормозит канцерогенез при постоянном освещении. Установлено, что в опухолях лёгких содержание белков-активаторов транскрипции *BMAL1* и *CLOCK* возрастает по сравнению с нормальной тканью, тогда как повышения уровня экспрессии соответствующих генов в опухолях не наблюдалось.

Ключевые слова: канцерогенез, режим освещения, часовые гены, опухоль легкого, уретан, мыши

E.A. Gubareva, M.N. Yurova, M.L. Tyndyk, M.A. Maydin, G.A. Yanus, P.A. Egormin, A.V. Panchenko, V.N. Anisimov

The effect of constant light and melatonin on urethane-induced lung carcinogenesis in mice and expression of clock genes and proteins

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

Introduction. Circadian rhythms are an adaptational mechanism to day-night cycle. At the cellular level rhythms are supported by oscillations of transcription of *Bmal1*, *2*, *Clock* and *Npas2*, *Per1-3*, *Cry1*, *2* clock genes; in the organism rhythms are synchronized with melatonin, the «hormone of darkness». Reliable data have been obtained that disruption of biological «clocks» at the cellular and/or organism level are associated with carcinogenesis, but the experimental results in this direction remain incomplete.

Aim. Assessment of the continuous lighting and melatonin administration effects on chemically induced carcinogenesis in mice and expression of clock genes and proteins in normal and tumor lung tissue.

Materials and methods. Lung tumors were induced by urethane in 120 male SHR mice. Animals were kept at constant (LL) or standard (LD) light; half of the animals received melatonin (MT) daily at 20 mg/l at night with water for 45 weeks of experiment. At the end of the experiment, the frequency and multiplicity of lung tumours of different size were assessed. Expression of clock genes *Clock*, *Bmal1*, *Cry1* was assessed in tumor samples and normal lung tissue by real-time PCR; protein content of *BMAL1*, *CLOCK*, *CRY1* and *PER2* was determined by immunohistochemistry. Statistical data were processed using the programs MS Excel 2007, GraphPad Prism 6.0 with commonly used statistical criteria.

Results. The number of animals with lung tumors was between 89 and 100% in different groups. Large tumors (>2 mm) were more frequently observed in LL group (62 tumors out of 294, 21.1%) than in LD group (59 tumors out of 405, 14.6%, $p=0.0245$). Administration of exogenous melatonin at constant lighting statistically significantly reduced the frequency of large tumors (28 tumors out of 320, 8.8%, $p=0.0001$ in comparison with LL). In normal lung tissue of animals kept at constant lighting (LL) the increase in relative expression of clock genes in comparison with LD group was revealed: *Bmal1* by 3.1 times ($p=0.02$) and *Cry1* by 3.6 times ($p=0.0002$). No such differences were found for *Clock* gene. The relative content of *BMAL1* and *CLOCK* proteins in all experimental conditions was higher in adenomas and adenocarcinomas compared to normal tissue.

Conclusion. Constant lighting promotes the development of chemically induced lung tumors, and melatonin administration inhibits carcinogenesis under constant lighting. The content of *BMAL1* and *CLOCK* transcription activator proteins in lung tumors was found to increase in comparison with normal tissue, whereas no increase in the expression level of corresponding genes in tumors was observed.

Key words: carcinogenesis, light regimen, clock genes, lung tumor, urethan, mice