

Б. Экспериментальные исследования

© Коллектив авторов, 2021
УДК 612.086
DOI 10.37469/0507-3758-2021-67-3-430-435

Вопросы онкологии, 2021. Том 67, №3

*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

Введение

Циркадианные, или суточные, ритмы (ЦР) живых организмов существуют как адаптация к смене дня и ночи. На клеточном уровне циркадианные ритмы поддерживаются за счет осцилляций транскрипции часовых генов *Bmal1*, 2, *Clock* и *Npas2*, *Per1–3*, *Cry1*, 2 [1]. На организменном уровне важную роль в син-

хронизации ритмов с внешней средой играет гормон «темноты» мелатонин (МТ), синтезируемый эпифизом [2]. Помимо основного биологического эффекта, мелатонин демонстрирует антиоксидантные, антигонадотропные и противоопухолевые свойства [3]. Доказано, что избыточное освещение в ночные часы угнетает синтез мелатонина эпифизом и увеличивает риск развития многих заболеваний, в том числе онкологических [4, 5].

Также известно, 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 [6]. При этом экспериментальные данные о ритме экспрессии часовых генов в опухолях не позволяют выявить общих тенденций [7, 8].

Возможности влияния на циркадианные ритмы в опухолях, а также влияние нарушения режима освещения и введения мелатонина на клеточные «часы» в них остаются недостаточно изученными. Кроме того, в некоторых экспериментах описано противоопухолевое действие мелатонина в условиях стандартного и постоянного освещения [9, 10], тогда как в других работах показано, что мелатонин не угнетает канцерогенез при нарушении суточных ритмов [11, 12].

Целью исследования была оценка влияния постоянного освещения и введения мелатонина на химически индуцированный канцерогенез легкого у мышей и экспрессию часовых генов и белков в нормальной и опухолевой ткани легкого.

Материалы и методы

В опытах использовали аутбредных мышей-самцов SHR в возрасте 3 мес массой тела 25–30 г (питомник Рапполово, ЛО, Россия). Исследования были одобрены локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ Онкологии им. Н.Н. Петрова» (Протокол №2 от 16.01.2017 г.). Животные содержались при температуре 20–24 °С, получали водопроводную воду и лабораторный корм для грызунов (ПК-120, ООО «Лабораторкорм», Россия) *ad libitum*.

120 мышам на 0 сут опыта внутривенно однократно ввели уретан (Fluka, Швейцария) в дозе 1 г/кг. После рандомизации первую и третью группы мышей содержали при стандартном освещении — LD (освещение с 08:00 до 20:00 MSK, 500 Лк), вторую и четвертую — в условиях постоянного освещения — LL (500 Лк). Мыши третьей и четвертой групп получали мелатонин ($\geq 99\%$, Sigma, США) с питьевой водой в концентрации 20 мг/л с 1 сут эксперимента в ночное время (с 20.00 ч до 08.00 ч), группы обозначены как LDMT и LLMT соответственно. За животными вели ежедневное наблюдение в течение 45 нед эксперимента.

После эвтаназии с последующей немедленной аутопсией в конце опыта по пять животных с опухолями из каждой группы были использованы для оценки экспрессии часовых генов. Образцы тканей замораживали в

жидком азоте и хранили при -80 °С. Выделяли общую РНК путем гомогенизации образцов с реагентом TRIzol (ThermoFisherScientific). РНК использовали для проведения реакции обратной транскрипции и получения кДНК. Далее проводили ПЦР в режиме реального времени с праймерами к генам *Clock*, *Bmal1*, *Cry1*, и гену β -актина (референтный ген). Относительный уровень экспрессии вычисляли по формуле: $E_{target} = 2^{-(Cq_{reference} - Cq_{target})}$, где $Cq_{reference}$ и Cq_{target} — количество циклов амплификации, необходимых для наработки детектируемого уровня продукта реакции.

От других животных кусочки тканей с опухолями фиксировали в 10% нейтральном формалине, затем под лупой подсчитывали число и размеры опухолевых узлов, которые делили на малые (≤ 1 мм), средние (1,1–2 мм) и крупные (> 2 мм). После гистологической проводки кусочки органов заливали в парафин, готовили микротомные срезы толщиной 3–5 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Выявленные новообразования классифицировали согласно рекомендациям МАИР.

Для проведения иммуногистохимического окрашивания использовали первичные антитела к *BMAL1* (NovusBiologicals, NB100-2288), *CLOCK* (NovusBiologicals, NB100-92284), *CRY1* (NovusBiologicals, NBPI-69080) и *PER2* (ThermoScientific, PA5-23339). Затем наносили вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой (Anti-Rabbit EnVision System, Dako, Дания) и раствор хромогена — диаминобензидин (ДАБ, 1:50 в буфере Liquid Dab+ Substrate Chromogen System, Dako, Дания). Срезы докрашивали в гематоксилине Майера, затем дегидратировали и заключали в синтетическую среду Biomount.

Для оценки *BMAL1* на микрофотографиях срезов легкого измеряли оптическую плотность, соответствующую окрашиванию ДАБ и вычисляли относительное содержание белка *BMAL1* в опухолях по сравнению с нормальной тканью. Окраску антителами к *CLOCK* оценивали в аденомах и аденокарциномах в баллах от 1 до 3 (1 — слабое окрашивание, 3 — интенсивное). В каждой группе было оценено не менее 10 опухолей.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ MS Excel 2007, GraphPad Prism 6.0. 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 и точный критерий Фишера. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Основные показатели канцерогенеза легкого приведены в таблице. Число животных с опухолями легкого составило от 89 до 100%. Опухоли крупного размера (> 2 мм) статистически значимо чаще наблюдались у животных группы LL (62 опухоли из 294, 21,1%) против 59 опухолей из 405, 14,6%) в группе LD. Введение экзогенного мелатонина при постоянном освещении статистически значимо уменьшало частоту крупных (28 опухолей из 320, 8,8%) по сравнению с LL. Введение мелатонина в группе LD не влияло на частоту опухолей разного размера, однако в дан-

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 (%) ¹	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 число 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 ²	28 (8,8) p=0,0001 ³

¹ Из каждой группы по пять животных с опухолями были использованы для оценки экспрессии часовых генов и в расчетах прочих приведенных показателей не учитывались; ² сравнение с группой LD; ³ сравнение с LL (точный тест Фишера).

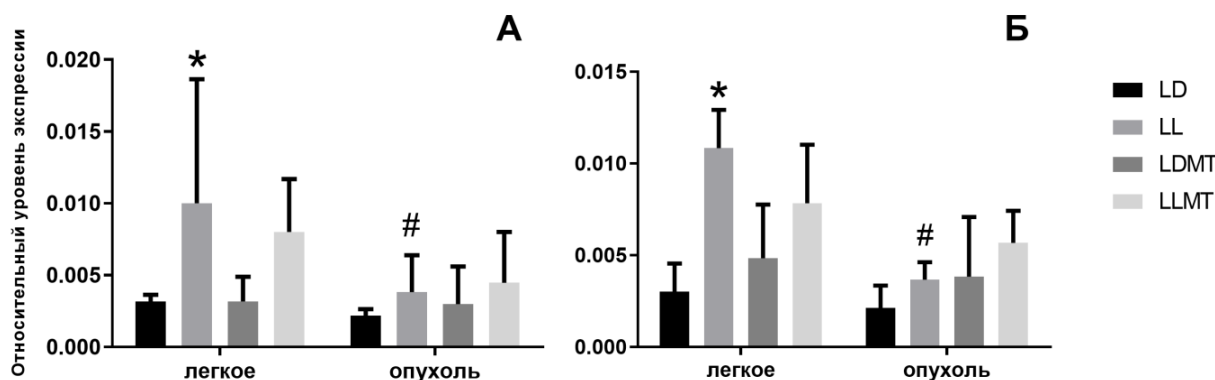


Рис. 1. Экспрессия генов Bmal1 (А) и Cry1 (Б) в образцах нормальной и опухолевой ткани легкого (M ± m).

* 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

ной группе было выявлено наименьшее общее количество опухолей (236).

При оценке в нормальной ткани легкого животных уровня относительной экспрессии гена Bmal1 (рис. 1, А) в группе постоянного освещения (LL) выявлено ее увеличение в 3,1 раза по сравнению с обычным режимом (LD) (p=0,02). В опухолях относительная экспрессия гена Bmal1 между группами не отличалась, но в опухолевой ткани легкого у животных группы LL она была в 2,6 раза ниже (p=0,03), чем в нормальной ткани легкого этих же животных.

Экспрессия гена Cry1 (рис. 1, Б) в нормальной ткани легкого была выше в 3,6 раза (p=0,0002) у животных, содержащихся в условиях постоянного освещения (LL) по сравнению с группой стандартного освещения (LD). Экспрессия гена Cry1 в опухолевой ткани легкого в группе LL была в 2,9 раза ниже (p=0,0005), чем в нормальной ткани легкого этих же животных.

Относительная экспрессия гена Clock статистически значимо не различалась ни между

группами, ни между нормальной и опухолевой тканью (данные не приведены).

Относительное содержание белка BMAL1 (рис. 2, А) во всех опытных группах было выше в аденомах (в 1,13–2,08 раза) и аденокарциномах (в 2,58–2,98 раза) по сравнению с нормальной тканью легкого (значение принято за 1). Статистически значимые различия в относительном содержании белка BMAL1 между аденомами и аденокарциномами наблюдались в группах LD (в 2 раза, p=0,005) и LDMT (в 2,4 раза, p=0,04).

Интенсивность окрашивания аденокарцином антителами к CLOCK во всех группах была статистически значимо выше, чем в аденомах (рис. 2, Б). Так, в группе LD интенсивность окрашивания аденом составляла в среднем 1,29±0,20 баллов, аденокарцином — 2,58±0,16 баллов (p=0,0001). Для группы LL эти значения составили 1,50±0,33 и 2,54±0,15 соответственно (p=0,005). Введение мелатонина не влияло на данный показатель: так, для группы LDMT получены значения в 1,33±0,41 балла для аденом и 2,67±0,18 для аденокарцином

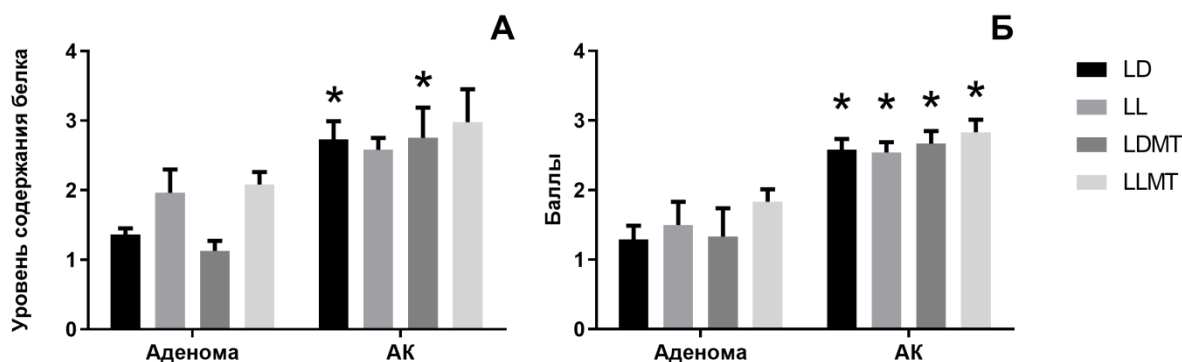


Рис. 2. Относительная интенсивность окрашивания антителами к BMAL1 (А) и CLOCK (Б) аденом и аденокарцином легкого (M ± m).

* $p < 0,05$ при сравнении с аденомами в той же группе, U-критерий Манна–Уитни. Для BMAL1 интенсивность окрашивания нормальной ткани легкого принята за 1

($p=0,002$), а для группы LLMT — $1,83 \pm 0,18$ и $2,83 \pm 0,18$ соответственно ($p=0,009$).

Обсуждение

В нашем опыте выявлено, что постоянное освещение приводит к увеличению частоты встречаемости крупных опухолей легкого. Введение мышам экзогенного мелатонина при нормальном освещении не оказывало статистически значимого влияния на параметры канцерогенеза, хотя общее число опухолей было наименьшим в группе LDMT. Эффект от введения мелатонина в группе LLMT проявился в уменьшении числа крупных опухолей. На модели опухолей легкого, индуцированных уретаном у мышей SHR/u, Веснушкиным Г.М. и соавт. в 2006 г. [13] был показан более 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. Показано, что у мышей с перевитой карциномой легкого Льюиса применение мелатонина ведет к уменьшению частоты метастазирования только в условиях стресса [14]. Мелатонин угнетает рост некоторых клеточных линий рака легкого [15] и повышает чувствительность опухолевых клеток к воздействию химиотерапевтических препаратов [16, 17]. Таким образом, введение мелатонина можно потенциально рассматривать как важный аспект сопутствующего лечения пациентов с раком легкого.

Экспериментальные исследования подтверждают, что нарушение суточных ритмов играет значимую 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 [18].

Несмотря на то, что в нашем опыте существенного изменения экспрессии генов Bmal1 и Clock не обнаружено, иммуногистохимическое окрашивание позволило выявить повышение содержания соответствующих им белков в аденомах по сравнению с нормальной тканью, а также в аденокарциномах по сравнению с аденомами. Для гена Cry1 и соответствующего белка ситуация обратная — при наличии экспрессии гена окрашивание антителами к белку CRY1 не позволило выявить детектируемого его количества. Вероятно, механизмы пост-трансляционных модификаций, которые приводят к деградации белков, изменены в опухолевых клетках по сравнению с нормальными.

Известно, что в злокачественных опухолях легкого человека экспрессия часовых генов нарушается, причем уровень их экспрессии коррелирует с прогнозом пациентов [19] и стадией заболевания [18]. Кроме того, показано, что именно согласованная ритмическая экспрессия часовых и многих других генов нарушается в опухолях легкого по сравнению с нормальной тканью [20].

Проведенный эксперимент подтвердил, что постоянное освещение промотирует канцерогенез легкого у лабораторных мышей, а мелатонин снижает этот эффект. Развитие опухолевого процесса сопровождается изменением содержания часовых белков в опухолях по сравнению с нормальной тканью.

Заключение

Анализ литературных данных и полученные нами результаты свидетельствуют о взаимосвязи нарушения суточных ритмов и опухолевого процесса, а также об антиканцерогенном эффекте мелатонина при канцерогенезе легкого.

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 было выявлено.

Вклад авторов:

Губарева Е.А. — получение данных, анализ полученных данных, написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи;

Юрова М.Н. — получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи;

Тындык М.Л. — получение данных для анализа;

Майдин М.А. — получение данных для анализа;

Янус Г.А. — анализ полученных данных;

Егормин П.А. — анализ полученных данных;

Панченко А.В. — анализ полученных данных, написание текста рукописи;

Анисимов В.Н. — руководство исследованием, редактирование рукописи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 18-75-10017 от 08 августа 2018 г.

ЛИТЕРАТУРА

- Cox KH, Takahashi JS. Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism // J. Mol. Endocrinol. BioScientifica Ltd. 2019;63(4): R93–R102. https: // doi: 10.1530/JME-19-0153
- Bollinger T, Schibler U. Circadian rhythms — from genes to physiology and disease // Swiss Med. Wkly. 2014;144: w13984. https: // doi: 10.4414/smw.2014.13984
- Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Tan D-X et al. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis // Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). 2017;18(4). https: // doi: 10.3390/ijms18040843
- Anisimov VN, Vinogradova IA, Panchenko AV et al. Light-at-night-induced circadian disruption, cancer and aging // Curr. Aging Sci. 2012;5(3):170–177. https: // doi: 10.2174/1874609811205030002
- Megdal SP, Kroenke CH, Laden F et al. Night work and breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis // Eur. J. Cancer. 2005;41(13):2023–2032. https: // doi: 10.1016/j.ejca.2005.05.010
- Ye Y, Xiang Y, Ozguc FM et al. The Genomic Landscape and Pharmacogenomic Interactions of Clock Genes in Cancer Chronotherapy // Cell Syst. Howard Hughes Medical Institute. 2018;6(3):314–328.e2. https: // doi: 10.1016/j.cels.2018.01.013
- Masri S, Papagiannakopoulos Th, Kinouchi K et al. Lung Adenocarcinoma Distally Rewires Hepatic Circadian Homeostasis // Cell. 2016;165(4):896–909. https: // doi: 10.1016/j.cell.2016.04.039
- 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;5(1):9997. https: // doi: 10.1038/srep09997
- 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;31(1):144–150. https: // doi: 10.3109/07420528.2013.842925
- Dauchy RT, 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;74(15):4099–4110. https: // doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3156
- Baturin DA, Alimova IN, Anisimov VN et al. 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 // Neuro Endocrinol. Lett. 2001;22(6):441–447.
- Otálora BB, Madrid JA, Alvarez N et al. Effects of exogenous melatonin and circadian synchronization on tumor progression in melanoma-bearing C57BL6 mice // J. Pineal Res. 2008;44(3):307–315. https: // doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00531.x
- Веснушкин Г.М, Плотникова Н.А., Семенченко А.В., Анисимов В.Н. Мелатонин угнетает канцерогенез легких, индуцируемый уретаном в мышей // Вопросы онкологии. 2006;52(2):164–168.
- Mocchegiani E, Perissin L, Santarelli L et al. Melatonin administration in tumor-bearing mice (intact and pinealectomized) in relation to stress, zinc, thymulin and IL-2 // Int. J. Immunopharmacol. 1999;21(1):27–46. https: // doi: 10.1016/s0192-0561(98)00067-8
- Fan C, Pan Yu, Yang Y et al. HDAC1 inhibition by melatonin leads to suppression of lung adenocarcinoma cells via induction of oxidative stress and activation of apoptotic pathways // J. Pineal Res. 2015;59(3):321–333. https: // doi: 10.1111/jpi.1226
- Kontek R, Nowicka H. The modulatory effect of melatonin on genotoxicity of irinotecan in healthy human lymphocytes and cancer cells // Drug Chem. Toxicol. 2013;36(3):335–342. https: // doi: 10.3109/01480545.2012.737805
- Plaimee P, Weerapreeyakul N, Barusux S, Johns NP et al. Melatonin potentiates cisplatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells // Cell Prolif. 2015;48(1):67–77. https: // doi: 10.1111/cpr.12158
- Papagiannakopoulos T, Bauer MR, Davidson SM et al. Circadian Rhythm Disruption Promotes Lung Tumorigenesis // Cell Metab. NIH Public Access. 2016;24(2):324–331. https: // doi: 10.1016/j.cmet.2016.07.001
- Qiu M, Chen Y-B, Jin S et al. Research on circadian clock genes in non-small-cell lung carcinoma // Chronobiol. Int. 2019;36(6):739–750. https: // doi: 10.1080/07420528.2018.1509080

20. Shiits J, Chen G, Hughey JJ. Evidence for widespread dysregulation of circadian clock progression in human cancer // *F1000Research*. 2018;6:e4327. [https://doi: 10.7717/peerj.4327](https://doi.org/10.7717/peerj.4327).

Поступила в редакцию 23.07.2020 г.

*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