

А.Г. Голубев, А.В. Панченко, Е.А. Губарева, Г.С. Киреева, В.Н. Анисимов

«Часовые» гены и рак молочной железы

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

«Часовые» гены (ЧГ) являются центральными компонентами генерации циркадных циклов (ЦЦ) в организме, обеспечивающих соответствие его состояния времени суток. Нарушения этого соответствия как со стороны внешних условий (сменная работа, избыточное ночное освещение, смена часовых поясов), так и со стороны изменений в ЦЦ организма, в том числе на уровне ЧГ, являются факторами риска развития опухолей, в первую очередь рака молочной железы (РМЖ). Рассмотрены обзоры и результаты мета-анализа эпидемиологических данных и экспериментальных работ по этой проблеме, опубликованные за последние 5 лет. Наиболее значимым феноменом является существенное повышение риска РМЖ у женщин, имеющих сменный характер работы. Представляется перспективной разработка схем применения мелатонина, позволяющих синхронизировать ЦЦ в опухоли и организме так, чтобы совместить по времени суток максимумы чувствительности опухоли к терапии и резистентности организма к ее возможным побочным эффектам.

Ключевые слова: часовые гены, циркадные циклы, рак молочной железы, факторы риска, мелатонин

Введение: краткая характеристика часовых генов

Экспрессия так называемых «часовых» генов (ЧГ) обеспечивает соответствие состояния организма суточным (циркадным) циклам (ЦЦ) изменений условий его существования. Это достигается реализуемыми с задержкой обратными отрицательными связями между уровнями экспрессии ЧГ (рис. 1).

Белковые продукты ЧГ являются транскрипционными факторами [76]. Их обозначения возникли в связи с обстоятельствами их идентификации и далее будут использоваться без дополнительных комментариев. Продукты генов BMAL1(2) — одноименные белки — образуют в цитоплазме димеры с продуктом гена CLOCK или NPAS. Поступая в ядро, эти димеры связываются с участками ДНК (E-boxes) в промоторах генов Per(1-3), Cry(1,2), Rev-Erb (a, b) и ROR (a, b, g), активируя их экспрессию. Димеры белковых продуктов генов Per(1-3) и Cry(1,2), поступая из цитоплазмы в ядро, блокируют действие BMAL1/CLOCK на E-боксы, в том числе в собственных промоторах, подавляя таким образом продукцию самих себя. Это — основная петля обратной связи в системе часовых генов. Кроме того, экспрессию BMAL1 и NPAS ингиби-

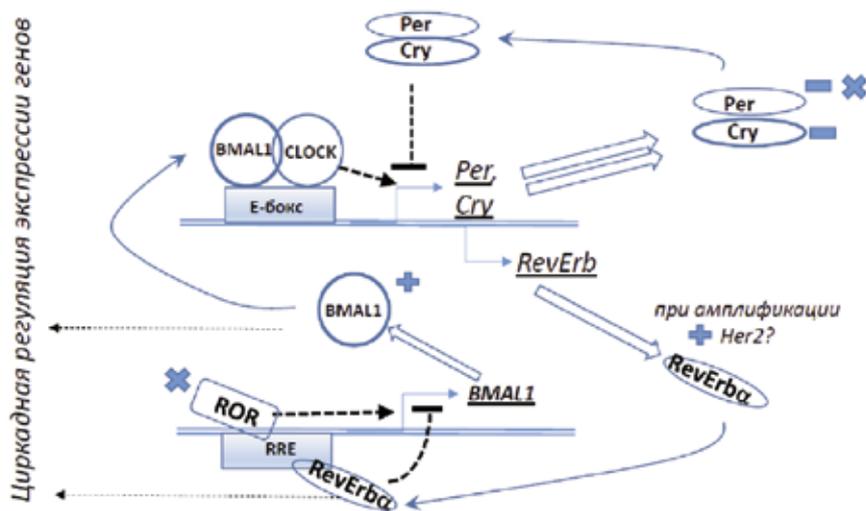


Рис. 1. Упрощенная схема взаимоотношений между ключевыми ЧГ. Объяснения в тексте. Наиболее характерные изменения при раке молочной железы указаны символами:

«+» — повышенная экспрессия, «-» — пониженная экспрессия, «x» — мутации

руют Rev-Erb и стимулируют ROR. Поскольку для транскрипции, трансляции, димеризации, поступления в ядро и образования комплексов транскрипционных факторов на промоторах генов-мишеней требуется время, ингибирование действия генов BMAL и CLOCK запаздывает относительно максимума их действия. Такие запаздывающие транскрипционно-трансляционные обратные связи и формируют колебательные режимы экспрессии участников этих взаимодействий в каждой отдельной клетке.

Сайты связывания BMAL/CLOCK и других ЧГ имеются в промоторах многих генов, участвующих в метаболических, секреторных и других функциях клеток, что приводит к циркадному режиму их выполнения. При этом димеры BMAL/CLOCK выступают как «пионерские» транскрипционные факторы: CLOCK ацетирует определенные гистоны, что создает возможность для экспрессии генов при действии других транскрипционных факторов [52, 80]. Так обеспечивается специфика ЦЦ тех или иных функций в различных типах клеток, а также сдвиги по фазам между разными функциями, оптимизирующие их взаимоотношения [94], например, конкуренцию за клеточные ресурсы.

Важнейшую роль в этой системе играют ковалентные модификации, такие как фосфорилирование и ацилирование, и протеасомальная деградация белковых продуктов ЧГ [76], зависящие от внутриклеточных сигнальных систем, что делает возможным регуляцию ЦЦ внешними по отношению к каждой отдельной клетке факторами, в частности взаимодействиями между клетками. Благодаря им, ЦЦ могут синхронизироваться в популяциях клеток, а фазы ЦЦ могут сдвигаться в соответствии с функциями органов, включающих в себя эти популяции, а также с внешними обстоятельствами, такими как смена дня и ночи или периодичность поступления пищи, и внутриклеточными условиями [88].

В организме млекопитающих роль центрального ритмоводителя выполняют нейроны супрахиазматического ядра (СХЯ) гипоталамуса. ЦЦ в них зависят от светового сигнала, воспринимаемого сетчаткой глаза, который передается, в частности, в верхние шейные ганглии. При этом активируются норадренергические нейроны, иннервирующие эпифиз, клетки которого синтезируют мелатонин в темное время суток [16].

Часовые гены и опухолевый рост: общие соображения

У каждой клетки свой ЦЦ, но в клеточных популяциях они синхронизируются взаимодействиями между клетками и настраиваются механизмами, действующими на уровне всего ор-

ганизма. Нарушения на любом из этих уровней могут сказываться на координации внутриклеточных процессов, включая те, что удерживают клетки от злокачественного перерождения. С другой стороны, независимость раковых клеток от системных ЦЦ может быть не только проявлением нарушенных регуляторных связей между опухолью и организмом, но способствовать росту опухоли. «Ускользание от циркадной регуляции — новоявленный критерий рака?» — так называется статья [18], подводящая итоги развития ситуации по состоянию на конец 2017 г.

Международное агентство по изучению рака (МАИР) признало еще 10 лет назад сменную работу, приводящую к нарушению ритма бодрствование/сон, возможным фактором риска развития РМЖ у человека (см. [31]).

Представляет большой практический интерес возможность влиянием на ЧГ синхронизировать фазы клеточного цикла раковых клеток с целью терапевтического воздействия в период наибольшей чувствительности к нему. Оценка состояния ЧГ может быть полезной для диагностики и прогноза. Учет таких факторов может свести к минимуму побочные эффекты терапии, зависящие от ЦЦ. Это направление получило в современной литературе название «хронотерапия» или «хронофармакология» [3, 56].

Число публикаций по этим вопросам непрерывно растет. Появились обзоры [40, 68, 70, 84], в том числе содержащие мета-анализ опубликованных данных [4, 53, 92]. Особое внимание привлекает связь ЧГ и РМЖ [7, 44, 64, 75]. Мета-анализ литературы по однонуклеотидным полиморфизмам ЧГ и риском рака (проанализированы 27 публикаций, 96756 обследованных, из них 38231 больных, и 687 полиморфизмов) выявил 10 полиморфизмов, связь которых с риском рака достоверна (в генах NPAS2, CLOCK, ROR a и b и Per3), и она для всех десяти относится к РМЖ и только для двух (в NPAS2) еще и к другим локализациям [4]. Из мета-анализа публикаций о влиянии сменной работы на риск онкологических заболеваний у женщин [92] следует такой рейтинг локализаций по относительному риску для занятых в сменной работе при сравнении с незанятыми: кожа 1,41, молочная железа 1,32, органы пищеварения 1,18; причем у медсестер на первом месте — молочная железа: 1,58.

Экспрессия часовых генов в опухолях

В работе [70] представлен анализ более 9000 записей в базе данных Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) без разбивки по локализациям. Частота случаев повышенной экспрессии ЧГ в опухолях выше (как прави-

ло в пределах 3-5%), чем пониженной (не более 0,5%). Исключения представлены генами RORg (экспрессия повышена в 8,6% случаев) и RevErba (экспрессия понижена в 2,4% и повышена в 5,3% случаев). Частота точечных мутаций не превышает 1%, чаще всего они выявляются у Per(1-3) (0,89, 0,92, 0,84% соответственно). Частота амплификаций также не превышает 1%, за исключением RORg (2,1%), что вписывается в относительно частое повышение его экспрессии, и RevErba (1,66%). RevErba локализован на участке хромосомы, содержащем также и ген Her2, который относительно часто амплифицирован в карциномах молочной железы, поэтому общее повышение частоты случаев повышенной экспрессии RevErba происходит практически полностью за счет таких вариантов РМЖ. Однако в целом, как свидетельствуют данные литературы, при РМЖ экспрессия RevErba снижена [90].

В работе [90] были рассмотрены с разбивкой по 14 типам рака результаты, доступные в базах данных Cancer Genome Atlas, Cancer Therapeutic Response Portal и The Genomics of Drug Sensitivity in Cancer. Проанализированы данные о 14 ключевых (core) ЧГ. Отмечено, что общий для всех опухолей паттерн экспрессии ЧГ не наблюдается. Экспрессия отдельных ЧГ может быть повышена в сравнении с нормальной тканью в одних опухолях, понижена в других и быть неизменной в третьих. Наименее подвержена изменениям экспрессия CLOCK. При наличии изменений они направлены всегда в сторону понижения у Per1 (13, включая РМЖ, из 14 видов рака), Per3 (11), RORa (11) и Cry1 (4), а только в сторону повышения — у BMAL (9, включая РМЖ). В остальных случаях можно говорить о преобладающих тенденциях: повышенная экспрессия более свойственна активаторам транскрипции в системе ЧГ, а пониженная — ингибиторам. Например, экспрессия Per2 (ингибитор) понижена в 7 случаях, в том числе РМЖ, и повышена в 1 из 14, а RORg — в 6 и 1 соответственно. Экспрессия Rev-ErbAa (активатор) повышена в 7 случаях и понижена в 1, причем этот 1 — именно случай карциномы молочной железы. В РМЖ, в отличие от других локализаций, повышена еще и экспрессия RORg. Таким образом, в опухолях МЖ, как правило, снижены уровни экспрессии всех Per, Rev-ErbAa, а также RORb и Cry2, и повышена экспрессия BMAL и RORg. Можно констатировать, что выводы по одной локализации совершенно необязательны для другой и даже для разных типов опухолей одной локализации.

РМЖ по числу мутаций в ЧГ ничем не отличается от других локализаций. Чаще всего они обнаруживаются в генах Per.

Отмечены особенности форм РМЖ, негативных по рецепторам эстрогенов и прогестерона. В таких случаях экспрессия BMAL еще выше, а Cry2, Per2 и ROR b и g еще ниже, чем при других видах РМЖ, а также повышена экспрессия NPAS.

Проведенный в работе [90] анализ результатов, полученных на моделях РМЖ *in vitro*, показал, что паттерны ЦЦ шести ЧГ, в том числе Per1 и BMAL1, выявляемые в клетках MCF10A (модель нормального эпителия МЖ), нарушены в трансформированных клетках MCF7. Однако в клетках MCF7 осцилляции выявляются в экспрессии 552 генов, экспрессия которых в клетках MCF10A неизменна. Эти данные позволяют предположить, что дело не в потере ЦЦ, а в их переходе на режим, отличный от действующего в нормальной эпителии молочной железы.

Этим выводам во многом соответствуют опубликованные позднее результаты исследования экспрессии генов CLOCK, BMAL1, NPAS2, Per1-3, Cry1 и 2 методом ПЦР в реальном времени в опухолях и прилежащей нормальной ткани у 107 больных РМЖ [42]. Экспрессия генов Per1-2 и Cry2 оказалась в опухолях сниженной, а гена CLOCK — повышенной. Снижение экспрессии по мере прогрессии опухоли отмечена только для Cry1. В негативных по рецепторам эстрогенов и прогестерона опухолях экспрессия генов Cry2, Per1, Per2 была меньше, чем в позитивных.

Таким образом, наименее противоречивые данные относительно РМЖ касаются ингибиторов экспрессии в системе ЧГ, и более всего генов группы Per, экспрессия которых в опухолях снижена в сравнении с нормальной тканью.

Экспрессия активаторов транскрипции в системе ЧГ, в отличие от ингибиторов, как правило, повышена (см. комментарий [18] к [90]). Это наводит на мысль, что активаторы способствуют опухолевому росту. Такой вывод подтверждается экспериментами на эмбриональных фибробластах мышей: индукция мутаций в генах CLOCK или Bmal1 снижает чувствительность клеток к действию трансформирующих агентов, тогда как воздействия, нарушающие функции генов Per и Cry, повышают ее [36]. Однако ситуация с геном Bmal1 не столь однозначна [70]. На основании того, что нокаут по Bmal1 в клетках рака легких и глиомы способствует пролиферации и инвазии клеток, а повышенная экспрессия снижает инвазию, предложено считать Bmal1 супрессором опухолевого роста, и этот вывод экстраполирован на РМЖ [44]. Экспрессия Bmal1 положительно коррелирует с продолжительностью жизни больных с меланомой [15]. С другой стороны, она повышена у больных с мезотелиомой плевры, что позволило предложить подавление

функций Bmal1 в качестве подхода к лечению таких больных [20].

Многочисленные неясности могут быть связаны именно с цикличностью экспрессии ЧГ. Сравнение между нормальной и опухолевой тканью допустимо только при отсутствии значительных сдвигов по фазе между ними, и только если образцы для сопоставления берутся в одно и то же время. Второе условие можно считать справедливым по умолчанию, но нет оснований считать, что первое соблюдается само собой. Как ни странно, это обстоятельство в публикациях как правило не оговаривается.

Попытка справиться с этой проблемой представлена в работе [69]. Авторы разработали алгоритмы выявления паттернов взаимосвязей (сигнатур) между уровнями экспрессии генов при их осцилляциях и использовали эти сигнатуры для анализа записей в публичных транскриптомных базах данных, относящихся к нормальным и опухолевым тканям. Анализ транскриптомов нормальных тканей мыши и человека подтвердил устойчивость таких сигнатур. В силу сложности процедуры, такой анализ данных по опухолям был ограничен раком легких. Он показал, что сигнатуры опухолевой и нормальной ткани легких статистически значимо различаются, и эти различия коррелируют с «опухолевой чистотой» проб ткани, взятых для транскриптомного анализа, то есть с долей собственно опухолевых клеток в сравнении с лимфоидными, соединительнотканями и другими сопутствующими клетками. Один из выводов этой работы состоит в том, что значительные фазовые сдвиги ЦЦ разных ЧГ в опухоли возможны без радикальных изменений их общей экспрессии.

Изменения в часовых генах как фактор риска развития опухоли

Даже если изменения экспрессии ЧГ в клеточных популяциях уже возникшего РМЖ могут играть роль в развитии опухоли, они мало что говорят о влиянии изменений в этих же генах на ее возникновение.

Для выявления связей между ЧГ и риском рака использован метод полногеномного анализа ассоциаций (genome-wide association study, GWAS). В работе [53] сопоставлены результаты мета-анализа более чем 15000 таких данных о РМЖ (материалы Консорциума Discovery, Biology, and Risk of Inherited Variants in Breast Cancer, DRIVE) с результатами по более чем 14000 данных о карциноме простаты (консорциум Elucidating Loci Involved in Prostate Cancer Susceptibility, ELLIPSE) и более чем 12000 данных о карциноме легких (консорциум Transdisciplinary Research in Cancer of the Lung,

TRICL). Общие для всех трех локализаций статистически значимые ассоциации повышенного риска заболевания были найдены с наличием полиморфизмов в генах CLOCK, RORa, RORb, BMAL1. Общими для РМЖ и рака легких оказались еще и Cry 1 и 2. Плюс специфическая только для РМЖ связь была найдена с полиморфизмами генов Per1 и RORg. Наиболее сильная связь между риском РМЖ (а также рака легких) и генными полиморфизмами была выявлена для RORa.

Был также проведен мета-анализ 15 опубликованных до середины 2016 г. эпидемиологических исследований связи между полиморфизмами ЧГ и риском РМЖ [64]. Авторы нашли, что в большинстве случаев заявление о найденной связи не подтверждается другими исследованиями. Кроме того, во многих случаях варианты полиморфизмов ЧГ, предрасполагающие к РМЖ, также предрасполагают к другим злокачественным новообразованиям или патологическим состояниям, таким как метаболический синдром и системные нарушения циркадных ритмов, которые сами по себе считаются факторами риска РМЖ.

В неоднозначность результатов по влиянию полиморфизмов ЧГ на риск РМЖ могут вносить свой вклад различия по численности лиц, подверженных разным факторам риска, в исследованных популяциях. Это в первую очередь относится к тем, кто занят в сменной работе. В исследовании на таких женщинах, проведенном во Франции [81], отмечена связь РМЖ с двумя полиморфизмами RORa, а в подгруппе постменопаузальных женщин — еще и с полиморфизмами CLOCK и NPAS2. В исследовании, проведенном в Германии [61] отмечено, что у редких носительниц гомозиготности по полиморфизмам в позиции rs10462028 (замена GG на AA) BMAL1 риск РМЖ повышен в 3,5 раза. В Норвегии [95] у носительниц TT в позиции rs2278749 гена BMAL1 и в позиции rs3749474 гена CLOCK риск РМЖ определен как сниженный, а повышен он, если вариантные аллели присутствуют в позициях rs2290035, rs2278749 и rs969485 гена BMAL1 и rs3750420 гена RORb.

При всей противоречивости данных литературы следует заметить, что подозреваемые в связи с риском РМЖ полиморфизмы, как правило, интронные, то есть они влияют на экспрессию генов, но не нарушают функции их белковых продуктов. В этой связи привлекает внимание возможность эпигенетических изменений в ЧГ, которые также влияют на их экспрессию, но не нарушают функции белков. В работе, проведенной в Норвегии [67], ДНК для исследований экстрагировалась из слюны. У больных РМЖ ночной режим работы оказался

связанным с повышением метилирования генов CLOCK, BMAL1, CRY1 и PER1. При экстракции ДНК из цельной крови у медсестер в Польше снижение метилирования промотора PER2 было обнаружено у занятых в ночные смены, а при длительном стаже сменной работы (более десяти лет), отмечено снижение метилирования промоторов Per1 и BMAL1 [65].

Отсутствие четких корреляций между эпидемиологическими данными и результатами анализа экспрессии ЧГ в опухолях и вовлечение подозреваемых полиморфизмов в развитие не только РМЖ, но и других патологических процессов, в том числе системных, позволяет предполагать, что наиболее вероятно наследуемые полиморфизмы ЧГ влияют на клетки молочной железы не прямо, а опосредованы изменениями метаболического, гормонального и/или иммунологического состояния организма.

В такой ситуации изменения в каком-либо ЧГ, включая мутации и эпигенетические модификации, выявляемые в самой раковой ткани, могут быть вторичными относительно ракового перерождения, даже если его риск зависит от тех изменений состояния организма, в которые вносит вклад тот же ЧГ, а также могут быть результатом последующего отбора раковых клеток на нечувствительность к факторам противораковой защиты организма и к терапевтическим воздействиям. Здесь следует различать изменения, действительно способствующие выживанию и росту популяций раковых клеток, и изменения, сцепленные с ними, но не оказывающие самостоятельного влияния (bystanders). Кроме того, некоторые ЧГ задействованы в функциях, вообще никак не связанных с циркадными ритмами. Ниже с этих позиций будут рассмотрены относящиеся к РМЖ данные по отдельным часовым генам, в первую очередь Per1-3.

Гены группы Per при раке молочной железы

Сведения о генах группы Per, приведенные выше, свидетельствуют о том, что именно эти гены наиболее устойчиво связаны с опухолевыми заболеваниями вообще и РМЖ, в частности. Как правило экспрессия Per в опухолях снижена, причем, при РМЖ более всего — в отсутствие рецепторов эстрогенов и прогестерона. Но предостережения от рассмотрения Per в качестве онкосупрессоров, не без изящества обозначенные как “An imPERfect link to cancer”, [38], получают все новую поддержку.

У нокаутных мышей Per2^{-/-} риск развития опухолей, включая РМЖ, не повышен [51]. Per2 и Per1 выполняют специфические, причем разные, функции в развитии молочной железы

мышей, не имеющие очевидной связи с участием Per в ЦЦ. Экспрессия Per2 высока до полового созревания, а Per1 — при лактации. У нокаутов по Per2 недоразвит люминальный компонент МЖ, а люминальные эпителиальные клетки экспрессируют маркер базальных клеток кератин 14. Однако повышенная склонность к злокачественному перерождению у них не отмечена [51]. В молочной железе у нокаутов Per2^{-/-} повышена экспрессия ER и PR, но пролиферативная активность, если судить по экспрессии антигена Ki67, снижена. С другой стороны, известно, что в промоторе Per2 присутствуют сайты связывания ER, посредством которых эстрогены усиливают его экспрессию, что может быть причиной снижения Per2 в опухолях фенотипа ER⁻. Но на экспрессию Per влияют не только ER. Продемонстрированы многочисленные взаимосвязи между уровнями экспрессии различных ЧГ, в том числе Per, онкогенов, супрессоров опухолевого роста, включая белок P53, генов, участвующих в организации клеточного цикла (КЦ) — см. обзоры [24, 48, 75]. Каждое такое наблюдение открывает новые возможности для экспериментов с высокой вероятностью выявить еще одно влияние чего-либо на что-то другое. Изобретательность экспериментаторов не знает предела. Что на выходе? На каком-то этапе оказывается, что уже ничего, кроме все новых публикаций. Интересно, на каком этапе мы сейчас?

Остановимся на этом вопросе в контексте соотношений между ЦЦ и клеточным циклом (КЦ), поскольку тема синхронизации КЦ и ЦЦ и ускорения пролиферации при нарушениях такого контроля неизменно всплывает в работах по связям между ЦЦ и опухолевым ростом.

Взаимоотношения циркадного и клеточного циклов

В клетках присутствует как минимум две системы регулярных циклических изменений (осцилляций) экспрессии генов с периодичностью порядка 24 часов: 1) часовые гены; 2) гены, определяющие последовательность фаз клеточного цикла. Средние длительности ЦЦ и КЦ близки (в обоих случаях примерно 24 часа, а не, скажем, 10 часов у одних и 30 у других). Поэтому велик соблазн считать, что одно зависит от другого и что потеря зависимости КЦ от циркадного управления должна приводить к ускорению пролиферации клеток и тем самым способствовать опухолевому росту [24, 48, 75].

Обсуждаются два возможных варианта сопряжения между ЦЦ и КЦ: синхронизация по фазе (phase locking) и затворный механизм (gating) [22, 41, 46].

По первому варианту между ЦЦ и КЦ устанавливаются кинетические соотношения аналогично тому, что получается, когда разные маятники подвешиваются на одной упругой балке: через некоторое время они синхронизируются. Такой эффект был описан Гюйгенсом еще 350 лет назад. Для его объяснения тогда не нашлось ничего лучше метафоры: маятники дескать испытывают взаимную симпатию. Физические принципы этой симпатии были обоснованы более чем три столетия спустя [58]. Молекулярно-биологические механизмы возникновения «симпатии» между ЦЦ и КЦ, надо думать, не проще, чем между маятниками. Однако эффект Гюйгенса привлекался для объяснения синхронизации ЦЦ и КЦ много раньше, чем было достигнуто физическое понимание его самого.

По второму механизму клетка по достижении некоего этапа КЦ остается в нем до получения разрешающего сигнала, который может поступать от системы ЧГ периодически. В такой ситуации ожидание разрешения на дальнейшие действия будет тем дольше, чем раньше клетка пришла в состояние ожидания, а это означает, что более всего продвижение по КЦ тормозится у тех клеток, у которых оно иначе было бы ускоренным. Вопрос: популяции трансформированных клеток растут быстрее, потому что у трансформированных клеток длительность КЦ в отсутствие циркадного контроля меньше, чем у соответствующих нормальных, или же в популяциях трансформированных клеток выше доля тех, которые находятся в состоянии пролиферации?

Процессы, наблюдаемые в клеточных популяциях, складываются из событий, происходящих в

отдельных клетках. Если определять экспрессию ЧГ в популяциях, то ЦЦ их экспрессии, которые выявляются после, например, кратковременного добавления сыворотки в высокой концентрации в культуру клеток, постепенно затухают. Но затухают они не потому, что это происходит во всех и каждой из клеток, а потому что в отдельных клетках ЦЦ весьма вариабельны [5, 54, 87]. Пример распределений числа клеток по длительности ЦЦ показан на рис. 2.

Видно, что при среднем ЦЦ около 24 часов заметные сегменты распределений заходят за пределы больше 30 и меньше 20 часов, а крайние значения разнесены по диапазону от 15 до 40 часов. Это не значит, что есть клетки, где длительность ЦЦ всегда большая, а есть — где маленькая: в каждой клетке длительность ЦЦ колеблется в указанных пределах. И приводит это к тому, что со временем в популяции клеток происходит исчезновение ЦЦ при том, что в каждой клетке они сохраняются, хотя и менее регулярные, чем принято считать на основании наблюдений за популяциями, выведенными из равновесия. На уровне популяций в каждый момент времени усредняются самые разные уровни экспрессии показателей ритмичности — от минимальных в одних клетках до максимальных в других. Клетки все время меняются местами в таком рейтинге, но в постоянных условиях сумма рангов остается одинаковой. Для сохранения колебаний в популяции, входящие в нее клетки должны периодически испытывать внешние синхронизирующие воздействия, в результате которых клетки скапливаются в каком-то одном состоянии их циркадных осцилляторов и затем выходят из него — не совсем одновременно,

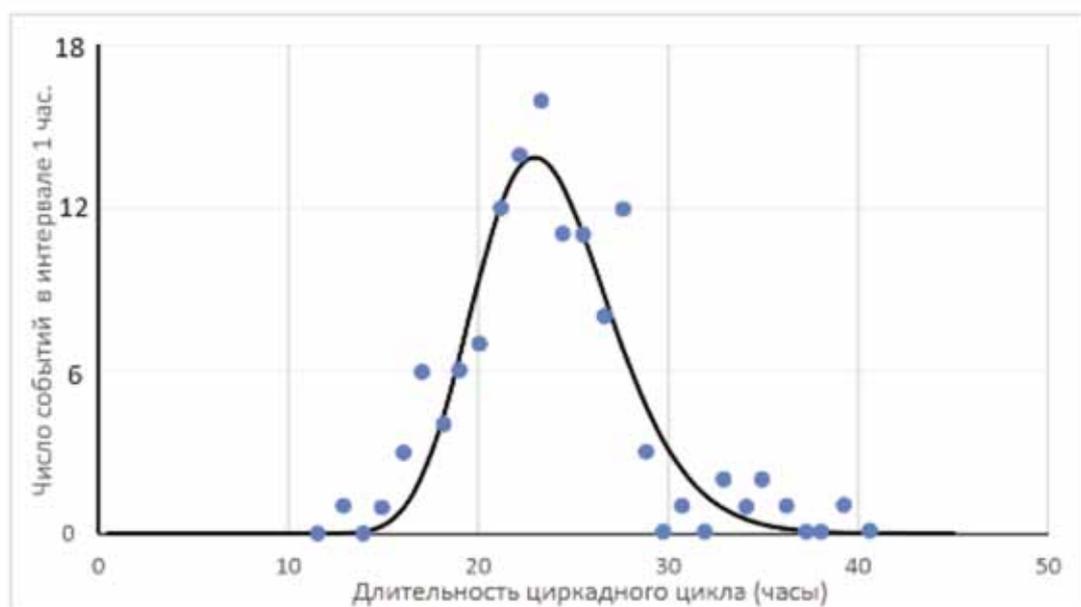


Рис. 2. Распределение числа фибробластов NIH3T3 по длительности циркадного цикла (по данным [54]). Экспериментальные результаты (точки) аппроксимированы логнормальным распределением

разумеется, но с разбросом по времени, много меньшим, чем средняя длительность ЦЦ.

То же наблюдается при рассмотрении КЦ. В любых справочных и учебных материалах указывается, что его длительность составляет около 24 часов. Однако в популяциях пролиферирующих клеток, даже тех, которые можно считать идентичными во всех других доступных контрольных отношениях, длительность КЦ сильно варьирует (см. [27]), например, от 10 до 40 часов в культурах клеток MCF10A, считающихся моделью нормальных клеток эпителия молочной железы человека. Пик распределения числа клеток по длительности клеточного цикла в этом случае приходится на 13 часов, но из-за сильной асимметрии пика (среднее около 16 часов), порядка 10% клеток приходится на дальний конец правого плеча с длительностью КЦ более 25 часов, и у заметной доли клеток она превышает 35 часов. Примерно то же относится ко всем клеткам, о которых есть данные, позволяющие провести такой анализ. Стимуляция клеток к пролиферации после того, как в эксперименте они все остановлены в некоторой точке КЦ по причине отсутствия условий для ее прохождения (нет определенных питательных веществ или факторов роста, или же есть ингибитор, например, синтеза холестерина) будет сопровождаться относительно синхронными изменениями экспрессии циклинов или включения меченых нуклеотидов в ДНК, генерирующими поначалу несколько выраженных пиков, которые с течением времени будут все более «смазываться».

Позволяет ли все сказанное выше считать само собой разумеющимся, что, если синхронизировать, укоротить или удлинить ЦЦ в клетках, то и КЦ изменятся соответственно? В обзорах на эту тему [24, 48, 75] цитируются десятки публикаций, где описаны прямые влияния продуктов ЧГ на экспрессию, ковалентную модификацию, действие генов и белков, принимающих участие в организации клеточных циклов — циклинов (Cyc: D, E, B, A), циклин-зависимых киназ (cdk: 2/4, 6...), ингибиторов циклин-зависимых киназ (cdki: p21, p16, p57...), равно как и влияния вторых на первые, а также и тех и других на онкогены и наоборот. Поэтому перечислять все это нет смысла — тем более, что термины «выше» или «ниже», обычно употребляемые для описания эффектов в применении к клеточным популяциям, весьма двусмысленны: к чему они в самом деле относятся — к уровням экспрессии во всех и каждой из клеток сравниваемых популяций, или к соотношениям между численностями клеток, где экспрессия имеет или не имеет место, или к перекрывающимся распределениям по уровню экспрессии?

По умолчанию, подразумевается первое, хотя на самом деле скорее будет верным второе или третье. Даже математические модели, например [19, 50, 60, 79] и ссылки в них), не охватывают все возможные взаимодействия, и у разных авторов разные критерии, чтобы выбрать то, чем можно жертвовать ради реализуемости без потери, предположительно, связи с выбранным для рассмотрения аспектом реальности. Поэтому разные модели приводят к тем выводам относительно действительности, которые кажутся предпочтительными авторам.

А на самом деле существуют еще и температурные эффекты. Механизмы генерации ЦЦ содержат системы температурной компенсации, в результате чего их частота не зависит от температуры. А у КЦ температурная компенсация отсутствует. При повышении температуры средняя длительность КЦ сокращается при неизменной длительности ЦЦ [59, 91]. Где здесь зависимость одного от другого? С другой стороны, выключение действия гена *Cyc2* интерферирующими РНК приводит к увеличению средней длительности ЦЦ непролиферирующих мышечных фибробластов NIH3T3 с 22 до 26 часов, но это не сказывается на длительности КЦ при переходе к пролиферации, зато средняя длительность ЦЦ при таком переходе сокращается [5]. На самом деле есть основания считать, что в пролиферирующих клетках ЦЦ больше зависят от КЦ, чем наоборот. Стоит также отметить, что ЦЦ не выявляются у эмбриональных стволовых клеток и появляются только после их выхода в дифференцировку [17, 85], то есть имеются у транзиторных амплифицирующих клеток, скорость пролиферации которых выше, чем у стволовых.

Говорить о зависимости между КЦ и ЦЦ на другом фланге клеточной иерархии — у конечно-дифференцированных клеток — вообще не приходится за отсутствием у них КЦ. Но в популяциях таких клеток возможна синхронизация ЦЦ в результате межклеточных взаимодействий, и зависимые от них процессы, например, паракринные, могут служить внешними ритмоводителями для клеток-предшественниц (стволовых и транзиторных) — как для их КЦ, так и для ЦЦ — так что синхронизация тех и других у них становится возможной. Причем в условиях целостной нормальной ткани это происходит независимо даже от центральной регуляции, чему есть подтверждения [47].

В общем можно заключить, что признаки десинхронизации между ЦЦ, КЦ и другими периодическими процессами в опухоли в первую очередь определяются снижением чувствительности опухолевых клеток к системным регуляторным факторам организма, в частности, к тем, что определяют ЦЦ в нормальных тканях.

Но ЧГ интересны тем, что модуляция действия какого-либо из них может сказаться на всем множестве внутриклеточных процессов, в циркадном контроле которых он участвует. Это происходит вне зависимости от степени синхронизации ЦЦ клеток и от ее изменений в результате патологического процесса или терапевтического воздействия. И это в полной мере относится к популяциям опухолевых клеток, где циркадная синхронизация ослаблена.

Терапевтический потенциал воздействий на циркадные ритмы в опухолях

В качестве отправной точки для обсуждения практических возможностей рассмотрим результаты поисков низкомолекулярных модификаторов функций белковых продуктов ЧГ. Из самых последних обзоров на эту тему [12, 32] следует, что модификаторы, прямо действующие на продукты ЧГ, найдены для ROR, RevErb и Cry. В онкологическом контексте упомянуты RevErb и Cry.

Агонисты RevErb цитотоксичны по отношению к раковым клеткам. Это наблюдение подтверждено в исследовании [74], где показано, что такие препараты оказывают цитотоксическое действие на несколько раковых линий, включая трансформированные клетки молочной железы MCF-7, но не на нормальные клетки. Поскольку при некоторых формах РМЖ амплификация Her2 происходит совместно с RevErb (по причине близости на одной хромосоме), средства активации RevErb, могут представлять особый интерес в отношении именно таких больных. Но нет достаточных оснований связывать это с ЦЦ.

Ингибиторы Cry тормозят рост культур и повышают чувствительность к доксорубину и тамоксифену у клеток MCF-7, но не MCF-10A [13]. Связано ли это с тем, что ЦЦ в клетках MCF-7 нарушены? Сравнение уровней экспрессии ЧГ в этих двух линиях после сывороточного шока описано в работе [30]. MCF-7 отличаются от MCF-10A и в этом плане тоже. Поскольку уровни экспрессии определялись в культуре, а не в отдельных клетках, неясно, обусловлены ли найденные различия внутриклеточными обстоятельствами (см. выше) или разной чувствительностью линий клеток к синхронизирующим факторам сыворотки.

Cry действует в комплексе с Per, поэтому можно предположить, что и действие на Per способно приводить к таким же эффектам. Препараты, для которых Per может быть непосредственной мишенью, неизвестны. Однако установлено, что действие Per ингибируется при фосфорилировании киназой-3b гликогенсинтетазы (GSK-3b), имеющей очень широкий диапазон

субстратной специфичности, включающий продукты других ЧГ. Ингибиторы GSK-3b снижают резистентность трансформированных, в отличие от нетрансформированных, клеток эпителия молочной железы к ингибитору топоизомеразы иринотекану [82].

Эффекты Cry также можно модифицировать не прямо, а через киназы, которые на него влияют. К их числу относятся казеинкиназы типа 1. Ген казеинкиназы SK1d амплифицирован в некоторых опухолях любого из типов РМЖ, и ингибиторы казеинкиназ цитотоксичны по отношению именно к этим формам РМЖ [66]. Но ввиду широкой субстратной специфичности казеинкиназ, нет особых оснований считать, что в таких случаях задействованы Cry или другие ЧГ.

Действие Cry блокируется еще одной киназой — АМФ-зависимой (АМРК). В цитируемых обзорах в качестве ее активатора упоминается метформин. Этот антидиабетический бигуанид известен своими антиканцерогенными эффектами [2], распространяющимися на РМЖ [8, 78]. Но его действие на АМРК не прямое [63, 93], и существование целого комплекса известных эффектов метформина, одним из проявлений которого является активация АМРК, не позволяет считать, что вклад его действия на ЧГ в антиканцерогенные эффекты является существенным.

Среди агентов, известных как своим влиянием на рост опухоли, в том числе на РМЖ, так и тем, что их прямые мишени действуют на, среди прочего, систему ЧГ, значатся активаторы сиртуина 1 (он деацетилюет гистоны, ацетилированные белком CLOCK), к числу которых относится ресвератрол, активаторы PPAR (он способствует взаимодействию Bmal1 и CLOCK), в том числе фибраты, такие как фенофибрат и клофибрат.... Надо думать, их введение должно как-то влиять на ЦЦ. Но надо ли думать, что раз так, то именно этим в значительной степени обусловлены их противораковые эффекты?

В качестве возможного модулятора молекулярных «деталей» механизма, генерирующего ЦЦ, не упомянут в цитированных обзорах гормон мелатонин, играющий важнейшую роль в системной организации ЦЦ в организме. Среди известных рецепторов мелатонина, кроме мембранных MT1,2, которые действуют через G-белки, рассматриваются ядерные, относящиеся к классу ROR — тому же, к которому относятся продукты одноименных часовых генов. Гены этих рецепторов были идентифицированы и клонированы на основании сходства с генами рецепторов к ретиноидам (Retinoid Acid Receptors, RAR), но природные лиганды продуктов новоявленных генов долгое время не были известны (рецепторы-сироты, Orphan

Receptors, отсюда Retinoid Orphan Receptors, ROR). Сведения о том, что их лигандом может быть мелатонин, стали появляться с середины 1990-х [11, 55]. Позже было установлено, что высоким сродством к ROR обладают некоторые эндогенные гидроксированные стероиды, по структуре никак не соответствующие мелатонину, и на этом основании предложено исключить мелатонин из списка возможных лигандов ROR [72]. Но сообщения об эффектах мелатонина, обусловленных наличием работоспособных ROR [23, 33], продолжают появляться.

Вопрос о взаимоотношениях между ROR и мелатонином остается открытым. В данном контексте он интересен по нескольким причинам: во-первых — это участие мелатонина в организации ЦЦ не только в качестве медиатора действия центральных компонентов генерации ЦЦ на периферические, но и модулятора центральных, для чего он должен как-то действовать на систему ЧГ в них [83]; во-вторых — это антиканцерогенное действие мелатонина [28, 43, 62, 77], в том числе в отношении РМЖ [1, 8, 29, 34], проявляющееся в частности в повышении риска РМЖ при снижении ночных пиков секреции мелатонина [39]. Многие из уже рассмотренных эффектов могут быть опосредованы мембранными рецепторами MT_{1,2} [34, 43]. С другой стороны, описаны антиканцерогенные эффекты активации ROR в опухолях ряда локализаций, включая РМЖ [21], а также изменения экспрессии ROR в опухолях молочной железы (см. выше).

Мелатонин восстанавливал осцилляции ЧГ после «сывороточного шока» в трансформированных клетках эпителия молочной железы, у которых осцилляции отсутствовали [89]. У голых (*nu/nu*) крыс с ксенографтами РМЖ человека свет в ночное время нарушал осцилляции GSK3 β (см. об этом белке выше) в опухолях, введение мелатонина восстанавливало их [45], при этом повышалась их чувствительность к доксорубину [71] и тамоксифену [14]. Способность мелатонина восстанавливать синхронизацию ЦЦ в опухолевых тканях и подавлять рост новообразований была продемонстрирована также при введении его мышам с раком простаты [35].

Таким образом, поиски оптимальных суточных режимов введения мелатонина больным РМЖ с учетом типа опухолей могут привести к повышению эффективности лечения. Одним из механизмов при этом может быть синхронизация ЦЦ опухолевых клеток [37], делающая их более или менее подверженными действию цитостатиков и/или антиэстрогенов в определенных периоды времени. Показано [49], что у мышей в опухолях молочной железы, возник-

ших в результате трансплантации клеток раковой линии, число клеток, позитивных по альдегиддегидрогеназе ADH3A1, возрастает в светлое время суток и снижается в темное. Поскольку ADH3A1 является маркером стволовых клеток, и известно, что опухолевые клетки способны переключаться между разными фенотипами, получается, что циркадные колебания происходят в константах перехода клеток между разными состояниями. Ингибитор ADH3A1 подавлял рост опухолей, если его вводили в период возрастания, но не снижения, содержания ADH3A1-позитивных клеток.

Воздействие на ЦЦ в организме носителя опухоли

Опухоли, в том числе РМЖ, оказывают системное действие на организм, приводящее к нарушениям ЦЦ и соответствующим метаболическим и иммунологическим расстройствам, способствующим опухолевому росту [9]. Но важно не только нормализовать ЦЦ пациентов, но и учитывать их особенности для проведения терапии в периоды, когда организм менее всего чувствителен к ее побочному действию и/или обеспечивает оптимальную фармакодинамику, и/или когда опухоль наиболее чувствительна к терапевтическим воздействиям [57, 73, 86]. Оптимальным было бы развести как можно дальше по времени суток пики чувствительности опухоли к лечению и организма к его побочному действию.

О трудностях в практическом осуществлении таких форм хронотерапии свидетельствует скудость конкретных клинических примеров ее эффективности в онкологии на фоне растущего уже не первый десяток лет числа публикаций по результатам экспериментальных работ, в которых обсуждаются возможности перенесения их результатов в клиническую практику.

В последнем из обзоров на эту тему [56] упоминаются 10 работ с результатами клинических испытаний. Половина их приходится на рак ободочной и прямой кишки (РОПК), по одному на немелкоклеточный рак легкого, светлоклеточную карциному почек, и рефрактерные к лечению солидные опухоли вообще, а также два — на РМЖ. Практически во всех случаях «хроно»-аспект ограничен сравнением между введением препарата либо утром, либо вечером. Во всех случаях, кроме РМЖ, испытываются цитостатики (капецитабин, оксалиплатин, 5-фторурацил), а при РМЖ — тамоксифен и ингибитор mTOR эверолимус.

Результаты, достаточные для мета-анализа, получены на больных с РОПК. Они относятся в первую очередь к оптимизации фармакоди-

намики для минимизации побочных эффектов. Сделан вывод о гендерной специфичности результатов: применяемые хронотерапевтические режимы введения цитостатиков улучшают результаты лечения у мужчин в большей степени, чем ухудшают их у женщин [25].

Если ограничиться обсуждением данных, полученных на больных РМЖ, то в работе с тамоксифеном установлено, что при его введении утром, площадь под кривой зависимости уровня препарата в крови от времени несколько выше, чем при введении вечером. Но эти различия минимальны в сравнении с тем, что было показано на мышцах в обоснование этого исследования. Продолжения этой работы [6], опубликованной три года назад, обнаружить не удалось. В пилотном исследовании ингибитор белка mTOR эверолимус вводили больным метастатическим РМЖ, девяти — утром и десяти — вечером. Отмечено, что при введении утром переносимость терапии лучше [26].

Заключение

Вершина айсберга, который возник из экспериментальных исследований ЦЦ в связи с онкологической проблематикой, пока еще едва только выступила над поверхностью того моря воды, в которой он растет. Но уже ясно, что в плане профилактики РМЖ особого внимания заслуживают женщины, занятые в сменной работе, в первую очередь медсестры. В плане терапевтическом внимание привлекает мелатонин, причем не только в связи с его прямым антиканцерогенным действием в сочетании с практически полным отсутствием нежелательных побочных эффектов даже при высоких дозах [10, 39, 62]. Представляется целесообразным разработать суточные режимы адьювантного введения мелатонина или агонистов рецепторов к нему для такой настройки ЦЦ в организме, которая могла бы минимизировать побочные эффекты цитостатиков и/или антиэстрогенов при введении в периоды, когда чувствительность опухоли к ним максимальна.

ЛИТЕРАТУРА

- Anisimov V.N. The role of pineal gland in breast cancer development // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* — 2003. — Т. 46. — № 3. — С. 221-234.
- Anisimov V.N. Metformin for cancer and aging prevention: is it a time to make the long story short? // *Oncotarget.* — 2015. — Т. 6. — № 37. — С. 39398-39407.
- Ballesta A., Innominato P.F., Dallmann R., Rand D.A., Lévi F.A. Systems chronotherapeutics // *Pharmacol. Rev.* — 2017. — Т. 69. — № 2. — С. 161-199.
- Benna C., Helfrich-Forster C., Rajendran S., Monticelli H., et al. Genetic variation of clock genes and cancer risk: a field synopsis and meta-analysis // *Oncotarget.* — 2017. — Т. 8. — № 14. — С. 23978-23995.
- Bieler J., Cannavo R., Gustafson K., Gobet C., et al. Robust synchronization of coupled circadian and cell cycle oscillators in single mammalian cells // *Mol. Syst. Biol.* — 2014. — Т. 10. — № 7. С. n/a-n/a.
- Binkhorst L., Kloth J. S. L., de Wit A. S., de Bruijn P., et al. Circadian variation in tamoxifen pharmacokinetics in mice and breast cancer patients // *Breast Cancer Res. Treat.* — 2015. — Т. 152. — № 1. — С. 119-128.
- Blakeman V., Williams J.L., Meng Q.-J., Streuli C.H. Circadian clocks and breast cancer // *Breast Cancer Res.* — 2016. — Т. 18. — № 1. — С. 89.
- Bojková B., Kajo K., Kisková T., Kubatka P., et al. Metformin and melatonin inhibit DMBA-induced mammary tumorigenesis in rats fed a high-fat diet // *Anti-Cancer Drugs.* — 2018. — Т. 29. — № 2. — С. 128-135.
- Borniger J.C., Walker li W.H., Surbhi, Emmer K.M. et al. A Role for hypocretin/orexin in metabolic and sleep abnormalities in a mouse model of non-metastatic breast cancer // *Cell Metab.* — 2018. — Т. 28. — № 1. — С. 118-129.e5.
- Cardinali D., Escames G., Acuña-Castroviejo D., et al. Melatonin-induced oncostasis, mechanisms and clinical relevance // *J. Integrative Oncol.* — 2016. — Т. S1.
- Carlberg C., Wiesenberg I. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship // *J. Pineal Res.* — 1995. — Т. 18. — № 4. — С. 171-178.
- Chen Z., Yoo S.-H., Takahashi J. S. Development and therapeutic potential of small-molecule modulators of circadian systems // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* — 2018. — Т. 58. — № 1. — С. 231-252.
- Chun S.K., Chung S., Kim H. D., Lee J. H. et al. A synthetic cryptochrome inhibitor induces anti-proliferative effects and increases chemosensitivity in human breast cancer cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2015. — Т. 467. — № 2. — С. 441-446.
- Dauchy R. T., Xiang S., Mao L., Brimer S. et al. Circadian and melatonin disruption by exposure to light at night drives intrinsic resistance to tamoxifen therapy in breast cancer // *Cancer Res.* — 2014. — Т. 74. — № 15. — С. 4099-110.
- de Assis L. V. M., Kinker G. S., Moraes M. N., Markus R. P. et al. Expression of the circadian clock gene BMAL1 positively correlates with antitumor immunity and patient survival in metastatic melanoma // *Frontiers Oncol.* — 2018. — Т. 8. — № 185.
- Dibner C., Schibler U., Albrecht U. The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks // *Annu. Rev. Physiol.* — 2010. — Т. 72. — № 1. — С. 517-549.
- Dierickx P., Van Laake L. W., Geijsen N. Circadian clocks: from stem cells to tissue homeostasis and regeneration // *EMBO Reports*, 2017.
- El-Athman R., Relógio A. Escaping circadian regulation: An emerging hallmark of cancer? // *Cell Systems.* — 2018. — Т. 6. — № 3. — С. 266-267.
- El Cheikh R., Bernard S., El Khatib N. A multiscale modeling approach for the regulation of the cell cycle by the circadian clock // *J. Theor. Biol.* — 2017. — Т. 426. — С. 117-125.
- Elshazley M., Sato M., Hase T., Yamashita R., et al. The circadian clock gene BMAL1 is a novel therapeutic target

- for malignant pleural mesothelioma // *Int. J. Cancer.* — 2012. — Т. 131. — № 12. — С. 2820-2831.
21. Fan J., Lv Z., Yang G., Liao T. et al. Retinoic acid receptor-related orphan receptors: Critical roles in tumorigenesis // *Frontiers Immunol.* — 2018. — Т. 9. — № 1187.
 22. Feillet C., Krusche P., Tamanini F., Janssens R. C., et al. Phase locking and multiple oscillating attractors for the coupled mammalian clock and cell cycle // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2014. — Т. 111. — № 27. — С. 9828-33.
 23. García J. A., Volt H., Venegas C., Doerrier C. et al. Disruption of the NF- κ B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor- α and blocks the septic response in mice // *FASEB J.* — 2015. — Т. 29. — № 9. — С. 3863-3875.
 24. Gaucher J., Montellier E., Sassone-Corsi P. Molecular cogs: Interplay between circadian clock and cell cycle // *Trends Cell Biol.* — 2018.
 25. Giacchetti S., Dugue P. A., Innominato P. F., Bjarnason G. A., et al. Sex moderates circadian chemotherapy effects on survival of patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis // *Ann. Oncol.* — 2012. — Т. 23. — № 12. — С. 3110-3116.
 26. Giacchetti S., Li X., Ozturk N., Cuvier C. et al. Abstract P4-06-06: Consistent dosing-time dependent tolerability of everolimus (EV) in a pilot study in women with metastatic breast cancers (MBC) and in a mouse chronopharmacology investigation // *Cancer Research.* — 2017. — Т. 77. — № 4 Supplement. — С. P4-06-06-P4-06-06.
 27. Golubev A. Applications and implications of the exponentially modified gamma distribution as a model for time variabilities related to cell proliferation and gene expression // *J. Theor. Biol.* — 2016. — Т. 393. — С. 203-217.
 28. González-González A., Mediavilla M., Sánchez-Barceló E. Melatonin: A molecule for reducing breast cancer risk // *Molecules.* — 2018. — Т. 23. — № 2. — С. 336.
 29. Griffin F., Marignol L. Therapeutic potential of melatonin for breast cancer radiation therapy patients // *Int. J. Radiat. Biol.* — 2018. — Т. 94. — № 5. — С. 472-477.
 30. Gutiérrez-Monreal M. A., Treviño V., Moreno-Cuevas J. E., Scott S.-P. Identification of circadian-related gene expression profiles in entrained breast cancer cell lines // *Chronobiol. Internat.* — 2016. — Т. 33. — № 4. — С. 392-405.
 31. Hansen J. Night shift work and risk of breast cancer // *Curr. Environ. Health. Rep.* — 2017. — Т. 4. — № 3. — С. 325-339.
 32. He B., Chen Z. Molecular targets for small-molecule modulators of circadian clocks // *Current Drug Metab.* — 2016. — Т. 17. — № 5. — С. 503-512.
 33. He B., Zhao Y., Xu L., Gao L., et al. The nuclear melatonin receptor ROR α is a novel endogenous defender against myocardial ischemia/reperfusion injury // *J. Pineal Res.* — 2016. — Т. 60. — № 3. — С. 313-326.
 34. Hill S. M., Belancio V. P., Dauchy R. T., Xiang S. et al. Melatonin: an inhibitor of breast cancer // *Endocr. Relat. Cancer.* — 2015. — Т. 22. — № 3. — С. R183-204.
 35. Jung-Hynes B., Huang W., Reiter R. J., Ahmad N. Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells // *J. Pineal Res.* — 2010. — Т. 49. — № 1. — С. 60-68.
 36. Katamune C., Koyanagi S., Shiromizu S., Matsunaga N., et al. Different roles of negative and positive components of the circadian clock in oncogene-induced neoplastic transformation // *J. Biol. Chem.* — 2016. — Т. 291. — № 20. — С. 10541-50.
 37. Kiessling S., Beaulieu-Laroche L., Blum I. D., Landgraf D., et al. Enhancing circadian clock function in cancer cells inhibits tumor growth // *BMC Biology.* — 2017. — Т. 15. — № 1. — С. 13.
 38. Kopalle H. M., Partch C. L. An imPERfect link to cancer? // *Cell Cycle.* — 2014. — Т. 13. — № 4. — С. 507.
 39. Kubatka P., Zubor P., Busseberg D., Kwon T. K. et al. Melatonin and breast cancer: Evidences from preclinical and human studies // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* — 2018. — Т. 122. — С. 133-143.
 40. Lamia K.A. Ticking time bombs: connections between circadian clocks and cancer // *F1000 Research.* — 2017. — Т. 6. — С. 1910.
 41. Laranjeiro R., Tamai T. K., Letton W., Hamilton N., et al. Circadian clock synchronization of the cell cycle in zebrafish occurs through a gating mechanism rather than a period-phase locking process // *J. Biol. Rhythms.* — 2018. — Т. 33. — № 2. — С. 137-150.
 42. Lesicka M., Jablonska E., Wieczorek E., Seroczynska B., et al. Altered circadian genes expression in breast cancer tissue according to the clinical characteristics // *PLoS One.* — 2018. — Т. 13. — № 6. — С. e0199622.
 43. Li Y., Li S., Zhou Y., Meng X., et al. Melatonin for the prevention and treatment of cancer // *Oncotarget.* — 2017. — Т. 8. — № 24. — С. 39896-39921.
 44. Lin H. H., Farkas M. E. Altered circadian rhythms and breast cancer: From the human to the molecular level // *Front Endocrinol.* — 2018. — Т. 9. — С. 219.
 45. Mao L., Dauchy R. T., Blasko D. E., Slakey L. M., et al. Circadian gating of epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells via melatonin-regulation of GSK3 // *Mol. Endocrinol.* — 2012. — Т. 26. — № 11. — С. 1808-1820.
 46. Masri S., Cervantes M., Sassone-Corsi P. The circadian clock and cell cycle: interconnected biological circuits // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 2013. — Т. 25. — № 6. — С. 730-734.
 47. Matsu-Ura T., Dovzhenok A., Aihara E., Rood J., et al. Intercellular coupling of the cell cycle and circadian clock in adult stem cell culture // *Mol. Cell.* — 2016. — Т. 64. — № 5. — С. 900-912.
 48. Matsu-ura T., Moore S. R., Hong C. I. WNT takes two to tango: Molecular links between the circadian clock and the cell cycle in adult stem cells // *J. Biol. Rhythms.* — 2018. — Т. 33. — № 1. — С. 5-14.
 49. Matsunaga N., Ogino T., Hara Y., Tanaka T., et al. Optimized dosing schedule based on circadian dynamics of mouse breast cancer stem cells improves the anti-tumor effects of aldehyde dehydrogenase // *Cancer Research.* — 2018.
 50. Mavroudis P. D., DuBois D. C., Almon R. R., Jusko W. J. Modeling circadian variability of core-clock and clock-controlled genes in four tissues of the rat // *PLoS One.* — 2018. — Т. 13. — № 6. — С. e0197534.
 51. McQueen C. M., Schmitt E. E., Sarkar T. R., Elswood J., et al. PER2 regulation of mammary gland development // *Development.* — 2018. — Т. 145.
 52. Menet J. S., Pescatore S., Rosbash M. CLOCK: BMAL1 is a pioneer-like transcription factor // *Genes Dev.* — 2014. — Т. 28. — № 1. — С. 8-13.
 53. Mocellin S., Tropea S., Benna C., Rossi C. R. Circadian pathway genetic variation and cancer risk: evidence from

- genome-wide association studies // *BMC Medicine*. — 2018. — Т. 16. — № 1. — С. 20.
54. Nagoshi E., Saini C., Bauer C., Laroche T., et al. Circadian gene expression in individual fibroblasts: Cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells // *Cell*. — 2004. — Т. 119. — № 5. — С. 693-705.
 55. Naji L., Carrillo-Vico A., Guerrero J.M., Calvo J.R. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs // *Life Sci*. — 2004. — Т. 74. — № 18. — С. 2227-2236.
 56. Ozturk N., Ozturk D., Kavakli I.H., Okyar A. Molecular aspects of circadian pharmacology and relevance for cancer chronotherapy // *Int. J. Molec. Sci*. — 2017. — Т. 18. — № 10. — С. 2168.
 57. Ozturk N., Ozturk D., Pala-Kara Z., Kaptan E., et al. The immune system as a chronotoxicity target of the anticancer mTOR inhibitor everolimus // *Chronobiol. Internat*. — 2018. — Т. 35. — № 5. — С. 705-718.
 58. Peña Ramirez J., Olvera L. A., Nijmeijer H., Alvarez J. The sympathy of two pendulum clocks: beyond Huygens' observations // *Scientific Reports*. — 2016. — Т. 6. — С. 23580.
 59. Pendergast J.S., Yeom M., Reyes B.A., Ohmiya Y., Yamazaki S. Disconnected circadian and cell cycles in a tumor-driven cell line // *Communicat. Integrat. Biol*. — 2010. — Т. 3. — № 6. — С. 536-539.
 60. Pierre K., Rao R.T., Hartmanshenn C., Androulakis I.P. Modeling the influence of seasonal differences in the HPA axis on synchronization of the circadian clock and cell cycle // *Endocrinology*. — 2018. — Т. 159. — № 4. — С. 1808-1826.
 61. Rabstein S., Harth V., Justenhoven C., Pesch B., et al. Polymorphisms in circadian genes, night work and breast cancer: Results from the GENICA study // *Chronobiol. Internat*. — 2014. — Т. 31. — № 10. — С. 1115-1122.
 62. Reiter R. J., Rosales-Corral S. A., Tan D.-X., Acuna-Castroviejo D., et al. Melatonin, a full service anti-cancer Agent: Inhibition of initiation, progression and metastasis // *Int. J. Molec. Scie*. — 2017. — Т. 18. — № 4. — С. 843.
 63. Rena G., Hardie D. G., Pearson E. R. The mechanisms of action of metformin // *Diabetologia*. — 2017. — Т. 60. — № 9. — С. 1577-1585.
 64. Reszka E., Przybek M., Muurlink O., Peplonska B. Circadian gene variants and breast cancer // *Cancer Lett*. — 2017. — Т. 390. — С. 137-145.
 65. Reszka E., Wiczorek E., Przybek M., Jablonska E. et al. Circadian gene methylation in rotating-shift nurses: a cross-sectional study // *Chronobiol. Int*. — 2018. — Т. 35. — № 1. — С. 111-121.
 66. Rosenberg L. H., Lafite M., Quereda V., Grant W., et al. Therapeutic targeting of casein kinase 1δ in breast cancer // *Sci. Translat. Med*. — 2015. — Т. 7. — № 318. — С. 318ra202-318ra202.
 67. Samulin Erdem J., Skare Ø., Petersen-Øverleir M., Notø H. Ø. et al. Mechanisms of breast cancer in shift workers: DNA methylation in five core circadian genes in nurses working night shifts // *J. Cancer*. — 2017. — Т. 8. — № 15. — С. 2876-2884.
 68. Sancar A., Lindsey-Boltz L. A., Gaddameedhi S., Selby C. P. et al. Circadian clock, cancer, and chemotherapy // *Biochemistry*. — 2015. — Т. 54. — № 2. — С. 110-123.
 69. Shiels J., Chen G., Hughey J. J. Evidence for widespread dysregulation of circadian clock progression in human cancer // *PeerJ*. — 2018. — Т. 6. — С. e4327.
 70. Shostak A. Human clock genes and cancer // *Curr. Sleep Med. Repts*. — 2018. — Т. 4. — № 1. — С. 65-73.
 71. Shulin X., T. D. R., Adam H., Lulu M. et al. Doxorubicin resistance in breast cancer is driven by light at night-induced disruption of the circadian melatonin signal // *J. Pineal Res*. — 2015. — Т. 59. — № 1. — С. 60-69.
 72. Slominski A.T., Zmijewski M.A., Jetten A.M. RORα is not a receptor for melatonin // *BioEssays*. — 2016. — Т. 38. — № 12. — С. 1193-1194.
 73. Stéphanou A., Fanchon E., Innominato P. F., Ballesta A. Systems biology, systems medicine, systems pharmacology: The what and the why // *Acta Biotheoretica*. — 2018.
 74. Sulli G., Rommel A., Wang X., Kolar M. J. et al. Pharmacological activation of REV-ERBs is lethal in cancer and oncogene-induced senescence // *Nature*. — 2018. — Т. 553. — С. 351.
 75. Sultan A., Parganiha A., Sultan T., Choudhary V., Pati A. K. Circadian clock, cell cycle, and breast cancer: an updated review // *Biol. Rhythm Res*. — 2017. — Т. 48. — № 3. — С. 353-369.
 76. Takahashi J. S. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock // *Nat. Rev. Genet*. — 2017. — Т. 18. — № 3. — С. 164-179.
 77. Talib W. Melatonin and cancer hallmarks // *Molecules*. — 2018. — Т. 23. — № 3. — С. 518.
 78. Tang G. H., Satkunam M., Pond G. R., Steinberg G. R., et al. Association of metformin with breast cancer incidence and mortality in patients with Type II diabetes: A GRADE-assessed systematic review and meta-analysis // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. — 2018. — Т. 27. — № 6. — С. 627-635.
 79. Traynard P., Feillet C., Soliman S., Delaunay F., Fages F. Model-based investigation of the circadian clock and cell cycle coupling in mouse embryonic fibroblasts: Prediction of RevErb-α up-regulation during mitosis // *Biosystems*. — 2016. — Т. 149. — С. 59-69.
 80. Trott A. J., Menet J. S. Regulation of circadian clock transcriptional output by CLOCK:BMAL1 // *PLoS Genetics*. — 2018. — Т. 14. — № 1. — С. e1007156.
 81. Truong T., Liquet B., Menegaux F., Plancoulaine S., et al. Breast cancer risk, night work and circadian clock gene polymorphisms // *Endocrine-Related Cancer*. — 2014.
 82. Ugolkov A., Gaisina I., Zhang J. S., Billadeau D. D., et al. GSK-3 inhibition overcomes chemoresistance in human breast cancer // *Cancer Lett*. — 2016. — Т. 380. — № 2. — С. 384-92.
 83. Vriend J., Reiter R. J. Melatonin feedback on clock genes: a theory involving the proteasome // *J. Pineal Res*. — 2015. — Т. 58. — № 1. — С. 1-11.
 84. Walton Z. E., Altman B. J., Brooks R. C., Dang C. V. Circadian clock's cancer connections // *Annu. Rev. Cancer Biol*. — 2018. — Т. 2. — № 1. — С. 133-153.
 85. Weger M., Diotel N., Dorsemans A. C., Dickmeis T., Weger B. D. Stem cells and the circadian clock // *Dev. Biol*. — 2017. — Т. 431. — № 2. — С. 111-123.
 86. Wei K., Wang Q., Gan J., Zhang S., et al. Mapping genes for drug chronotherapy // *Drug Discovery Today*. — 2018.
 87. Welsh D. K., Yoo S. H., Liu A. C., Takahashi J. S., Kay S. A. Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of

- clock gene expression // *Curr. Biol.* — 2004. — Т. 14. — № 24. — С. 2289-95.
88. Wible R. S., Ramanathan C., Sutter C. H., Olesen K. M., et al. NRF2 regulates core and stabilizing circadian clock loops, coupling redox and timekeeping in *Mus musculus* // *eLife*. — 2018. — Т. 7. — С. e31656.
89. Xiang S., Mao L., Duplessis T., Yuan L., et al. Oscillation of clock and clock controlled genes induced by serum shock in human breast epithelial and breast cancer cells: Regulation by melatonin // *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*. — 2012. — Т. 6. — С. BCBCR.S9673.
90. Ye Y., Xiang Y., Ozguc F. M., Kim Y., et al. The genomic landscape and pharmacogenomic interactions of clock genes in cancer chronotherapy // *Cell Syst*. — 2018. — Т. 6. — № 3. — С. 314-328.e2.
91. Yeom M., Pendergast J. S., Ohmiya Y., Yamazaki S. Circadian-independent cell mitosis in immortalized fibroblasts // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2010. — Т. 107. — № 21. — С. 9665-9670.
92. Yuan X., Zhu C., Wang M., Mo F., Du W., Ma X. Night shift work increases the risks of multiple primary cancers in women: A systematic review and meta-analysis of 61 articles // *Cancer Epidemiol. Biomarkers*. — 2018. — Т. 27. — № 1. — С. 25-40.
93. Zhang C.-S., Li M., Ma T., Zong Y., et al. Metformin activates AMPK through the lysosomal pathway // *Cell Metabolism*. — 2016. — Т. 24. — № 4. — С. 521-522.
94. Zhang R., Lahens N. F., Ballance H. I., Hughes M. E., Hogenesch J. B. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2014. — Т. 111. — № 45. — С. 16219-24.
95. Zienolddiny S., Haugen A., Lie J. A., Kjuus H., et al. Analysis of polymorphisms in the circadian-related genes and breast cancer risk in Norwegian nurses working night shifts // *Breast Cancer Res.* — 2013. — Т. 15. — № 4. — С. R53.

*A.G. Golubev, A.V. Panchenko, E.A. Gubareva,
S.G. Kireeva, V.N. Anisimov*

Clock genes vs. breast cancer

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

Clock genes (CG) are responsible for adapting body to diurnal changes in environmental conditions (circadian cycles, CC). Discordances caused by changes in both environmental CC (shift work, excess light at night, or jet lag) and bodily CC, in particular due to changes in CG expression, increase the risk of cancer, the breast being the most vulnerable site. The present discussion is based on the reviews of relevant epidemiological and experimental findings, including meta-analyses, mainly published within the last five years. The conclusions related to translational medicine are, with regard to prevention, that shift work is a significant risk factor of breast cancer and, with regard to treatment, that melatonin properties make it feasible to develop regimens of its administration able to synchronize tumor and body CC so that cancer becomes most sensitive to treatment when body is least vulnerable to its side effects.

Keywords: clock genes, circadian cycles, breast cancer, risk factors, melatonin

Поступила в редакцию 03.10.2018 г.