

*Е.А. Губарева<sup>1</sup>, М.А. Майдин<sup>1</sup>, М.Л. Тындык<sup>1</sup>, И.А. Виноградова,<sup>2</sup> А.В. Панченко<sup>1</sup>*

### **Суточные ритмы пролиферации в кишечном эпителии и опухолях молочной железы у HER-2/neu трансгенных мышей и мышей FVB/N дикого типа и их коррекция мелатонином**

<sup>1</sup>ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург,

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск

Циркадианные (суточные) ритмы и опухолевый процесс взаимосвязаны: факторы, нарушающие суточные ритмы, такие как световое загрязнение, увеличивают риск возникновения злокачественных новообразований, а при онкологических заболеваниях наблюдаются изменения суточных ритмов в организме. Изучена суточная динамика пролиферации и апоптоза в эпителии тонкого кишечника и опухолях молочной железы у мышей линии FVB/N, трансгенных по HER-2/neu, а также проведена оценка влияния мелатонина на данные показатели. Показано, что у мышей наблюдается суточный ритм пролиферации кишечного эпителия с максимумом в утренние часы, а у мышей с опухолями данный ритм нарушается. Применение экзогенного мелатонина способствует сохранению суточного ритма пролиферации кишечного эпителия у животных с опухолями. Суточные изменения уровня пролиферации опухолей молочной железы зависят от времени секреции эндогенного мелатонина либо введения экзогенного гормона. Таким образом, мелатонин может рассматриваться как перспективное средство в терапии онкологических заболеваний, модулирующее циркадианные ритмы в опухолях и здоровых тканях.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, мышцы, трансгенные по HER-2/neu, мелатонин, суточные ритмы

#### **Введение**

Изучение взаимоотношений опухоли и организма имеет давнюю историю [1]. В последние годы все большее внимание привлекают вопросы роли микроокружения опухоли. Показано, что при опухолевом процессе нарушается функционирование не только ткани, в которой развивается опухоль, но и дистантных тканей. У животных с опухолями в пролиферативно активных тканях, не затронутых опухолевым процессом (например,

в кишечном эпителии и коже), накапливаются повреждения ДНК, вызванные активацией воспалительных процессов и окислительным стрессом [8, 14]. Влияние опухолевого процесса на циркадианные ритмы в дистантных нормальных тканях остается недостаточно изученным. У онкологических пациентов нарушаются суточные ритмы сна-бодрствования и секреции некоторых гормонов [13]. Это частично может быть обусловлено избыточной продукцией активных форм кислорода (АФК)/свободных радикалов, которые взаимодействуют с легко окисляемыми сигнальными молекулами, такими как мелатонин и, таким образом, влияет на суточные ритмы в клетках, тканях или организме [7]. Гормон эпифиза мелатонин, наряду с синхронизацией суточных ритмов, обладает антиоксидантным и противоопухолевым действием [2]. Нейтрализация молекулами мелатонина свободных радикалов снижает риск мутаций в ДНК [15]. Собственное противоопухолевое действие мелатонина хорошо документировано, но не до конца изучено. Выявлено несколько сигнальных путей и белков, являющихся мишенями мелатонина в опухолевых клетках. Мелатонин регулирует поглощение и метаболизм линолевой кислоты, которая является стимулятором пролиферации опухолевых клеток [4]. Применение мелатонина сопровождается снижением активности и экспрессии теломеразы в клетках рака молочной железы MCF-7 in vivo [10]. Мелатонин является антагонистом некоторых ростовых факторов [6]. Антиэстрогеновый эффект мелатонина способствует торможению роста гормонозависимых опухолей молочной железы [5]. Мелатонин повышает чувствительность опухоли к химиотерапевтическим препаратам [15].

Одним из перспективных направлений в лечении злокачественных новообразований является хронотерапевтический подход. Главный принцип этого подхода заключается в том, что противоопухолевые препараты вводят в те часы, когда ожидается, что их эффект будет максимальным, а повреждение здоровых тканей - минимальным.

Согласование суточных ритмов здоровых и опухолевых тканей с помощью экзогенных препаратов-хронобиотиков повышает эффективность и безопасность такого режима химиотерапии [11].

В данной работе впервые представлены результаты изучения влияния опухолевого процесса на суточный ритм пролиферации в интактном кишечном эпителии, а также возможность коррекции нарушений суточного ритма пролиферации с помощью мелатонина. Кроме того, оценена степень влияния мелатонина на суточные колебания пролиферативной активности опухолевых клеток.

### Материалы и методы

*Схема эксперимента.* В опытах использовали мышей линии FVB/N, трансгенных по HER-2/neu (64 животных), и мышей линии FVB/N (64 животных), содержащихся в виварии Петрозаводского государственного университета при режиме освещения 12:12 (включение света в 08:00) с доступом к воде и лабораторному корму ad libitum. Животные были получены из ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова». Протокол исследования был рассмотрен и одобрен локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» (Протокол №2 от 16.01.17). Трансгенные по HER-2/neu мыши линии FVB/N характеризуются спонтанным развитием аденокарцином молочной железы в возрасте 5-6 месяцев и короткой продолжительностью жизни (до 9 мес.), обусловленной гибелью животных, вызванной развитием множественных опухолей молочной железы и их быстрым ростом [12]. Все животные были разделены на 8 экспериментальных групп (табл. 1)

Мыши групп №№ 3, 4, 7 и 8 получали мелатонин (Sigma, США) с питьевой водой в ночное время (с 19:00 по 07:00) с возраста 2 мес. Мелатонин разводили в капле 96% этанола и затем добавляли водопроводную воду до концентрации 20 мг/л, и наливали в поилки темного стекла. Эвтаназию производили путем цервикальной дислокации в 08:00, 14:00, 20:00 и 02:00 часов группами по 4 мыши в возрасте 6 или 9 мес. В ночное время эвтаназию производили в затемненном помещении при свете настольной люминесцентной лампы, экранированной красным стеклом, после чего перемещали животное для аутопсии в освещенное помещение. В ходе аутопсии измеряли опухоли, объем вычисляли по формуле  $V=a*b^2/2000$  (мм<sup>3</sup>) (a и b – наибольший и наименьший линейный размер опухоли), затем выделяли жировые подушечки, содержащие молочные железы, опухоли молочных желез и кишечник, которые немедленно помещали в 10% нейтральный забуференный формалин. После фиксации материала в течение 48 часов он подвергался стандартной гистологической проводке, после чего изготавливали парафиновые блоки. Микротомные срезы срезы толщиной 3-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Г-Э) по стандартной методике.

*Изучение суточного ритма пролиферации и апоптоза в кишечном эпителии и в опухолях молочной железы.* Для оценки пролиферативной активности кишечного эпителия на поперечных срезах тощей кишки, окрашенных Г-Э, подсчитывали число митозов в 50 продольно срезаемых криптах у каждого животного. Число апоптотических клеток в 50 криптах подсчитывали на тех же гистологических препаратах. Для каждой группы животных, умерщвленных с 6 часовыми интервалами, рассчитывали среднее число митозов/апоптотических клеток на крипту. Для оценки пролиферативной активности опухолей молочной железы подсчитывали митотический индекс (МИ) - число митозов на

1000 жизнеспособных опухолевых клеток при увеличении х400. Анализ проводили в образцах, полученных в 4 временных точках в течение суток. Статистическую обработку полученных результатов выполняли в программе GraphPad Prism 6.0 с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с апостериорными множественными сравнениями с поправкой по Холм-Шидаку. Значимыми считали различия с  $p<0,05$ . Числовые данные представляли как среднее и ошибку средней ( $M\pm m$ ).

### Результаты и обсуждение

*Влияние мелатонина на суточный ритм пролиферации и апоптоза в кишечном эпителии.* Сведения о среднем числе митозов на крипту эпителия тощей кишки приведены в табл. 2, данные о среднем числе апоптотических клеток – в табл. 3.

Как можно судить по данным, представленным в табл. 2, пролиферация в кишечном эпителии животных линии FVB/N, как интактных, так и получающих в ночные часы мелатонин, носила ритмический характер с пиком митотической активности в утренние часы (08:00 ч). У мышей FVB/N, трансгенных HER-2/neu, этот ритм был нарушен уже на ранних стадиях опухолевого процесса (группа 5: HER-2/6м/К), тогда как при развитии у мыши множественных крупных опухолей суточные изменения уровня пролиферации кишечного эпителия не обнаруживались (группа 6: HER-2/9м/К). Введение в ночные часы мелатонина предупреждало эти нарушения и способствовало сохранению суточного ритма пролиферации в группах мышей № 7 и 8 (HER-2/6м/MT и HER-2/9м/MT).

Изучение уровня спонтанного апоптоза в криптах тощей кишки мышей (табл. 3) не выявило его суточных колебаний как не было обнаружено достоверного влияния на этот показатель и наличия опухоли.

Таким образом, нами было установлено, что развитие аденокарцином молочной железы у трансгенных по HER-2/neu мышей сопровождается нарушением ритма пролиферации в здоровой дистантной ткани – кишечном эпителии, а применение мелатонина у животных с опухолями молочной железы предотвращает нарушение суточного ритма пролиферации в кишечнике.

Влияние мелатонина на суточный ритм пролиферации в спонтанных опухолях молочной железы мышей, трансгенных по HER-2/neu. У мышей, трансгенных по HER-2/neu, в возрасте 6 мес. средний объем опухолей на животное составил  $0,61\pm 0,11$  см<sup>3</sup> и  $0,49\pm 0,11$  см<sup>3</sup> в контрольной и опытной группе, соответственно (группы 5 и 7), тогда как в возрасте 9 мес. –  $1,10\pm 0,14$  см<sup>3</sup> и  $0,97\pm 0,13$  см<sup>3</sup> (группы № 6 и 8). Различия между группами № 5 и 7, 6 и 8 статистически не достоверны, однако наблюдается тенденция к

**Таблица 1. Схема эксперимента**

№	Шифр группы	Линия	Воздействие	Возраст выведения из опыта, мес.	Число животных
1	FVB/6м/К	FVB/N	контроль	6	16
2	FVB/9м/К	FVB/N	контроль	9	16
3	FVB/6м/МТ	FVB/N	мелатонин	6	16
4	FVB/9м/МТ	FVB/N	мелатонин	9	16
5	HER-2/6м/К	FVB/N, HER-2/neu	контроль	6	16
6	HER-2/9м/К	FVB/N, HER-2/neu	контроль	9	16
7	HER-2/6м/МТ	FVB/N, HER-2/neu	мелатонин	6	16
8	HER-2/9м/МТ	FVB/N, HER-2/neu	мелатонин	9	16

**Таблица 2. Среднее число митотических фигур в крипах тощей кишки мышей линии FVB/N и линии FVB/N, трансгенных по HER-2/neu**

№	Шифр группы	Время суток, час			
		14:00	20:00	02:00	08:00
1	FVB/6м/К	1,49±0,09*	1,28±0,09*	1,39±0,09*	2,05±0,09
2	FVB/9м/К	1,44±0,08*	1,38±0,11*	1,45±0,1*	2,08±0,1
3	FVB/6м/МТ	1,25±0,08*	1,56±0,1*	1,59±0,09*	2,25±0,11
4	FVB/9м/МТ	1,31±0,07*	1,59±0,07*	1,57±0,08*	2,18±0,09
5	HER-2/6м/К	1,54±0,1	1,32±0,08*	1,42±0,08*	1,76±0,11
6	HER-2/9м/К	1,28±0,09	1,27±0,09	1,39±0,09	1,46±0,08а
7	HER-2/6м/МТ	1,32±0,08*	1,55±0,09*	1,43±0,09*	1,82±0,16
8	HER-2/9м/МТ	1,42±0,09*	1,45±0,08*	1,53±0,09*	1,94±0,1в

p<0,05, <sup>а</sup> – отличия от FVB/9м/К, <sup>б</sup> – от FVB/6м/МТ, <sup>в</sup> – от HER-2/9м/К, \* – от значения в точке 08:00 часов в той же группе.

**Таблица 3. Среднее число апоптотических клеток в крипах тощей кишки мышей линии FVB/N и линии FVB/N, трансгенных по HER2/neu**

№	Шифр группы	Время суток, час			
		14:00	20:00	02:00	08:00
1	FVB/6м/К	0,33±0,03	0,31±0,03	0,34±0,04	0,31±0,04
2	FVB/9м/К	0,28±0,03	0,38±0,05	0,32±0,03	0,28±0,05
3	FVB/6м/МТ	0,29±0,04	0,35±0,04	0,3±0,04	0,26±0,04
4	FVB/9м/МТ	0,32±0,05	0,33±0,03	0,29±0,04	0,3±0,03
5	HER-2/6м/К	0,35±0,03	0,36±0,03	0,4±0,03	0,33±0,05
6	HER-2/9м/К	0,36±0,05	0,38±0,03	0,39±0,04	0,36±0,05
7	HER-2/6м/МТ	0,29±0,04	0,35±0,05	0,35±0,05	0,36±0,04
8	HER-2/9м/МТ	0,38±0,04	0,37±0,04	0,36±0,04	0,38±0,04

**Таблица 4. Митотический индекс в опухолях молочной железы мышей линии FVB/N, трансгенных по HER2/neu**

№	Шифр группы	Время суток, час			
		14:00	20:00	02:00	08:00
5	HER-2/6м/К	1,35±0,06*	1,41±0,13*	0,73±0,06	1,29±0,07*
6	HER-2/9м/К	1,41±0,08*	1,28±0,11	1,01±0,06	1,38±0,08*
7	HER-2/6м/МТ	1,24±0,08	0,99±0,05 <sup>а</sup>	1,33±0,10 <sup>а*</sup>	1,34±0,09 <sup>#</sup>
8	HER-2/9м/МТ	1,26±0,07 <sup>#</sup>	0,79±0,08 <sup>б</sup>	1,53±0,09 <sup>б*</sup>	1,42±0,10 <sup>#</sup>

p<0,05, <sup>а</sup> – отличие от HER-2/6м/К, <sup>б</sup> - от HER-2/9м/К, \* - от значения в точке 02:00 часа в той же группе, <sup>#</sup> - от значения в точке 20:00 часов в той же группе

снижению среднего объема опухоли в группах, получавших мелатонин.

Все исследованные опухоли были диагностированы как низкодифференцированные аденокарциномы молочной железы солидного строения. В опухолях интактных животных (группы №5: HER-2/6м/К и № 6: HER-2/9м/К) показатели митотического индекса были достоверно меньшими в 02:00 ч по сравнению со всеми другими временными точками (табл. 4) что, возможно, обусловлено ночным пиком секреции мелатонина эпифизом (шишковидной железой). Достоверных различий этих показателей у мышей в группах HER-2/6м/К и HER-2/9м/К выявлено не было. В опухолях животных, получавших мелатонин (группа 7: HER-2/6м/МТ и группа 8: HER-2/9м/МТ), также было обнаружено снижение митотической активности, но не в ночное, а в вечернее время (20:00 ч). По-видимому, причиной сдвига надира этого показателя было потребление мышами раствора мелатонина, который они получали с 19 часов. Имеются наблюдения, что применение мелатонина в одно и то же время суток вызывает сдвиг фазы суточных ритмов активности у мышей [3].

Есть основания полагать, что опухолевые клетки отвечают на воздействие мелатонином снижением пролиферации в течение относительно короткого промежутка времени. Вопрос о наличии в аденокарциномах молочной железы собственного циркадианного ритма пролиферации остается открытым. Наиболее вероятно, что в опухолях молочной железы мышей, трансгенных по HER-2/нец, такой ритм отсутствует, поскольку нам не удалось зарегистрировать пик митотической активности. В то же время снижение митотической активности в этих опухолях может быть обусловлено антипролиферативным эффектом мелатонина [15].

В данной работе нами было изучено влияние хронического введения мелатонина на циркадианный ритм пролиферации в опухолевой ткани молочной железы и в дистантной нормальной ткани – эпителии тощей кишки. Было установлено, что опухолевый процесс сопровождается нарушением суточного ритма пролиферации в дистантной нормальной ткани – кишечном эпителии, и не оказывает влияния на суточный ритм показателей спонтанного апоптоза. Введение в ночные часы мелатонина предупреждало нарушения суточного ритма пролиферации в эпителии тощей кишки у животных с опухолями молочной железы, при этом пик митотической активности кишечного эпителия наблюдался в утренние часы как у интактных, так и у получавших мелатонин мышей. Динамика суточных колебаний уровня пролиферации в опухолях молочной железы свидетельствует о том, что

снижение в них митотической активности обусловлено действием секретируемого ночью эндогенного мелатонина, либо введениями экзогенного мелатонина. Следует отметить, что введение мелатонина, начиная с вечерних часов (19:00 ч), в отличие от опухолевой ткани молочной железы, не сопровождалось сдвигом пика пролиферации в кишечном эпителии. Это, возможно, обусловлено тем обстоятельством, что эпителий кишечника регулируется собственным функциональным осциллятором, а также содержит в своем составе энтерохромаффинные клетки, которые вырабатывает собственный, экстрапинеальный мелатонин [9].

Синхронизация ритмов пролиферации в нормальных тканях с помощью хронобиотиков может существенно снизить токсичность химиотерапевтического лечения, поскольку пик митотической активности в нормальных тканях и время введения противоопухолевых препаратов будут разнесены во времени. Назначение мелатонина онкологическим пациентам в дополнение к противоопухолевым препаратам представляется обоснованным, поскольку этот гормон нормализует суточные ритмы в здоровых тканях и способен сдвигать ритм пролиферации в опухолях. Особенности влияния мелатонина на циркадианный ритм пролиферации опухолевых клеток нуждается в дальнейшем изучении на различных моделях экспериментальных опухолей.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-304-50013 (мол\_нр) «Изучение нарушений и возможностей фармакологической коррекции суточных ритмов пролиферации в здоровых тканях и опухолях молочной железы у мышей».*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Канцерогенез / Под ред. Д.Г. Заридзе. – М: Медицина, 2004. – 576 с.
2. Anisimov V.N., Popovich I.G., Zabezhinski M.A., et al. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2006. – Vol. 1757(5–6). – P. 573–589.
3. Benloucif, S., Dubocovich, M. L. Melatonin and Light Induce Phase Shifts of Circadian Activity Rhythms in the C3H/HeN Mouse // *Journal of Biological Rhythms*. – 1996. – Vol. 11(2). – P. 113–125.
4. Blask, D. E., Dauchy, R. T., Sauer, L. A., et al. Growth and fatty acid metabolism of human breast cancer (MCF-7) xenografts in nude rats: impact of constant light-induced nocturnal melatonin suppression // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2003. – Vol. 79(3). – P. 313–20.
5. Cos S., Blask D.E., Lemus-Wilson A., Hill A. B. Effects of melatonin on the cell cycle kinetics and «estrogen-rescue» of MCF-7 human breast cancer cells in culture // *Journal of Pineal Research*. – 1991. – Vol. 10(1). – P. 36–42.

6. Di Bella G., Mascia F., Gualano L., Di Bella L. Melatonin anticancer effects: review // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2013. – Vol. 14(2). – P. 2410–30.
7. Fanjul-Moles M.L., López-Riquelme G.O. Relationship between Oxidative Stress, Circadian Rhythms, and AMD // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1–18.
8. Inácio Pinto N., Carnier J., Oyama et al. Cancer as a Proinflammatory Environment: Metastasis and Cachexia // *Mediators of Inflammation*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–13.
9. Konturek, P. C., Brzozowski, T., Konturek, S. J. Gut clock: implication of circadian rhythms in the gastrointestinal tract // *Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2011. – Vol. 62(2). – P. 139–50.
10. Leon-Blanco, M. M., Guerrero, J. M., Reiter et al. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro // *Journal of Pineal Research*. – 2003. – Vol. 35(3). – P. 204–11.
11. Mormont, M.-C., Lévi, F. Cancer chronotherapy: Principles, applications, and perspectives // *Cancer*. – 2003. – Vol. 97(1). – P. 155–169.
12. Panchenko A.V., Popovich I.G., Trashkov A.P. et al. Biomarkers of aging, life span and spontaneous carcinogenesis in the wild type and HER-2 transgenic FVB/N female mice // *Biogerontology*. – 2016. – Vol. 17(2). – P. 317–324.
13. Payne J.K. Altered Circadian Rhythms and Cancer-Related Fatigue Outcomes // *Integrative Cancer Therapies*. – 2011. – Vol. 10(3). – P. 221–233.
14. Redon C.E., Dickey J.S., Nakamura A.J. et al. Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2010. – Vol. 107. P. 17992–17997.
15. Reiter R.J., Rosales-Corral S.A., Tan D.-X. et al. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 18(4). – P. 843.

Поступила в редакцию 05.10.2018 г.

*E.A. Gubareva<sup>1</sup>, M.A. Maydin<sup>1</sup>, M.L. Tyndyk<sup>1</sup>,  
I.A. Vinogradova<sup>2</sup>, A.V. Panchenko<sup>1</sup>*

**Circadian rhythm of proliferation in intestinal epithelium and mammary tumors in HER-2/neu transgenic and FVB/N wild type mice; their correction with melatonin**

<sup>1</sup>N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg,  
<sup>2</sup>Petrozavodsk State University, Petrozavodsk

Circadian rhythms and tumor development are interconnected as the factors like light pollution which disrupt circadian rhythms increase the risk of cancer, and oncological diseases are associated with changes in organism's circadian rhythms. Circadian changes in intestinal epithelium and mammary tumors proliferation and apoptosis in HER-2/neu overexpressing FVB/N mice and assessment of melatonin's influence on these parameters were studied in this work. It was shown by us that intestinal epithelium in mice exhibits circadian rhythm of proliferation with the peak in the morning and in tumor-bearing mice this rhythm is disrupted. Exogenous melatonin contributes to circadian rhythm of intestinal epithelium proliferation. Circadian changes in mammary tumors proliferation rate depend on melatonin secretion or supplementation time. Thus, melatonin may be considered as a perspective drug in anticancer therapy modulating circadian rhythms in cancerous and normal tissues.

Key words: mammary cancer, HER-2/neu transgenic mice, melatonin, circadian rhythms