

на правах рукописи

ГУБАРЕВА

Екатерина Александровна

ВЛИЯНИЕ ПОСТОЯННОГО ОСВЕЩЕНИЯ И ВВЕДЕНИЯ МЕЛАТОНИНА
НА КАНЦЕРОГЕНЕЗ И ЭКСПРЕССИЮ ЧАСОВЫХ ГЕНОВ В ОПУХОЛЯХ
У МЫШЕЙ

14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург, 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
им. Н.Н. Петрова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: Доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН **Анисимов Владимир Николаевич**

Официальные оппоненты: **Борисенков Михаил Федорович**, доктор биологических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук (ИФ Коми НЦ УрО РАН), старший научный сотрудник
Бланк Ольга Алексеевна, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» Минздрава России), учёный секретарь

Ведущая организация: Научно-исследовательский институт онкологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Защита состоится «___» _____ 2020 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.052.01 при ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России (197759, Санкт-Петербург, Песочный-2, ул. Ленинградская, д. 68).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Петрова» Минздрава России, на сайте <http://www.niioncologii.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Лариса Валентиновна Филатова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Актуальность темы исследования

Циркадианные ритмы (ЦР) у живых организмов возникли как адаптивный механизм, позволяющий не просто реагировать на циклически изменяющиеся параметры окружающей среды, но заблаговременно готовиться к ним. У млекопитающих в течение суток изменяется уровень активности мозга (сон-бодрствование), артериального давления, температуры тела, синтеза и секреции гормонов, иммунных реакций, пролиферации клеток и апоптоза в некоторых тканях (Tsoumtsa, Torre, and Ghigo 2016). Основную роль в регуляции ЦР играет супрахиазматическое ядро (СХЯ) гипоталамуса; «гормон темноты» мелатонин (МТ) выполняет функцию синхронизации центрального (СХЯ) и периферических осцилляторов. Свет является важнейшим фактором синхронизации ЦР у млекопитающих, а нарушение режима освещения негативным образом сказывается на поведении, метаболизме, синтезе и секреции различных гормонов (Karatsoreos et al. 2011). Свет, поступающий на сетчатку ночью, блокирует синтез мелатонина - гормона эпифиза, ответственного за синхронизацию суточных ритмов, а также обладающего антиоксидантным, антигонадотропным и противоопухолевым действием (Reiter et al. 2017). Нарушение ЦР, вызванное световым загрязнением в больших городах, а также изменением ритма жизни (сменная работа, круглосуточный доступ к телевидению и интернету), является важной проблемой современного общества. Доказано, что освещение ночью увеличивает риск развития многих заболеваний, в том числе онкологических (Anisimov et al. 2012).

Биологические часы на клеточном уровне реализуются осцилляциями транскрипции генов *Bmal1,2*, *Clock* и *Npas2*, *Per1-3*, *Cry1, 2*, возникающими благодаря нескольким транскрипционно-трансляционным контурам обратной связи. В результате осцилляций в системе часовых генов (ЧГ) и белков в клетке с суточной периодичностью происходит транскрипция генов, ремоделирование хроматина (Le Martelot et al. 2012), пост-транскрипционный процессинг (Menet et al. 2012) и трансляция мРНК (Janich et al. 2015). Как в эпидемиологических исследованиях, так и в эксперименте доказана связь нарушений режима освещения с повышением частоты развития опухолей молочной железы, простаты и прямой кишки (Megdal et al. 2005).

Показано, что в различных опухолях человека нарушается согласованная экспрессия ЧГ; во многих случаях экспрессия репрессоров

транскрипции *Per* и *Cry* снижается, а экспрессия активаторов транскрипции *Bmal* и *Clock* повышается (Ye et al. 2018). При этом экспериментальные данные о ритме экспрессии часовых генов в опухолях не позволяют выявить общих тенденций (Masri et al. 2016; Tan et al. 2015).

Возможности влияния на ЦР в опухолях, а также влияние нарушения режима освещения и введения мелатонина (МТ) на клеточные «часы» в них остаются недостаточно изученными. В некоторых экспериментах описано противоопухолевое действие МТ в условиях стандартного и постоянного освещения (Dauchy et al. 2014; Schwimmer et al. 2014), тогда как в других работах показано, что МТ не угнетает канцерогенез при нарушении суточных ритмов (Baturin et al. 2001; Otálora et al. 2008).

Таким образом, изучение влияния мелатонина на канцерогенез при нарушении суточных ритмов, а также оценка суточного ритма экспрессии часовых генов и белков у животных с опухолями представляются актуальной задачей.

Степень разработанности темы

Изучение связи между нарушением суточных ритмов и опухолевым процессом ведется уже несколько десятилетий. Доказано, что клеточные «часы» участвуют в регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза, которые как правило нарушаются при возникновении опухолей (Shostak 2018). На клиническом материале описаны изменения экспрессии основных часовых генов в опухолях различных локализаций (Savvidis and Koutsilieris 2012; Панченко, Губарева, и Анисимов 2016). Однако, материал клинических исследований не позволяет оценивать суточные ритмы экспрессии ЧГ в опухолях и влияние на них различных факторов окружающей среды. Экспериментальные данные в этой области на сегодняшний день немногочисленны. В нескольких работах показано, что ритмы в опухолевой ткани по сравнению с нормальной нарушаются (Huisman et al. 2015; Masri et al. 2016; Soták et al. 2013), тогда как результаты, полученные на других моделях, свидетельствуют о сохранении суточных ритмов в опухолевых клетках (Puram et al. 2016; Tan et al. 2015; Yang et al. 2015). Кроме того, в последние годы опубликовано несколько работ, посвященных влиянию опухолей на суточные ритмы организма или дистантных тканей, не затронутых опухолевым процессом (Huisman et al. 2015; Masri et al. 2016).

Несмотря на большое количество экспериментальных исследований, посвященных частным аспектам изучения взаимосвязи циркадианных ритмов и опухолевого процесса, наблюдается недостаток комплексных исследований, в частности таких, где оценивались бы одновременно влияния нарушений суточных ритмов и введения мелатонина на систему часовых генов и белков.

Цель исследования:

Оценка влияния постоянного освещения и введения мелатонина на химически индуцированный канцерогенез у мышей; оценка экспрессии часовых генов и их белковых продуктов в опухолях различных локализаций.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние постоянного освещения и введения мелатонина на химически индуцированный канцерогенез легкого у мышей SHR.

2. Изучить влияние постоянного освещения и введения мелатонина на химически индуцированный канцерогенез кожи у мышей SHR.

3. Изучить влияние постоянного освещения и введения мелатонина на экспрессию часовых генов и содержание часовых белков в опухолевой и нормальной тканях легкого у мышей SHR.

4. Изучить влияние постоянного освещения и введения мелатонина на содержание часовых белков в опухолевой и нормальной тканях кожи у мышей SHR.

5. Оценить суточные колебания экспрессии часовых генов в опухолевой и нормальной ткани молочной железы, СХЯ и печени у мышей линии FVB/N дикого типа и трансгенных по HER2/neu.

6. Оценить суточные колебания пролиферативной активности опухолей молочной железы и кишечного эпителия у мышей линии FVB/N, трансгенных по HER2/neu.

Научная новизна

Экспериментальное исследование влияния режима освещения в сочетании с введением мелатонина на канцерогенез и экспрессию часовых генов и белков проведено впервые. Показано, что содержание часовых белков в опухолях кожи и легкого изменяется по сравнению с нормальной тканью, в опухолях двух локализаций разного гистогенеза продемонстрировано увеличение содержания часовых белков-активаторов

транскрипции. Показано влияние постоянного освещения и введения мелатонина как на показатели канцерогенеза, так и на систему часовых генов и белков.

Впервые показано, что развитие спонтанных опухолей молочной железы влияет на ритм экспрессии часовых генов в тканях, не затронутых непосредственно опухолевым процессом – печени и супрадиафрагмальном ядре.

Теоретическая и практическая значимость

В результате экспериментального исследования выявлено, что нарушение суточных ритмов способствует канцерогенезу, а опухолевый процесс влияет на ритм экспрессии генов не только в окружающей опухоль ткани, но и в СХЯ, которое регулирует суточные ритмы всего организма. В связи с этим целесообразно дальнейшее изучение препаратов с хронобиотической активностью на экспериментальных моделях различных опухолей. Применение хронобиотиков в лечении онкологических пациентов потенциально может не только повысить эффективность лечения, но и улучшить качество жизни за счет стабилизации суточных ритмов. Помимо этого, полученные данные расширяют теоретические представления о роли часовых генов и белков в развитии опухолевого процесса.

Методология и методы исследования

Исследование проведено с использованием трех экспериментальных моделей опухолей: химически индуцированный канцерогенез легкого у мышей SHR; химически индуцированный канцерогенез кожи у мышей SHR; спонтанные опухоли молочной железы у мышей FBV/N, трансгенных по HER2/neu. В каждом эксперименте использовано достаточное для получения статистически значимых результатов число животных; предусмотрены необходимые для обоснования наблюдаемых эффектов контрольные группы мышей. На каждой модели опухолей проводили измерения новообразований, затем проводили расчет их частоты и множественности.

Для оценки часовых генов использован метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, для оценки содержания часовых белков использован метод иммуногистохимии. Для обработки полученных данных использованы адекватные статистические критерии. Полученные

результаты исследований обобщены, подвергнуты анализу и сопоставлены с результатами, описанными в мировой литературе.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Нарушение светового режима способствует развитию химически индуцированных опухолей легкого и кожи. Введение мелатонина тормозит канцерогенез при постоянном освещении, тогда как в условиях смены дня и ночи у животных его введение не влияет на число и размеры опухолей обеих локализаций.

2. Содержание часовых белков в опухолях изменяется по сравнению с нормальной тканью. Содержание белков-активаторов транскрипции BMAL1 и CLOCK возрастает в доброкачественных и злокачественных опухолях по сравнению с соответствующей нормальной тканью.

3. Нарушение светового режима, так же как экзогенный мелатонин, могут влиять на экспрессию часовых генов и содержание часовых белков в опухолевых и нормальных тканях.

4. В спонтанных опухолях молочной железы у мышей, трансгенных по HER-2/neu, отсутствуют суточные колебания экспрессии часовых генов. При этом суточные колебания экспрессии ЧГ в центральном осцилляторе организма (СХЯ), печени и молочной железе при опухолевом процессе нарушаются.

5. У мышей, трансгенных по HER-2/neu, суточная динамика пролиферации в кишечном эпителии прогрессивно нарушается с увеличением объема опухолевой ткани.

Степень достоверности и апробация работы

Результаты проведенного исследования достоверны и обоснованы, что обусловлено достаточным количеством экспериментальных животных, использованных в опытах (270 мышей), включением необходимых контрольных групп, применением нескольких экспериментальных моделей и современных морфологических и молекулярных методов исследования.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на следующих мероприятиях: II Российский симпозиум с международным участием «Световой режим, старение и рак» (Петрозаводск, 2013), VIII Всероссийский съезд онкологов (Санкт-Петербург, 2013), 4 Всероссийский симпозиум с международным участием (Екатеринбург, 2013), конференция молодых

ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2014), Всероссийская конференция молодых ученых-онкологов «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 2014), Всероссийская конференция молодых ученых-онкологов в рамках II форума молодых ученых U-NOVUS (Томск, 2015), международная конференция «Молекулярная онкология. Итоги и перспективы» (Москва, 2016), I, III и IV Петербургский международный онкологический форум "Белые ночи (Санкт-Петербург, 2015; 2017 и 2018).

По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и 1 глава в зарубежном издании.

Личный вклад автора

Автор работы принимал непосредственное участие в планировании экспериментальных исследований, работе с животными, взятии материала, проведении патоморфологического анализа, постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР), иммуногистохимическом (ИГХ) окрашивании, статистической обработке результатов и подготовке публикаций.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 14.01.12 – онкология (п.2).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения и обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Диссертационная работа изложена на 163 страницах, иллюстрирована 15 таблицами и 41 рисунком. Список использованной литературы включает в себя 273 источника, из них 261 на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Препараты

Мелатонин ($\geq 99\%$, Sigma, США) вводили с питьевой водой из расчета 20 мг/л, навеску растворяли в 100-200 мкл этилового спирта, полученный раствор вносили в 1 л воды.

Уретан (Fluka, Швейцария) был использован в качестве канцерогена для индукции опухолей легкого.

Для индукции опухолей кожи на выбритый участок кожи спины 4-кратно в течение 2 недель наносили канцероген - диметилбензантрацен (ДМБА, 100 нмоль/100 мкл ацетона/мышь, Sigma, США), после этого до конца опыта дважды в неделю наносили промотор опухолевого роста - О-тетрадеканойлфорболацетат (ТФА, 17 нмоль/100 мкл ацетона/мышь, Sigma, США).

Животные

Все эксперименты были проведены в виварии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Протоколы опытов с животными были одобрены локальным этическим комитетом (Протокол заседания ЛЭК №2 от 16.01.2017). Все животные содержались в поликарбонатных клетках при температуре 22-23°C, получали водопроводную воду и лабораторный корм (ПК-120, ООО «Лабораторкорм», Россия) *ad libitum*. Мыши содержались при автоматизированном стандартном искусственном режиме освещения 12:12 (обозначен как LD, свет включен с 08:00 до 20:00 MSK, люминесцентные лампы, 500 Лк) или при постоянном режиме освещения (обозначен как LL, 500 Лк) в помещениях без окон. Время включения света принимали за 0 точку циркадианного времени (ZT0). За животными велось ежедневное наблюдение.

В опытах использовали аутбредных мышей SHR (питомник лабораторных животных Рапполово, Ленинградская область, Россия) и мышей линии FVB/N и линии FVB/N, трансгенных по HER2/neu (получены из питомника Charles River, США, поддерживаются в виварии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Мыши линии FVB/N, трансгенные по HER2/neu, характеризуются 100% частотой развития аденокарцином молочной железы начиная с 5-месячного возраста (Panchenko et al., 2016).

Схемы опытов

Исследование влияния режима освещения и введения мелатонина на канцерогенез легкого

120 мышей-самцов SHR в возрасте 3 месяцев массой тела 25-30 г на 1 сутки опыта рандомизировали на 4 группы по 30 мышей. Во всех группах внутрибрюшинно вводили уретан на 0 сутки опыта в дозе 1 г/кг в 0,9% стерильном растворе NaCl. Первую и третью группы мышей содержали при LD, вторую и четвертую – в условиях LL. Мыши третьей и четвертой групп получали мелатонин с 1 суток эксперимента в ночное время (с 20.00 ч. до 08.00 ч.), группы обозначены как LDMT и LLMT, соответственно. Через 45 недель после введения канцерогена эксперимент был остановлен.

Исследование влияния режима освещения и введения мелатонина на химически индуцированный канцерогенез кожи мышей

В опыте использовали 102 самцов мышей SHR в возрасте 14 месяцев массой тела 25-30 г. Мышей рандомизировали на 6 экспериментальных групп. Группы кLD и кLL получали аппликации ацетона, группы LD, LL, LDMT и LLMT получали аппликации ДМБА и ТФА. В группах с обозначением MT с первых суток опыта давали мелатонин с питьевой водой в ночное время (20 мг/л, с 20:00 до 08:00 ч.). Группы с обозначением LD и LL содержались при соответствующем режиме освещения.

Один раз в 2 недели проводили регистрацию массы тела и фотосъемку участка спины (фотоаппарат Canon PowerShot A540) при одинаковом масштабе. Анализ изображений проводили с помощью программного обеспечения ImageJ. Рассчитывали следующие параметры канцерогенеза: частота мышей с опухолями, общее количество опухолей, среднее количество опухолей на мышь среди мышей с опухолями, средняя площадь опухолей.

Изучение суточных колебаний экспрессии часовых генов и белков и пролиферации кишечного эпителия у мышей линии FVB, трансгенных по HER2/neu

В опыте использовали 16 самок мышей линии FVB/N и 32 самки мышей линии FVB/N, трансгенных по HER2/neu. Мыши FVB/N были выведены из эксперимента в возрасте 6 месяцев в 08:00 (ZT0), 14:00 (ZT6), 20:00 (ZT12) и 02:00 (ZT18), мыши линии FVB/N, трансгенные по HER2/neu - в возрасте 6 и 9 месяцев в 08:00 (ZT0), 14:00 (ZT6), 20:00 (ZT12) и 02:00 (ZT18) (по 4 мыши в каждой группе).

Молекулярно-генетические методы

Выделяли общую РНК из гомогенатов образцов ткани (гомогенизатор Minilys, Bertin Instruments, реагент TRIzol, ThermoFisherScientific) для проведения реакции обратной транскрипции для получения кДНК. Далее проводили ПЦР в режиме реального времени с праймерами к генам Clock, Bmal1, Cry1, и гену β -актина (референтный ген) (синтезированы в лаборатории молекулярной онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова). ПЦР с каждой пробы проводили как минимум в двух повторностях. Относительный уровень экспрессии вычисляли по формуле: $E_{target} = 2^{-(Cq_{reference} - Cq_{target})}$, где $Cq_{reference}$ и Cq_{target} – количество циклов амплификации для референсного и изучаемого генов, соответственно.

Патоморфологические методы

Все павшие животные и животные после эвтаназии подвергались немедленной аутопсии. Образцы тканей для молекулярно-генетического исследования (участок мозга с супрахиазматическим ядром, печень, жировые подушечки с молочными железами, фрагменты опухолей) замораживали в жидком азоте и хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Кусочки тканей с опухолями, а также ткани и органы, подозрительные на наличие новообразований, фиксировали в 10 % нейтральном формалине. На фиксированных формалином легких под лупой подсчитывали число и размеры опухолевых узлов, которые делили на малые ($\leq 1\text{ мм}$), средние (1,1–2 мм) и крупные ($> 2\text{ мм}$).

После традиционной 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 оценки пролиферативной активности опухолей подсчитывали митотический индекс по формуле $M = N_{mit}/N \times 100$, где N_{mit} – число клеток, претерпевающих митоз, N – общее число клеток. Для оценки пролиферативной активности кишечного эпителия использовали поперечные срезы тощей кишки, выбирали 50 продольно срезанных крипт, подсчитывали число митозов и вычисляли среднее число митозов на 1 крипту.

Иммуногистохимическое окрашивание (ИГХ)

Для проведения иммуногистохимического окрашивания использовали парафиновые срезы, помещенные на стекла Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific, Германия), которые инкубировали с раствором первичных антител

(анти-BMAL1, разведение 1:300, NovusBiologicals, NB100-2288; анти-CLOCK разведение 1:200, NovusBiologicals, NB100-92284; анти-CRY1, разведение 1:100, NovusBiologicals, NBP1-69080 и анти-PER2, разведение 1:100, ThermoScientific, PA5-23339). Затем наносили вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой (Anti-Rabbit EnVision System, Dako, Дания) и раствор хромогена - диаминобензидина (ДАБ, 1:50 в буфере Liquid Dab+ Substrate Chromogen System, Dako, Дания). С помощью КМОП-камеры MMC-31C-M (MMCSoft, Россия) получали микрофотографии опухолевой и нормальной ткани. Обработку и анализ изображений проводили в программе ImageJ (НИН, США) с использованием модуля Colour deconvolution.

Оценка содержания часовых белков в опухолевой и нормальной ткани на ИГХ препаратах

Для оценки BMAL1 в опухолях и нормальной ткани легких на микрофотографиях срезов легкого измеряли оптическую плотность, соответствующую окрашиванию ДАБ. Оптическую плотность нормальной ткани принимали за 1, затем вычисляли относительное содержание белка BMAL1. Окрашивание антителами к CLOCK оценивали в аденомах и аденокарциномах легких в баллах от 1 (слабое) до 3 (интенсивное).

Для оценки содержания часовых белков BMAL1, CLOCK и CRY1 в коже и опухолях кожи на микрофотографиях препаратов подсчитывали процент позитивно окрашенных ядер в базальном слое кожи и папиллом кожи. Оценку содержания белка BMAL1 в молочной железе и спонтанных опухолях молочной железы проводили так же, как в легком. Для оценки содержания белка CLOCK подсчитывали процент иммунопозитивных ядер.

Статистическая обработка данных

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 ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние режима освещения и введения мелатонина на канцерогенез легких, индуцированный уретаном у мышей

Проведена оценка влияния режима освещения (экспериментальные группы LD – освещение 12:12 и LL – постоянное освещение) и введения мелатонина на канцерогенез легкого при стандартном режиме освещения (экспериментальная группа LDMT) и при постоянном свете (экспериментальная группа LLMT). Результаты оценки основных показателей канцерогенеза и распределение доброкачественных/злокачественных опухолей приведены в таблице 1.

Таблица 1 - 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 (%)	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 количество 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	28 (8,8%) #p=0,0001

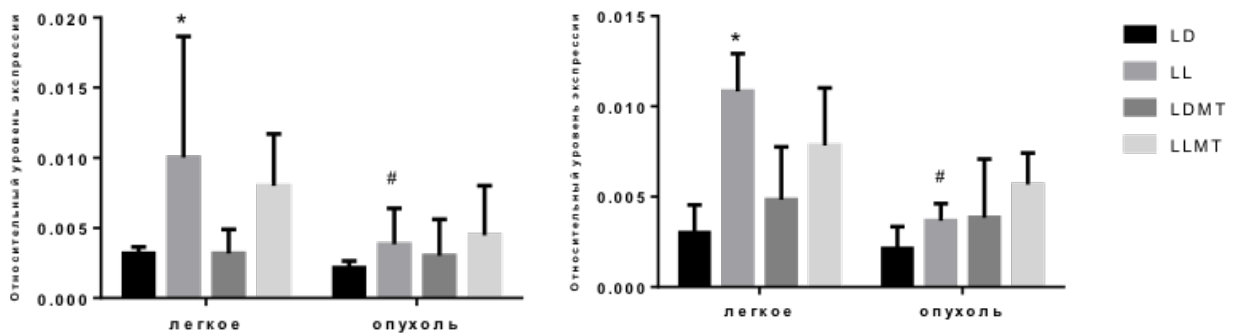
* сравнение с группой LD, # сравнение с LL (точный тест Фишера)

При анализе частоты опухолей различного размера выявлено, что опухоли крупного размера на 12% чаще выявлялись у животных группы LL, содержащейся при постоянном освещении (62 опухоли из 294, 21,1%), по сравнению с группой LD (28 опухолей из 320, 14,6%, p=0,0245). Введение экзогенного мелатонина при постоянном освещении существенно уменьшало частоту крупных опухолей на 6,5% (p<0,001, по сравнению с LL).

Экспрессия часовых генов в опухолях легких у мышей

Оценка экспрессии часовых генов *Bmal1*, *Clock* и *Cry1* в образцах нормальной и опухолевой ткани легкого проводилась методом ПЦР в режиме реального времени. Данные для генов *Bmal1* и *Clock*, для которых получены статически значимые различия, приведены на рисунке 1.

Относительная экспрессия гена *Bmal1* в опухолевой ткани легкого у животных группы LL была в 2,6 раз ниже, чем в нормальной ткани ($p=0,0345$). При этом в нормальной ткани легкого животных, содержащихся в условиях постоянного освещения (группа LL), уровень относительной экспрессии данного гена в 3,1 раза превышал значения аналогичного показателя для животных при стандартном режиме освещения (LD) ($p=0,02$, рисунок 1А). Экспрессия гена *Cry1* в опухолевой ткани легкого в группе LL была в 2,9 раза ниже, чем в нормальной ткани ($p=0,0005$). В нормальной ткани легкого уровень экспрессии данного гена был выше в 3,6 раза у животных, содержащихся в условиях постоянного освещения (LL) по сравнению с группой стандартного освещения (LD) ($p=0,0002$, рисунок 1Б).



А

Б

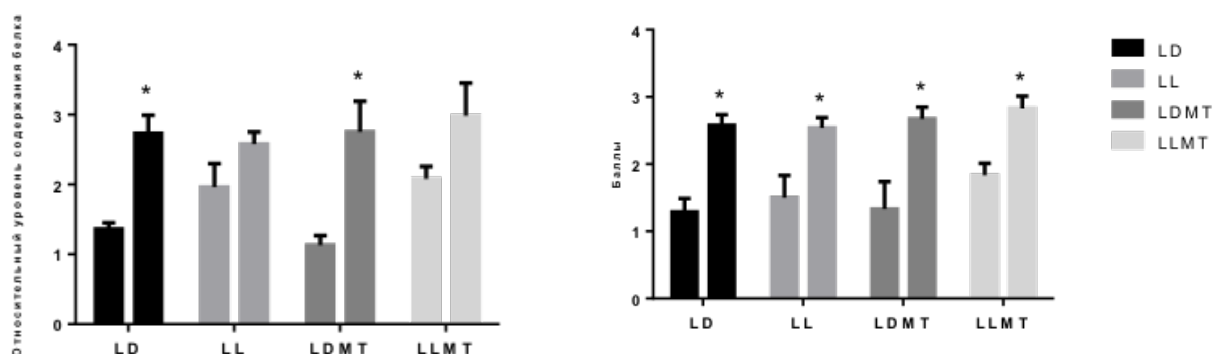
Рисунок 1. Экспрессия генов *Bmal1* (А) и *Cry1* (Б) в образцах нормальной и опухолевой ткани легкого ($M \pm m$)

* - $p=0,02$, 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.

Данные по содержанию белков *BMAL1* и *CLOCK* приведены на рисунке 2. Содержание белка *BMAL1* (рисунок 2А) во всех опытных группах было выше в аденомах (1,13-2,08) и аденокарциномах (2,58-2,98), чем в нормальной ткани легкого (значение принято за 1). Статистически значимые различия в относительном содержании белка *BMAL1* между аденомами и

аденокарциномами наблюдались в группах LD (в 2 раза, $p=0,0048$) и LDMT (в 2,4 раза, $p=0,0437$).

Интенсивность окрашивания аденокарцином антителами к CLOCK (рисунок 2Б) во всех группах была статистически значимо выше, чем в аденомах. Так, в группе LD интенсивность окрашивания аденом составляла в среднем $1,29 \pm 0,20$ баллов, аденокарцином – $2,58 \pm 0,16$ баллов ($p=0,0001$). Для группы LL эти значения составили $1,50 \pm 0,33$ и $2,54 \pm 0,15$, соответственно ($p=0,0053$). Введение мелатонина не влияло на данный показатель: так, для группы LDMT получены значения в $1,33 \pm 0,41$ балла для аденом и $2,67 \pm 0,18$ для аденокарцином ($p=0,0018$), а для группы LLMT – $1,83 \pm 0,18$ и $2,83 \pm 0,18$, соответственно ($p=0,0085$).



А

Б

Рисунок 2. Интенсивность окрашивания аденом (левый столбец) и аденокарцином (правый столбец) легкого антителами к VMAL1 (А) и CLOCK (Б) ($M \pm m$)

* $p \leq 0,05$ при сравнении с аденомами в той же группе, U-критерий Манна-Уитни

Влияние режима освещения и введения мелатонина на канцерогенез кожи, индуцированный ДМБА и ТФА у мышей SHR

Для индукции опухолей кожи была использована модель двухстадийного канцерогенеза с применением ДМБА и ТФА. Как и в опыте по изучению канцерогенеза легкого, задачей эксперимента было оценить влияние режима освещения и введения мелатонина на канцерогенез. Результаты оценки основных показателей канцерогенеза приведены в таблице 2.

Наибольшее количество животных с папилломами наблюдалось в группе постоянного освещения LL: 16 животных из 18 (89%), в то время как в группе стандартного освещения LD папилломы были обнаружены только у

13 животных из 22 (59%, $p=0,038$ по сравнению с LD). Число животных с папилломами кожи в группе LLMT составило 12/20 (60%), что на 30% ниже, чем в группе LL, животные в которой не получали мелатонин ($p=0,048$).

Таблица 2 - Основные показатели индуцированного ДМБА и ТФА канцерогенеза у мышей SHR

Показатели	Группа					
	kLD	kLL	LD	LL	LDMT	LLMT
Количество эффективных животных	10	10	22	18	19	20
Количество животных с папилломами кожи	0	0	13 (59%) * $p=0,038$	16 (89%)	14 (74%)	12 (60%) * $p=0,048$
Количество выявленных папиллом кожи при аутопсии	0	0	72	90	55	44
Время выявления первой опухоли кожи (сутки опыта)	—	—	82,7±6,74	70,8±4,86	80,2±6,15	81,3±5,43

* по сравнению с LL, точный тест Фишера

Содержание часовых белков в опухолях кожи у мышей

Было проведено иммуногистохимическое окрашивание образцов кожи и папиллом кожи антителами к часовым белкам BMAL1, CLOCK и CRY1. Оценку окрашивания проводили путем подсчета доли позитивно окрашенных ядер (ПЯ) базального слоя кожи и папиллом.

Процент позитивно окрашенных антителами к BMAL1 ядер (рисунок 3А) в коже с места аппликации канцерогена у животных в группе стандартного освещения (LD) составил $62,2±2,1$, а в группе постоянного освещения (LL) значение данного показателя было на 7% выше – $69,2±2,0$ ($p=0,025$). Аналогично, ПЯ в опухолях животных группы LD был на 19% ниже, чем в опухолях животных группы LL: получены значения $65,3±2,3$ и $72,5±1,8$ для групп LD и LL, соответственно ($p=0,024$).

Процент позитивно окрашенных антителами к CLOCK ядер (рисунок 3Б) в опухолях составил $44,1±4,2$ в группе LD, а в группе постоянного освещения LL достигал значений $62,8±2,2$ и был статистически значимо выше ($p=0,024$). В группах LDMT, LL, LLMT было обнаружено повышение содержания белка CLOCK на 10 – 21% в опухолях(Оп) по сравнению с кожей(К) в той же группе. Так, для группы LDMT были получены значения Оп= $64,0±2,6$ и К= $50,2±1,8$ ($p=0,0003$), для группы LL – Оп= $62,8±2,2$ и

$K=53,0\pm 3,4$ ($p=0,0106$) и для группы LLMT – $Op=71,1\pm 1,3$ и $K=51,6\pm 1,9$ ($p<0,000001$).

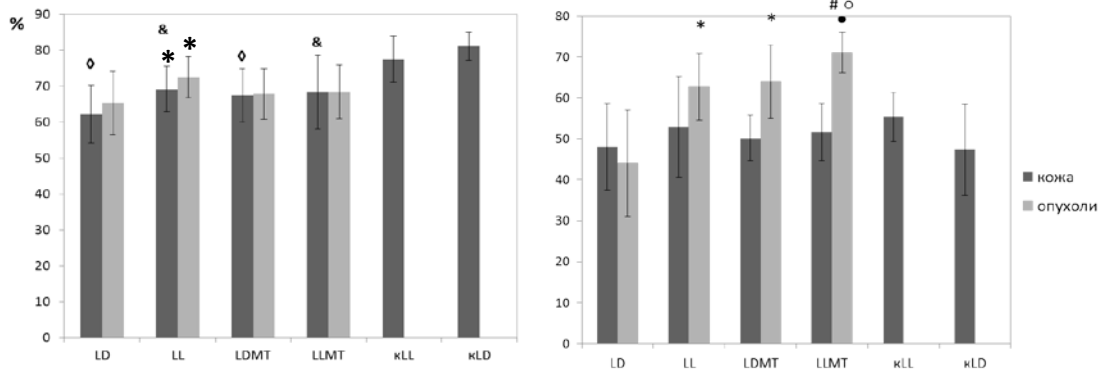


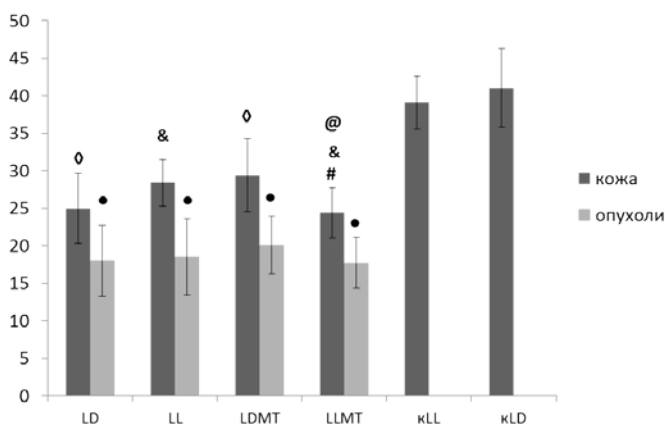
Рисунок 3 – Доля ядер базального слоя эпидермиса кожи мышей, экспрессирующих BMAL1 (А) и CLOCK (Б), M(SD)

* - $p\leq 0,05$ при сравнении тканей в той же группе, t-тест Стьюдента;

- $p\leq 0,05$ при сравнении с LL, тест Тьюки;

o - $p\leq 0,05$ при сравнении с LDMT, тест Тьюки

При оценке CRY1 (рисунок 4) было обнаружено, что во всех опытных группах процент позитивных ядер в коже статистически значимо снижался по сравнению с контролем. Для контрольной группы kLD получено значение $41,0\pm 2,1$, для групп стандартного освещения LD и LDMT - $25,0\pm 0,9$ ($p=0,0002$) и $29,3\pm 1,3$ ($p=0,001$), соответственно. В коже животных, содержащихся при постоянном освещении, обнаружены следующие значения: $39,0\pm 1,6$ (kLL); $28,3\pm 0,8$ (LL, $p=0,001$), $24,4\pm 0,8$ (LLMT, $p=0,004$).



* $p\leq 0,05$ при сравнении с LL тест Тьюки; # $p\leq 0,05$ при сравнении с LL, тест Тьюки; $p\leq 0,05$ при сравнении с LDMT тест Тьюки; & $p\leq 0,05$ при сравнении с kLL, тест Тьюки; \diamond $p\leq 0,05$ при сравнении с kLL тест Тьюки; @ $p\leq 0,05$ при сравнении с LDMT, тест Тьюки
● - $p\leq 0,05$ при сравнении тканей в той же группе, t-тест Стьюдента

Рисунок 4 – Доля ядер базального слоя эпидермиса кожи мышей, экспрессирующих CRY1 в опыте с ДМБА и ТФА индуцированным канцерогенезом кожи, M(SD)

Опухоли животных всех опытных групп характеризовались сниженным на 27-34% содержанием CRY1 по сравнению с образцами кожи с места аппликации канцерогена у животных той же группы ($p < 0,005$ для групп, получавших мелатонин, и $p < 0,001$ для групп без мелатонина).

Суточные изменения экспрессии часовых генов и белков в нормальных тканях и спонтанных опухолях молочной железы мышей

Был проведен анализ экспрессии генов *Bmal1*, *Clock*, *Cry1* методом ПЦР в образцах мозга, печени, опухолевой и нормальной ткани молочной железы, взятых в 08:00 (ZT0), 14:00 (ZT6), 20:00 (ZT12) и 02:00 (ZT18).

В образцах мозга, содержащих СХЯ (рисунок 5), у мышей дикого типа наблюдался выраженный пик экспрессии *Bmal1* ($E = 0,137 \pm 0,034$), *Clock* ($E = 1,715 \pm 0,58$), и *Cry1* ($E = 0,211 \pm 0,069$) в середине темновой фазы (ZT18). У 6-месячных мышей, трансгенных по *HER2/neu*, значение уровня экспрессии в данной временной точке оказалось значимо снижено. E_{Bmal1} снижался в 8,5 раз ($0,016 \pm 0,004$, $p < 0,0001$), E_{Clock} в 6,9 раз ($0,25 \pm 0,11$, $p = 0,0009$), E_{Cry1} – в 13,2 раза ($0,016 \pm 0,005$, $p = 0,033$). У мышей группы *HER2/neu* 9 месяцев экспрессия часовых генов в СХЯ характеризовалась большим разбросом данных, чем в группе *HER2/neu* 6 месяцев, и статистически значимые различия с *FVB/N* в точке ZT18 выявлены только для гена *Clock*, экспрессия которого была снижена в 2,6 раза ($E_{Clock} = 0,65 \pm 0,40$ ($p = 0,029$)).

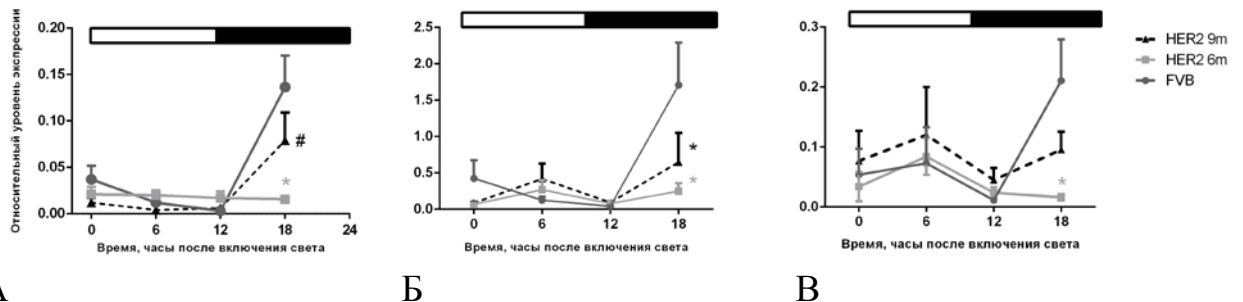


Рисунок 5 - Суточные изменения экспрессии генов *Bmal1* (А), *Clock* (Б), *Cry1* (В) в СХЯ у мышей *FVB/N* и мышей *FVB/N*, трансгенных по *HER2/neu*

* - $p \leq 0,05$ при сравнении с *FVB/N*, тест Тьюки

- $p \leq 0,05$ при сравнении с *HER2/neu* 6 месяцев, тест Тьюки

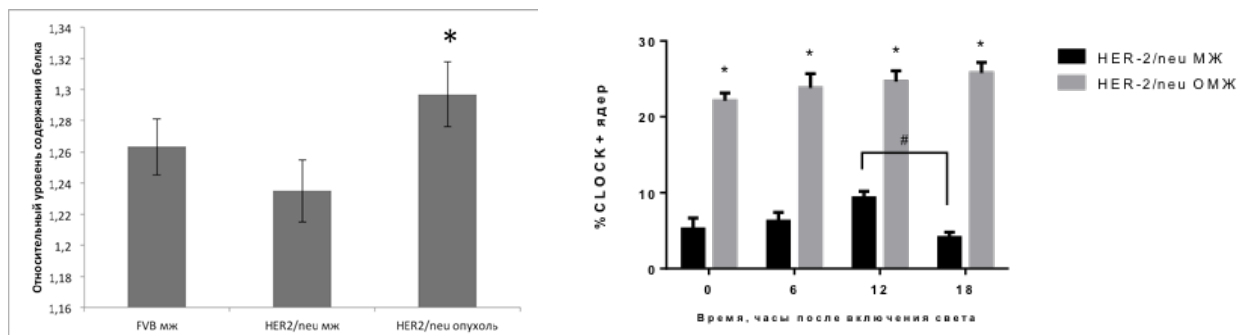
В печени у мышей *FVB/N* пик экспрессии ЧГ также приходился на точку ZT 18; его значение составило: $E_{Bmal1} = 0,038 \pm 0,015$, $E_{Clock} = 1,01 \pm 0,049$, $E_{Cry1} = 0,188 \pm 0,07$. Статистически значимое снижение экспрессии часовых генов *Clock* и *Cry1* в точке ZT18 наблюдалось в печени у мышей,

трансгенных по HER2/neu в возрасте 6 месяцев по сравнению с FVB/N. E_{Clock} снижалось в 14,4 раза ($0,07 \pm 0,02$, $p < 0,0001$), E_{Cry1} - в 11,75 раз ($0,016 \pm 0,004$, $p = 0,0002$). У мышей HER2/neu в возрасте 9 месяцев выявлено снижение экспрессии гена Clock в точке ZT18 по сравнению с FVB/N: $E_{Clock} = 0,41 \pm 0,30$ ($p = 0,0067$).

В молочной железе мышей FVB/N наивысший уровень экспрессии Clock выявлен в ZT18 ($E_{Clock} = 2,78 \pm 1,71$); при этом у мышей HER2/neu в этой точке экспрессия Clock была снижена в 23,2 раза ($p = 0,018$ по сравнению с HER2/neu 6 месяцев, $p = 0,015$ - с HER2/neu 9 месяцев).

Уровень экспрессии гена Cry1 в ткани молочной железы мышей FVB/N достигал максимума в точке ZT6 ($0,473 \pm 0,30$) и был в 5,8 раз выше, чем у мышей HER2/neu в той же точке ($p = 0,023$ по сравнению с HER2/neu 6 месяцев, $p = 0,029$ - с HER2/neu 9 месяцев). Анализ экспрессии генов Bmal1, Clock и Cry1 в образцах опухолей молочной железы мышей HER2/neu показал, что эти гены в опухолевой ткани имеют относительно низкий уровень экспрессии, и его суточные колебания не наблюдаются.

В нормальной и опухолевой ткани молочной железы мышей провели оценку содержания белков BMAL1 и CLOCK (рисунок 6).



А

* - $p = 0,0002$ при сравнении с тканью молочной железы мышей HER2/neu, t-тест Стьюдента

Б

- $p = 0,0012$, апостериорный тест Тьюки при сравнении между ZT12 и ZT18,

* - $p < 0,0001$, U-критерий Манна-Уитни при сравнении с протоками молочной железы в той же временной точке

Рисунок 6 – Относительный уровень содержания белка BMAL1 в молочной железе и опухолях молочной железы мышей (А); Суточные изменения доли ядер, позитивно окрашенных антителами к CLOCK в молочной железе и опухолях молочной железы мышей (Б)

Интенсивность окрашивания антителами к BMAL1 статистически значимо не различалась между тканью МЖ мышей линии FVB ($1,26 \pm 0,02$), и

трансгенных мышей ($1,23 \pm 0,02$). При этом у мышей, трансгенных по HER2/neu, различия между тканью и опухолями МЖ носили значимый характер: в опухолях интенсивность окрашивания была на 0,07 относительных единиц выше и составляла $1,30 \pm 0,02$ ($p=0,0002$).

В случае белка CLOCK процент позитивно окрашенных ядер в протоках молочной железы в точке ZT12 составлял $9,31 \pm 0,89\%$ и был статистически значимо выше, чем в точке ZT 18 ($4,08 \pm 0,71\%$, $p=0,0012$). В опухолях во всех временных точках ПЯ был выше, чем в протоках: в опухолях и протоках в точке ZT0 значение данного показателя составило, соответственно $22,11 \pm 1,03\%$ и $5,21 \pm 1,44$ ($p < 0,0001$), в точке ZT6 – $23,8 \pm 1,88\%$ и $6,24 \pm 1,17\%$ ($p < 0,0001$), в точке ZT12 – $24,62 \pm 1,44\%$ и $9,31 \pm 0,89\%$ ($p < 0,0001$), в точке ZT18 – $25,77 \pm 1,39\%$ и $4,08 \pm 0,71\%$ ($p < 0,0001$).

Суточные изменения митотической активности спонтанных опухолей молочной железы мышей FVB, трансгенных по HER2/neu

В обеих группах мышей в опухолях наблюдался статистически значимый спад митотической активности или тенденция к таковому в точке ZT18 по сравнению со всеми другими временными точками (таблица 3). Минимальное значимое снижение митотического индекса составило 1,38 раз и наблюдалось в группе HER2/neu 9 месяцев ZT6 ($p < 0,05$), максимальное снижение выявлено в группе HER2/neu 6 месяцев ZT12 - в 1,93 раза ($p < 0,0001$).

Таблица 3 – Митотический индекс в опухолях молочной железы мышей линии FVB/N, трансгенных по HER2/neu

Шифр группы	Время суток, час			
	14:00 (ZT6)	20:00 (ZT12)	02:00(ZT18)	08:00(ZT0)
HER-2/6м	$1,35 \pm 0,06$ * $p < 0,0001$	$1,41 \pm 0,13$ * $p < 0,0001$	$0,73 \pm 0,06$	$1,29 \pm 0,07$ * $p < 0,0001$
HER-2/9м	$1,41 \pm 0,08$ # $p = 0,0063$	$1,28 \pm 0,11$	$1,01 \pm 0,06$	$1,38 \pm 0,08$ # $p = 0,0128$

$p < 0,05$, * сравнение с FVB/N/6м ZT18, тест Тьюки

сравнение с FVB/N/9м, ZT18, тест Тьюки

Суточные изменения пролиферации в кишечном эпителии мышей FVB, трансгенных по HER2/neu

На препаратах тощей кишки мышей FVB/N дикого типа и трансгенных по HER2/neu, подвергнутых эвтаназии в разное время суток, было подсчитано среднее число митозов на крипту тощей кишки (таблица 4).

У мышей контрольной группы наибольший уровень пролиферации в кишечном эпителии наблюдался в начале световой фазы (точка ZT0). У мышей HER2/neu в возрасте 9 месяцев значимых различий между временными точками не обнаружено; значение в точке ZT0 на 29,9% ниже по сравнению с группой FVB/N/6м/К ($1,46 \pm 0,08$, $p < 0,0001$). У мышей HER2/neu в возрасте 6 месяцев наблюдалась тенденция к снижению пикового значения в точке ZT0.

Таблица 4 – Среднее число митотических фигур в криптах тощей кишки мышей линии FVB/N и линии FVB/N, трансгенных по HER-2/neu

Шифр группы	Время суток, час			
	14:00 (ZT6)	20:00 (ZT12)	02:00 (ZT18)	08:00 (ZT0)
FVB/N/6м	$1,49 \pm 0,09$ * $p < 0,0001$	$1,28 \pm 0,09$ * $p < 0,0001$	$1,39 \pm 0,09$ * $p < 0,0001$	$2,05 \pm 0,09$
HER-2/6м	$1,54 \pm 0,1$	$1,32 \pm 0,08$ # $p = 0,0029$	$1,42 \pm 0,08$ # $p = 0,0346$	$1,76 \pm 0,11$
HER-2/9м	$1,28 \pm 0,09$	$1,27 \pm 0,09$	$1,39 \pm 0,09$	$1,46 \pm 0,08$ ^a $p < 0,0001$

* сравнение с FVB/N/6м 08:00, # сравнение с FVB/N/6м 08:00 ,

^a – сравнение с FVB/N/6м , тест Тьюки

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературных данных и полученные результаты свидетельствуют о взаимосвязи нарушения суточных ритмов и опухолевого процесса, а также об антиканцерогенном эффекте мелатонина. В эксперименте выявлено, что постоянное освещение промотирует развитие химически индуцированных опухолей легкого и кожи, а введение мелатонина тормозит канцерогенез только при постоянном освещении.

Установлено, что в опухолях легкого и молочной железы 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. Таким образом, нельзя

ограничиваться только анализом уровня экспрессии часовых генов в опухолях. Вопрос об активности данных транскрипционных факторов в опухолях требует дальнейшего изучения.

У мышей HER-2/neu обнаружено нарушение суточной динамики экспрессии часовых генов в спонтанных опухолях молочной железы, СХЯ и печени. Таким образом, подтверждено негативное влияние опухолей на циркадианные ритмы всего организма. Вопрос о возможностях и целесообразности фармакологической коррекции циркадианных ритмов в экспериментах и у онкологических пациентов нуждается в дальнейшем изучении.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что постоянное освещение промотирует индуцированный уретаном канцерогенез легкого у мышей SHR. Так, частота крупных опухолей в группе LL была на 12% выше, чем в LD ($p=0,0245$). Введение мелатонина угнетает канцерогенез легкого только при постоянном освещении, частота крупных опухолей в группе LLMT на 6,5% ниже, чем в LL ($p=0,0001$).

2. Показано промотирующее влияние постоянного освещения на развитие химически индуцированных опухолей кожи у мышей SHR (частота животных с опухолями в группе LL выше, чем в LD, на 30%, $p=0,038$). Торможение канцерогенеза кожи с помощью мелатонина наблюдалось только в условиях постоянного освещения (частота животных с опухолями в группе LLMT на 29% ниже, чем в LL, $p=0,048$).

3. Выявлено повышение уровня экспрессии часовых генов *Bmal1* и *Cry1* в нормальной ткани легкого у мышей, содержащихся при постоянном освещении по сравнению с контролем (LD) в 3,1 ($p=0,02$) и 3,6 ($p=0,0002$) раза, соответственно. Опухоли легкого у животных этой группы характеризовались сниженной экспрессией *Bmal1* (в 2,6 раза, $p=0,0345$) и *Cry1* (в 2,9 раза, $p=0,0005$) по сравнению с нормальной тканью. Содержание часового белка BMAL1 существенно повышалось в аденокарциномах легкого по сравнению с аденомами в группах животных, содержащихся в условиях постоянного освещения (в LD – в 2 раза, $p=0,0048$, в LDMT – в 2,4 раза, $p=0,0437$). Содержание белка CLOCK было значимо выше в аденокарциномах по сравнению с аденомами во всех группах (2,54 – 2,83 балла и 1,29 – 1,83 балла, соответственно, $p<0,005$).

4. На модели канцерогенеза кожи выявлены разнонаправленные изменения содержания часовых белков BMAL1, CLOCK и CRY1 в гиперпластическом эпителии и в опухолях кожи по сравнению с нормальной тканью. При этом содержание BMAL1 и CLOCK в опухолях повышалось под влиянием постоянного освещения на 7% ($p=0,024$) и 19% ($p=0,024$). В опухолях кожи во всех группах животных, кроме LD, выявлено повышение содержания белка CLOCK на 10 – 21% ($p<0,05$) а содержание CRY1 на 27–34% ниже в опухолях, чем в эпидермисе, во всех группах мышей ($p<0,005$).

5. На модели спонтанного канцерогенеза у мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu, выявлено, что наибольший уровень экспрессии часовых генов Bmal1, Clock и Cry1 в супрадиазматиическом ядре и печени контрольных животных (мыши FVB/N) наблюдается в середине темного периода (ZT18). У животных с опухолями в супрадиазматиическом ядре и печени такой пик не определяется, а экспрессия часовых генов в данной точке снижена в 2,6 – 14,4 раза ($p<0,05$). В молочной железе мышей FVB/N наивысший уровень экспрессии Clock выявлен в ZT18, Cry1 – в ZT6; у мышей HER2/neu в этих точках экспрессия Clock и Cry1 снижена в 5,8 – 23,2 раза ($p<0,05$). В спонтанных аденокарциномах молочной железы суточных колебаний экспрессии часовых генов и содержания часовых белков не обнаружено. В опухолях молочной железы выявлено повышение содержания белка BMAL1 на 0,07 относительных единиц ($p=0,0002$) и доли CLOCK-позитивных ядер в 2,6 - 6,3 раза ($p<0,0001$).

6. В спонтанных аденокарциномах у мышей FVB/N, трансгенных по HER2/neu, выявлено снижение митотического индекса в 1,38 ($p<0,05$) – 1,93 ($p<0,0001$) раза в середине темного периода по сравнению с другими точками. При этом в кишечнике мышей с опухолями наблюдается потеря суточной динамики митотической активности; у мышей с крупными опухолями в точке ZT0 (пик митотической активности у контрольной группы) число митозов на крипту в тощей кишке снижено на 29,9% по сравнению с контролем ($p<0,0001$).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Губарева Е.А., Майдин М.А., Тындык М.Л., Виноградова И.А., Панченко А.В.** 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 // **Вопросы онкологии. – 2019. – Т.65 – №1. – С.154-158**
2. **Голубев А.Г., Панченко А.В., Губарева Е.А., Киреева Г.С., Анисимов В.Н.** «Часовые гены» и рак молочной железы // **Вопросы онкологии – 2019. – Т. 65, №1, – С. 43-55.**
3. **Панченко А.В., Ланских Г.П., Анисимов В.Н., Янус Г.А., Венина А.Р., Киреева Г.С., Тындык М.Л., Майдин М.А., Губарева Е.А.** Суточный ритм экспрессии часовых генов в нормальных тканях и спонтанных опухолях молочной железы у мышей линии FBV и линии FBV, трансгенной по HER2/neu. // **Материалы IV Петербургского международного онкологического форума "Белые ночи 2018", Санкт-Петербург: Издатель АННОМО, 5-8 июля, 2018 г. - С. 53.**
4. **Губарева Е.А., Полторацкий А.Н., Панченко А.В., Анисимов В.Н.** Суточные ритмы пролиферации в кишечном эпителии и опухолях молочной железы у мышей линии FBV, трансгенных по HER2/neu. // **III Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи 2017», сборник научных работ– Санкт-Петербург, 23-25 июня, 2017 г. – С. 114.**
5. **Andrey V. Panchenko, Ekaterina A. Gubareva and Vladimir N. Anisimov.** Circadian System and Aging in Rodent Models // **Circadian Rhythms and Their Impact on Aging/ Ed. S. Michal Jazwinski, Victoria P. Belancio, Steven M. Hill. Springer International Publishing AG, 2017. 103–128 pp.**
6. **Панченко А.В., Губарева Е.А., Анисимов В.Н.** Роль циркадианных ритмов и «клеточных часов» в старении и развитии онкологических заболеваний // **Успехи геронтологии. – 2016. – Т. 29, № 1. – С. 29-37.**
7. **Панченко А.В., Губарева Е.А., Майдин М.А., Тындык М.Л., Виноградова И.А.** Роль часовых белков в канцерогенезе кожи у мышей SHR в возрасте 14 месяцев при нарушении светового режима // **Вопросы онкологии – 2016. – Т. 62, №5, – С. 666-670.**
8. **Губарева Е.А., Майдин М.А., Егормин П.А., Тындык М.Л., Анисимов В.Н., Панченко А.В.** Влияние постоянного освещения на уровень синтеза часового белка BMAL1 при канцерогенезе кожи у мышей SHR //

Материалы 1-го Российского онкологического научно-образовательного форума с международным участием «Белые Ночи – 2015» 8–10 июня 2015 г. г. Санкт-Петербург – с. 411.

9. Губарева Е.А., Панченко А.В., Майдин М.А., Виноградова И.А. Влияние постоянного освещения и мелатонина на уровень синтеза часового белка Crg1 в опухолях кожи у мышей SHR // Материалы конференции «Молекулярная онкология. Итоги и перспективы. 16-17 декабря 2015 г., г. Москва. С. 12-13
10. Губарева Е.А., Майдин М.А., Панченко А.В. Влияние постоянного освещения на экспрессию часового гена CLOCK в опухолях кожи у мышей SHR. // Сибирский онкологический журнал. Приложение №1. Тезисы Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» 22 мая 2015 г. г. Томск – 2015. - С. 28-29.
11. Панченко А.В., Губарева Е.А., Юрова М.Н., Анисимов В.Н. Экспрессия часового гена BMAL1 при канцерогенезе легких у мышей // Сибирский онкологический журнал. Приложение №1. Тезисы Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященная памяти академика РАМН Н.В. Васильева «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» 24 апреля 2014 г. г. Томск – 2014. - С. 97-98.
12. Губарева Е.А., Юрова М.Н., Панченко А.В. Изменения экспрессии часового гена BMAL1 при канцерогенезе легких в условиях различного светового режима у мышей SHR. // Материалы конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии – 2014» (Санкт-Петербург, 9-10 апреля 2014) / Под ред. Проф. Власова Т.Д. – СПб.: «Арт-Экспресс», 2014. С. 36-37.
13. Панченко А.В., Губарева Е.А. Антиканцерогенные свойства мелатонина в условиях нарушения светового режима // Световой режим, старение и рак. Сборник научных трудов II Российского симпозиума с международным участием (Петрозаводск, 17-19 октября 2013 года) – Киров: МЦНИП, 2013. – С. 245-251.
14. Панченко А.В., Губарева Е.А. Влияние светового режима на канцерогенез легких, индуцированный уретаном у мышей / Сборник

научных трудов 4 Всероссийского симпозиума с международным участием, Екатеринбург, 24-25 апреля 2013, С. 142-144.

15. Губарева Е.А., Панченко А.В. Канцерогенез легких, индуцируемый уретаном у мышей SHR в условиях постоянного освещения // Материалы VIII Всероссийского съезда онкологов, Т.1. Фундаментальная онкология («Петровские чтения»). Санкт-Петербург, 11-13 сентября 2013г. – Вопр. онкол. – 2013. – Т.59, № 3 приложение. – С.55-56

Благодарности

Автор выражает благодарность Анисимову Владимиру Николаевичу за руководство работой, научному коллективу лаборатории канцерогенеза и старения за помощь в планировании и организации исследований. Также автор благодарит сотрудников лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России за предоставленную возможность провести исследование экспрессии часовых генов.