

**КОЗЛОВА**  
**Мария Александровна**

**ВЛИЯНИЕ СВЕТОВОГО РЕЖИМА И ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКО-  
ГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬ-  
НОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ И СТРУКТУРУ ЕЁ  
ЦИРКАДНЫХ РИТМОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

**1.5.22. – Клеточная биология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына»

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук

**Кириллов Юрий Александрович**

**Официальные оппоненты:**

**Доктор медицинских наук, профессор,  
заслуженный деятель науки РФ**

**Кветной Игорь Моисеевич**

Руководитель Центра молекулярной биомедицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский Научно-исследовательский институт Фтизиопульмонологии» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры патологии Медицинского факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет».

**Кандидат медицинских наук**

**Бобков Павел Сергеевич**

Старший научный сотрудник лаборатории биохимической фармакологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины».

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН).

Защита диссертации состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр. д. 71.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12 и на сайте <http://iemsrb.ru/science/diss/diss001-022-02/>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года

Ученый секретарь диссертационного  
совета 24.1.158.01, д.б.н., доцент

**Алешина Галина Матвеевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Для биологических систем всех уровней организации характерна ритмичность процессов функционирования (Рапопорт С. И., Чибисов С. М., 2018; Forger D. V., 2017), которая является одним из фундаментальных свойств живой материи. Для различных биологических систем описаны ритмы с разной периодичностью: от долей секунды до десятков лет. Одними из наиболее значимых видов биоритмов для млекопитающих являются суточные, или циркадные ритмы (ЦР) (Чибисов С. М. с соавт., 2018; McKenna H. et al., 2018; Walker W. H. et al., 2020). Совокупность ЦР биологических процессов в различных системах органов образует строго согласованный ансамбль, представляющий собой хроноструктуру организма. Наличие этой организованной ритмической структуры биологических процессов обеспечивает необходимый порядок их протекания и делает возможным поддержание функционирования систем организма на оптимальном уровне (Eckel-Mahan K., Sassone-Corsi P., 2013; Roenneberg T., Mellow M., 2016; Panda S., 2016; Zimmet P. et al., 2019).

Комплекс ЦР млекопитающих, будучи генетически обусловленным, достаточно пластично модулируется действием периодических факторов внешней и внутренней среды – синхронизаторов, или пейсмейкеров (Foster R. G., Roenneberg T., 2008; Michel S., Meijer J. H., 2020), ведущую роль среди которых играет световой режим. Следующие друг за другом ЦР различных процессов различаются по своим параметрам – амплитуде, фазе. В случаях адекватного протекания процессов адаптации стрессоры не оказывают значительного влияния на циркадные ритмы, при срыве адаптации ритмические процессы организма утрачивают свою правильность, регулярность, а возникающие изменения фазово-амплитудных характеристик ритмов могут привести к возникновению десинхронозов и быть причиной развития некоторых заболеваний (Jasser S. A. et al., 2006; Fonken L. K. et al., 2010; Verlande A., Masri S., 2019; Anisimov V. N., 2019; Leng Y. et al., 2019).

К значимым факторам дезорганизации биоритмов в современном мире относят нарушение режима света-темноты, т. н. световое загрязнение. В силу ряда социальных причин (продолжительное взаимодействие с цифровой техникой, сверхурочная и сменная работа, трансмеридианные перелеты и т. д.) человек подвергается длительному воздействию интенсивного искусственного освещения в темное время суток, что приводит к сдвигу циркадных ритмов организма и развитию десинхроноза (Fárková E. et al., 2019). Уровни светового загрязнения коррелируют с изменениями обмена липидов и углеводов (Aho V. et al., 2016; Poggiogalle E. et al., 2018). Нарушение светового режима может быть одной из предпосылок возникновения метаболического синдрома, сахарного диабета 2 типа, атеросклероза (Mota M. C. et al., 2017; Anisimov V. N., 2019) и развития злокачественных опухолей печени (Masri S., Sassone-Corsi P., 2018; Yalçın M. et al., 2020). Напряженный режим фотопериодики, относящийся к природно-климатическим факторам Севера, нередко сказывается на функционировании желез внутренней секреции (Ульяновская С.

А. с соавт., 2019). Наследственная несостоятельность механизмов адаптации у значительной части людей, приезжающих на Север, не позволяет обеспечить длительное сохранение здоровья в условиях хронического действия экстремальных факторов высоких широт, поэтому симптомы нарушения циркадной ритмичности функций органов и их систем должны быть предметом превентивного этиопатогенетического анализа у людей, длительно пребывающих в другой жизненной среде (Шуркевич Н. П. с соавт., 2017)

Злоупотребление алкоголем является одной из наиболее важных медицинских и социальных проблем современного общества. Органом, наиболее страдающим от алкогольной интоксикации, является печень, которая занимает центральное место в поддержании гомеостаза (Джандарова Т. И, Шабанова С. С., 2016). Динамика алкогольной болезни определяется уровнем базального метаболизма печени, который является генетически детерминированным и носит индивидуальный характер. При систематическом воздействии этанола и его токсичных метаболитов значительно нарушаются структура и функции печени, что, в свою очередь, обычно изменяет метаболизм других органов (Дробленков А.В. с соавт., 2013; Пауков В. С. с соавт., 2018; Rehm J., 2011). Одним из важных эффектов алкоголя является его деструктивное влияние на ЦР, что приводит к повышению восприимчивости органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и печени к вызываемым алкоголем повреждениям, усилению тяжести алкогольной болезни (Keshavarzian A. et al., 1999; Delco F. et al., 2005; Swanson G. et al., 2011; Summa K. C. et al., 2013; Bailey S. M., 2018).

#### **Степень разработанности темы исследования**

К настоящему времени установлено, что большая часть ЦР как печени, так и других органов в отсутствие влияния внешних ритмозадатчиков является автономной. В темноте ритмичность экспрессии часовых генов сохраняется, однако ритмы других генов могут разрушаться (Lamia K. A. et al., 2008; Koronowski K. B. et al., 2019). Доказано, смена света и темноты оказывает влияние на период и амплитуду ЦР, экспрессию генов и согласование ритмов между собой (Li H. et al., 2020).

В гепатоцитах молекулярно-генетическое звено биологических часов, обеспечивающее автономность их ЦР, включает в себя ген *Bmal*, работающий в паре с геном *Clock*, семейство генов *Per* (*Per1*, *Per2*, *Per3*) и гены *Cry* (*Cry1*, *Cry2* – кодирующие белки криптохромы) (Kim P. et al., 2019; Shi D. et al., 2019).

Установлено, что основным водителем циркадных ритмов у млекопитающих являются парные супрахиазматические ядра гипоталамуса (СХЯ). Ритморганизующая функция СХЯ модулируется извне времяздатчиками, главным из которых является свет. Кроме того, регуляцию функционального состояния ритмоводителя в головном мозге и за его пределами осуществляют различные нейромедиаторы и гормоны (Арушанян Э.Б. с соавт., 2016). Ведущая роль во внешней регуляции ЦР печени принадлежит оси гипоталамус-гипофиз-надпочечники и эпифизу (Sinturel F. et al., 2021). Другим времяздатчиком, определяющим структуру ЦР некоторых органов, в том числе и печени, является кормление. В некоторых случаях метабо-

лические процессы выходят из-под контроля СХЯ, тогда прием пищи десинхронизируется с нормальным дневным режимом активности. В этой ситуации доминирующим управляющим фактором становится время приема пищи (время кормления) (Bechtold D.A., 2008; Engin A., 2017; Westerterp-Plantenga M.S., 2020).

В настоящее время достаточно изученным может считаться влияние искусственного освещения в ночное время суток на ЦР. Установлено, что световое загрязнение приводит к возникновению десинхроноза и может явиться причиной развития многих заболеваний, включая алкогольную болезнь (Schmidt C., Bao Y., 2017; Malone S. K. et al., 2019; Tähkämö L. et al., 2019; Leung J. M., Martinez M.E., 2020; Rajput S. et al., 2021).

В 1981 г. И. Н. Пятницкой было высказано предположение о том, что часть клинических и морфологических проявлений алкогольной болезни, связываемых, как правило, с хронической интоксикацией, может оказаться следствием перестройки ЦР, то есть длительного десинхроноза (Пятницкая И. Н., Иванов В.И., 1981). Ведущая роль расстройств синхронизации ЦР при алкоголизме подтверждена многими авторами (Паначев И.В. с соавт., 2015; Rosenwasser A.M., 2015; Davis B.T. 4<sup>th</sup> et al., 2017; Davis B.T. 4<sup>th</sup> et al., 2018).

Нарушения циркадных ритмов, вызванные употреблением алкоголя, имеют решающее значение для повышения восприимчивости органов ЖКТ и печени к вызываемым алкоголем повреждениям и играют определяющую роль в тяжести алкогольной патологии (Keshavarzian A. et al., 1999; Delco F. et al., 2005; Swanson G. et al., 2011; Summa K. C. et al., 2013; Bailey S. M., 2018). Данные, полученные Forsyth C.B. et al., (2013), Swanson G.R. et al. (2016), указывают на то, что у нокаутных по *Clock* и *Per2* мышей по сравнению с контролем гораздо быстрее развиваются индуцированные алкоголем стеатоз, фиброз и цирроз печени. В свою очередь, тканевые реакции, определяющие специфику алкогольного поражения печени (An L. et al., 2012; Kawaratani H. et al., 2013), также могут нарушать нормальное функционирование циркадных генов (Haas S., Straub R.H., 2012; Lopez M. et al., 2014).

Однако в доступной литературе не описано эффектов совместного влияния хронической алкогольной интоксикации (ХАИ) и постоянного освещения как на структуру, так и на ЦР печени, хотя оба этих фактора являются хронодеструктивными и влияющими на морфофункциональный гомеостаз печени.

**Цель работы** – исследование влияния хронической алкогольной интоксикации, постоянного освещения и их совместного действия на морфофункциональное состояние и циркадные ритмы печени в эксперименте.

#### **Задачи исследования.**

1. Изучить влияние постоянного освещения, хронической алкогольной интоксикации и совместного действия этих факторов на морфофункциональное состояние печени.

2. Исследовать особенности суточной динамики микроморфометрических параметров гепатоцитов в норме, при хронической алкогольной интоксикации, постоянном освещении и их комбинированном действии.

3. Установить влияние хронической алкогольной интоксикации, постоянного освещения и их сочетанного действия на характер и особенности суточной ритмичности экспрессии генов *Bmal1*, *Per2*, *p53*, *Ki-67* и *Adh5*.

4. Исследовать особенности воздействия хронической алкогольной интоксикации, постоянного освещения и их совместного влияния на биохимические и гематологические параметры организма крыс, характеризующие морфофункциональное состояние печени, и на их суточную динамику.

### **Научная новизна**

Впервые описано влияние хронической алкогольной интоксикации, постоянного освещения и совместного действия этих факторов на комплекс микроморфометрических параметров гепатоцитов. Показано, что 21-дневное воздействие постоянного освещения приводит к развитию жировой дистрофии печени, тот же фактор в сочетании с ХАИ вызывает развитие гепатита.

Впервые изучены реактивные функциональные изменения гепатоцитов при совместном действии ХАИ и постоянного освещения, а также картина изменений биохимических и гематологических показателей, характеризующих состояние печени.

Впервые показано влияние ХАИ и постоянного освещения на характер экспрессии *Bmal1*, *Per2*, *p53*, *Ki-67* и *Adh5*. Установлено хронодеструктивное влияние постоянного освещения и ХАИ при постоянном освещении на циркадную ритмику некоторых морфологических, биохимических и гематологических показателей, характеризующих морфофункциональное состояние печени крыс. Выявлен характер ЦР экспрессии генов *Bmal1*, *Per2*, *p53*, *Ki-67* и *Adh5* при ХАИ, постоянном освещении и сочетании этих факторов.

Впервые доказано, что 21-дневная ХАИ в условиях постоянного освещения вызывает наиболее неблагоприятные морфофункциональные изменения в печени млекопитающих, разрушение циркадной ритмичности большинства изученных параметров, а ее хронодеструктивный эффект более выражен, чем при отдельном действии ХАИ и постоянного освещения на организм млекопитающего.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные результаты углубляют и дополняют представления о влиянии алкогольной интоксикации и нарушения режима освещения на функционирование и адаптацию печени млекопитающих. Результаты исследования свидетельствуют о возникновении стойких изменений морфофункционального состояния и хроноструктуры органа, снижающих адаптационный потенциал органа.

Полученные данные показывают взаимосвязь морфологических проявлений дезадаптации с нарушением циркадной ритмики организма, разрушением и рассогласованием некоторых ЦР, что приводит к нарушению интеграции биологических

процессов в организме. Полученные результаты могут быть использованы в хронодиагностике и хронотерапии заболеваний печени.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. Постоянное освещение вызывает нарушение морфофункциональной целостности печени, проявляющееся в развитии жировой дистрофии органа, изменении комплекса микроморфометрических показателей органа, отклонениях от нормы исследованных биохимических и гематологических показателей.

2. Постоянное освещение и хроническая алкогольная интоксикация вызывают нарушение и поломку ряда циркадных ритмов исследованных параметров.

3. Совместное действие постоянного освещения и хронической алкогольной интоксикации приводит к более выраженному, чем при отдельном действии этих факторов, нарушению морфофункциональной целостности печени, изменению комплекса микроморфометрических показателей органа, изменению уровня исследованных биохимических и гематологических показателей.

4. Совместное влияние постоянного освещения и хронической алкогольной интоксикации приводит к более значительному, чем при их отдельном действии, хронодеструктивному эффекту относительно печени, проявляющемуся в разрушении большинства из исследованных циркадных ритмов.

**Методология исследования заключается** в системном комплексном анализе российской и зарубежной научной литературы в области изучения влияния ХАИ и нарушений светового режима на строение и функции печени, структуру циркадных ритмов морфологических и функциональных параметров, отражающих морфофункциональное состояние печени. В работе использованы следующие методы исследования: морфологические (гистологические, гистохимические, иммуногистохимические, световая и электронная микроскопия), микроморфометрические, методы статистической обработки данных.

**Личный вклад соискателя** заключается в планировании и проведении экспериментов, статистической обработке данных, обобщении и анализе полученных результатов, подготовке публикаций.

**Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.22. Клеточная биология.**

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов обоснована достаточным количеством экспериментальных групп и объемом данных для каждой из них. В работе использованы современные и корректные морфологические, биохимические, гематологические методы, а также методы статистического анализа данных.

**Апробация результатов исследования**

Материалы диссертации доложены на Международной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии», Москва, 2020; Международной конференции «Chronobiology in medicine and sport», Москва, 2020; 32<sup>nd</sup> European congress of Pathology (Глазго, Великобритания); 33<sup>rd</sup> European congress of Pathology, 2021 (Гётеборг, Швеция, 2021); Всероссийской Научной Конференции с

международным участием, посвященной памятной дате института (60-Летию НИИ Морфологии человека имени академика А.П. Авцына), Москва, 2021; VI Всероссийской научно-практической конференции «Современные подходы к морфологической диагностике новообразований человека», Челябинск, 2021.

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 16 работ, из них 3 статьи в журналах, входящих в Перечень ВАК РФ рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук и ученой степени доктора наук, 12 в журналах, индексируемых WoS и Scopus, а также 2 материала конференций.

### **Структура и объем диссертации.**

Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы (293 работы, в т.ч. 61 отечественная и 232 зарубежных). Диссертация содержит 78 рисунков и 6 таблиц.

### **Внедрение результатов работы.**

Основные результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры биохимии, молекулярной биологии и медицины медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет», в научно-практическую деятельность Центра скрининга и доклинических исследований ФГБНУ «Институт проблем химической физики Российской академии наук» и в практическую деятельность ООО «Таргет-инжиниринг».

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Работа выполнена на 160 самцах крыс аутбредного стока Вистар в возрасте 6 месяцев, с массой тела 350 г, Животные были получены из питомника ФГБНУ НЦБМТ ФМБА России «Столбовая». Содержание животных и эксперименты осуществляли в соответствии Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в других научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). Работа выполнена на базах лаборатории патологии клетки ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» и лаборатории экспериментальной биологии и биотехнологии НОЦ Московского государственного областного университета в г. Черноголовка. На проведение исследования получено одобрение Комиссии по биоэтике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» (Москва), протокол №27(3).

Крысы были разделены на 4 равные группы.



Контрольную группу (n=40) содержали в стандартных лабораторных условиях при фиксированном световом режиме (свет:темнота/10:14 часов с включением света в 8:00 и выключением в 18:00).

I группу (n=40) содержали в тех же условиях, что и контроль, но животные получали в качестве питья 15-% водный раствор этанола *ad libitum*.

II группу (n=40) содержали в стандартных лабораторных условиях при постоянном освещении.

III группу (n=40) содержали в стандартных лабораторных условиях, но также при постоянном освещении; животные получали в качестве питья 15-% водный раствор этанола *ad libitum*.

Эвтаназию осуществляли спустя три недели после начала эксперимента в углекислотной камере. Предварительно у животных осуществляли измерение ректальной температуры. После умерщвления проводили забор крови для гематологических и биохимических исследований и эвисцерацию. Массу животных определяли в начале исследования, а затем на каждой неделе эксперимента. После извлечения печени взвешивали, затем вычисляли относительную массу органа.

Печень фиксировали в 10-% нейтральном забуференном формалине с дальнейшей проводкой по традиционной методике и приготовлением серийных гистологических срезов толщиной 5-6 мкм. Осуществляли окраску срезов гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван Гизону-Фуше. Для идентификации жировой дистрофии и содержания липидов проводили стандартную селективную окраску замороженных срезов раствором судана-III в 70-% этиловом спирте, для определения содержания гликогена проводили ШИК-реакцию, в дальнейшем производили количественную оценку содержания гистохимически выявляемых соединений. Для плоидометрии проводили окраску мазков отпечатков печени фуксинсернистой кислотой по Фельгену. Среднюю плоидность гепатоцитов рассчитывали в единицах плоидности относительно оптической плотности результатов окраски диплоидных ядер малых лимфоцитов (Делоне Г. В. с соавт., 1987; Безбородкина Н.Н., 2006). Также определяли долю двуядерных гепатоцитов (Автандилов Г.Г., 2006).

Микроскопию гистологических препаратов проводили на цифровом микроскопе Nikon Eclipse 80I с применением цифровой фотокамеры Nikon DI-FI (Япония). С каждого исследованного препарата выполняли по 10 цифровых снимков случайно выбранных полей зрения при увеличении  $\times 400$ ,  $\times 1000$ , на которых в дальнейшем осуществляли кардио- и цитометрию. При морфометрических исследованиях использовали программный комплекс Fiji, построенный на базе программы ImageJ v2 с соответствующими плагинами (Broeke J. et al., 2015). Определяли площадь поперечного сечения ядра (площадь ядра), короткий и длинный диаметры ядра, периметр ядра, площадь поперечного сечения клетки, короткий и длинный диаметры клетки. С применением соответствующих формул вычисляли: ядерно-цитоплазматическое отношение, средний диаметр ядра, объем ядра, объем клеток, индекс удлинённости ядра, коэффициент формы ядра, индекс контура ядра, площадь поперечного сечения ядра.

Для проведения электронно-микроскопического исследования образцы печени объемом 2 мм<sup>3</sup> фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере (pH 7,4), дофиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия (OsO<sub>4</sub>), обезвоживали в этаноле по общепринятой схеме, в процессе обезвоживания контрастировали 1% уранилацетатом на 70% этаноле и проводили заливку в смесь эпон–аралдит по стандартной методике. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-III (LKB Produkter, Швеция), срезы дополнительно контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу и просматривали в просвечивающем электронном микроскопе Libra 120 (Zeiss, Германия). В ходе трансмиссионной электронной микроскопии оценивали форму ядра гепатоцита и его органелл (митохондрий, рибосом), выявляли наличие липидных вакуолей.

Для проведения иммуногистохимических реакций срезы печени депарафинировали, регидратировали и обрабатывали 3% раствором перекиси водорода для блокировки эндогенной пероксидазы. Затем срезы помещали в раствор «Ultra V Block» (Thermo Fisher Scientific; USA), для демаскировки антигенов предварительно производили кипячение в цитратном буфере (pH 6.0). Проводили иммуногистохимические реакции с первичными антителами. Использовались следующие антитела: *Ki-67*, *Per2*, *Bmal1*, *p53*, *Adh5* (Cloud-Clone Corp. США). Срезы инкубировали с антителами в течение 60 мин при комнатной температуре. В качестве системы детекции использовали набор UltraVision Quanto Detection System (Thermo Fisher Scientific; США).

Контролем служили реакции с заменой первых антител на раствор фосфатного буфера. О результатах иммуногистохимической реакции судили по доле окрашенных клеток относительно общего количества гепатоцитов. Оценку проводили в 4 полях зрения при увеличении  $\times 400$ . На препаратах подсчитывали клетки, окрашенные с помощью соответствующих антител, затем вычисляли соответствующий индекс как отношение окрашенных клеток к общему числу клеток в процентах (%).

В плазме крови с помощью анализатора StatFax-3300 (США) с соответствующими наборами «Spinreact» (Испания) определяли уровни исследуемых параметров: общий белок, альбумин, аланинаминотрансфераза (АЛТ), аспаратамино-трансфераза (АСТ), билирубин прямой, билирубин общий, глюкоза.

Образцы периферической крови собирали в пробирки с ЭДТА. В образцах крови отобранные гематологические показатели измеряли с помощью анализатора Abacus junior VET (Diatron, Австрия). Исследовали количество эритроцитов (RBC), гематокрит (HCT), гемоглобин (HGB), средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах (MCHC), широта распределения популяции эритроцитов (RDWc). Протромбиновое время определяли при помощи коагулометра TS4000Plus (HTI, США). Ректальную температуру измеряли термометром BIO-TK8851 (Bioseb, США).

Построение графиков и статистическую обработку результатов выполняли в программе GraphPad Prism v8.41 (США). Для выявления нормальности распределения использовали тест Д'Агостино-Пирсона. При нормальном распределении использовали t-тест Стьюдента для сравнения двух групп и тест Тьюки для сравнения трёх и более групп. Различия групп исследования с контрольной оценивали с помощью теста Даннета. При ненормальном распределении использовали тест Манна-Уитни для сравнения двух групп и тест Данна для сравнения трёх и более групп. Статистически значимыми считали различия при уровне статистической значимости ( $\alpha$ ) или вероятности ошибки отклонения от нулевой гипотезы или ниже 5% ( $p < 0,05$ ). При построении графиков изображали арифметическое среднее и стандартное отклонение. Силу различий обозначали: «\*» соответствует  $p < 0,05$ ; «\*\*» –  $p < 0,005$ ; «\*\*\*» –  $p < 0,0005$ .

Для статистического расчета амплитуды и акрофазы циркадных ритмов выполняли косинор-анализ, являющийся международным, общепризнанным методом унифицированного исследования биологических ритмов, с использованием программы CosinorEllipse2006-1.1. Косинор-анализ предназначен для анализа волновых процессов и обработки хронобиологических данных. При проведении анализа экспериментальные данные аппроксимируются методом наименьших квадратов синусоидой. Определяли наличие достоверного циркадного ритма, а также его акрофазу ( $\Phi$ ), то есть время наступления максимума функции, и амплитуду синусоиды ( $A$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### **Влияние постоянного освещения и ХАИ на морфологию печени и среднесуточную величину исследованных морфофункциональных параметров.**

Нами установлено, что трехнедельная ХАИ вызывала возникновение жировой дистрофии в печени в условиях фиксированного светового режима, аналогичная картина отмечена и у животных, находившихся в условиях постоянного освещения. В то же время совместное влияние двух факторов – постоянного освещения и хронической алкогольной интоксикации – в течение 3 недель привело к значительным изменениям в морфофункциональном состоянии печени, в частности, проявившимся в развитии гепатита у половины экспериментальных животных. Выявили также накопление липидов в гепатоцитах крыс всех экспериментальных групп (Рис.1).

В гепатоцитах крыс III экспериментальной группы при электронномикроскопическом исследовании обнаруживается наличие пикнотичных ядер. Количество липидных вакуолей в клетках этой группы значительно выше, чем в других. (Рис. 2).

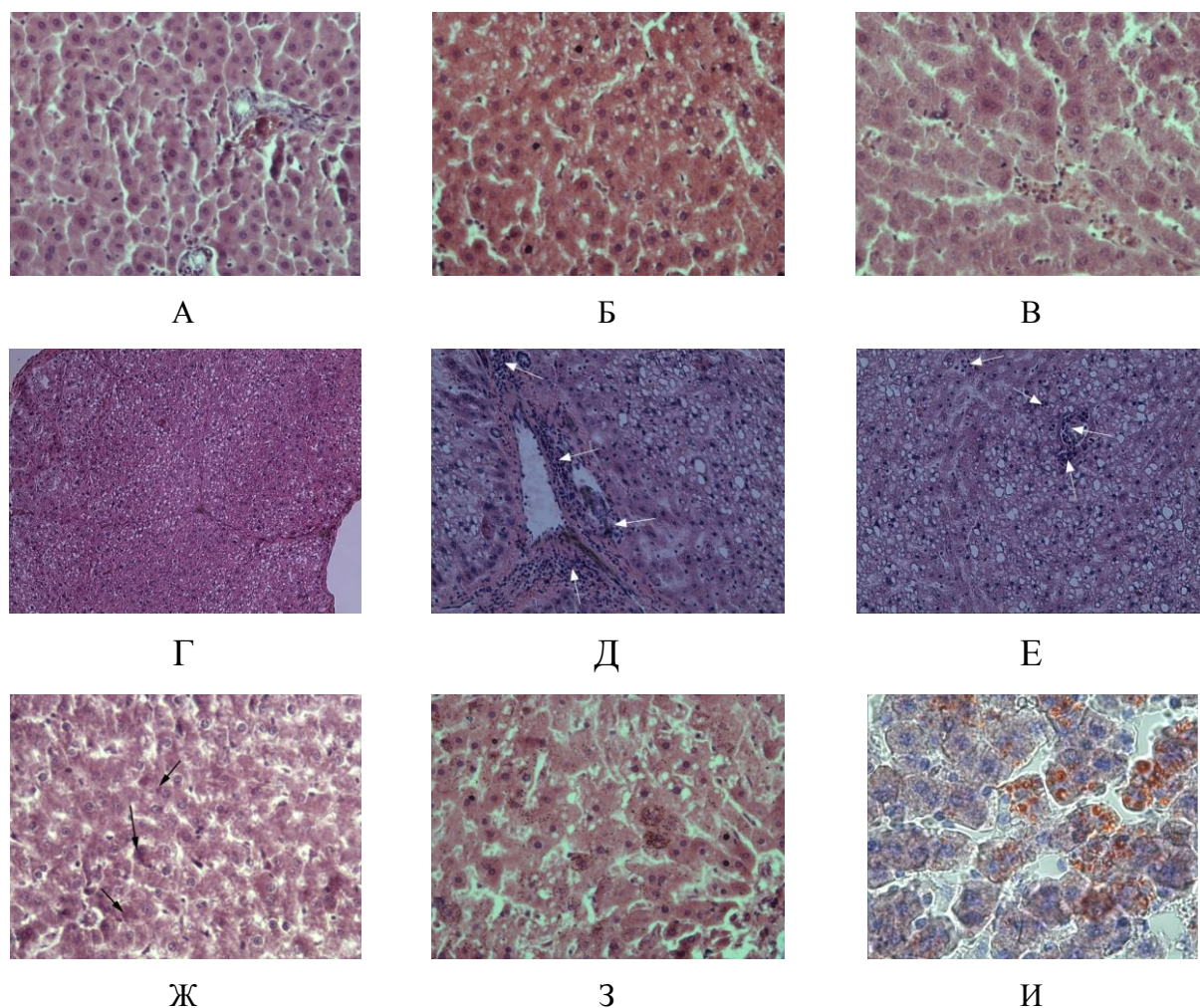


Рис. 1. Печень крыс: А – контрольной группы; Б – I экспериментальной группы; В – II экспериментальной группы; Г, Д, Е – III экспериментальной группы, стрелками указаны скопления воспалительного инфильтрата; Ж – печень крыс III экспериментальной группы, стрелками обозначены тельца Мэллори-Денка; З – скопления липофусцина в гепатоцитах крыс III экспериментальной группы. Окраска гематоксилином и эозином. И – липидосодержащие вакуоли в клетках печени животных III экспериментальной группы. Окраска суданом-III с докраской гематоксилином,  $\times 1000$ . А, Б, В, Д, Е, Ж, З  $\times 400$ , Г  $\times 200$ .

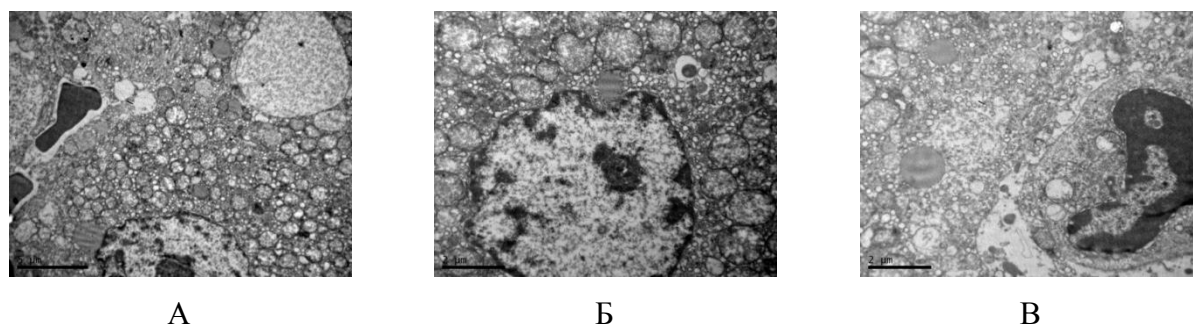


Рис. 2. Ультраструктура гепатоцитов III экспериментальной группы, ТЭМ, А –  $\times 8000$ , Б, В –  $\times 14000$ .

Установлено, что хроническая алкогольная интоксикация не вызвала изменений исследованных микроморфометрических параметров гепатоцитов. В то же

время в гепатоцитах крыс второй группы увеличилось отношение объема ядра к его площади, возросли его короткий и средний диаметры, снизился индекс удлиненности. При том увеличились как площадь поперечного сечения клетки, так и ее объем, и снизилось ЯЦО. Также произошло снижение средней плоидности гепатоцитов этой группы, и уменьшилась доля двуядерных клеток. В печени крыс третьей группы отмечено снижение линейных размеров ядер гепатоцитов, а также V/A-отношения при росте коэффициента формы ядра, снижении индекса контура и ЯЦО (Табл 1.).

Таблица 1. Результаты микроморфометрических исследований гепатоцитов крыс.

	Контроль	I группа	II группа	III группа
Площадь поперечного сечения ядра, мкм <sup>2</sup>	41,79±8,13	42,65±4,80	42,72±5,63	35,50±3,01***
Объем ядра, мкм <sup>3</sup>	205,90±59,54	210,51±35,39	211,30±41,67	159,59±20,23***
Отношение объема ядра к площади ядра (V/A коэффициент)	4,84±0,47	4,90±0,27	4,90±0,32***	4,48±0,19**
Периметр ядра, мкм	14,96±4,78	15,34±4,78	15,11±3,39	9,59±2,49***
Длинный диаметр ядра, мкм	7,98±0,58	8,04±0,50	8,26±0,55	7,78±0,52
Короткий диаметр ядра, мкм	6,52±0,51	6,63±0,58	7,29±0,61***	6,56±0,38
Средний диаметр ядра, мкм	7,25±0,91	7,34±0,89	7,77±0,75**	7,17±0,76
Индекс удлиненности ядра	1,23±0,06	1,22±0,08	1,14±0,05***	1,19±0,07
Коэффициент формы	2,35±0,11	2,28±0,15	2,35±0,11	4,85±0,17*
Индекс контура	2,31±0,10	2,35±0,13	2,31±0,11	1,61±0,18**
Площадь поперечного сечения клетки, мкм <sup>2</sup>	185,80±31,95	190,10±34,03	261,90±55,30***	184,80±21,67
Объем клетки, мкм <sup>3</sup>	1926,01±486,21	1994,02±510,02	3317,21±818,81***	1898,25±326,85
ЯЦО	0,230±0,056	0,233±0,055	0,162±0,022***	0,194±0,018***
Плоидность гепатоцитов, n	4,47±2,12n	5,02±2,18n	4,04±2,16n*	5,18±2,14n
Доля двуядерных гепатоцитов, %	7,44±2,66	8,92±3,60	4,73±2,03**	6,51±2,56

Примечание: здесь и далее \*(P≤0,05); \*\*(P≤0,005); \*\*\*(P≤0,0005) – в сравнении показателями животных контрольной группы.

Анализ содержания липидов в гепатоцитах позволил установить достоверное повышение уровня этих метаболитов относительно контроля в клетках крыс всех экспериментальных групп. В то же время содержание гликогена в клетках паренхимы печени достоверно уменьшилось относительно контроля только в печени крыс второй группы.

Результаты иммуногистохимических исследований свидетельствуют о значительном увеличении экспрессии *Ki-67* – маркера пролиферации – в гепатоцитах крыс третьей группы. Также отмечены усиление экспрессии *p53* в гепатоцитах крыс всех экспериментальных групп и снижение экспрессии *Bmall* и увеличение экспрессии его антагониста *Per2*. Экспрессия *Adh5* была выше в гепатоцитах крыс групп, потреблявших этанол (Рис.3).

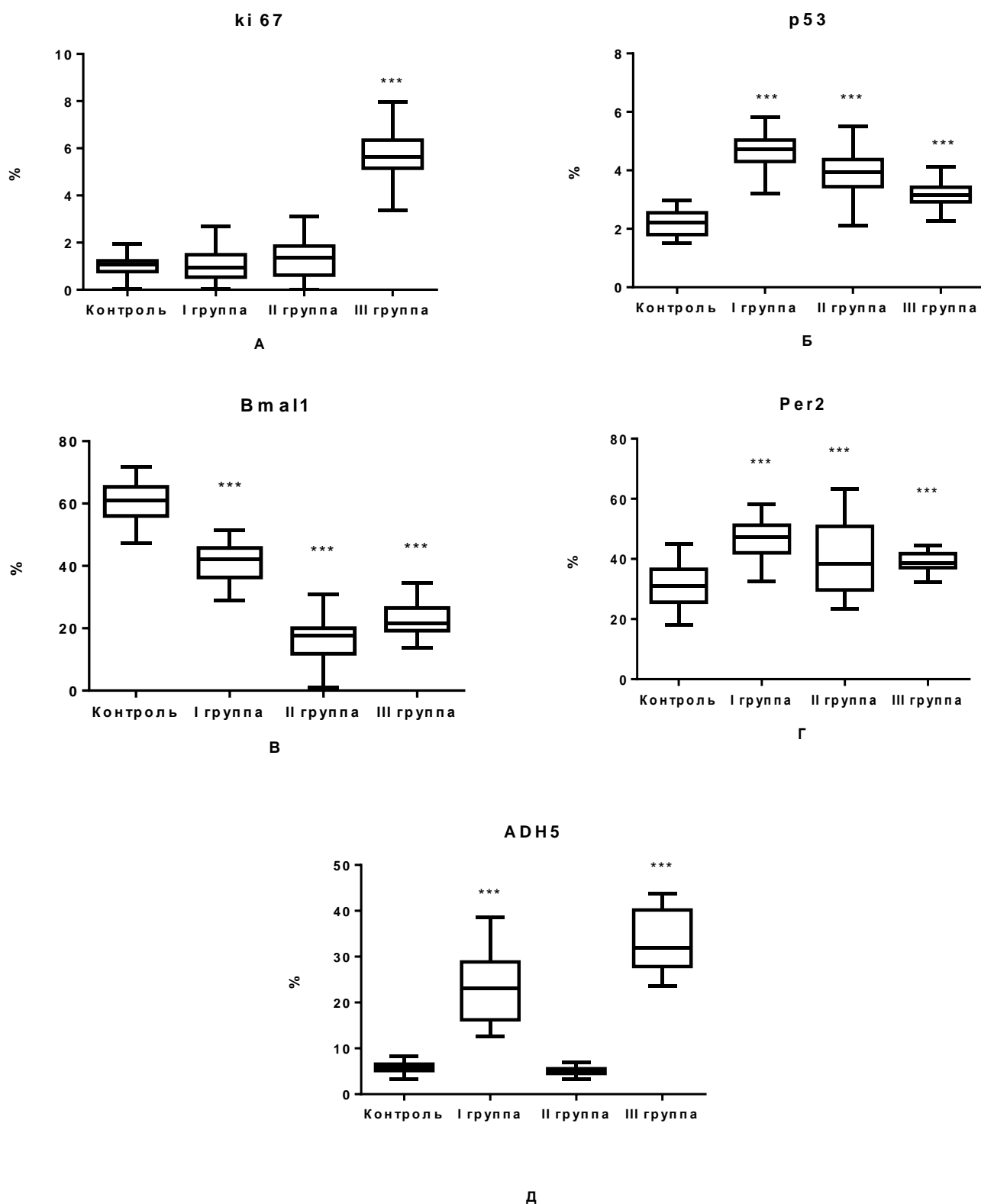


Рис. 3. Экспрессия: А – *Ki-67*, Б – *p53*, В – *Bmal1*, Г – *Per2*, Д – *Adh5* в гепатоцитах крыс контрольной и экспериментальных групп.

Анализ содержания глюкозы в плазме крови позволил установить, что у животных первой и второй группы его уровень увеличился от  $7,10 \pm 1,51$  ммоль/л в контроле до  $9,11 \pm 2,88$  ммоль/л и  $8,26 \pm 1,35$  ммоль/л соответственно, при этом у жи-

вотных третьей группы содержание глюкозы значительно меньше –  $5,70 \pm 1,40$  ммоль/л.

Активность АЛТ была практически неизменной в I и III экспериментальных группах, составляя  $60,12 \pm 9,93$  ед/л и  $52,81 \pm 10,0$  ед/л соответственно против  $60,16 \pm 11,37$  ед/л в контроле. В крови крыс второй группы активность АЛТ увеличилась до  $80,10 \pm 10,50$  ед/л, что выше, чем во всех других группах. Активность АСТ в контроле составила  $125,2 \pm 27,90$  ед/л, во второй и третьей экспериментальной группе она достоверно увеличилась до  $151,80 \pm 32,99$  ед/л и  $153,1 \pm 24,06$  ед/л соответственно.

Содержание общего белка в сыворотке крови контрольных животных составило  $68,55 \pm 8,19$  г/л, в то же время его уровень в крови крыс экспериментальных групп оказался ниже:  $59,71 \pm 8,52$  г/л в первой,  $60,87 \pm 8,22$  г/л во второй и  $61,96 \pm 6,68$  г/л в третьей группе. Содержание альбумина снизилось достоверно только во второй группе, составив  $29,17 \pm 5,91$  г/л против  $34,44 \pm 8,80$  г/л в контроле.

При анализе содержания прямого билирубина не было отмечено достоверных отличий от уровня контроля –  $10,64 \pm 3,33$  мкмоль/л. Уровень общего билирубина существенно увеличился в крови животных первой и третьей групп, достигнув  $30,15 \pm 9,50$  и  $28,7 \pm 5,82$  мкмоль/л против  $21,12 \pm 9,16$  мкмоль/л в контроле.

При анализе результатов гематологических исследований установлено, что хроническая алкогольная интоксикация в сочетании с постоянным освещением привела к снижению гематокрита с  $55,28 \pm 2,09\%$  до  $51,54 \pm 5,02\%$ . Во всех других группах животных этот показатель не отличался от контроля. При этом количество эритроцитов достоверно снизилось относительно контроля ( $11,01 \pm 0,52 \cdot 10^9$ /л) во всех экспериментальных группах, составляя  $10,60 \pm 0,48 \times 10^9$ /л в первой,  $10,42 \pm 0,41 \times 10^9$ /л во второй и  $10,14 \pm 0,50 \times 10^9$ /л в третьей группе.

Аналогичным образом произошло снижение содержания гемоглобина в крови от  $173,1 \pm 6,80$  г/л в контроле до  $166,2 \pm 7,6$  г/л,  $164,7 \pm 11,26$  г/л и  $166,0 \pm 6,85$  г/л в первой, второй и третьей экспериментальной группе соответственно. При этом МСН повысился только в III экспериментальной группе, составляя  $16,50 \pm 1,27$  пг против  $15,76 \pm 0,44$  пг в контроле. Величина МСНС у животных экспериментальных групп не изменилась относительно контроля.

Величина MCV в крови крыс экспериментальных групп не отличалась от показателей контроля, составивших  $50,31 \pm 1,47$  фл. Уровень RDWc, составляя в контроле  $15,21 \pm 0,68\%$ , оказался достоверно выше в эксперименте, составив в первой группе  $16,04 \pm 0,80\%$ ,  $16,68 \pm 1,1\%$  во второй и  $17,11 \pm 1,93\%$  в третьей.

Аналогичным образом протромбиновое время увеличилось от  $23,59 \pm 9,1$  сек в контроле до  $40,33 \pm 6,5$  сек во второй группе и  $32,96 \pm 4,25$  сек в третьей.

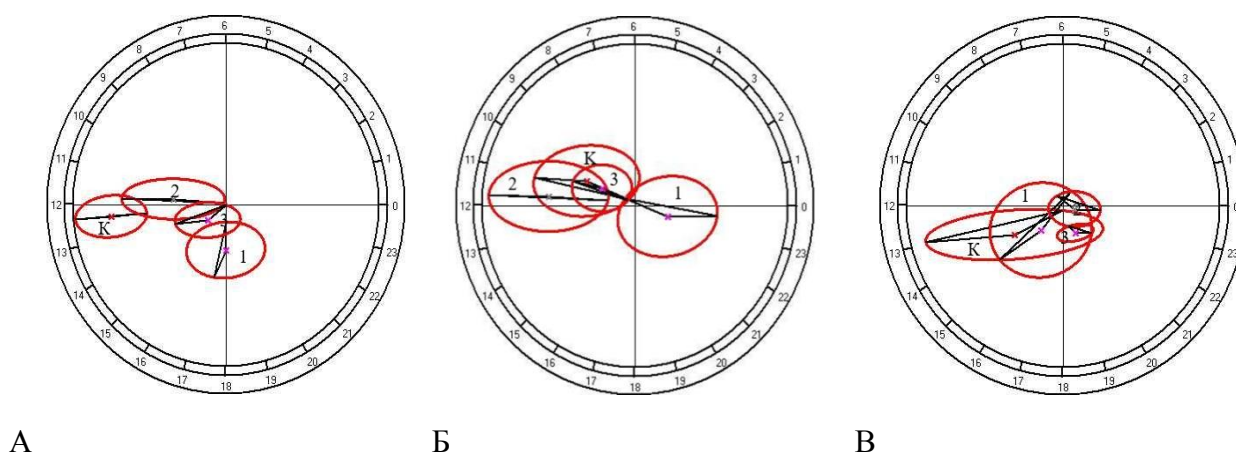
### **Влияние постоянного освещения и ХАИ на организацию циркадных ритмов печени**

Для всех исследованных параметров, характеризующих морфофункциональное состояние печени, в контроле обнаружены циркадные ритмы, которые перестроились или разрушились у животных экспериментальных групп (Табл. 2).

ХАИ как при фиксированном световом режиме, так и при постоянном освещении вызвала разрушение ЦР температуры, в то время как постоянное освещение – лишь перестройку ЦР этого параметра. Поскольку ритм температуры тела является универсальным показателем циркадной системы млекопитающих, то разрушение ритма свидетельствует о развитии выраженного десинхроноза в группах ХАИ и существенной перестройке структуры суточных биоритмов у животных второй экспериментальной группы.

При анализе суточного ритма микроморфометрических параметров нами установлено, что поломка ЦР площади ядра отмечена только в гепатоцитах крыс третьей группы, ритмичность изменения размеров гепатоцитов нарушена у животных первой экспериментальной группы, а ЦР ЯЦО разрушен в гепатоцитах второй и третьей групп (Рис. 4).

ЦР *p53* и *Ki-67* отмечены только в контроле и у животных I группы, хоть и в перестроенном виде. Таким образом, в разрушении этих ЦР ведущая роль принадлежит постоянному освещению. В то же время ЦР часовых генов обнаружены в контроле и II экспериментальной группе, что вызвано ведущей ролью этанола в деструкции ритмов.



А Б В  
Рис. 4. Результаты косинор-анализа суточной динамики площади ядер гепатоцитов (А), площади гепатоцитов (Б), ЯЦО гепатоцитов (В). Примечание: здесь и далее: К – контроль, 1 – первая экспериментальная группа, 2 – вторая экспериментальная группа, 3 – третья экспериментальная группа.

Ритм *Adh5* разрушился только во второй группе. Видимо, нарушение режима освещения вызывает его поломку, а наличие ЦР у крыс первой и третьей экспериментальных групп вызвано тем, что времязадатчиком здесь выступает не свет, а время употребления этанола.

У крыс I группы сохранился ЦР содержания липидов в печени, но у всех животных разрушен ЦР содержания гликогена в гепатоцитах, что, по всей видимости, связано со значительными нарушениями ритма обмена углеводов, а именно гликогенеза, т.к. у животных всех исследованных групп сохранился ЦР глюкозы крови, при этом амплитудно-фазовые характеристики его у животных экспериментальных групп отличаются от контроля в незначительной степени.



Разрушение ритма гликогена коррелирует с данными, полученными при исследовании влияния этанола на ритмичность гликогена, и объясняется рассогласованием ритмов нескольких процессов, участвующих в гликогенезе. Нарушение ритмичности липидов при постоянном освещении вызывается ранее описанными повышением количества потребляемой пищи и изменением обмена липидов и углеводов, а также рассогласованием гормональных сигналов, регулирующих обмен веществ.

Нами установлено, что циркадная ритмичность АСТ оказалась более устойчивой к действию исследованных факторов, нарушившись только у крыс III группы, в то время как ЦР АЛТ отсутствует у крыс всех экспериментальных групп.

Таблица 2. Влияние постоянного освещения и ХАИ на организацию циркадных ритмов печени

	I группа	II группа	III группа		I группа	II группа	III группа
<b>Биохимические параметры</b>				<b>Гематологические параметры</b>			
Глюкоза	Зеленый	Зеленый	Зеленый	HCT	Зеленый	Зеленый	Красный
АЛТ	Зеленый	Красный	Красный	RBC	Зеленый	Зеленый	Зеленый
АСТ	Зеленый	Зеленый	Красный	HGB	Зеленый	Зеленый	Зеленый
Общий белок	Зеленый	Зеленый	Красный	MCV	Красный	Зеленый	Красный
Альбумин	Зеленый	Зеленый	Красный	MCH	Красный	Зеленый	Красный
Билирубин общий	Красный	Красный	Красный	MCHC	Зеленый	Зеленый	Красный
Билирубин прямой	Красный	Красный	Красный	RDWc	Красный	Зеленый	Красный
				ПТ	Красный	Красный	Красный
<b>Иммуногистохимические параметры</b>							
	I группа	II группа	III группа				
<i>Ki67, %</i>	Зеленый	Красный	Красный				
<i>p53, %</i>	Зеленый	Красный	Красный				
<i>Bmal1, %</i>	Красный	Зеленый	Красный				
<i>Per2, %</i>	Красный	Зеленый	Красный				
<i>Adh5, %</i>	Зеленый	Красный	Зеленый				
<b>Гистохимические параметры</b>							
	I группа	II группа	III группа				
Гликоген	Красный	Красный	Красный				
Липиды	Зеленый	Красный	Красный				

Примечание: зеленым цветом обозначены параметры, ЦР которых перестроились при действии ХАИ и постоянного освещения, красным – параметры, ЦР которых разрушились в тех же условиях.

Примечательно, что как ЦР общего белка плазмы, так и ЦР альбумина, перестраиваясь у животных первой и второй экспериментальной группы, разрушились

у третьей, что свидетельствует, с одной стороны, об устойчивости этих ритмов к воздействию внешних десинхронизаторов, а с другой – о сильном хронодеструктивном действии сочетания этанола и постоянного освещения.

Наименее устойчивыми к действию исследованных хронодеструкторов оказались ЦР общего и прямого билирубина, которые разрушились во всех экспериментальных группах.

При рассмотрении ритмов исследованных гематологических параметров нами установлено, что ЦР количества эритроцитов и гемоглобина в крови сохранились, хотя и претерпели изменения фазово-амплитудных характеристик. В большей степени эти изменения проявились в крови крыс III группы.

Циркадные ритмы гематокрита и МСНС обнаружены в крови крыс всех групп, кроме III. В свою очередь, циркадные ритмы MCV, MCH и RDWc обнаружены только в крови крыс контрольной и второй группы, что свидетельствует о ведущей роли этанола в разрушении этих ритмов. ЦР протромбинового времени также обнаружен только в крови крыс контрольной группы.

Хроническая алкогольная интоксикация вызывала разрушение 13, постоянное освещение – 9, а совместное действие этих факторов – 20 из 26 исследованных ритмов.

### Заключение

Проведенное исследование позволило установить особенности влияния каждого из исследованных хронодеструкторов на морфофункциональный гомеостаз печени белых крыс.

В частности, даже непродолжительное постоянное воздействие этанола на печень вызывает изменения как в величине ряда важных показателей, отражающих измененные функциональные возможности гепатоцитов, так и в ансамбле исследованных ЦР. Так, печень этих животных к концу исследования, при неизменных микроморфометрических показателях гепатоцитов, характеризовалась развитием стеатоза (в клетках отмечается рост содержания липидов), изменилась интенсивность экспрессии исследованных часовых генов. Увеличение экспрессии *p53*, общее для всех экспериментальных групп, свидетельствует об интенсификации апоптоза. Отмечены изменения биохимических и гематологических параметров, говорящие о нарушении обменных функций органа.

В то же время нами установлено, что из 26 исследованных ЦР у животных этой группы разрушилось 13, а сохранившиеся претерпевают существенную перестройку.

Под влиянием постоянного освещения в печени крыс также развивается жировая дистрофия, снижается плоидность гепатоцитов; кроме того, постоянное освещение в течение трех недель, в отличие от ХАИ той же продолжительности, вызывало изменение микроморфометрических показателей гепатоцитов. В то же время темновая депривация так же, как и ХАИ, вызвала существенные изменения исследованных биохимических и гематологических параметров. Однако у живот-

ных этой группы разрушенными оказались 9 ЦР из 26 исследованных, при этом перестройка ЦР температуры свидетельствует в пользу, по крайней мере, частичной успешной адаптации к новым условиям среды.

Совместное действие ХАИ и постоянного освещения привело к наиболее сильным изменениям морфофункционального состояния исследованного органа. Это проявляется в развитии гепатита, при этом анализ изменений микроморфометрических показателей и экспрессии *Ki-67* и *p53* указывает на то, что в печени крыс этой группы протекают процессы репаративной регенерации, в отличие от органов крыс других экспериментальных групп, где отмечается регенерация физиологическая.

Кроме того, на фоне значительных изменений исследованных биохимических и гематологических параметров, у крыс этой группы сохранились (в перестроенном виде) только 6 ЦР из 26 исследованных, что свидетельствует о срыве адаптации к изменившимся условиям среды.

Таким образом, нами показано, что как отдельное действие постоянного освещения и ХАИ, так и совместное влияние этих факторов вызывают значительные неблагоприятные изменения в морфофункциональном состоянии печени, но в наибольшей степени они проявляются именно в группе животных, подвергнутых совместному действию хронодеструкторов.

### **Выводы.**

1. Хроническая алкогольная интоксикация и постоянное освещение в течение 21 суток, независимо друг от друга, инициируют развитие жировой дистрофии гепатоцитов. Сочетанное действие этих факторов аналогичной длительности усиливает изменения микроморфометрических параметров гепатоцитов и приводит к возникновению и развитию гепатита.

2. Статистически значимое усиление экспрессии *p53*, *Per2* и *Bmal1* обнаружено при всех изученных условиях, экспрессия *Adh5* возрастает при хронической алкогольной интоксикации в обоих режимах освещения, а экспрессия *Ki-67* – только при совместном действии этих факторов. Циркадные ритмы экспрессии *p53*, *Ki-67*, *Per2* и *Bmal1* разрушаются при хронической алкогольной интоксикации независимо от условий освещения, а ритм *Adh5* – лишь при постоянном освещении.

3. Хроническая алкогольная интоксикация вызывает достоверное повышение уровня глюкозы и общего билирубина на фоне снижения общего белка крови. При постоянном освещении увеличивается содержание глюкозы и активность АСТ и АЛТ и снижается содержание общего белка и альбумина. При совместном действии этих факторов снижается уровень глюкозы и общего белка при одновременном усилении активности АСТ и росте общего билирубина. У животных всех экспериментальных групп разрушаются ритмы общего и прямого билирубина, а циркадные ритмы общего белка, альбумина, активности АСТ и АЛТ разрушаются только при совместном действии исследованных факторов.

4. Хроническая алкогольная интоксикация, постоянное освещение и их совместное действие вызывают достоверное снижение содержания RBC, HGB, рост протромбинового времени и увеличение RDWc. При раздельном действии этих факторов снижается HCT и увеличивается MCH. У животных всех экспериментальных групп разрушается ритм протромбинового времени. Хроническая алкогольная интоксикация вызывает разрушение ритмов RDWc, MCH и MCV. Совместное действие двух хронодеструкторов приводит к разрушению ритмов всех изученных гематологических параметров, за исключением количества эритроцитов и общего гемоглобина.

5. При оценке воздействия хронической алкогольной интоксикации, постоянного освещения и сочетания этих факторов на организм лабораторных животных установлено, что совместное влияние двух хронодеструкторов приводит к развитию комплекса выраженных морфофункциональных изменений в печени и наибольшей дезорганизации ритмостаза, проявляющихся в разрушении 20 из 26 исследованных циркадных ритмов.

#### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

- 1. Кириллов Ю. А. Влияние хронической алкогольной интоксикации и постоянного освещения на морфофункциональное состояние печени / Ю. А. Кириллов, М. А. Козлова, Л. А. Макарецца, И. А. Чернов, Д. А. Арешидзе // Научно-практический рецензируемый журнал Клиническая и экспериментальная морфология. – 2021. – Т. 10. – №. S4. – С. 68-76.**
2. Кириллов Ю. А. Влияние хронической алкогольной интоксикации на морфофункциональное состояние печени крыс в возрасте 6 месяцев / Ю. А. Кириллов, М. А. Козлова, Д. А. Арешидзе, И. А. Чернов, Е. В. Штемлевская // Сборник научных трудов международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». – М.: Группа МДВ, 2020.
- 3. Кириллов Ю. А. Влияние хронической алкогольной интоксикации на организацию циркадианных ритмов некоторых биологических параметров у самцов крыс линии Вистар в возрасте 6 месяцев / Ю. А. Кириллов, М. А. Козлова, И. А. Чернов, Л. А. Макарецца, Д. А. Арешидзе, Е. В. Штемлевская // Медицинская наука и образование Урала. – 2020. – №1. – С.43-46.**
- 4. Кириллов Ю. А. Особенности суточной динамики некоторых биохимических показателей у разнополых крыс линии Вистар в возрасте 6 месяцев / Ю. А. Кириллов, И. А. Чернов, М. А. Козлова, Л. А. Макарецца, Д. А. Арешидзе // Медицинская наука и образование Урала. – 2021. – № 4. – С. 44-49.**
- 5. Чернов И. А. Использование специализированных математических методов для оценки суточной динамики некоторых микроморфометрических параметров гепатоцитов в эксперименте / И. А. Чернов, Ю. А. Кириллов, М. А. Козлова, Л. А. Макарецца, Д. А. Арешидзе, Е. В. Штемлевская // Медицинская наука и образование Урала. – 2020. – Т. 21. – №. 2. – С. 67-72.**
6. Штемлевская Е. В. Влияние модификации циркадных ритмов (ЦР) на тече-

ние хронической алкогольной интоксикации (ХАИ) в эксперименте / Е. В. Штемплевская, Ю. А. Кириллов, Д. А. Арешидзе, М. А. Козлова, И. А. Чернов, В. И. Кукушкин // Сборник научных трудов международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». – М.: Группа МДВ, 2020.

7. **Areshidze D. A. The ontogeny of circadian rhythms of several physiological parameters in male Wistar rats / D.A. Areshidze, L.A. Makartseva, S.A. Kucher, A.A. Gritsyunayte, K.A. Sakhnova, V.S. Kaplan, E.A. Shmigelskiy, M.A. Kozlova // Morphology, Physiology, Pathology. Archive euromedica. – 2019. – V. 9. – №2. – P. 74-80.**

8. **Kirillov Y. A. Character of the Daily Dynamics of a Number of Morphometric Parameters of Hepatocytes of Wistar Rats at Chronic Alcohol Intoxication / Y. A. Kirillov, M. A. Kozlova, L. A. Makartseva, D. A. Areshidze, I. A. Chernov, E. V. Shtemplevskaya // World Heart Journal. – 2021. – V. 13. – №. 1. – P. 215-217.**

9. **Kirillov Y. A. Influence of chronic alcoholic intoxication and lighting regime on karyometric and ploidometric parameters of hepatocytes of rats / Y. A. Kirillov, M. A. Kozlova, L. A. Makartseva, I. A. Chernov, E. V. Shtemplevskaya, D. A. Areshidze // Caryologia – 2021. – V.74(3). – P. 45-51.**

10. **Kirillov Y. A. The effect of chronic alcohol intoxication on the daily rhythm of some micromorphometric parameters of rat hepatocytes / Y. A. Kirillov, M. A. Kozlova, L. A. Makartseva, D. A. Areshidze, S. A. Kucher, I. A. Chernov and E. V. Shtemplevskaya // J Pharm Nutr Sci. – 2021. – V. 11. – №. 1. – P. 1-12.**

11. **Kirillov Y. Effect of chronic alcohol intoxication and constant lighting on cardiovascular parameters in male rats / Y. Kirillov, L. Makartseva, M. Kozlova, I. Chernov, Y. Shtemplevskaya, D. Areshidze // Morphology, Physiology, Pathology. Archive euromedica. – 2020. – V.11. – №1. – P. 43-47.**

12. **Kirillov Y. The influence of chronic alcohol intoxication on the daily dynamics of a number of morphological parameters of liver and related functional parameters of organism of rats / Y. Kirillov, M. Kozlova, L. Makartseva, I. Chernov, Y. Shtemplevskaya, D. Areshidze // Fresenius environmental bulletin. – 2021. – V. 30. – №. 6 A. – P. 6814-6826.**

13. **Kirillov Y. The influence of constant lighting on some hematological parameters of Wistar rats / Y. Kirillov, M. Kozlova, L. Makartseva, D. Areshidze, I. Chernov, E. Shtemplevskaya, S. Timofeev // Virchows archiv. – One New York Plaza, Suite 4600, New York, Ny, United States: Springer, 2021. – V. 479. – №. Suppl 1. – P. S152-S152.**

14. **Kozlova M.A. Morphofunctional State and Circadian Rhythms of the Liver under the Influence of Chronic Alcohol Intoxication and Constant Lighting / M. A. Kozlova, Y. A. Kirillov, L. A. Makartseva, I. A. Chernov, D. A. Areshidze // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22. – №. 23. – 13007. – 27 pp.**

15. **Makartseva L. The effect of constant lighting on the organization of circadian rhythms of hematological parameters in Wistar rats at age of 6 months / L. Makartseva, M. Kozlova, Y. Kirillov, D. Areshidze // International Journal of pharma-**

**ceutical Sciences and Research – 2021. – V. 12(3). – P. 1933-1938.**

**16. Makartseva L. The influence of constant lighting on the daily dynamics of some physiological parameters of male Wistar rats / L. Makartseva, M. Kozlova, S. Kucher, D. Areshidze // International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences. – 2020. – №9(3). – P. 1-13.**

Полужирным шрифтом выделены работы, опубликованные в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, а также в изданиях, индексируемых Web of Science и Scopus.

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- АЛТ – аланинаминотрансфераза
- АСТ – аспартатаминотрансфераза
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
- СХЯ – супрахиазматические ядра гипоталамуса
- ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия
- ХАИ – хроническая алкогольная интоксикация
- ЦР – циркадный ритм
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение
- НСТ – hematocrit (гематокрит)
- НГВ – hemoglobin (гемоглобин)
- МСН – mean corpuscular hemoglobin (среднее содержание гемоглобина в эритроците)
- МСНС – mean corpuscular hemoglobin concentration (средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах)
- MCV – mean corpuscular volume (средний объем эритроцитов)
- RBC – red blood cells (абсолютное содержание эритроцитов)
- RDWc – red cell distribution width (широта распределения популяции эритроцитов)