

**ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека
имени академика А.П. Авцына»**

На правах рукописи

Козлова Мария Александровна

**Влияние светового режима и хронической алкогольной интоксикации
на морфофункциональное состояние печени и структуру её
циркадных ритмов в эксперименте**

1.5.22. – Клеточная биология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.м.н. Ю.А. Кириллов

Москва – 2022

ВВЕДЕНИЕ	4
1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1.Особенности структуры циркадных ритмов млекопитающих в норме и при патологии и место и роль печени в ней	13
1.2.Особенности влияния этанола на организм млекопитающих	22
1.3.Влияние этанола на структуру циркадных ритмов млекопитающих	27
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
2.1. Объект исследования	33
2.2. Дизайн исследования	33
2.3. Морфологические методы	34
2.4. Определение массы тела и печени	37
2.5. Электронная микроскопия	38
2.6. Биохимические методы	38
2.7. Гематологические методы	38
2.8. Измерение ректальной температуры	39
2.9. Методы статистической обработки	39
3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
3.1. Влияние постоянного освещения и ХАИ на массу тела и печени крыс, морфологию печени и среднесуточную величину исследованных морфофункциональных параметров	42
<i>3.1.1. Влияние постоянного освещения и ХАИ на массу тела и печени крыс</i>	42
<i>3.1.2. Влияние постоянного освещения и ХАИ на морфологию печени</i>	43
<i>3.1.3. Влияние постоянного освещения и ХАИ на величину микроморфометрических показателей гепатоцитов</i>47	
<i>3.1.4. Влияние постоянного освещения и ХАИ на содержание липидов и гликогена в гепатоцитах</i>	51
<i>3.1.5. Влияние постоянного освещения и ХАИ на экспрессию исследованных генов</i>	53
<i>3.1.6. Влияние постоянного освещения и ХАИ на некоторые биохимические показатели</i>	59
<i>3.1.7. Влияние постоянного освещения и ХАИ на некоторые гематологические показатели</i>	61
<i>3.1.8. Влияние постоянного освещения и ХАИ на ректальную температуру</i>	63
3.2. Влияние постоянного освещения и ХАИ на организацию циркадных ритмов печени	64
<i>3.2.1. Влияние постоянного освещения и ХАИ на организацию циркадных ритмов микроморфометрических параметров гепатоцитов</i>	64
<i>3.2.2. Влияние постоянного освещения и ХАИ на организацию циркадных ритмов липидов и гликогена в гепатоцитах</i>	68
<i>3.2.3. Влияние постоянного освещения и ХАИ на организацию циркадных ритмов некоторых биохимических показателей</i>	70
<i>3.2.4. Влияние постоянного освещения и ХАИ на организацию циркадных ритмов некоторых гематологических показателей</i>	80
<i>3.2.5. Влияние постоянного освещения и ХАИ на организацию циркадного ритма температуры</i>	90
<i>3.2.6. Влияние постоянного освещения и ХАИ на организацию циркадных ритмов экспрессии исследованных генов</i>	91

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.	117
ВЫВОДЫ	120
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	122
ЛИТЕРАТУРА.	123

ВВЕДЕНИЕ.

Актуальность темы исследования

Для биологических систем всех уровней организации характерна ритмичность процессов функционирования (Рапопорт С.И., Чибисов С.М., 2018; Forger D.B., 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., Merrow M., 2016; Panda S., 2016; Zimmet P. et al., 2019).

Комплекс ЦР млекопитающих, будучи генетически обусловленным, достаточно пластично модулируется под 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 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; Kogonowski 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

ся кормление. В некоторых случаях метаболические 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 4th B.T. et al., 2017; Davis 4th B.T. 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-суточное воздействие постоянного освещения приводит к развитию жирового гепатоза, а в сочетании с ХАИ – гепатита.

Получены новые данные о реактивных функциональных изменениях гепатоцитов при совместном действии ХАИ и постоянного освещения и о модификации биохимических и гематологических показателей, характеризующих состояние печени.

Впервые изучено влияние ХАИ и постоянного освещения на характер экспрессии *Bmal1*, *Per2*, *p53*, *Ki-67* и *Adh5*.

Доказан хронодеструктивный эффект воздействия постоянного освещения и ХАИ при постоянном освещении на циркадную ритмику некоторых морфологических, биохимических и гематологических показателей, характеризующих морфофункциональное состояние печени лабораторных 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 био-

логических 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.

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; 32nd European congress of Pathology (Глазго, Великобритания); 33rd 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».

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.22. Клеточная биология согласно пунктам: 5 - Исследование адаптации тканевых элементов к действию различных биологических, физических, химических и других факторов, 6 - Молекулярные, иммунологические и физиологические аспекты изучения клеток многоклеточных, малоклеточных и одноклеточных организмов в норме и патологии.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Особенности структуры циркадных ритмов млекопитающих в норме и при патологии и место и роль печени в ней.

Для биологических систем всех уровней организации характерна ритмичность функционирования. Исследователями описаны биологические ритмы с периодичностью от долей секунды до десятков лет, однако для млекопитающих наибольшей значимостью обладают суточные, или циркадные ритмы (ЦР) (Чибисов С. М. с соавт., 2018; McKenna H. et al., 2018).

Термин «циркадный» имеет латинское происхождение (от лат. *circa* «около, кругом» + *dies* «день») и применяется для описания различных колебательных процессов с периодом около 24 часов, поэтому циркадные ритмы практически являются околосуточными. Они регулируются 24-часовым вращением Земли и связаны со сменой дня и ночи. Ежедневное изменение интенсивности освещения приводит к возникновению циклов отдыха и активности, кормления и голодания у людей, как у вида, ведущего дневной образ жизни и осуществляющего большую часть своей деятельности днем и меньшую – ночью. Совокупность биоритмов физиологических процессов в различных системах образует строго согласованный ансамбль, представляющий собой хроноструктуру организма. Наличие данной ритмической структуры биологических процессов обеспечивает необходимый порядок их протекания, согласованность, поддержание функционирования систем организма на оптимальном уровне (Eckel-Mahan K., Sassone-Corsi P., 2013; Roenneberg T., Merrow M., 2016; Panda S., 2016; Zimmet P. et al., 2019).

На молекулярном уровне генерация циркадных временных сигналов складывается из транскрипционных и трансляционных позитивно-негативных петель обратной связи. В клетках большинства органов и тканей функционируют ауторегуляторные петли отрицательной обратной связи, при которых белки, продуцируемые определенными часовыми генами (*clock genes*), негативно регулируют их собственную транскрипцию. Центральными факторами являют-

ся два семейства генов: *Per* (*Per1-3*), а также *Cry* (*Cry1* и *Cry2*), кодирующие белки криптохромы. Транскрипция этих генов активируется с наступлением индивидуального дня комплексом, содержащим *CLOCK*- и *BMAL1*-белки. В результате его активации в клетках на протяжении дня накапливаются мРНК *Per*- и *Cry*-генов с запаздывающим синтезом их белков. В свою очередь, *CRY*-протеины обеспечивают взаимодействие *Clock*- и *Bmal1*-генов. Подобным образом организованная во времени система часовых генов определяет частоту и амплитуду циркадных осцилляций ведущего пейсмекера в целом. В супрахиазматических ядрах гипоталамуса (СХЯ) м-РНК и соответствующие белки *BMAL*, *PER* и *CRY* образуются ритмично, в определенные фазы суточного цикла, тогда как продукция м-РНК и белка *CLOCK* происходит круглосуточно. Акрофаза транскрипции м-РНК *Bmal* приходится на середину-вторую половину темновой фазы суток, а соответствующего белка – на ранние утренние часы (Губин Д.Г., 2013; Панченко А. В. с соавт., 2016; Takahashi J., 2017; Nonna S., 2018; Nonna S., 2020).

Временная организация систем организма млекопитающих, будучи генетически обусловленной, достаточно пластично модулируется под действием периодических факторов внешней и внутренней среды – синхронизаторов, или пейсмекеров (Foster R.G., Roenneberg T., 2008; Michel S., Meijer J. H., 2020), ведущую роль среди которых играет световой режим. Следующие друг за другом циклы жизненных процессов различаются по своим амплитудно-фазовым характеристикам. При адекватном протекании адаптационных процессов степень воздействия стрессоров на циркадные ритмы незначительна. В случае срыва адаптации ритмические процессы организма утрачивают свою правильность, регулярность, их рассогласование составляет сущность десинхроноза, который может 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).

Ведущим водителем циркадных ритмов у млекопитающих являются парные супрахиазматические ядра гипоталамуса. Ритморганизующая функция СХЯ модулируется извне датчиками времени, основным 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). Информация от рецепторов сетчатки через ганглиозные клетки передается напрямую в СХЯ (LeGates T.A. et al., 2014). СХЯ, в свою очередь, передают «сигнал времени» (Zeitgeber) другим органам, синхронизируя периферические пейсмейкеры. Эта передача осуществляется по шести основным эфферентным направлениям от СХЯ (каудальному, роstralьному, роstral-дорсальному, роstral-каудальному, латеральному и вентральному). Таким образом, СХЯ являются центральными водителями ритма, их ритмическая деятельность управляет экспрессией часовых генов, которые определяют циркадную динамику метаболизма в органах и тканях и функционального состояния всего организма (Кудрявцева Г.А. с соавт., 2013; Podkolodnyu N.L. et al., 2017; Schwartz W. J., Klerman E. B., 2019).

Периферические осцилляторы, зависимые от СХЯ, обнаружены в обонятельной луковице, дугообразном ядре и ряде других структур. Синхронизирующую функцию также выполняют эпифиз и кора надпочечников посредством синтеза своих гормонов (Balsalobre A. et al., 2000; Guilding C. et al., 2009; Guerrero-Vargas N.N. et al., 2015). Температура также способна влиять на экспрессию часовых генов в печени (Brown S.A. et al., 2002).

Особое место в организации хроноструктуры млекопитающих принадлежит взаимодействию СХЯ с эпифизом и, в меньшей степени, с гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой. Эпифиз выступает в роли важнейшей релейной станции и одновременно является ведущим звеном для реализации циркадных сигналов. СХЯ почти целиком определяют афферентацию эпифиза, что обуславливает зависимость его деятельности от состояния внешней освещённости (Арушанян Э.Б., Попов А. В., 2011; Зворыгина П.Д., 2020). Выработ-

ка основного гормона – мелатонина – подчинена чёткому суточному периодизму: продукция начинается с наступлением темного времени суток, достигает максимальных значений в полночь и купируется воздействием света. В светлое время суток этот процесс сменяется усиленным синтезом серотонина, представляющего собой непрямой предшественник мелатонина (Méndez-Hernández R. et al., 2020; Reghunandanan V., 2020).

Эпифиз занимает особое место и в организации циркадных колебаний поведения. Данная железа у млекопитающих не имеет собственных осцилляторных свойств и, таким образом, не подменяет собой ведущий пейсмейкер, однако во многом определяет течение ЦР. При этом мелатонин способен вызывать синхронизацию циркадной локомоции у животных с исходно нарушенной ритмикой (Арушанян Э.Б. с соавт., 2007; Кравченко Е.В., Асташко Ю.В., 2012). Фазовый сдвиг околосуточных ритмов под влиянием мелатонина отмечен и у человека, что определяет возможность его применения для коррекции широтного десинхроноза (Арушанян Э.Б. с соавт., 1993; Narváez-Rojas A. R. et al., 2020). Мелатонин обеспечивает эпифизарный контроль над деятельностью СХЯ посредством активации специализированных рецепторов, широко представленных в их клетках. В СХЯ выявляется два типа мелатониновых рецепторов (MT1 и MT2), число и аффинность которых демонстрируют выраженную околосуточную ритмику, которая совпадает по фазе с деятельностью самого эпифиза (Gorman M.R., 2020; Yu H.S., Reiter R. J., 2020).

Ось гипоталамус-гипофиз-надпочечники находится под строгим контролем СХЯ. СХЯ-индуцированное высвобождение вазопрессина в дорсомедиальном ядре гипоталамуса в начале фазы сна оказывает сильное ингибирующее влияние на секрецию кортикостерона (Kalsbeek A. et al., 1996), тогда как уменьшение этого воздействия к началу активного периода вызывает дневной пик кортикостерона, подготавливая животных к началу деятельности. Передача кортикостероном сигналов в дугообразное ядро снижает чувствительность пе-

чени к инсулину, создавая гармонию между пиками кортикостерона и глюкозы, ритмы которых синхронизируются СХЯ (Yi C.X. et al., 2012).

Значимым звеном циркадной системы организма млекопитающего являются ее молекулярные компоненты, локализованные в клетках периферических тканей, включая ЖКТ, поджелудочную железу, печень. Печень занимает особое положение в данной системе, так как является центральным органом метаболизма, осуществляет трансформацию алиментарных аминокислот, углеводов, липидов, витаминов, синтез сывороточных белков, проводит детоксикацию и экскрецию эндогенных и экзогенных токсинов (Семак И.В., Кульчицкий В.А., 2007; Подколотный Н.А. с соавт., 2018). Посредством циркадных колебаний экспрессии молекулярных компонентов и составляющих их белковых продуктов происходят ритмические изменения в физиологических процессах, таких как процессы питания и метаболизма (Писарев И.В., Варницына В.В., 2021).

Времязадатчиком, определяющим структуру ЦР некоторых органов, в том числе и печени, является кормление. Метаболические процессы достаточно легко выходят из-под контроля СХЯ, тогда прием пищи десинхронизируется с нормальным дневным режимом активности. В этой ситуации время приема пищи (время кормления) становится доминирующим управляющим фактором (Bechtold D. A., 2008; Engin A., 2017; Westerterp-Plantenga M. S., 2020). Питание во время фазы покоя не только влияет на ритмы температуры и глюкокортикоидов, но и полностью меняет экспрессию часовых генов в печени, почках, сердце и поджелудочной железе (Damiola F. et al., 2000), подтверждая значение потребления пищи в качестве важного синхронизирующего сигнала для периферических органов. Однако в условиях голодания ритм в печени сохраняется, так же, как и у животных с повреждением СХЯ (Sabath E. et al., 2014).

Собственно, в самих клетках печени, так же, как и в других периферических органах, биологические часы на молекулярно-генетическом уровне включают в себя не только часовые гены *Bmal*, *Clock*, семейство генов *Per* и гены *Cry*, но и некоторые другие гены, активность которых влияет на вышеупомяну-

тые ключевые, либо которые подконтрольны им (Kim P. et al., 2019; Shi D. et al., 2019).

Установлена относительная автономность печени при отсутствии влияния внешних ритмозадатчиков. Было показано, что в условиях полной темноты часовые гены, гены *P450* и гены метаболизма липидов экспрессируются с сохранением эндогенного ЦР. В то же время в условиях полной темноты исчезает ЦР глюкозы и липидов при сохранении других суточных ритмов (Lamia K.A. et al., 2008; Koronowski K. V. et al., 2019). Свет не всегда является фактором, критичным для сохранения циркадных ритмов, но влияет на их период и амплитуду, на экспрессию генов, а также на согласование ритмов между собой (Li H. et al., 2020).

Экспериментально доказана высокая степень зависимости функционирования печени от нормально синхронизированного контроля её ЦР (Robles M.S. et al., 2014; Mauvoisin D. et al., 2014; Wang J. et al., 2017).

Нарушение нормальной циркадной ритмичности печени рассматривается как один из ведущих факторов развития неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) и других заболеваний печени (Южакова А. Е. с соавт., 2020).

Печень является главным органом глюконеогенеза млекопитающих и участвует в поддержании гомеостатического уровня глюкозы в крови. Циркадная система поддержания физиологического уровня глюкозы в крови функционирует за счет синхронизации тканеспецифических механизмов метаболизма этого углевода (Rudic R.D. et al., 2004). Со стороны СХЯ осуществляется контроль ритма кормления/голодания, в то время как периферические пейсмейкеры (печень, поджелудочная железа, скелетные мышцы) запускают координированные во времени программы экспрессии генов для поддержания физиологических уровней глюкозы в крови (Bass J., 2012; Kalsbeek A. et al., 2014; Zhang Y. et al., 2019).

Часовые гены клеток печени являются одними из важнейших регуляторов липидного обмена, а также суточных колебаний свободных жирных кислот, холестерина, триглицеридов, фосфолипидов (Turek F.W. et al., 2005; Grimaldi B. et al., 2010; Paschos G.K. et al., 2012; Chaix A. et al., 2019). Установлена циркадная ритмичность выработки желчных кислот, необходимых для нормального обмена липидов (Lavery D.J., Schibler U., 1993; Frazier K., Chang E. B., 2020), описана суточная ритмичность для ферментов цитолиза (Калько Е.А. с соавт., 2015; Sherman H. et al., 2011 (a); Sherman H. et al., 2011 (b)).

Установлено, что нарушение циркадной ритмичности (в т.ч. нарушение работы часовых генов) играет важную роль в развитии метаболического синдрома, а также НАЖБП, которая возникает из-за неспособности гепатоцитов эффективно метаболизировать углеводы и свободные жирные кислоты (СЖК) (Shetty A. et al., 2018; Mukherji A. et al., 2020) и является следствием дисбаланса между поступлением СЖК в адипоциты, липогенезом *de novo* в печени и утилизацией СЖК (Friedmann, S.L., 2018; Mukherji A. et al., 2019; Saran A.R. et al., 2020).

Экспрессии циркадных генов в печени присущи два периода транскрипции, которые соответствуют периодическому переходу между активной фазой и фазой покоя. Эти два «пика» отражают сильно различающиеся физиологические потребности, к примеру, в энергии или в детоксикации, в зависимости от их периодов активности или отдыха. В эти фазы выявляются специфичные пулы мРНК, генерирующиеся благодаря внутренней ритмичности часовых генов. Эти же гены, контролируя экспрессию глюкокиназы, регулируют метаболизм глюкозы после поступления ее в гепатоциты (Feng D., Lazar M.A., 2012; Eckel-Mahan K.L., Sassone-Corsi P., 2013). Также хорошо известно, что часовые гены печени регулируют течение клеточных процессов, вовлечённых в патогенез НАЖБП, например, аутофагию, ER-стресс и окислительный стресс (Ma D., et al., 2012; Chaix A. et al., 2016; Younossi Z., Henry L., 2016; Samuel V.T., Shulman G.I., 2018).

Показано, что часовые гены участвуют в переходе НАЖБП в НАСГ (Samuel V.T., Shulman G.I., 2018; Friedmann S.L. et al., 2018) посредством рассогласования в работе центральных и периферических осцилляторов, а десинхронизация указывается в качестве одной из причин развития НАСГ (Saran A.R. et al., 2020). Доказано, что при гепатитах происходит нарушение нормального функционирования генов семейства *Per*, а тяжесть протекания болезни коррелирует с нарушением цикла сон-бодрствование (Wei Y. et al., 2010; Shouval D., 2014; Diallo A.B. et al., 2020).

Установлено, что у пациентов с циррозом печени обнаруживается дисфункция системы циркадных часов, характеризующаяся задержкой цикла сна и бодрствования, изменениями уровней циркулирующих мелатонина и кортизола и дневной сонливостью (Montagnese S. et al., 2014). У этих же лиц отмечаются аномальные дневные ритмы фибринолиза и артериального давления (De Cruz S. et al., 2012). У мышей с остро развивающимся фиброзом печени, индуцированным тетрахлорметаном, были обнаружены аномальные ритмы экспрессии *Cry2*, а у животных с нокаутом *Per2* выявляется более интенсивный фиброз печени после инъекции четыреххлористого углерода по сравнению с контролем (Chen P. et al., 2010). У мышей с двойным нокаутом *Per1* и *Per2* отмечаются повышенные уровни желчных кислот в сыворотке крови и в печени, а также признаки холестаза (Ma K. et al., 2009; Tahara Y., Shibata S., 2016).

Хорошо изучена и взаимосвязь между нарушениями ЦР печени и развитием онкологических заболеваний. Циркадные часы регулируют гены клеточного цикла, гены пролиферации клеток, онкогены и гены-супрессоры опухолей, включая *Myc*, *Wee1*, *Cyclin D*, *Mdm2*, *Ctnnb1*, *Cdk4*, *Itga6*, *Cdkn2a*, *Cdkn1a* и *Trp53*. Более того, в мышинных моделях онкогенеза благоприятный исход заболевания коррелирует с уровнем улучшения циркадной ритмичности (Feillet C. et al., 2015; Jiang W. et al., 2016; Kiessling S. et al., 2017.; Shostak A., 2017). У *Per2*-мутантных мышей, *Bmall* +/- и мыши, дефицитных как по *Per1*, так и по *Per2*, или по *Cry1* и *Cry2*, обнаруживают повышенный спонтанный и индуциро-

ванный радиацией туморогенез по сравнению с мышами дикого типа (Kelleher F.C. et al., 2014). Имитация хронической смены часовых поясов у мышей также ускоряет развитие индуцированного диэтилнитрозамином рака печени (Filipski E. et al., 2009). Аномальная экспрессия основных часовых генов, обнаруженная в биоптатах гепатоцеллюлярной карциномы человека, коррелировала с увеличением размера опухоли (Lin Y.M. et al., 2008). При гепатоцеллюлярной карциноме (ГЦК), индуцированной диэтилнитрозамином, у мышей была выявлена низкая амплитуда колебаний экспрессии часовых генов (Zhao B. et al., 2012). Установлено, что хронический jetlag вызывает спонтанную ГЦК у мышей дикого типа по механизму, очень похожему на тот, который наблюдается у людей с ожирением. Процесс начинается с неалкогольной жировой болезни печени, которая прогрессирует до НАСГ, цирроза и ГЦК. Этот патофизиологический путь обусловлен нарушением регуляции генов, вызванным сменой часовых поясов, и глобальной дисфункцией и десинхронозом метаболизма печени (Kettner N. M. et al., 2016).

С использованием мультиспектральной визуализации была установлена синхронизация фаз между ЦР и клеточным циклом в отдельных клетках млекопитающих, показано, что циркадные часы регулируют скорость клеточного цикла, а их повреждение приводит к неправильной регуляции клеточного цикла и ускоренному росту клеток (Feillet C. et al., 2014).

Известно, что деление клеток во многих тканях млекопитающих связано с определенным временем суток. Установлено, что при регенерации печени у мышей внутриклеточные циркадные часы могут напрямую и однонаправленно контролировать цикл клеточного деления в пролиферирующих клетках (Matsuo T. et al., 2003). При частичной гепатэктомии обнаружено четыре последовательных волны регенерации гепатоцитов, при этом митотическая активность гепатоцитов в первых трех пролиферативных циклах демонстрировала циркадный ритм, проявляющийся в трех соответствующих пиках митоза. Путь *Bmall-Clock / Wee1 / Cdc2* был предложен в качестве управляющего циркадным рит-

мом митоза гепатоцитов при регенерации печени. Кроме того, во время регенерации печени отмечено три волны накопления в ней липидов. Первая начиналась до первого пика пролиферации гепатоцитов, тогда как вторая и третья происходили одновременно со вторым и третьим митотическими пиками, соответственно (Zou Y. et al., 2012).

1.2. Особенности влияния этанола на организм млекопитающих.

Непосредственная связь между систематическим употреблением алкогольных напитков и поражением печени впервые выявлена в XVI веке (Baillie M., 1793). Приоритет морфологического описания алкогольной жировой дистрофии печени принадлежит К. Рокитанскому, труды которого переведены на русский язык в 1850 году Д. Мином и А. Циммерманом (Фрисс С.А. с соавт., 2010). В 1995 г. Ш. Шерлок ввел понятие «алкогольная болезнь печени» (Sherlock S., 1995).

Злоупотребление алкоголем является одной из наиболее важных медицинских и социальных проблем современного общества. Развитие алкогольной болезни определяется генетически детерминированным уровнем базального метаболизма печени и носит индивидуальный характер. При этом печень является органом, наиболее значительно страдающим от алкогольной интоксикации. Систематическое потребление алкоголя приводит к нарушению структуры и функции печени и влияет на метаболизм других органов. Алкогольная болезнь печени (АБП) включает в себя несколько последовательных клиникo-морфологических форм: алкогольный стеатоз, алкогольный гепатит, прогрессирующий фиброз и алкогольный цирроз печени, которые являются стадиями единого патологического процесса, вызванного длительным употреблением алкоголя (Абдурахманов Д.Т., 2007; Усанова А. А. с соавт., 2020; Rehm J., 2011).

Стеатоз печени – начальная стадия развития АБП – отмечается у лиц, которые регулярно потребляют этанол в гепатотоксических дозах (более 40 г в день). Помимо ожирения печени, при АБП отмечается гепатит у 10–35% и цирроз печени примерно у 10–15% алкоголиков (Åberg F., Färkkilä M., 2020). Серь-

езную озабоченность вызывает рост заболеваемости гепатоцеллюлярной карциномой, которая развивается примерно у 1-2% алкоголиков (Stickel F., 2015; Stickel F. et al., 2017).

Клеточные и молекулярные механизмы патогенеза АБП все еще не полностью изучены, что обусловлено сложным взаимодействием поведенческих, средовых и генетических факторов. Морфологические признаки АБП являются результатом взаимосвязанных и последовательных патофизиологических процессов в контексте непрерывного воздействия алкоголя. Ключевым компонентом развития АБП является прямая токсичность первого метаболита алкоголя – ацетальдегида (АА) (Konishi M., Ishii H., 2007; Dinis-Oliveira J., 2016).

Две основные ферментные системы могут метаболизировать алкоголь до АА посредством окислительного разложения. Первая из них, алкогольдегидрогеназная, является системой, ответственной за разложение поступающего в организм алкоголя в случаях его умеренного употребления. Она расположена в цитозоле и не может быть активирована по требованию. Цитохром P450 2E1 (CYP2E1), расположенный в микросомах, напротив, является индуцибельным и его активность может повышаться в 10-20 раз у сильно пьющих людей (Peccerella T. et al., 2018). Обе ферментные системы производят АА, являющийся высокореактивным токсичным и мутагенным метаболитом. Помимо образования АА, CYP2E1 также способствует окислительному повреждению мембран клеток за счет образования активных форм кислорода (АФК), таких как супероксид-анион и перекись водорода. Активность CYP2E1 в печени человека может увеличиваться уже после приема всего 40 г этанола в день в течение 1 недели (Neuman M.G. et al., 2015). АА также представляет собой мощный канцероген, приводящий к возникновению злокачественных новообразований печени (Scoccianti C. et al., 2015; LoConte N.K. et al., 2018).

Все гистопатологические изменения в ходе АБП начинаются и обычно наиболее заметны в центрилобулярной области печеночной доли. Центрилобулярные гепатоциты ферментативно подготовлены к метаболизму алкоголя,

например, посредством цитозольной алкогольдегидрогеназы и индукции ферментов цитохрома р450. Такие пути продуцируют жирные кислоты, накапливающиеся в стеатотических гепатоцитах, и создают токсичные метаболиты, вызывающие воспаление, повреждение гепатоцитов и фиброз (Theise N.D., 2013).

Наиболее ранней патофизиологической реакцией на хроническое употребление алкоголя со стороны печени является стеатоз – накопление жиров (триглицеридов, фосфолипидов и эфиров холестерина) в гепатоцитах. Воздействие этанола может вызвать накопление жира в печени за счет изменения метаболизма жиров с помощью нескольких механизмов (You M. et al., 2004; Purohit V. et al., 2009; Mahli A., Hellerbrand C., 2016). Гепатоцеллюлярный стеатоз является первым признаком АБП, как правило, прогрессирует от мелкокапельной жировой дистрофии гепатоцитов до крупнокапельной, хотя часто встречаются и обе формы. Стеатоз начинается в зоне 3 печеночной долики и распространяется по направлению воротного тракта. Стеатоз может наблюдаться в сочетании с гепатитом (стеатогепатит) и фиброзом (Lefkowitz J.H., 2005).

Особым видом жировой дистрофии, свойственным для АБП, является алкогольная пеннистая дегенерация. При световой микроскопии она выявляется как обширный мелкокапельный стеатоз, не прогрессирующий в крупнокапельное ожирение. При этом отмечается значительное увеличение размеров гепатоцитов, стаз желчи в желчных канальцах, может проявляться перицеллюлярный фиброз. Этот вид дистрофии встречается редко, но является наиболее тяжелым вариантом стеатоза. Отказ от алкоголя приводит к быстрому регрессу патологических признаков. В зарубежной литературе выделяют синдром внезапной смерти у злоупотребляющих алкоголем лиц с мелкокапельным стеатозом печени (Sorkin T., Sheppard M.N., 2017).

Помимо изменения жирового обмена, поступление алкоголя в организм может влиять на мобилизацию и выведение жирных кислот, вызывая липолиз (расщепление жиров на жирные кислоты и другие продукты) и гибель адипоцитов, что приводит к увеличению объема циркулирующих жирных кислот и их

последующему накоплению в печени. Употребление алкоголя может также увеличить поступление липидов в печень из тонкого кишечника (Parker R. et al., 2018). Примечательно, что аутофагия играет решающую роль в удалении липидных капель в гепатоцитах, а хроническое потребление алкоголя подавляет аутофагию, тем самым снижая клиренс липидов (Dolganіus A. et al., 2012).

Следующей стадией АБП, наблюдаемой в 10-30% случаев, является алкогольный гепатит – воспаление, исходом которого может быть развитие фиброза, цирроза (10-15% случаев) и гепатоцеллюлярной карциномы (2% случаев). (Wang S. et al., 2016). Наиболее типичным проявлением является набухание гепатоцитов, разрежение цитоплазмы и нарушение цитоскелета, часто с образованием телец Мэллори-Денка; развитие алкогольного гепатита происходит на фоне сохраняющегося стеатоза печени. Часто наблюдается апоптоз. Картина воспаления варьирует от скудной, преимущественно мононуклеарной инфильтрации портальных трактов и паренхимы печени до более характерного преобладания в инфильтрате нейтрофилов, которое либо фокусируется вокруг набухших гепатоцитов, либо распространяется диффузно по дольке (Crawford J.M., 2012; Sakhuja P., 2014).

Фиброз печени является исходом ее хронического повреждения, включая воспаление, вызванное воздействием алкоголя. Развивающийся при алкогольном повреждении печени перисинусоидальный фиброз первично локализуется в перипортальной части ацинуса с дальнейшим распространением в направлении его центра. Этот процесс связан с уплотнением расположения эндотелиоцитов, активацией перисинусоидальных клеток и угнетением макрофагов печени (Бобков П.С., 2012). На более поздних стадиях для АБП характерно развитие выраженного фиброза (Lackner C. et al., 2017). Продукция внеклеточного матрикса активированными звездчатыми клетками печени является ключевым событием в фиброгенезе печени. В меньшей степени в фиброгенезе печени принимают участие портальные фибробласты, а также миофибробласты костного мозга (Tsuchida T., Friedman S.L., 2017). Фиброз при АБП характеризуется

скоплением перицеллюлярного и перисинусоидального накопления матрикса с характерной картиной «проволочной сетки» (Yip W. W., Burt A.D., 2006; Lackner C., Tiniakos D., 2019). Постоянное употребление алкоголя активирует клетки Купфера через эндотоксины кишечника и способствует воспалению печени, что приводит к дополнительной активации соседних клеток Купфера, которые, в свою очередь, активируют клетки Ито. Более того, алкоголь и ацетальдегид могут активировать клетки Ито напрямую и тем самым способствовать фиброгенезу в печени, а опосредованное алкоголем ингибирование нескольких антифиброзных путей создает дополнительные условия для развития фиброза (Enomoto N. et al., 2001; Paik Y. H. et al., 2003; Slevin E. et al., 2020)

В результате прогрессирования фиброза происходят структурная перестройка и рубцовое сморщивание печени, что приводит к серьезному нарушению кровотока в органе из-за сужения сосудистых структур в доле печени, включая синусоиды. В результате портальная гипертензия может сопровождаться другими осложнениями, включая асцит и варикозное расширение вен пищевода. Кроме того, из-за гибели гепатоцитов снижается функция печени (Mueller S., 2016; Teschke R., 2018). При длительной хронической алкоголизации происходит развитие цирроза печени, для которого характерно нарушение архитектоники органа и наличие регенераторных узлов. В 5–15% случаев прогрессирование фиброза с последующей трансформацией в цирроз наблюдается несмотря на отказ от алкоголя. При продолжении же приема алкоголя в гепатотоксичных дозах риск прогрессирования цирроза существенно возрастает (Михеева О.М. с соавт., 2010; Ивашкин В.Т. с соавт., 2017; Zhu C.C. et al., 2004).

Цирроз любой этиологии, включая алкогольную, является фактором риска развития гепатоцеллюлярной карциномы. При алкогольном циррозе печени ведущим звеном в патогенезе опухоли является воспалительный процесс, сопровождающийся оксидантным повреждением гепатоцитов (Бредер В.В., 2016; Joshi K. et al., 2016).

1.3. Влияние этанола на структуру циркадных ритмов млекопитающих.

К настоящему времени хорошо известно, что стрессогенные воздействия различной природы обладают способностью влиять на структуру ЦР организма. При этом стресс небольшой силы упорядочивает ЦР, а сильный в состоянии вызвать десинхроноз. Как свидетельствуют клинические наблюдения, при алкоголизме десинхроноз нередко является одним из первых его проявлений (Паначев И.В. с соавт., 2015; Rosenwasser A.M., 2015; Davis 4th B.T. et al., 2017; Davis B.T. 4th et al., 2018). Примечательно, что еще в 1981 году 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).

При оценке влияния алкоголя на организм млекопитающих в хронобиологическом контексте выделяют, во-первых, его хроноэффекторное действие алкоголя, имея изменение его эффективности в зависимости от времени суток, в которое его потребляют. В частности, установлено, что алкоголь наиболее ярко проявляет свое деструктивное действие, если вводится в самом начале периода суточной активности (у дневных животных – утром, у ночных – вечером) (Danel T., Touitou Y., 2004).

Во-вторых, значительная часть исследований влияния алкоголя на биоритмы различных параметров организма, так называемый хроноэффекторный подход, указывает на необходимость учета других факторов помимо времени его употребления (Wasielewski J.A., Holloway F.A., 2001).

Как упоминалось выше, хроническим воздействием высоких концентраций этанола индуцируется его метаболизм с помощью *CYP2E1*. Было показано, что воздействие алкоголя на ткань кишечника крыс в высоких концентрациях способствует высвобождению кислородных радикалов (Cederbaum A.I. et al., 2001; Pronko P. et al., 2002). Активные формы кислорода, генерируемые *CYP2E1*, могут повреждать клеточные защитные системы, что приводит к

окислительному стрессу и разнообразным патологическим последствиям для различных систем, включая циркадный ритм (Caro A.A., Cederbaum A.I., 2004). Многие белки основных циркадных часов (*CLOCK*, *BMAL1*, *PER1-3*, *CRY1-2*) содержат PAS-домены, чувствительные к окислительно-восстановительным процессам, поэтому опосредованный алкоголем окислительный стресс также влияет на циркадные часы. Так, у людей, страдающих алкоголизмом показано изменение экспрессии белков основных циркадных генов (*Clock*, *Bmall*, *Per1*, *Per2*, *Cry1* и *Cry2*) (Huang M.C. et al., 2010; Ozburn A.R. et al., 2013; Hasler V. P. et al., 2015).

Этанол, влияя на СХЯ, изменяет ЦР физической активности, реакцию на световую и не световую стимуляцию (Prosser R.A. et al., 2008; Logan R.W. et al., 2010; Brager A.J. et al., 2010; 2011). Показано, что патологическое влечение к алкоголю у лиц, страдающих алкоголизмом, также обладает собственным ЦР, не зависящим от цикла «сон/бодрствование» пациента. Пиком максимума этого ритма выступает период с 9:00 до 11:00 часов (Danel T. et al., 2003).

Описаны примеры, когда нарушения ЦР из-за длительной сменной работы (Schluter P.J. et al., 2012; Virtanen M. et al., 2015), сдвиг по фазе фотопериода или пребывание в условиях постоянного освещения увеличивают как объем потребления алкоголя человеком, так и вероятность его предпочтения воде у лабораторных животных (Hammer S.B. et al., 2010; Rosenwasser A.M. et al., 2010; Morikawa Y. et al., 2014) а Perreau-Lenz S. и Spanagel R. (2004) выявили роль генов *Per* в стресс-индуцированном потреблении алкоголя. В литературе есть указания на то, что не только употребление алкоголя изменяет функционирование СХЯ, но и нарушение нормальной организации биоритмов организма способствует влечению к алкоголю и более быстрому течению алкогольной болезни (Udoh U.S. et al., 2015).

Другие исследователи считают, что влияние этанола на циркадные ритмы в периферических органах может быть более сильным, чем его воздействие на ритмическую деятельность СХЯ. Так, показано, что в присутствии алкоголя

циркадный ритм в СХЯ, определяемый по экспрессии *Per2*, не был нарушен. Однако в печени при этом его прием индуцировал значительный фазовый сдвиг суточной экспрессии гена, изменение липидного обмена и развитие стеатоза, а также нарушение ритмичности и уровня экспрессии некоторых метаболических генов (Filiano A.N. et al., 2013). Было установлено, что хроническая алкогольная интоксикация вызывает сдвиг фазы ЦР печени на 3 часа, не влияя на ЦР клеток СХЯ (Yoo S.H. et al., 2004), приводя тем самым к рассогласованию между ритмами клеток печени и СХЯ, нарушению ритмичности в работе генов, участвующих в синтезе желчных кислот, увеличению экспрессии генов, отвечающих за метаболизм липидов, обмен которых изменяется на фоне снижения содержания гликогена в гепатоцитах (Zhou P. et al., 2014). Истощение запасов гликогена объясняется хроническими изменениями зависимых от ЦР ключевых компонентов метаболизма этого углевода (Udoh U.S. et al., 2015)

По некоторым данным, употребление даже малых доз алкоголя в течение 14 дней вызывает фазовый сдвиг ритма мелатонина и ритма экспрессии циркадных генов в мононуклеарных клетках крови, что свидетельствует о влиянии алкоголя как на центральные, так и на периферические звенья циркадной системы человека (Swanson G.R. et al., 2016). Показано, что влияние этанола в раннем постнатальном онтогенезе вызывает стойкие изменения в ритме экспрессии *Cry1* в СХЯ при одновременном увеличении фазы ритма *Per2* в печени (Farnell Y.Z. et al., 2008).

В многочисленных работах подчеркивается, что нарушения циркадной ритмичности, спровоцированные факторами окружающей среды или непосредственно алкоголем, имеют решающее значение для повышения восприимчивости органов ЖКТ и печени к этанол-индуцированным 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). Показано что у нокаут часовых генов *Clock* и *Per2* у мышей приводит к значительно более быстрому развитию алкоголь-индуцированного

стеатоза, фиброза и цирроза печени по сравнению с контролем (Forsyth C.V. et al., 2013; Swanson G.R. et al., 2016). При этом провоспалительные цитокины, которым принадлежит ведущая роль в патогенезе алкогольного повреждении печени (Маевская М.В., Буеверов А.О., 2009) также, в свою очередь, могут нарушать нормальное функционирование циркадных генов (An L., et al., 2012; Haas S., Straub R.H., 2012; Kawaratani H. et al., 2013; Lopez M. et al., 2014).

Следует упомянуть, что этанол влияет на эпифиз и его основной гормон – мелатонин. В работах Wetterberg L. et al. (1992), Angarita G.A. et al. (2016) подчеркивается, что при алкоголизме существенно снижается продукция ночного мелатонина, причем снижение сохраняется как во время абстиненции (Fonzi S. et al., 1994; Spanagel R. et al., 2005), так и на стадии ремиссии (Stevens R.G. et al., 2000; Ait-Daoud N. et al., 2019). Также имеются свидетельства о полном или частичном нарушении функционирования эпифиза при алкоголизме (Боровина Н.И., Насташинская Л.М., 1990; Martínez-Salvador J. et al., 2018).

При обследовании пациентов с алкогольной болезнью печени были выявлены существенные расстройства циркадной ритмики, которые проявлялись в извращении цикла «сон–бодрствование» в результате нарушения синтеза мелатонина (Zawilska J.V. et al., 2009; Bruyneel M., Sersté T., 2018; Hu C. et al., 2019). Оценивая ведущую роль эпифиза в формировании циркадной ритмики путем синтеза и выделения мелатонина – основного маркера биоритмов, Анипченко А.В. с соавт. (2012) приходят к выводу о том, что при длительной алкогольной интоксикации этот орган постепенно утрачивает свои хронобиологические характеристики. Кроме того, этими авторами высказывается предположение, что быстрое физиологическое старение алкоголиков обусловлено именно депрессией выработки мелатонина.

Кроме хрономодулирующего действия, мелатонин выполняет набор функций, обеспечивающих непосредственную защиту печени от воздействия патогенных факторов. По некоторым данным, при пинеалэктомии или в условиях длительного постоянного освещения у крыс развивается фиброз печени

(Chen L. et al., 2019). Показано, что мелатонин снижает уровень повреждения печени при модельных патологиях фиброза и цирроза печени за счет ослабления окислительного стресса, снижает степень старения желчных путей (Cruz A. et al., 2005; Wang H. et al., 2005; Hu S. et al., 2009; Wu N. et al., 2017).

Таким образом, как нарушения ритмичности, так и уменьшение синтеза и выделения мелатонина вследствие хронической алкогольной интоксикации могут являться причиной структурно-функциональных изменений в печени, в том числе и нарушения ритмостаза органа.

В литературе есть указания на использование в практике препаратов, регулирующих ЦР при различных метаболических заболеваниях (Meng Q.J. et al., 2010). Показано, что ингибирование *CSNK1*, с которым ассоциирован синдром расширенной фазы сна, с помощью препарата PF-670462 предотвращает рецидив алкоголизации у крыс (Perreau-Lenz S. et al., 2012). В связи с этим есть основания предположить, что применение хронотерапевтического подхода в лечении АБП может принести ощутимые результаты.

Таким образом, согласно современным литературным данным ЦР печени являются эндогенными, генетически обусловленными (гены *Per1*, *Per2*, *Cry* и др.), модулируемыми воздействием внешних времязадатчиков, важнейшим из которых является свет. Регуляция и синхронизация ЦР печени осуществляются нейроэндокринным путем (эфферентное влияние вегетативной нервной системы, мелатонин, кортикостероиды и др.). Нарушение нормальной циркадной ритмичности может явиться одним из факторов, вызывающих существенные изменения в гомеостазе печени и всего организма.

Длительное злоупотребление алкоголем представляет серьезную медицинскую и социальную проблему. Хроническая алкогольная интоксикация оказывает повреждающее действие на все органы, однако повреждение самой печени, в свою очередь, служит причиной выраженных вторичных нарушений в работе внутренних органов и их систем.

Однозначно установлено, что хроническое употребление алкоголя изменяет нормальное функционирование как центральных, так и периферических ритморганизующих структур, препятствуя нормальному функционированию печени, что выражается в нарушении функциональных возможностей органа, его ритмостаза и развитии в нем стеатоза, фиброза и цирроза.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования.

Работа выполнена на 160 самцах крыс аутбредного стока Вистар в возрасте 6 месяцев, с массой тела 350 г. Животные были получены из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА России «Столбовая». Всех животных содержали в пластиковых клетках при температуре 20-22°C и относительной влажности воздуха 60-70%, свободном доступе к питью и пище в течение 3 недель. До начала эксперимента всех животных содержали при естественном освещении. Крысы имели свободный доступ к питьевой воде и брикетированному корму ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб», сертификат соответствия № РОССТУ.п081.В00113, ГОСТ Р50258-92). 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.). На проведение исследования получено одобрение Комиссией по биоэтике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» (Москва), протокол №27(3).

2.2. Дизайн исследования.

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).

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

2-ю группу (n=40) содержали в стандартных лабораторных условиях при постоянном освещении.

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

Критерием отбора крыс в исследование, наряду с отсутствием видимых отклонений в состоянии и поведении, было исходное предпочтение 15-% раствора этилового спирта водопроводной воде. Для этого был проведен предварительный эксперимент в течение 3 суток в индивидуальных клетках со свободным доступом к обеим жидкостям.

В течение эксперимента ежедневно определяли объем выпитого раствора этанола, затем вычисляли массу спирта на 1 кг массы тела. В среднем в животные выпивали $15,48 \pm 1,28$ мл/сут, что в пересчете на абсолютный этанол составляет 7г/кг массы тела.

Эвтаназию осуществляли спустя три недели после начала эксперимента в углекислотной камере, оборудованной устройством для верхней подачи газа (100% CO₂) в 9:00, 15:00, 21:00 и 3:00. Камеру заполняли газом со скоростью 20% в минуту во избежание возникновения у животных диспноэ и боли. Предварительно животным измеряли ректальную температуру. После умерщвления проводили забор крови для гематологических и биохимических исследований и эвисцерацию.

2.3. Морфологические методы.

Печень фиксировали в 10-% нейтральном забуференном формалине, проводили через спирты возрастающей концентрации (50°, 60°, 70°, 80° и 96°), заливали в гистологическую среду «Гистомикс» (БиоВитрум, Россия). Полученные срезы окрашивали гематоксилином и эозином и пикрофуксином по Ван Гизону-Фуше. Окрашенные срезы заключали в монтирующую среду БиоМаунт (Био-Витрум, Россия).

Для идентификации жировой дистрофии проводили стандартное селективное окрашивание замороженных срезов раствором судана-III в 70-% этиловом спирте. Для определения содержания гликогена проводили ШИК-реакцию.

Для плоидометрии проводили окраску мазков отпечатков печени фуксин-сернистой 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 $\times 400$, $\times 1000$, которые в дальнейшем использовали для кардио- и цитометрии. Для морфометрических исследований использовали программный комплекс Fiji, построенный на базе программы ImageJ v2 с соответствующими плагинами (Broeke J. et al., 2015). Измерения проводили в микрометрах после предварительной геометрической калибровки по оцифрованной с тем же увеличением шкале объективного микрометра. Осуществляли микроморфометрию только одноядерных интерфазных гепатоцитов без признаков патологических изменений. Определяли площадь поперечного сечения ядра (площадь ядра, $S_{я}$), короткий (d) и длинный (D) диаметры ядра, периметр ядра ($P_{я}$), площадь поперечного сечения клетки (площадь клетки, $S_{кл}$), короткий (a) и длинный (b) диаметры клетки.

С помощью соответствующих формул вычисляли ряд показателей.

Ядерно-цитоплазматическое отношение определяли по формуле:

$$ЯЦО = S_{я}/S_{кл} \quad (2.3.1)$$

где: $S_{я}$ – площадь поперечного сечения ядра клетки; $S_{кл}$ – площадь поперечного сечения (Автандилов Г.Г., 2002).

Средний диаметр ядра рассчитывали по формуле:

$$M = (D+d)/2 \quad (2.3.2)$$

где D – длиннейший диаметр, d – кратчайший диаметр (Smitha T. et al., 2011).

Объем ядра вычисляли по формуле:

$$V_{я} = 0,523M^3 \quad (2.3.3)$$

где M – средний диаметр ядра (Автандилов Г.Г., 2002).

Расчет объема клеток производили по формуле:

$$V_{\text{кл}} = 0,523M^3 \quad (2.3.4)$$

где M – средний диаметр клетки (Автандилов Г.Г., 2002).

Индекс удлиненности ядра вычисляли по формуле:

$$ИУ = D/d \quad (2.3.5)$$

где D –длиннейший диаметр, d – кратчайший диаметр (Smitha T. et al., 2011).

Для определения коэффициента формы ядра использовали формулу:

$$КФ = 4 \times \pi \times S_{\text{я}} / P_{\text{я}}^2 \quad (2.3.6)$$

где $S_{\text{я}}$ – площадь ядра, $P_{\text{я}}$ – периметр ядра (Smitha T. et al., 2011).

Индекс контура ядра, отражающий рельеф его поверхности, рассчитывали согласно формуле:

$$ИК = P_{\text{я}} / \sqrt{S_{\text{я}}} \quad (2.3.7)$$

где $S_{\text{я}}$ – площадь поперечного сечения ядра, $P_{\text{я}}$ – периметр ядра (Smitha T. et al., 2011).

Для количественной оценки содержания гистохимически выявляемых соединений определяли интенсивность их окрашивания на микрофотографиях (I), которую оценивали как яркость изображения в уровнях серого от 0 до 255. Таким же образом оценивали яркость фонового окрашивания препарата (I_0). Оптическую плотность исследуемой области рассчитывали в условных единицах по формуле:

$$D = \lg I_0 / I \quad (2.3.8)$$

где D – оптическая плотность продукта реакции, I_0 – интенсивность света, прошедшего через препарат без среза (фон), I – интенсивность света, прошедшего через препарат со срезом (Агроскин Л.С., Папаян Т.В., 1977; Ирьянов Ю.М. с соавт, 2004; Солонский А.В., 2008).

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 – кроличьи поликлональные (Cloud-Clone Corp. США), 1:300;

Per2 – кроличьи поликлональные (Cloud-Clone Corp. США), 1:200;

Bmall – кроличьи поликлональные (Cloud-Clone Corp. США), 1:200;

p53 – кроличьи поликлональные (Cloud-Clone Corp. США), 1:200;

Adh5 – кроличьи поликлональные (Cloud-Clone Corp. США), 1:300.

Срезы инкубировали с антителами в течение 60 мин при комнатной температуре. Контролем служили реакции с заменой первых антител на раствор фосфатного буфера. В качестве системы детекции использовали набор UltraVision Quanto Detection System (Thermo Fisher Scientific; США).

После того, как срезы приобретали голубой оттенок, стекла извлекали, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и ксилоле по стандартной схеме и заключали в монтирующую среду БиоМаунт (БиоВитрум, Россия).

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 (%).

2.4. Определение массы тела и печени.

Массу животных определяли в начале исследования, а затем на каждой неделе эксперимента при помощи весов OHAUS EX1003 (США) Печень после извлечения взвешивали при помощи лабораторных весов CAS CAUX-220 (Южная Корея), затем вычисляли относительную массу органа.

2.5. Электронная микроскопия

Образцы печени размером 2 мм³ фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида на фосфатном буфере (рН 7,4), дофиксировали в 1% растворе четырехокси осмия (OsO₄), 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 (Балканов А.С. с соавт., 2021).

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 проведения трансмиссионной электронной микроскопии оценивали форму ядра гепатоцита и его органелл (митохондрий, рибосом), выявляли наличие липидных вакуолей.

2.6. Биохимические методы.

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

2.7. Гематологические методы.

Образцы периферической крови собирали в пробирки с ЭДТА. В образцах крови выбранные гематологические показатели измеряли с помощью анализатора Abacus junior VET (Diatron°, Австрия). Исследовали следующие параметры: количество эритроцитов (RBC), гематокрит (HCT), гемоглобин (HGB), средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах (MCHC), ширина распределения популяции эритроцитов (RDWc).

Определение протромбинового времени (ПТ) осуществляли при помощи коагулометра TS4000Plus (HTI, США).

2.8. Измерение ректальной температуры.

Для измерения ректальной температуры использовали термометр BIO-TK8851 (Bioseb, США).

2.9. Методы статистической обработки.

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 (α) или вероятности ошибки отклонения от нулевой гипотезы или ниже 5% ($p < 0,05$). При построении столбчатых диаграмм 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 ЦР 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. Выходной информацией косинор-анализа являются основные параметры ритмов: мезор, т.е. величина среднего уровня синусоиды (h), амплитуда синусоиды (A) и акрофаза (Φ), то есть время наступления максимума функции. Мезор

совпадает по величине со среднесуточным значением исследуемой функции. Акрофаза — это мера пикового времени общей ритмической изменчивости за 24-часовой период, т.е. время наступления максимума функции. Амплитуда соответствует половине общей ритмической изменчивости в цикле. Акрофазу выражают в часах, значения амплитуды – в тех же единицах, что и исследуемые переменные.

Вторым этапом является построение эллипса ошибок, необходимого для определения достоверности существования ритмов на принятом доверительном уровне (в наших исследованиях – на уровне 0,95). Синусоида изображается на плоскости точкой, полярными координатами которой являются амплитуда и акрофаза. Все полученные таким образом точки в декартовых координатах рассматриваются как реализации двумерной случайной величины с гипотетически нормальным законом распределения, и строится эллипс рассеивания ошибок генерального среднего. Достоверным циркадный ритм считается при выполнении двух условий: усреднённая аппроксимирующая хронограммы синусоида (изображенная крестиком) должна входить в эллипс, он сам не должен проходить через центр координат (т.к. в данном случае акрофаза будет приходиться на весь 24 ч период) (Рис. 1). (Cornelissen G., 2014).

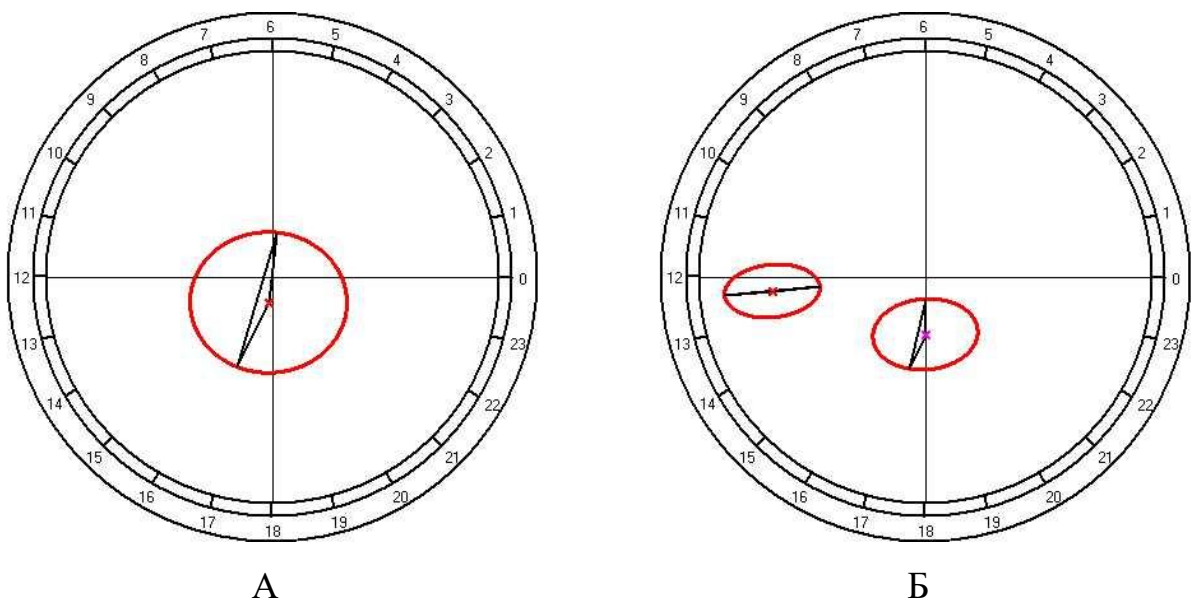


Рис. 1. А – Косинор-анализ суточной динамики содержания липидов в гепатоцитах крыс. Поскольку эллипс пересекает центр координат, ЦР недостоверен. Б – Косинор-анализ суточной динамики площади ядер гепатоцитов животных контрольной группы (малый эллипс) и животных, подвергнутых хронической алкогольной интоксикации (большой эллипс). Поскольку эллипсы не пересекают центр координат, ЦР достоверен. Видно, что в первой группе животных акрофаза ритма приходится на 12^{20} , во второй группе она сдвигается на 18^{18} , что сопровождается увеличением амплитуды ритма (увеличение размеров эллипса).

3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Влияние постоянного освещения и ХАИ на массу тела и печени крыс, морфологию печени и среднесуточную величину исследованных морфофункциональных параметров.

3.1.1. Влияние постоянного освещения и ХАИ на массу тела и печени крыс.

При анализе массы тела крыс нами не было обнаружено достоверных межгрупповых изменений, однако масса тела крыс II группы достоверно снизилась относительно начала эксперимента, а в III группе снижение было отмечено на 1 и 2-й неделе исследования (Табл. 1).

Таблица 1. Динамика массы тела крыс в эксперименте, г.

Группа	Этап эксперимента			
	Начало эксперимента	1 неделя эксперимента	2 неделя эксперимента	3 неделя эксперимента
Контроль, (n=40)	350,90±42,3	344,01±21,1	347,01±21,57	348,74±21,86
I группа, (n=40)	352,7±41,80	342,50±42,29	344,50±44,53	344,56±46,03
II группа, (n=40)	353,90±23,40	333,0±21,0***	333,90±22,81***	340,60±23,54*
III группа, (n=40)	351,50±18,20	332,20±14,97***	332,80±17,76***	346,70±21,33

Примечание: *($P \leq 0,05$); **($P \leq 0,005$); ***($P \leq 0,0005$) – в сравнении с массой тела животных в начале эксперимента.

В то же время масса печени у животных II и III экспериментальных групп оказывается выше, чем в контроле, что также справедливо и в отношении относительной массы органа (Рис. 2).

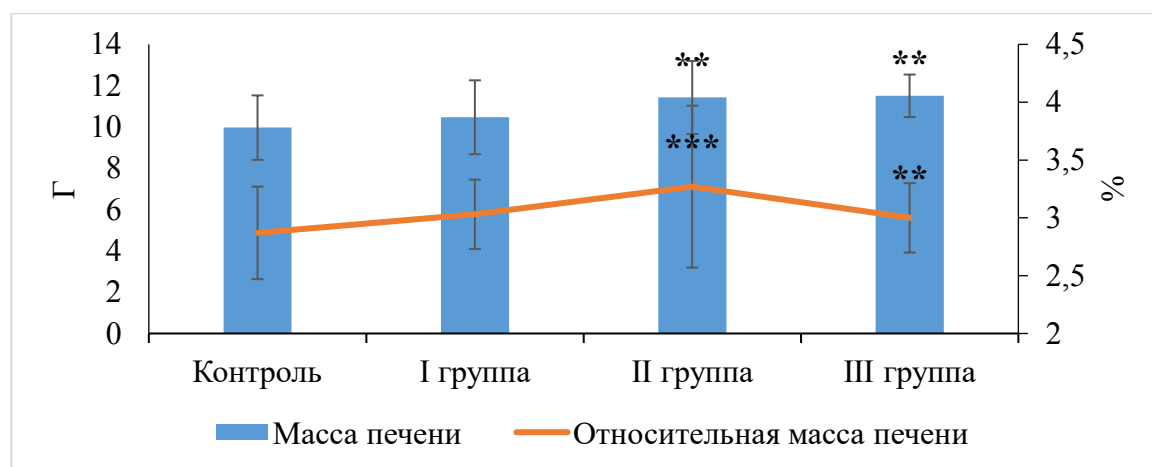
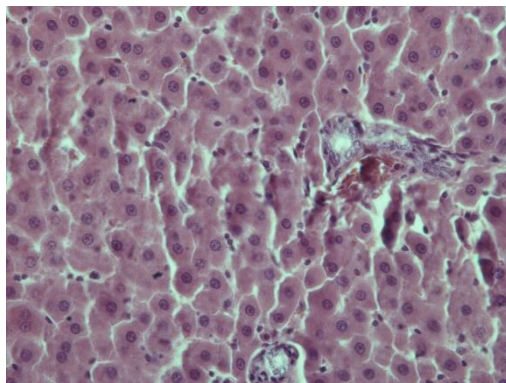


Рис. 2. Абсолютная и относительная масса печени крыс. Примечание: здесь и далее *($P \leq 0,05$); **($P \leq 0,005$); ***($P \leq 0,0005$) – в сравнении показателями животных контрольной группы.

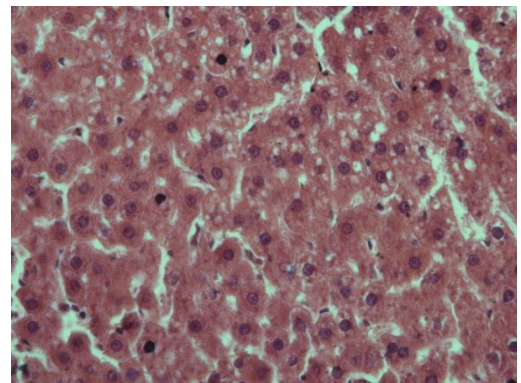
3.1.2. Влияние постоянного освещения и ХАИ на морфологию печени.

Морфологическая картина печени крыс контрольной группы соответствовала возрастной норме. Печень имела балочное строение и сохранную структуру печеночных пластинок, составленных гепатоцитами полигональной формы с округлым центрально расположенным ядром, без признаков дистрофических изменений и некроза (Рис. 3, А). В печени крыс первой экспериментальной группы обнаружено значительное количество гепатоцитов, содержащих вакуоли (Рис. 3, Б). Контрольная окраска суданом-III выявила липидные капли в цитоплазме гепатоцитов данной группы, что подтверждает жировую дистрофию печени. При этом в данной группе мы наблюдали как единичные клетки, так и группы гепатоцитов в состоянии некроза и апоптоза (Рис. 6, А).

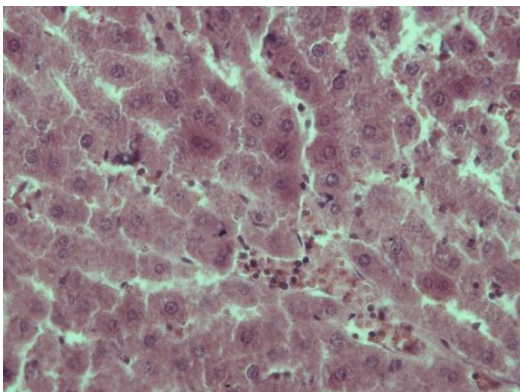
На ультраструктурном уровне в гепатоцитах крыс данной группы наблюдали маргинальное распределение хроматина вдоль ядерной плазмолеммы, вакуоли с содержимым неравномерной электронной плотности (в т.ч. содержащие липиды), локальное набухание митохондрий (Рис. 4, А, Б).



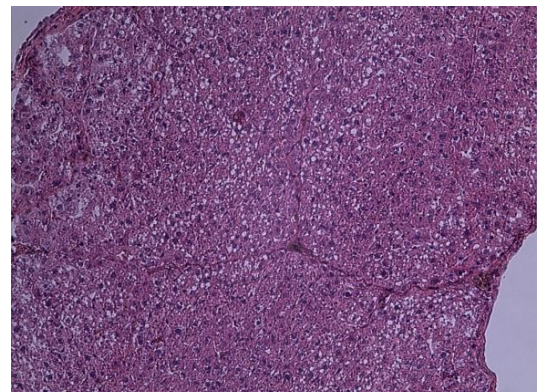
А



Б



В



Г

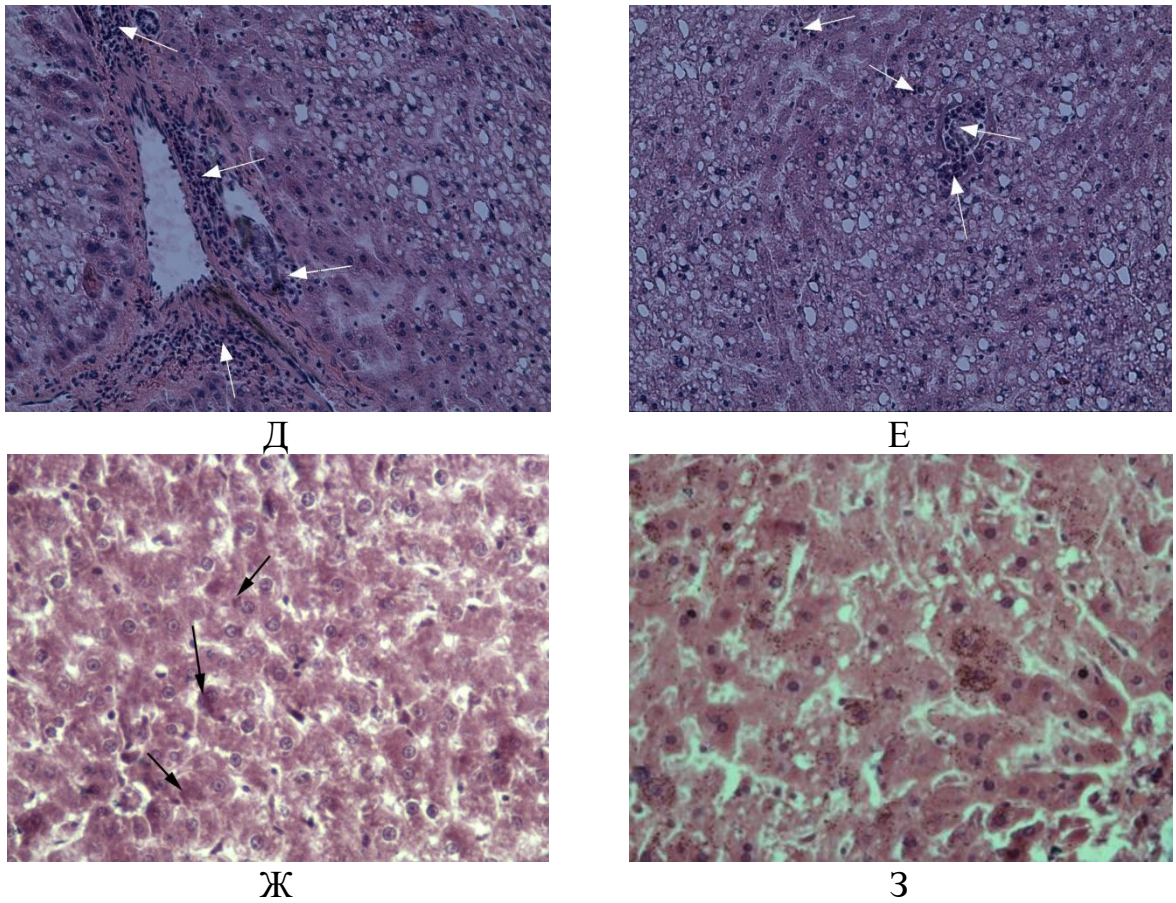


Рис. 3. Печень крыс: А – контрольной группы; Б – 1-й экспериментальной группы, мелкокапельная жировая дистрофия большинства гепатоцитов; В – 2-й экспериментальной группы, некроз отдельных гепатоцитов; Г, Д, Е – 3-й экспериментальной группы, очаговая и распространенная крупнокапельная жировая дистрофия гепатоцитов, соединительнотканые прослойки, формирующие ложные дольки, стрелками указаны скопления клеток воспалительного инфильтрата; Ж – печень крыс 3-й экспериментальной группы, стрелками обозначены тельца Мэллори-Денка; З – скопления липофусцина в гепатоцитах крыс 3-й экспериментальной группы. Окраска гематоксилином и эозином, А, Б, В, Д, Е, Ж, З $\times 400$, Г $\times 200$.

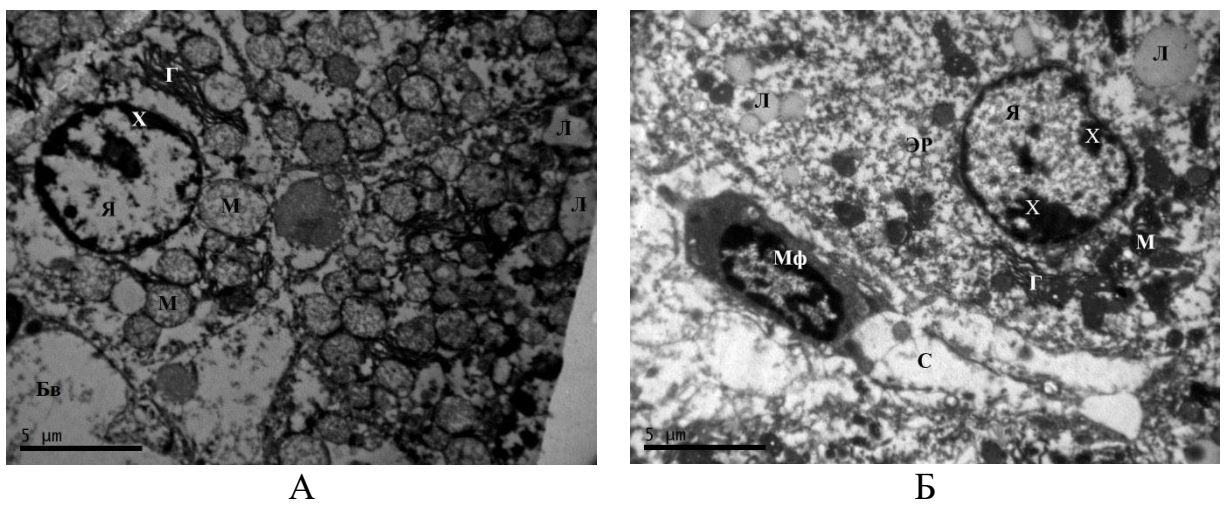


Рис. 4. Ультраструктура гепатоцитов I экспериментальной группы, ТЭМ, $\times 8000$. А: набухание гепатоцита, в цитоплазме вакуоли, содержащие аморфные электронно-плотные белковые включения (Бв) и липиды (Л), локальное набухание митохондрий (М), маргинальное распределение хроматина вдоль ядерной плазмолеммы; Б: макрофаг в перисинусоидаль-

ном пространстве (Мф), липидные вакуоли в цитоплазме гепатоцита (Л). Условные обозначения: Г – комплекс Гольджи; Л – липиды; М – митохондрии; Мф – макрофаг; С – перисинусоидальное пространство; Х – хроматин; ЭР – шероховатый эндоплазматический ретикулум; Я – ядро.

Печень крыс второй экспериментальной группы практически сохраняла нормальное строение, но в ней появились единичные некротизированные гепатоциты, а также клетки с признаками мелкокапельной жировой дистрофии (Рис. 3, В). В гепатоцитах животных данной группы на ультраструктурном уровне мы отметили изменение формы ядер, набухание цитоплазмы (Рис. 5, А), феномен осыпания рибосом (Рис. 5, Б), присутствие липидных капель (Рис. 5, В), наличие гиперплазии митохондрий. Митохондрии данных клеток отличались небольшим размером и высокой электронной плотностью.

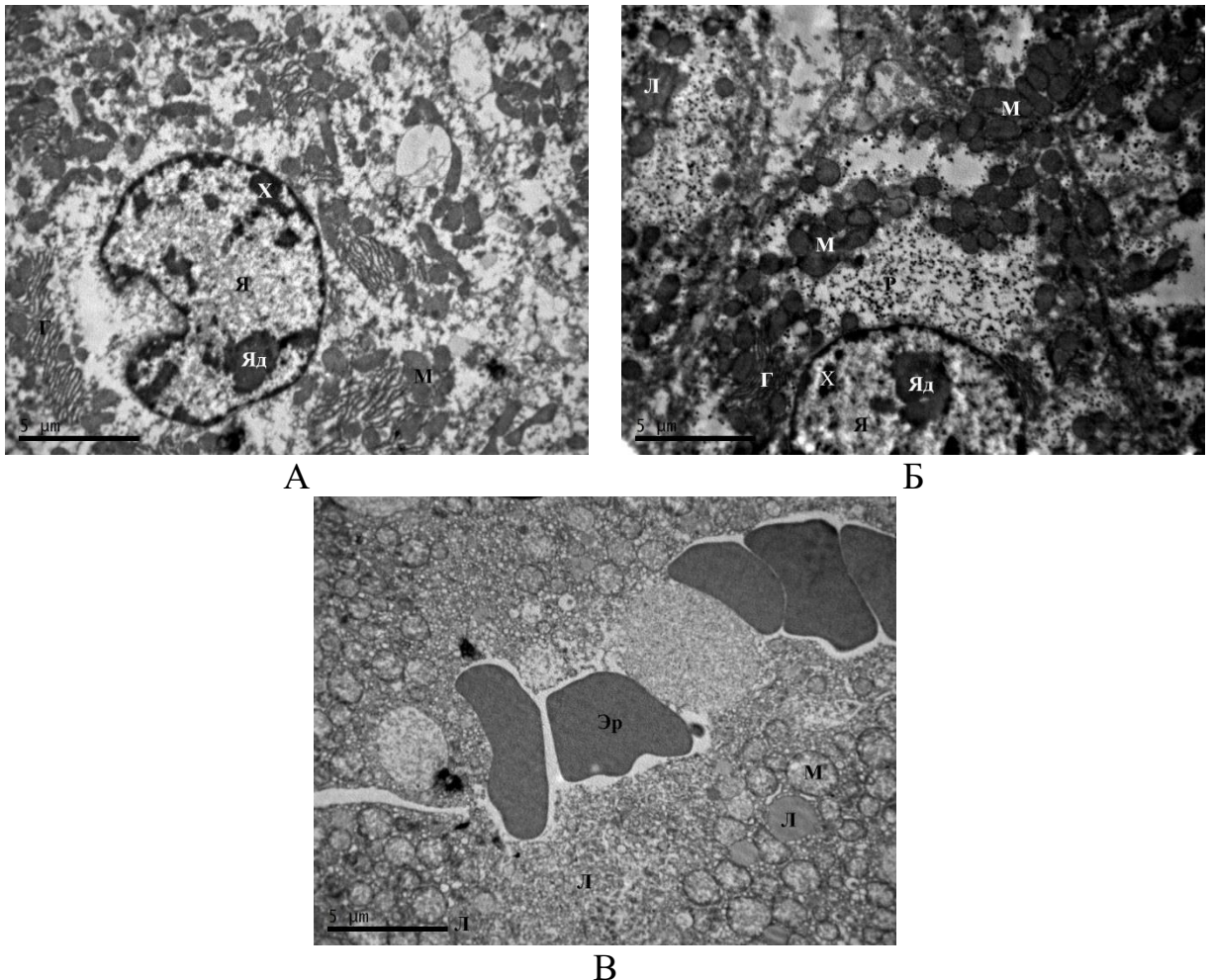


Рис. 5. Ультраструктура гепатоцитов II экспериментальной группы, ТЭМ, $\times 8000$. А: инвагинация кариолеммы ядра гепатоцита. Б: феномен осыпания рибосом. В: полнокровие синусоида. Условные обозначения: Г – комплекс Гольджи; Л – липиды; М – митохондрия; Х – хроматин; Эр – эритроцит; Я – ядро; Яд – ядрышко.

Более чем у половины животных третьей экспериментальной группы выявлены морфологические признаки алкогольного гепатита (Рис. 3, Г,Д,Е): включения в них липофусцина и телец Мэллори-Денка (Рис. 3, Ж,З), некроз, клетки в процессе апоптоза (Рис. 6, Б), мелко- и крупнокапельная жировая дистрофия (Рис. 7), инфильтрат из нейтрофильных лейкоцитов, лимфоцитов и макрофагов, локализованный в портальных трактах и проникающий в печеночную дольку. У 2% животных балочное строение органа нарушено, выявлены мелкие мономорфные узлы-регенераты (ложные дольки), разделенные узкими прослойками соединительной ткани (Рис. 8).

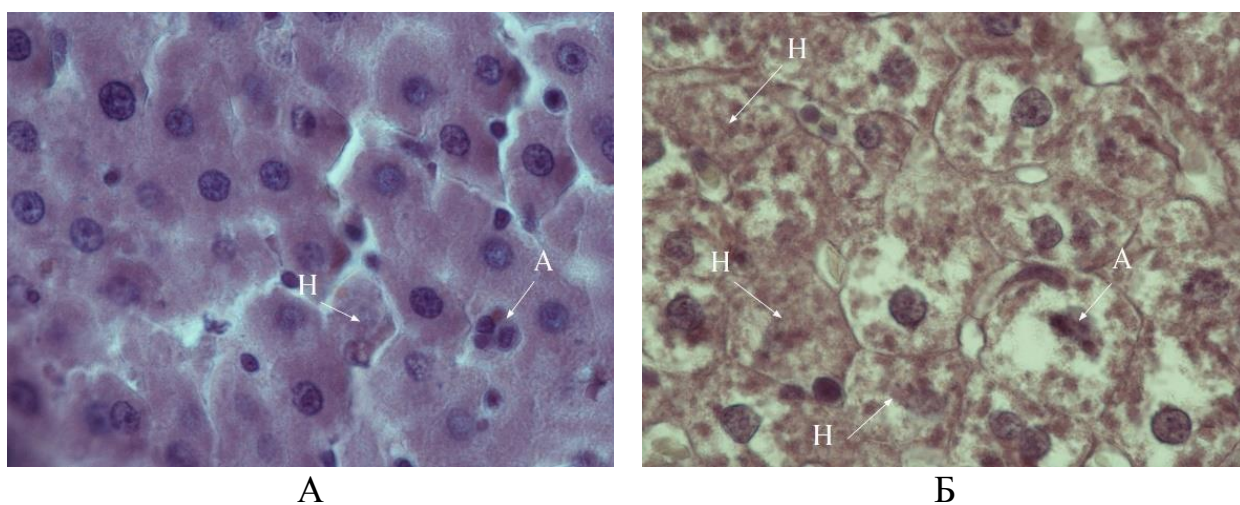


Рис. 6. Печень крыс: А – I экспериментальной группы; Б – III экспериментальной группы. А: некроз (Н) и апоптоз (А) единичных гепатоцитов. Б: некроз групп гепатоцитов (Н). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 1000$.

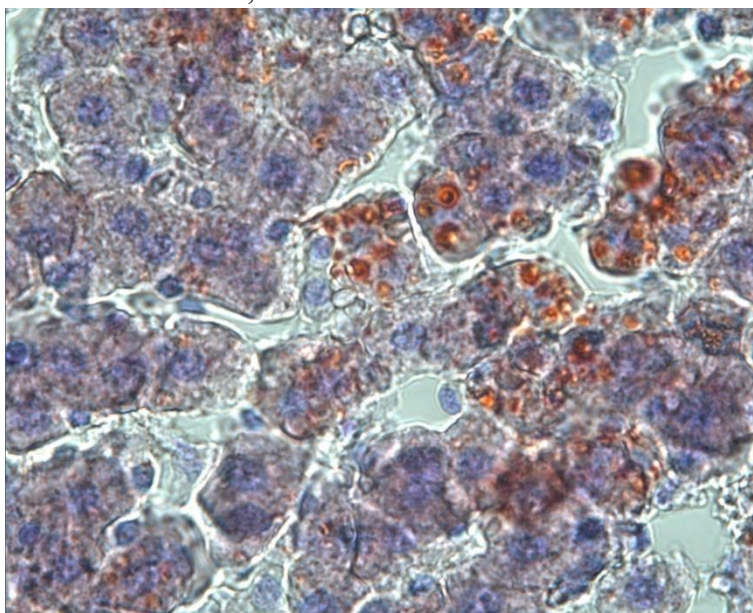


Рис. 7. Липидосодержащие вакуоли в клетках печени животных III экспериментальной группы. Окраска суданом-III с докраской гематоксилином, $\times 1000$.

В гепатоцитах животных третьей экспериментальной группы при электронно-микроскопическом исследовании мы наблюдаем наличие пикнотичных ядер. Количество липидных вакуолей в данной группе значительно выше, чем в предыдущих. (Рис. 9).

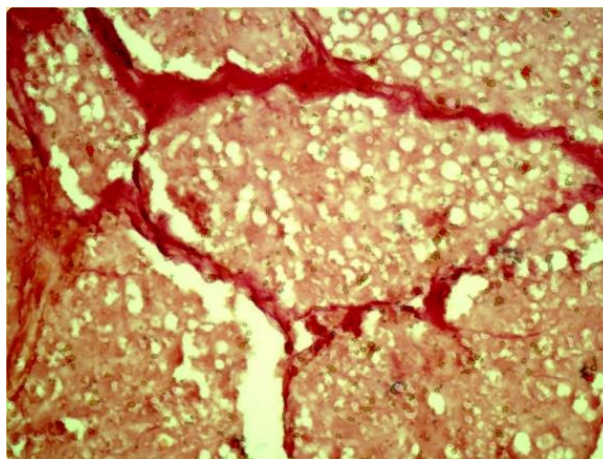


Рис. 8. Ложная долька, образованная прослойками соединительной ткани в печени животных III экспериментальной группы. Окраска пикрофуксином по Ван Гизону-Фуше, $\times 200$.

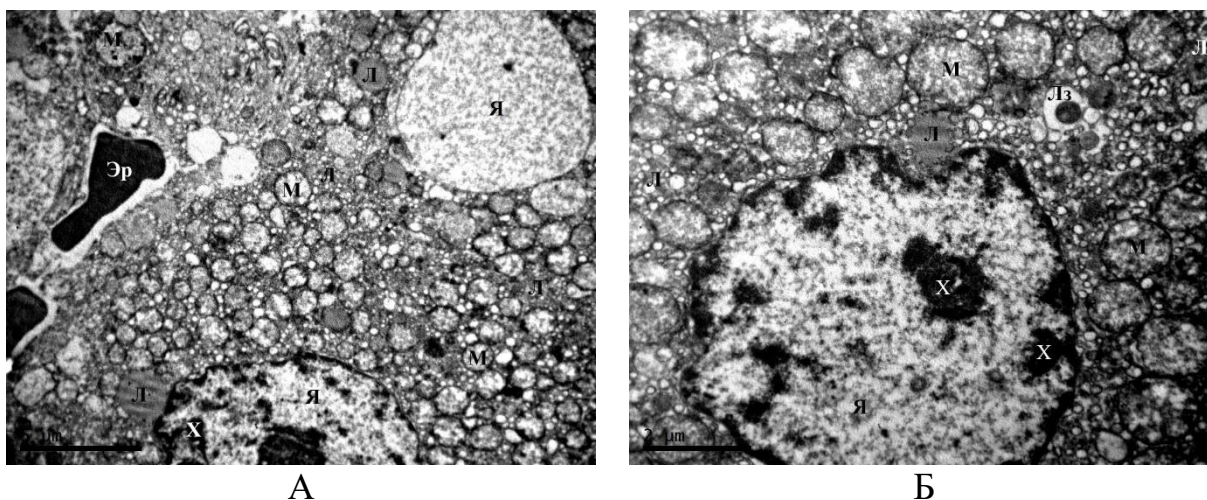


Рис. 9. Ультраструктура гепатоцитов III экспериментальной группы, ТЭМ, А – $\times 8000$, Б – $\times 14000$. Прогрессирование дистрофических и некробиотических изменений в гепатоцитах (кариопикноз, кариолизис). Условные обозначения: Л – липиды; Лз – лизосома; М – митохондрия; Х – хроматин; Эр – эритроцит; Я – ядро.

3.1.3. Влияние постоянного освещения и ХАИ на величину микрометрических показателей гепатоцитов.

Результаты кариометрии показали, что площадь поперечного сечения ядер гепатоцитов и их объемы в I и II экспериментальных группах практически не отличались от показателей контроля, но в III экспериментальной группе отмечено существенное снижение этого параметра как относительно контроля,

так и относительно показателей I и II экспериментальных групп (Табл. 2,3). Аналогичным образом в течение эксперимента изменился и периметр ядер гепатоцитов.

В то же время средний диаметр гепатоцитов оказывается наибольшим во второй экспериментальной группе, при этом эта величина достоверно отлична от показателей других групп.

Таблица 2. Результаты микроморфометрических исследований гепатоцитов крыс.

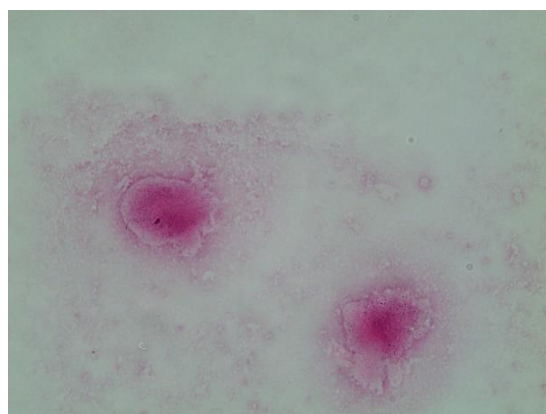
	Контроль	I группа	II группа	III группа
Площадь поперечного сечения ядра, мкм ²	41,79±8,13	42,65±4,80	42,72±5,63	35,50±3,01
Объем ядра, мкм ³	205,90±59,54	210,51±35,39	211,30±41,67	159,59±20,23
Отношение объема ядра к площади ядра (V/A коэффициент)	4,84±0,47	4,90±0,27	4,90±0,32	4,48±0,19
Периметр ядра, 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 ²	185,80±31,95	190,10±34,03	261,90±55,30	184,80±21,67
Объем клетки, мкм ³	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

Таблица 3. Достоверность межгрупповых различий исследованных микроморфометрических показателей.

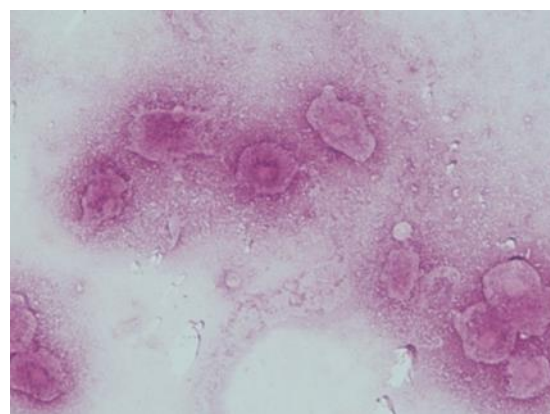
	К×1ЭГ	К×2ЭГ	К×3ЭГ	1ЭГ×2ЭГ	1ЭГ×3ЭГ	2ЭГ×3ЭГ
Площадь поперечного сечения ядра, мкм ²	>0,05	>0,05	<0,0005	>0,05	<0,0005	<0,0005
Объем ядра,	>0,05	>0,05	<0,0005	>0,05	<0,0005	<0,0005

	К×1ЭГ	К×2ЭГ	К×3ЭГ	1ЭГ×2ЭГ	1ЭГ×3ЭГ	2ЭГ×3ЭГ
мкм ³						
Отношение объема ядра к площади ядра (V/A коэффициент)	>0,05	<0,0005	<0,005	<0,0005	<0,005	<0,0005
Периметр ядра, мкм	>0,05	>0,05	<0,0005	>0,05	<0,0005	<0,0005
Длинный диаметр ядра, мкм	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,0005
Короткий диаметр ядра, мкм	>0,05	<0,0005	>0,05	<0,0005	>0,05	<0,0005
Средний диаметр ядра, мкм	>0,05	<0,005	>0,05	<0,05	>0,05	<0,0005
Индекс удлиненности	>0,05	<0,0005	>0,05	<0,0005	>0,05	<0,05
Коэффициент формы	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	<0,005	<0,0005
Индекс контура	>0,05	>0,05	<0,0005	>0,05	<0,0005	<0,0005
Площадь поперечного сечения клетки, мкм ²	>0,05	<0,0005	>0,05	<0,0005	>0,05	<0,0005
Объем клетки, мкм ³	>0,05	<0,0005	>0,05	<0,0005	>0,05	<0,0005
ЯЦО	>0,05	<0,0005	<0,005	<0,005	<0,005	<0,05
Плоидность гепатоцитов, п	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05
Доля двуядерных гепатоцитов, %	>0,05	<0,005	>0,05	<0,0005	<0,005	<0,05

Плоидность ядер гепатоцитов относительно контроля достоверно снизилась только во второй экспериментальной группе, однако имеются некоторые межгрупповые различия (Рис. 10).



А



Б

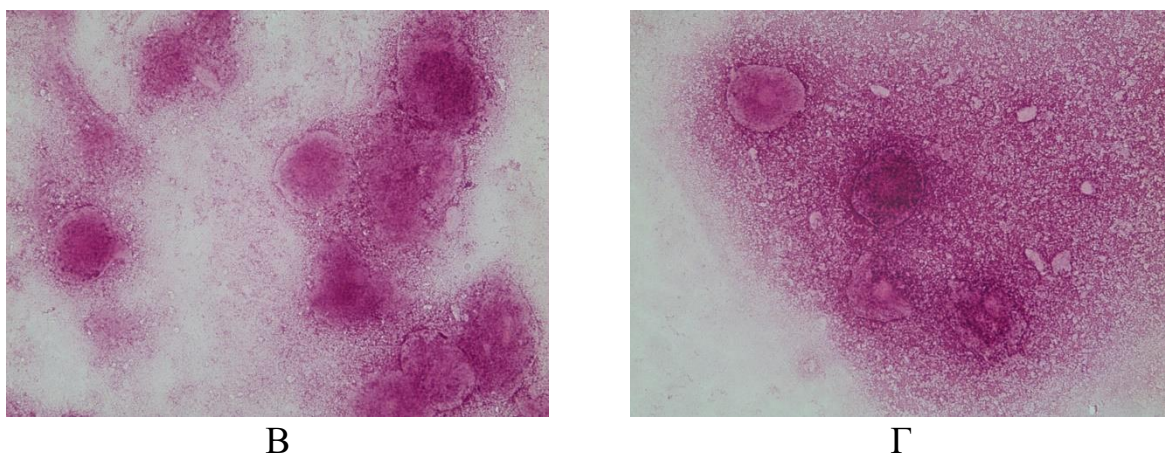


Рис. 10. Мазки-отпечатки печени крыс: А – контрольной группы, Б – 1-й экспериментальной группы, В – 2-й экспериментальной группы, Г – 3-й экспериментальной группы. Окраска фуксинсернистой кислотой по Фельгену, $\times 1000$. Повышение интенсивности окраски ядра свидетельствует об увеличении пloidности гепатоцита.

Во второй экспериментальной группе нами отмечено снижение ЯЦО, произошедшее за счет гипертрофии гепатоцитов.

При рассмотрении результатов кариометрии в данной группе нами выявлено увеличение как длинного, так и короткого, и, соответственно, среднего диаметра ядра гепатоцитов. Следственно, меняется индекс удлинённости ядер, что говорит о некотором изменении формы ядра в сторону шаровидности.

В гепатоцитах крыс третьей экспериментальной группы отклонения ряда исследованных кариометрических параметров от показателей контроля носят более выраженный характер.

В частности, в клетках этой группы существенно уменьшилась площадь поперечного сечения, периметр и объем ядра, что, при неизменной площади поперечного сечения клетки, вызвало и снижение ЯЦО, а также отношения объема ядра к площади. Сочетанное воздействие алкоголя и постоянного освещения привело к развитию иной морфологической картины, чем у животных, подверженных только постоянному освещению. В печени крыс данной группы мы наблюдали значительное число мелких клеток, по всей видимости, недавно вышедших из процесса деления, что снизило средние показатели площади поперечного сечения гепатоцита до значений, близких к значениям контроля.

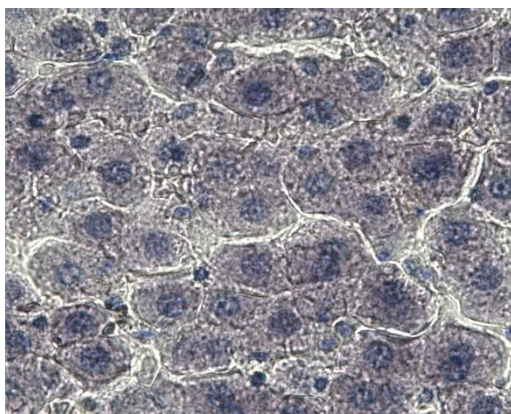
Число двуядерных клеток возросло по сравнению со II экспериментальной группой и также приблизилось к значениям контроля.

Примечательно, что практически неизменными в третьей группе остаются диаметры ядра и, соответственно, индекс удлиненности, но существенно отличаются от показателей контроля параметры, характеризующие его форму. Так, в клетках печени крыс этой группы происходит снижение индекса контура, но увеличивается коэффициент формы, что свидетельствует о том, что границы ядра гепатоцита становятся неровными. Ядра гепатоцитов этой группы приобретают неправильную форму, отклоняясь от окружности.

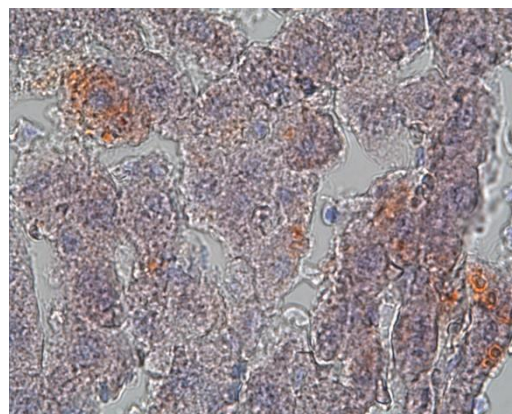
3.1.4. Влияние постоянного освещения и ХАИ на содержание липидов и гликогена в гепатоцитах.

Анализ содержания липидов в гепатоцитах крыс (Рис. 11) позволил установить достоверное повышение их содержания относительно контроля ($0,308 \pm 0,028$ ед. опт. пл.) в клетках крыс всех экспериментальных групп: $0,443 \pm 0,051$ ед. опт. пл. в первой группе, $0,397 \pm 0,031$ ед. опт. пл. во второй и $0,476 \pm 0,038$ ед. опт. пл. в третьей группе (Рис. 12). При этом достоверные межгрупповые отличия обнаружены только при сравнении содержания липидов в клетках печени крыс I и III экспериментальных групп.

В то же время содержание гликогена в клетках паренхимы печени (Рис. 13) достоверно уменьшилось относительно $0,303 \pm 0,087$ ед. опт. пл. в контроле только в печени крыс второй группы, составляя $0,247 \pm 0,074$ ед. опт. пл. (Табл.4).



А



Б

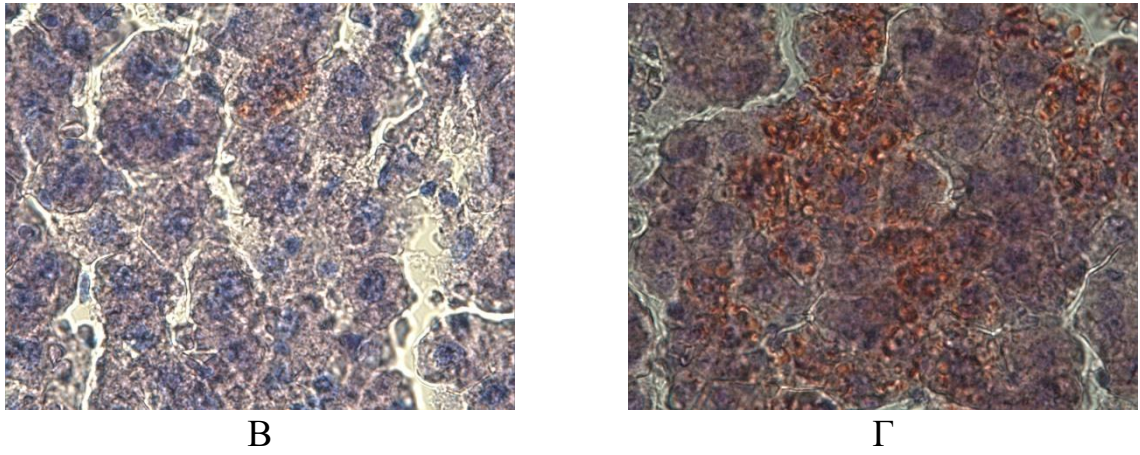


Рис 11. Липиды в гепатоцитах крыс: А – контрольной группы, Б – I экспериментальной группы, В – II экспериментальной группы, Г – III экспериментальной группы. Окраска суданом III с докраской гематоксилином, $\times 1000$. Максимальное содержание липидов (вакуоли, окрашенные в оранжевый цвет) – в гепатоцитах животных III экспериментальной группы.

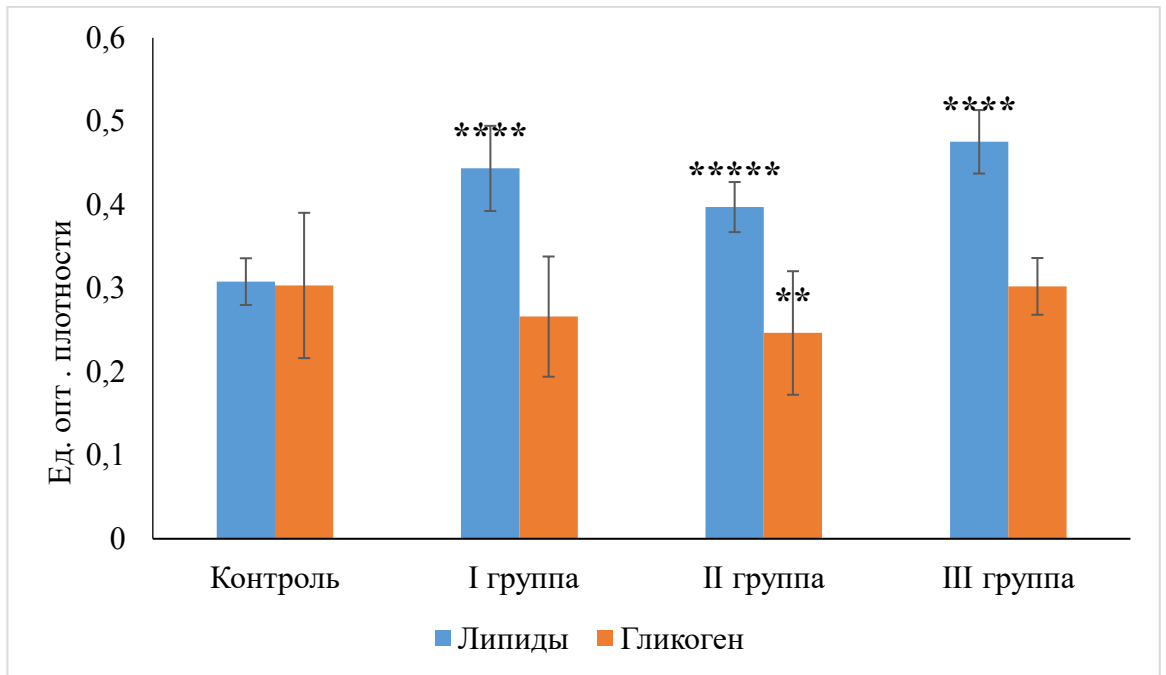


Рис. 12. Содержание липидов и гликогена в гепатоцитах крыс.

Таблица 4. Достоверность межгрупповых различий исследованных гистохимических показателей.

	К \times 1ЭГ	К \times 2ЭГ	К \times 3ЭГ	1ЭГ \times 2ЭГ	1ЭГ \times 3ЭГ	2ЭГ \times 3ЭГ
Липиды	<0,0005	<0,0005	<0,0005	<0,05	>0,05	<0,005
Гликоген	>0,05	<0,0005	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

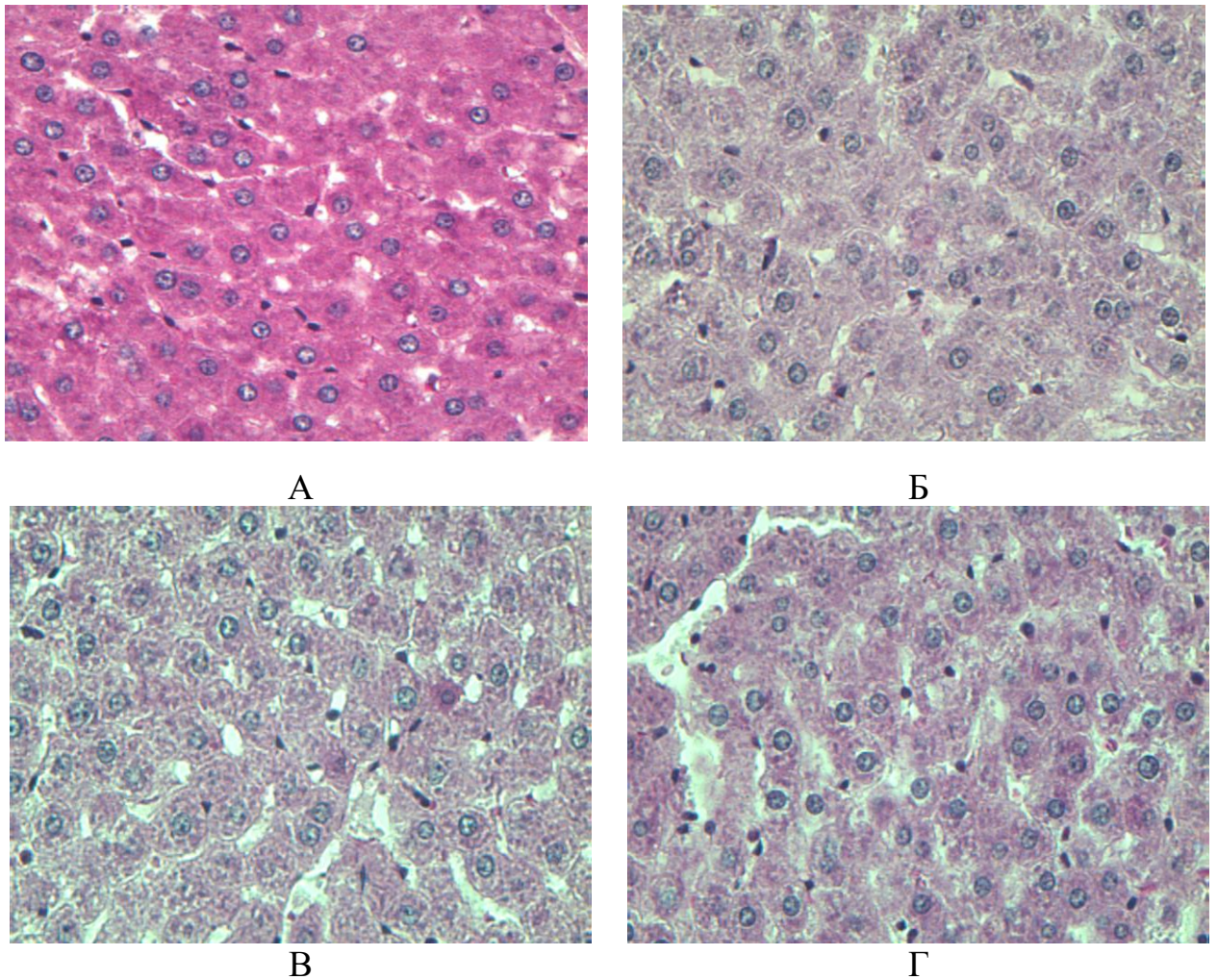


Рис. 13. Гликоген в гепатоцитах крыс: А – контрольной группы, Б – I экспериментальной группы, В – II экспериментальной группы, Г – III экспериментальной группы. ШИК-реакция, $\times 400$. Выраженное снижение содержания гликогена в цитоплазме гепатоцитов животных II экспериментальной группы (В).

3.1.5. Влияние постоянного освещения и ХАИ на экспрессию исследованных генов.

В печени крыс контрольной группы количество *Ki-67*⁺ гепатоцитов крайне незначительно – $1,0 \pm 0,17\%$. Среди гепатоцитов первой и второй экспериментальных групп доля этих клеток так же невелика – $1,03 \pm 0,15\%$ и $1,35 \pm 0,50\%$ соответственно, хотя и несколько выше, чем в контроле. В печени крыс третьей экспериментальной группы обнаружено существенное увеличение количества *Ki-67*⁺ гепатоцитов до $5,73 \pm 0,35\%$. (Рис. 14, 19).

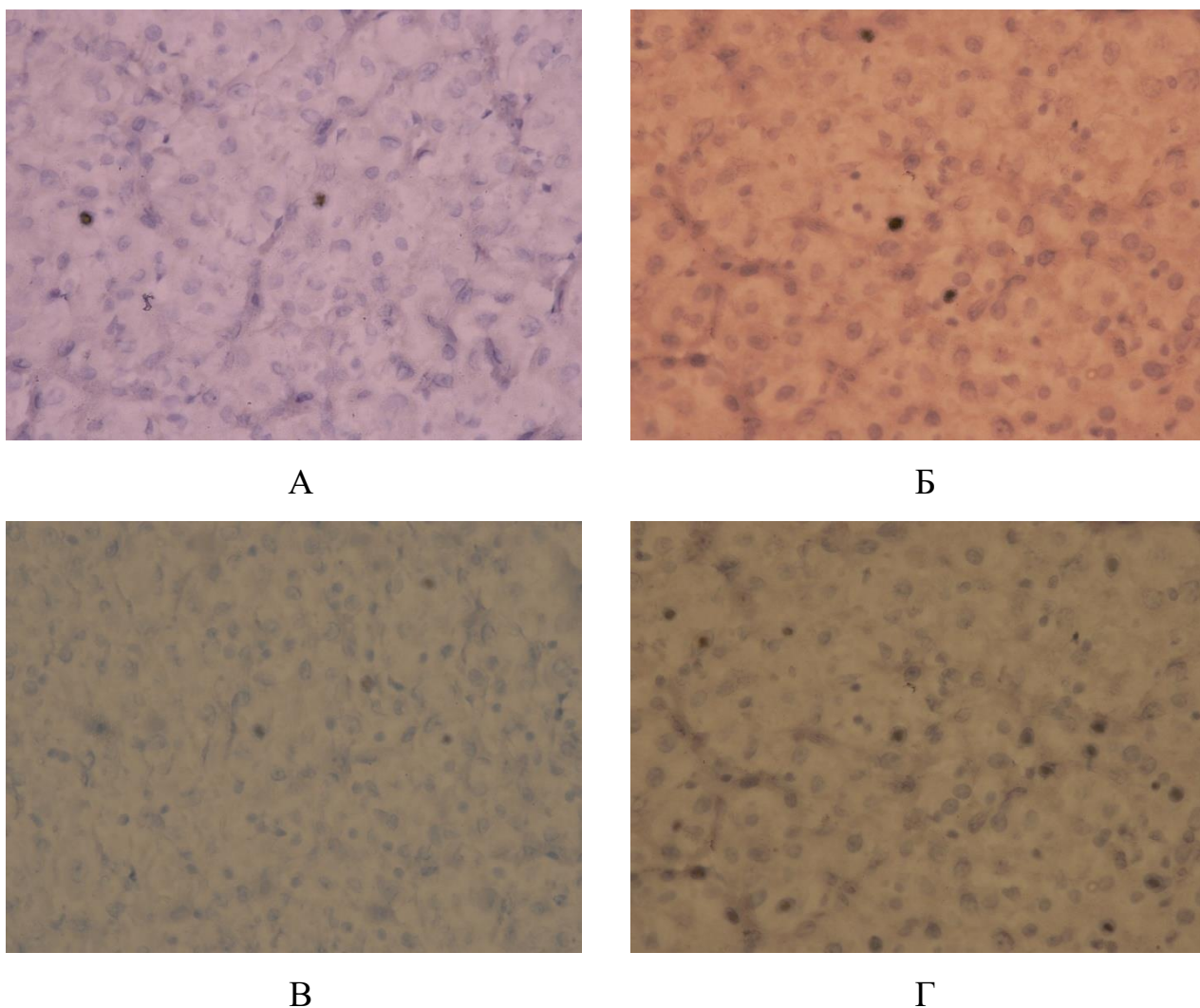


Рис. 14. Экспрессия *Ki-67* в печени крыс. А – контрольной группы, Б – I экспериментальной группы, В – II экспериментальной группы, Г – III экспериментальной группы. Усиление экспрессии *Ki-67* в ядрах гепатоцитов животных III экспериментальной группы (Г).

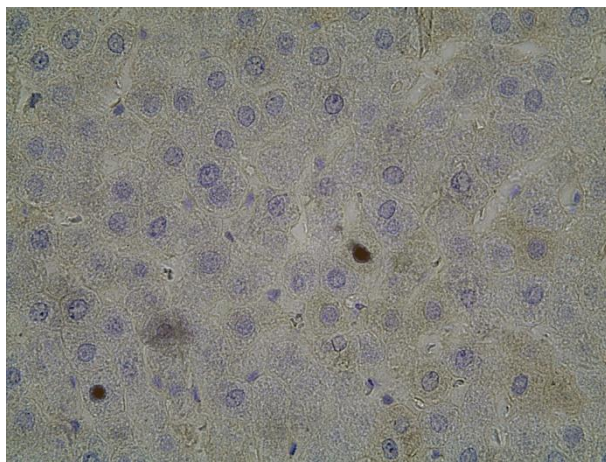
В печени интактных животных было обнаружено $2,20 \pm 0,11\%$ *p53*-положительных гепатоцитов, у крыс экспериментальных групп этот показатель достоверно выше, чем в контроле, составляя $4,73 \pm 0,14\%$ в первой группе, $3,99 \pm 0,13\%$ во второй и $3,20 \pm 0,12\%$ в третьей (Рис. 15, 19).

В печени интактных животных доля *Bmal1*-положительных гепатоцитов составила $60,76 \pm 2,04\%$, но во всех экспериментальных группах экспрессия этого гена снижена (Рис. 16). В первой группе доля прореагировавших клеток составила $41,05 \pm 2,06\%$, во второй – $16,40 \pm 1,32\%$ и $22,61 \pm 1,50\%$ в третьей. Показатели всех экспериментальных групп статистически достоверно отличаются от

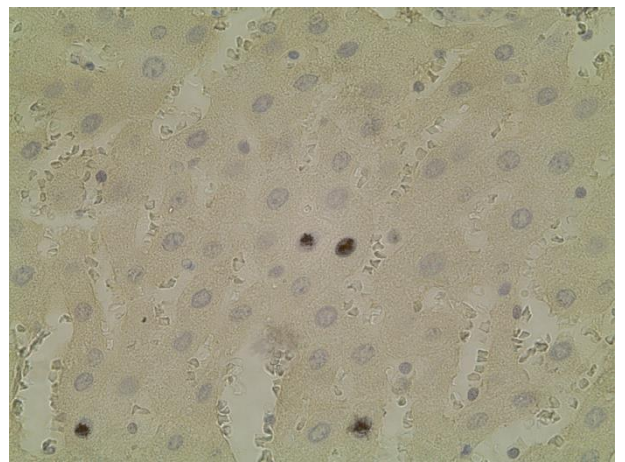
контроля, а значения для второй и третьей группы – от показателей первой (Рис. 16, 19).

Анализ экспрессии *Per2* позволил установить её увеличение относительно контроля ($31,3 \pm 1,68\%$) до $46,37 \pm 1,87\%$ в первой, $40,01 \pm 2,30\%$ во второй и $39,16 \pm 1,07\%$ в третьей группе (Рис. 17, 19).

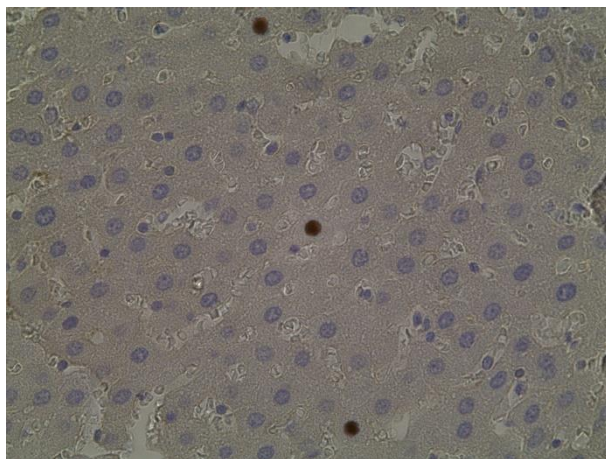
Низкий уровень экспрессии *Adh5* обнаружен в гепатоцитах крыс контрольной и второй группы – $5,88 \pm 0,36\%$ и $5,11 \pm 0,40\%$ соответственно, в то время как в клетках печени первой и третьей группы значения составили $23,18 \pm 1,30\%$ и $33,55 \pm 1,34\%$ (Рис. 18, 19).



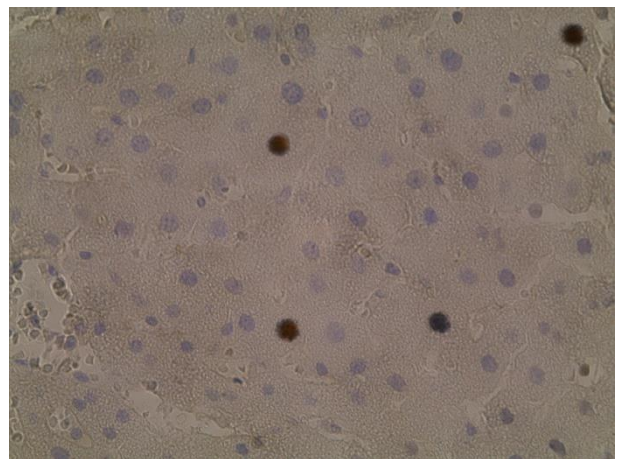
А



Б

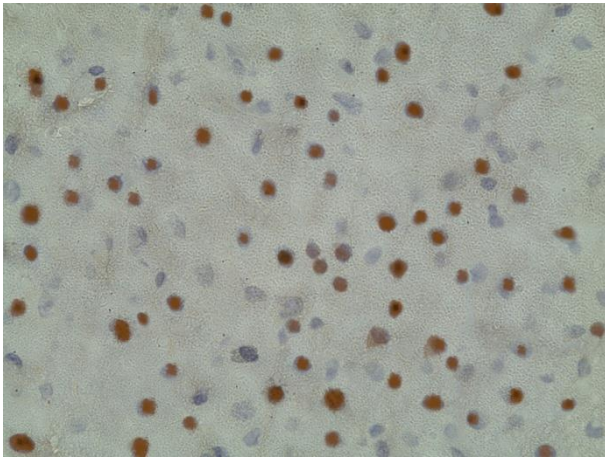


В

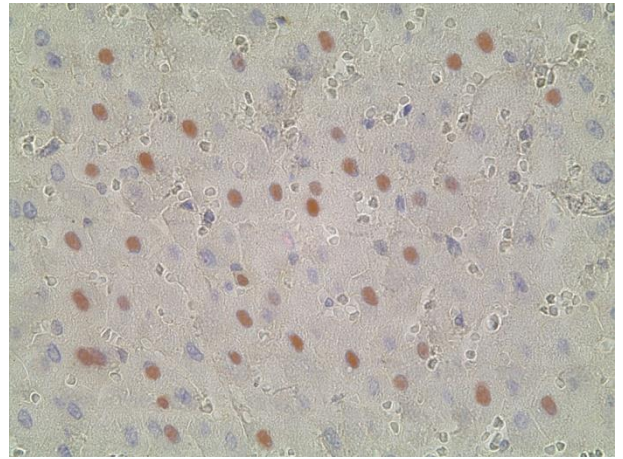


Г

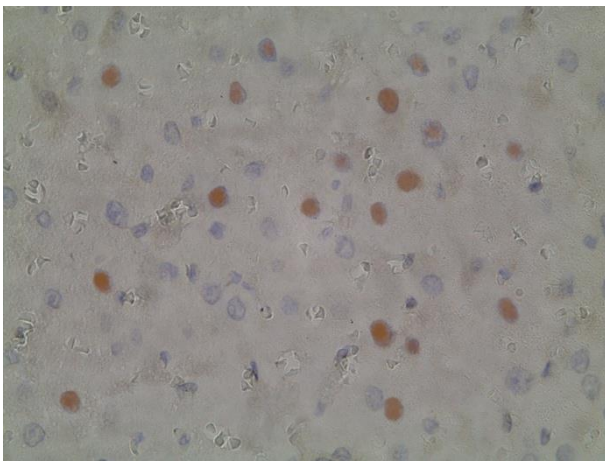
Рис. 15. Экспрессия *p53* в печени крыс. А – контрольной группы, Б – I экспериментальной группы, В – II экспериментальной группы, Г – III экспериментальной группы. Усиление экспрессии *p53* в ядрах гепатоцитов животных всех экспериментальных групп (коричневая окраска ядер, Б, В, Г).



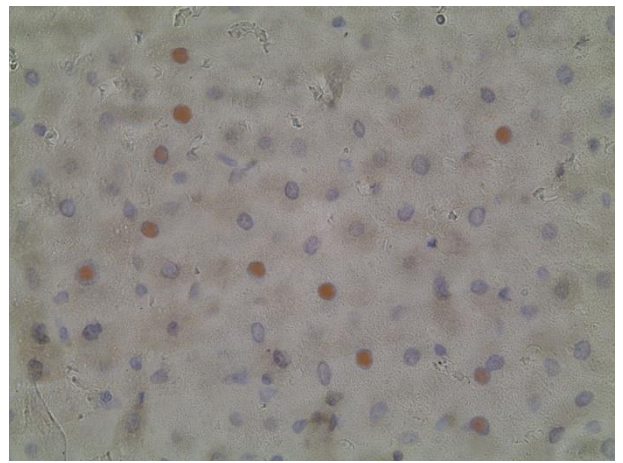
А



Б

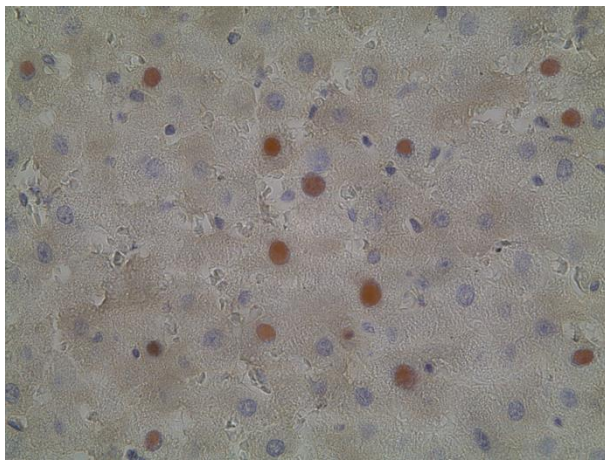


В

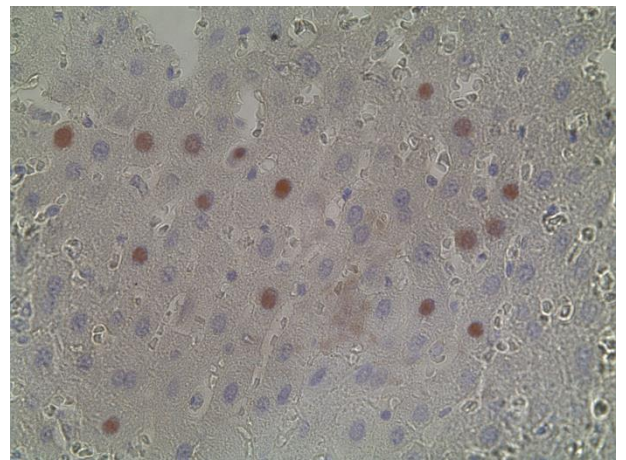


Г

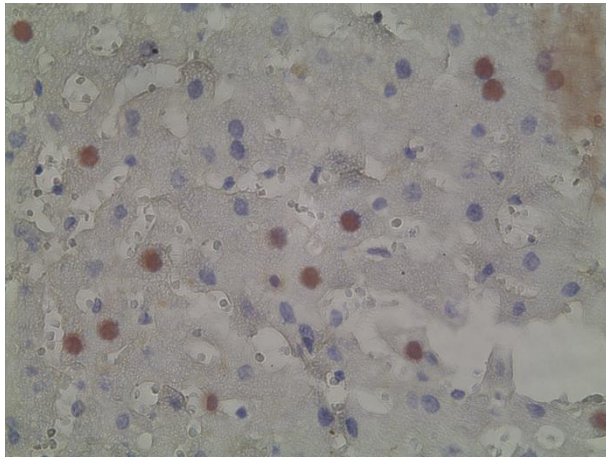
Рис. 16. Экспрессия *Bmal1* в печени крыс. А – контрольной группы, Б – I экспериментальной группы, В – II экспериментальной группы, Г – III экспериментальной группы. Ядерная экспрессия гена снижена во всех экспериментальных группах (Б, В, Г).



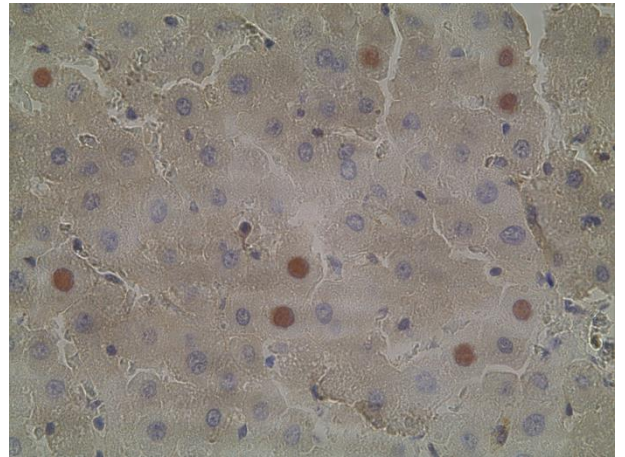
А



Б

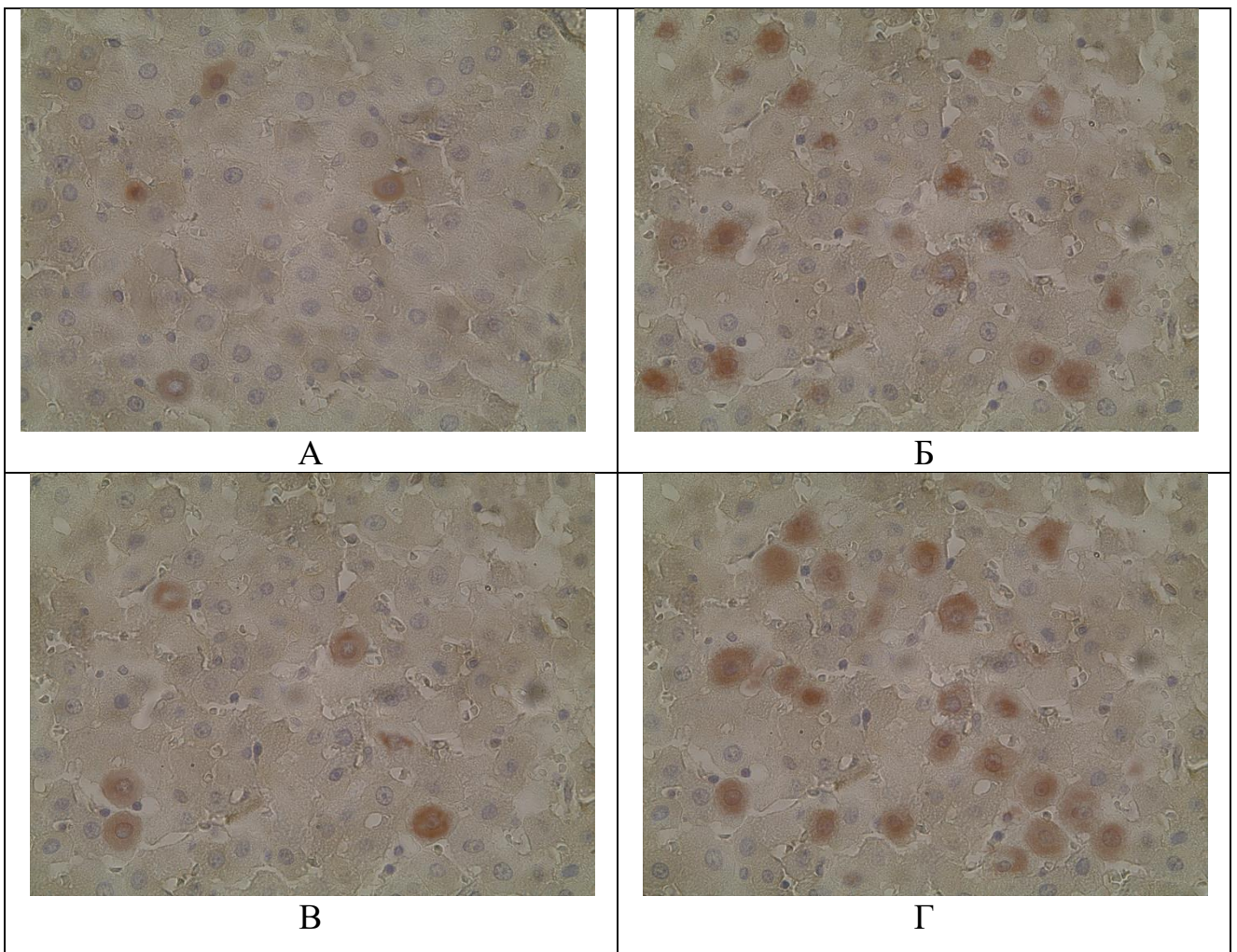


В



Г

Рис. 17. Экспрессия *Per2* в печени крыс. А – контрольной группы, Б – I экспериментальной группы, В – II экспериментальной группы, Г – III экспериментальной группы. Увеличение экспрессии *Per2* относительно контроля во II и III экспериментальных группах (коричневая окраска ядер, В, Г.).



А

Б

В

Г

Рис. 18. Экспрессия *Adh5* в печени крыс. А – контрольной группы, Б – I экспериментальной группы, В – II экспериментальной группы, Г – III экспериментальной группы. Уси-

ление цитоплазматической экспрессии *Adh5* в гепатоцитах животных I и III экспериментальных групп (коричневая окраска цитоплазмы, Б, Г).

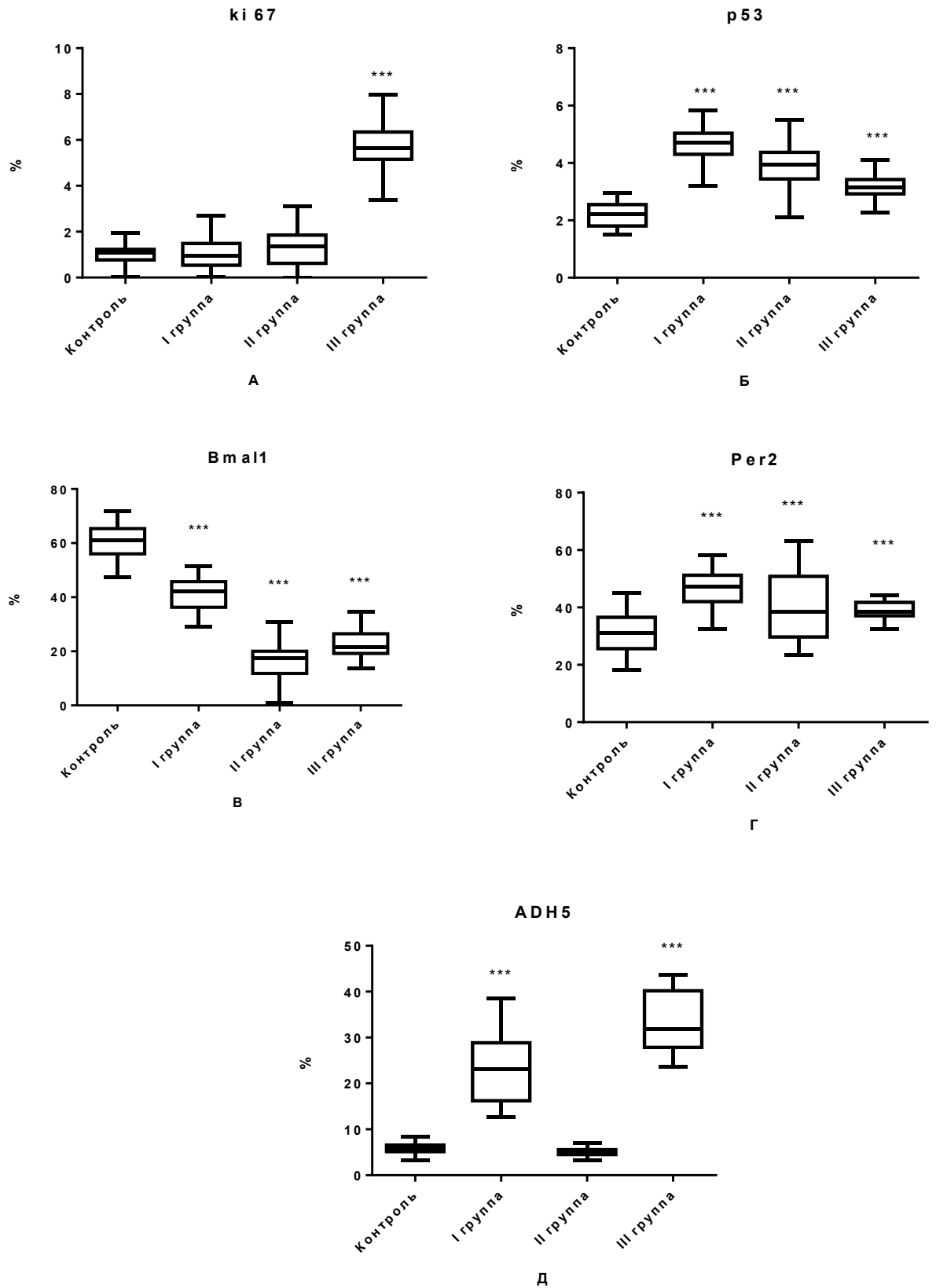


Рис. 19. Экспрессия: А – *Ki-67*, Б – *p53*, В – *Bmal1*, Г – *Per2*, Д – *Adh5* в гепатоцитах крыс контрольной и экспериментальных групп.

3.1.6. Влияние постоянного освещения и ХАИ на некоторые биохимические показатели.

Анализ содержания глюкозы в сыворотке крови показал, что у животных первой и второй группы его уровень увеличивается 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 животных третьей группы содержание глюкозы значительно меньше – $5,70 \pm 1,40$ (Рис. 20), (Табл. 5).

Активность АЛТ практически неизменна 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 увеличивается до $80,10 \pm 10,50$ ед/л, что выше, чем во всех других группах (Рис. 20).

Активность АСТ в контроле составила $125,2 \pm 27,90$ ед/л, во второй и третьей экспериментальной группе она достоверно увеличивается до $151,80 \pm 32,99$ ед/л и $153,1 \pm 24,06$ ед/л соответственно (Рис. 20).

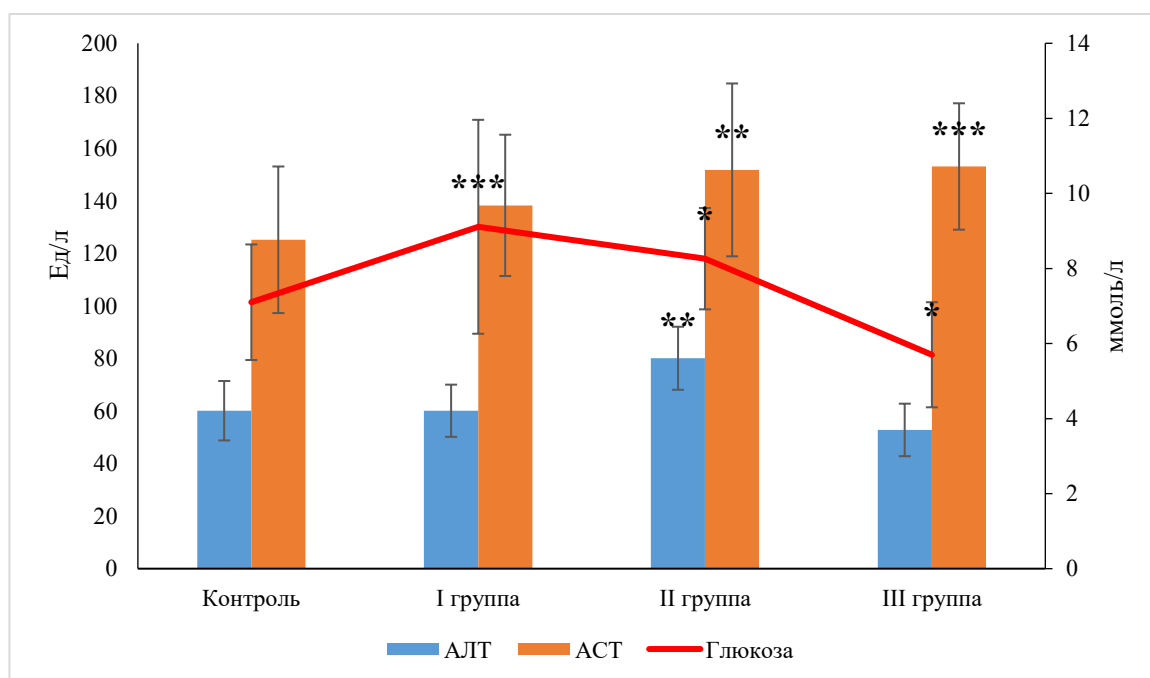


Рис. 20. Содержание глюкозы и активность АЛТ и АСТ в крови крыс.

Содержание общего белка в сыворотке крови контрольных животных составляло $68,55 \pm 8,19$ г/л, а в крови крыс экспериментальных групп оказалось ниже: $59,71 \pm 8,52$ г/л в первой, $60,87 \pm 8,22$ г/л во второй и $61,96 \pm 6,68$ в третьей группе (Рис. 21).

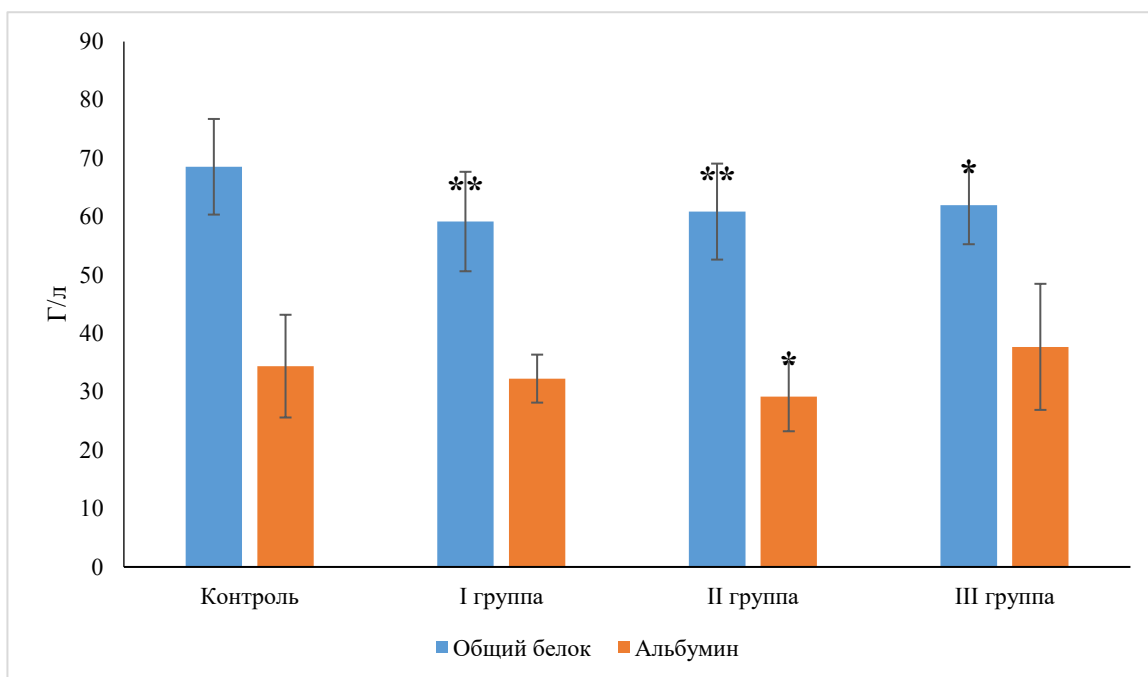


Рис. 21. Содержание общего белка и альбумина в крови крыс.

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, достигая $30,15 \pm 9,50$ и $28,7 \pm 5,82$ мкмоль/л против $21,12 \pm 9,16$ мкмоль/л в контроле (Рис. 22).

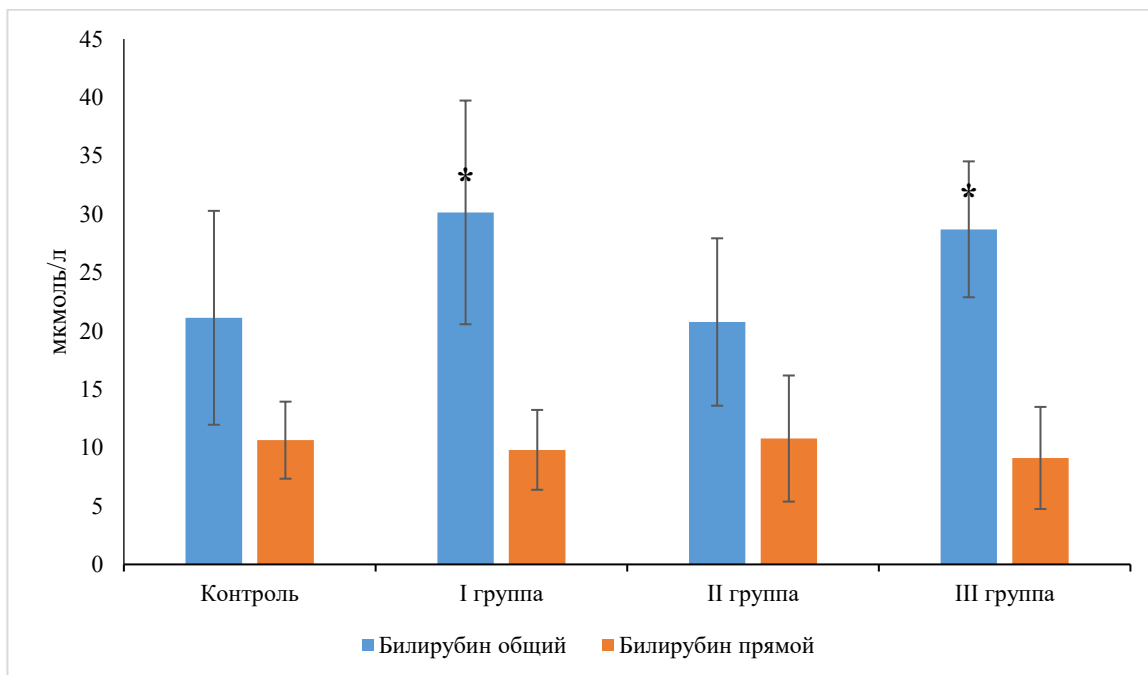


Рис. 22. Содержание общего и прямого билирубина в крови крыс.

Таблица 5. Достоверность межгрупповых различий исследованных биохимических показателей.

	К-1ЭГ	К×2ЭГ	К×3ЭГ	1ЭГ×2ЭГ	1ЭГ×3ЭГ	2ЭГ×3ЭГ
Глюкоза	<0,0005	<0,05	<0,005	>0,05	<0,0005	<0,0005
АЛТ	>0,05	<0,0005	>0,05	<0,0005	>0,05	<0,0005
АСТ	>0,05	<0,005	<0,0005	>0,05	>0,05	>0,05
Общий белок	<0,005	<0,005	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Альбумин	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05	<0,0005
Общий билирубин	<0,005	>0,05	<0,05	<0,0005	>0,05	<0,005
Прямой билирубин	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

3.1.7. Влияние постоянного освещения и ХАИ на некоторые гематологические показатели.

Анализ результатов гематологических исследований показал, что хроническая алкогольная интоксикация в сочетании с постоянным освещением приводит 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 (Рис. 23, Табл. 6).

При этом количество эритроцитов было достоверно снижено относительно контроля ($11,01 \pm 0,52 \cdot 10^9/\text{л}$) во всех экспериментальных группах, составляя $10,60 \pm 0,48 \times 10^9/\text{л}$ в первой, $10,42 \pm 0,41 \times 10^9/\text{л}$ во второй и $10,14 \pm 0,50 \times 10^9/\text{л}$ в третьей группе (Рис. 23).

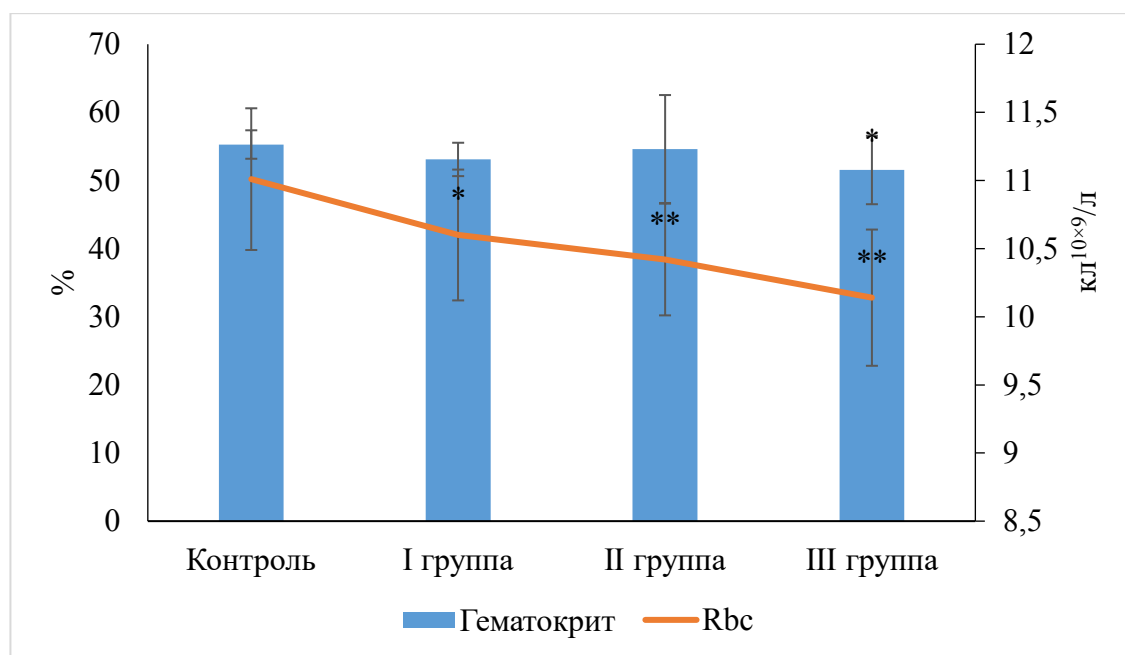


Рис. 23. Гематокрит и RBC в крови крыс.

Достоверно снизилось и содержание 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 повышается только в III экспериментальной группе, составляя $16,50 \pm 1,27$ пг против $15,76 \pm 0,44$ пг в контроле. Величина МСНС относительно контроля у животных экспериментальных групп не изменяется (Рис. 24).

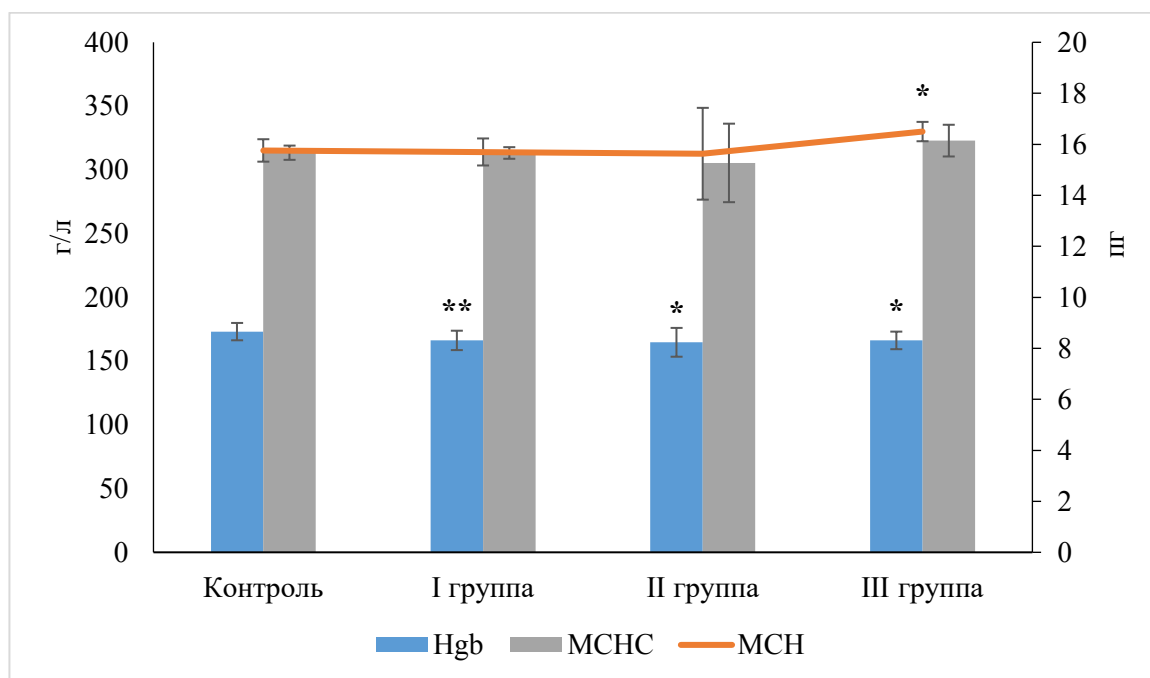


Рис. 24. HGB, MCH и MCHC в крови крыс.

Величина MCV в крови крыс экспериментальных групп не отличается от показателей контроля, составивших $50,31 \pm 1,47$ фл. Уровень RDWc, составляя в контроле $15,21 \pm 0,68\%$, оказывается достоверно выше в эксперименте, составляя в первой группе $16,04 \pm 0,80\%$, $16,68 \pm 1,1\%$ во второй и $17,11 \pm 1,93\%$ в третьей (Рис. 25).

Протромбиновое время также увеличивается от $23,59 \pm 9,10$ сек в контроле до $40,33 \pm 6,5$ сек во второй группе и $32,96 \pm 4,25$ сек в третьей (Рис. 25).

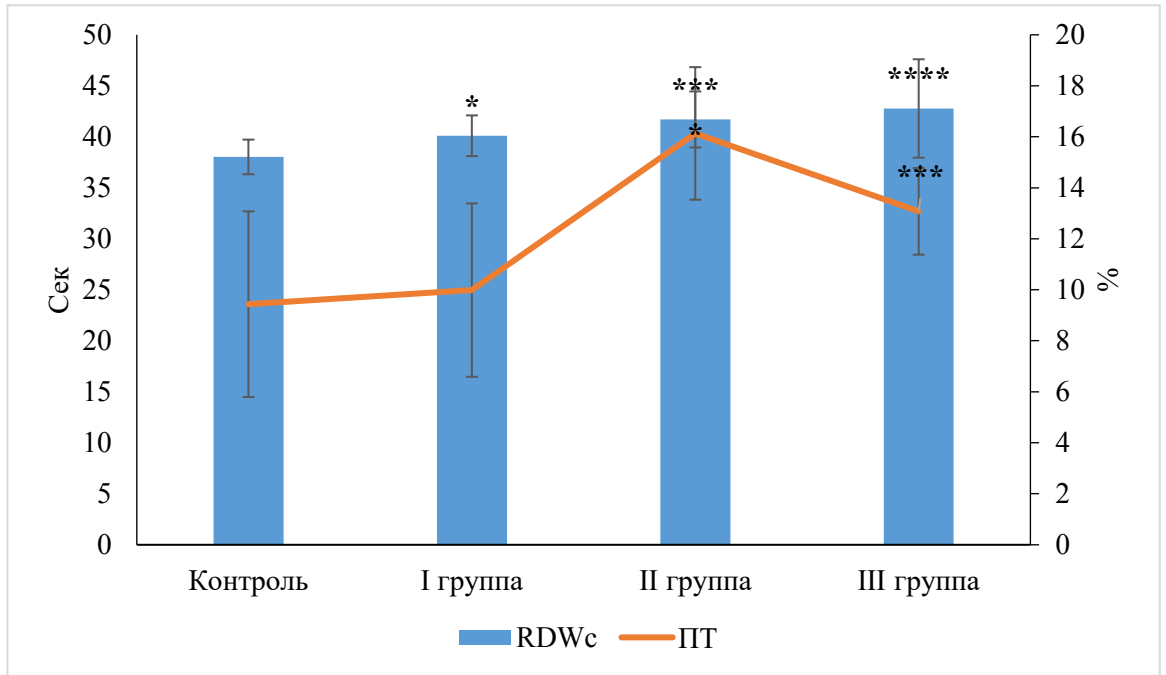


Рис. 25. RDWc и протромбиновое время в крови крыс.

Таблица 6. Достоверность межгрупповых различий исследованных гематологических показателей.

	К-1ЭГ	К×2ЭГ	К×3ЭГ	1ЭГ×2ЭГ	1ЭГ×3ЭГ	2ЭГ×3ЭГ
HCT	>0,05	>0,05	<0,005	>0,05	>0,05	<0,05
RBC	<0,05	<0,005	<0,005	>0,05	>0,05	>0,05
Hgb	<0,005	<0,05	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05
MCH	>0,05	>0,05	<0,05	>0,05	<0,05	<0,005
MCHC	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	<0,0005
MCV	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
RDWc	<0,05	<0,0005	<0,0005	>0,05	<0,005	>0,05
ПТ	>0,05	<0,05	<0,0005	>0,05	>0,05	>0,05

3.1.8. Влияние постоянного освещения и ХАИ на ректальную температуру.

Установлено, что ХАИ при фиксированном световом режиме не приводит к изменению температуры тела, составившей в контроле $35,83 \pm 0,87^\circ\text{C}$, однако у крыс второй экспериментальной группы она снижается до $35,30 \pm 0,41^\circ\text{C}$, а у животных третьей группы она выше, чем в контроле – $36,37 \pm 0,62^\circ\text{C}$.

3.2. Влияние постоянного освещения и ХАИ на организацию циркадных ритмов печени.

3.2.1. Влияние постоянного освещения и ХАИ на организацию циркадных ритмов микроморфометрических параметров гепатоцитов.

Анализ суточной динамики площади ядер гепатоцитов крыс контрольной группы позволил установить наличие выраженного максимума, приходящегося на 15 часов, и минимума в 21 час. Под влиянием ХАИ при сохранившемся максимуме минимальные значения площади ядер отмечены в 9 часов. Постоянное освещение привело к смещению максимума на 9 часов, а минимума – на 3 часа. Менее всего суточные колебания размеров ядер гепатоцитов выражены в печени крыс третьей экспериментальной группы, на хронограмме которой практически не выделялись точки экстремума (Рис. 26).

По данным косинор-анализа достоверный ЦР площади ядра обнаружен в контроле, первой и второй экспериментальных группах (Рис. 27). При этом в контроле акрофаза ритма была отмечена в 12²¹, амплитуда ритма составила 10,03 мкм². В печени крыс первой экспериментальной группы акрофаза ЦР сместилась на 18⁰², а амплитуда ритма уменьшилась до 3,73 мкм². Во второй экспериментальной группе смещение акрофазы относительно контроля было менее выражено (11³⁶), но амплитуда ритма также уменьшилась, составив 4,60 мкм². В печени крыс третьей экспериментальной группы достоверного ЦР площади ядра не было обнаружено.

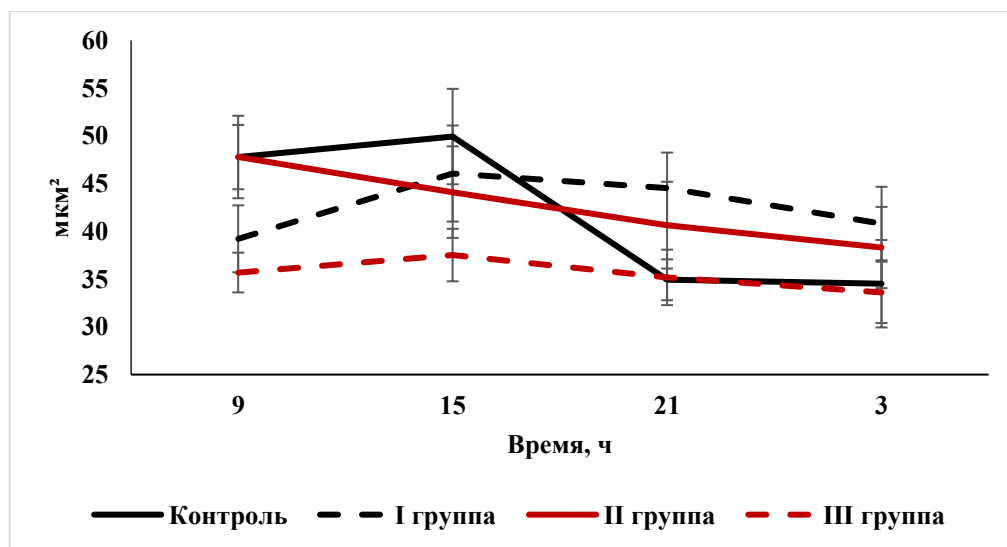


Рис. 26. Суточные колебания площади ядра гепатоцитов крыс.

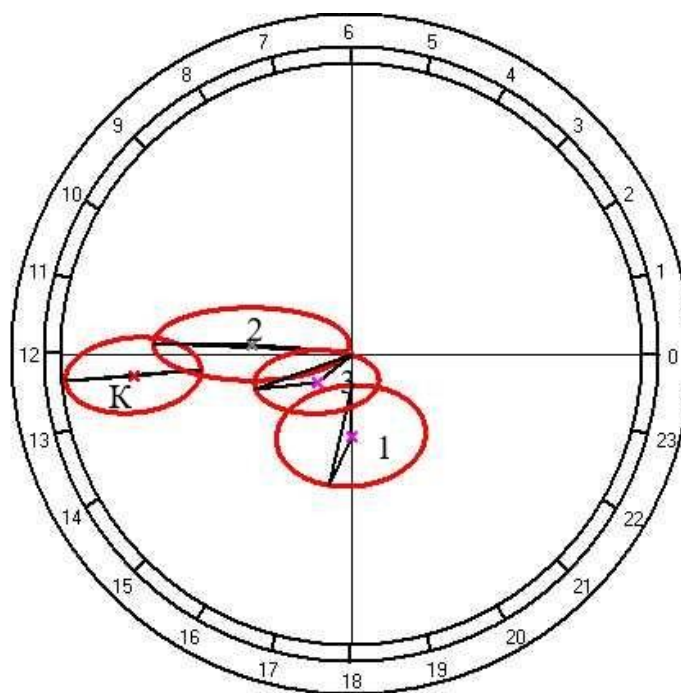


Рис. 27. Результаты косинор-анализа суточной динамики площади ядер гепатоцитов. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 2 – вторая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

Анализ суточной динамики площади гепатоцитов позволил установить наличие максимума этого показателя в 9 часов и минимума в 3 часа у крыс контрольной группы. В печени животных первой группы произошло смещение максимума на 21 час, а минимальных значений – на 9 часов. У животных второй группы при максимуме в 9 часов минимальная площадь клетки была отмечена в 21 час. В печени крыс третьей группы наибольшего значения размеры клеток достигали в 9 часов, а минимального – в 21 (Рис. 28). При этом, по результатам косинор-анализа, произошло разрушение ЦР в печени крыс первой экспериментальной группы. Акрофазы ЦР в контроле и второй и третьей группах отмечались в утренние часы: 10^{13} , 11^{37} и 10^{09} соответственно (Рис. 29), при этом амплитуда ритма во второй группе увеличилась до $40,02 \text{ мкм}^2$ против $16,28 \text{ мкм}^2$, а в третьей группе она практически не изменилась, составляя $16,84 \text{ мкм}^2$.

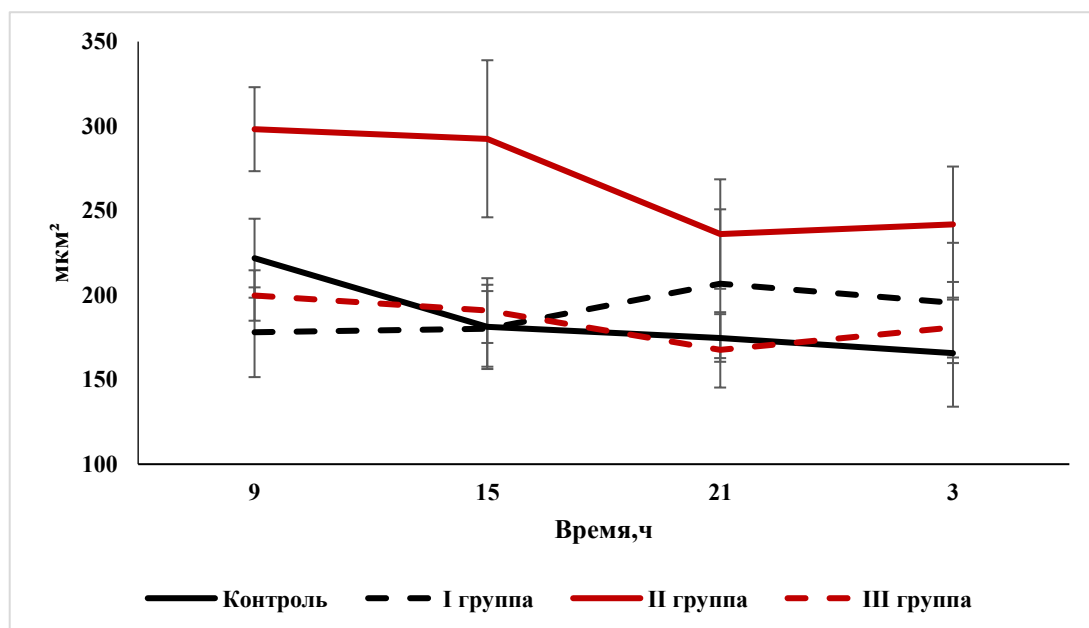


Рис. 28. Суточные колебания площади гепатоцитов крыс.

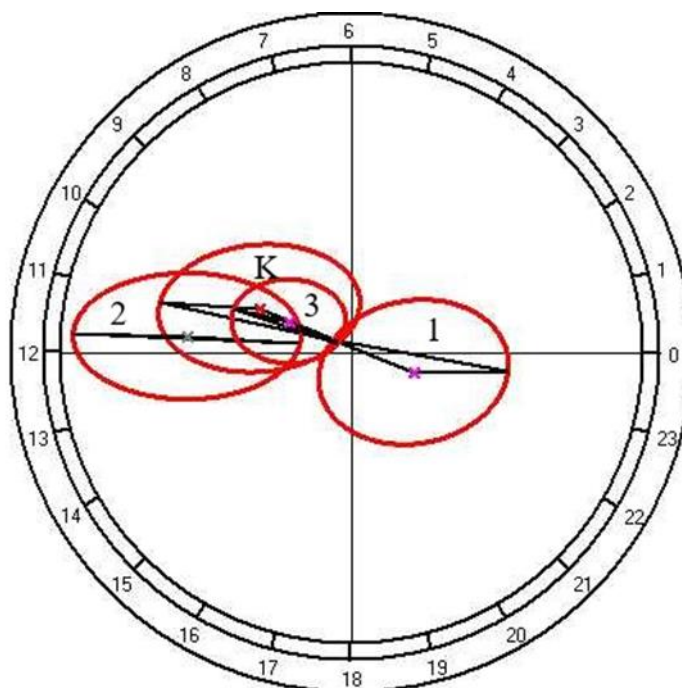


Рис. 29. Результаты косинор-анализа суточной динамики площади гепатоцитов. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 2 – вторая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 3 – третья экспериментальная группа (достоверный ЦР).

ЯЦО в печени крыс контрольной группы было максимальным в 15 часов, а минимальным – в 21. В печени крыс первой и второй групп суточный ритм был значительно сглажен, что не позволило нам выявить точек экстремума на

хронограмме. В третьей экспериментальной группе максимальные значения ЯЦО были отмечены в 21 час, а минимальные – в 9 часов (Рис. 30).

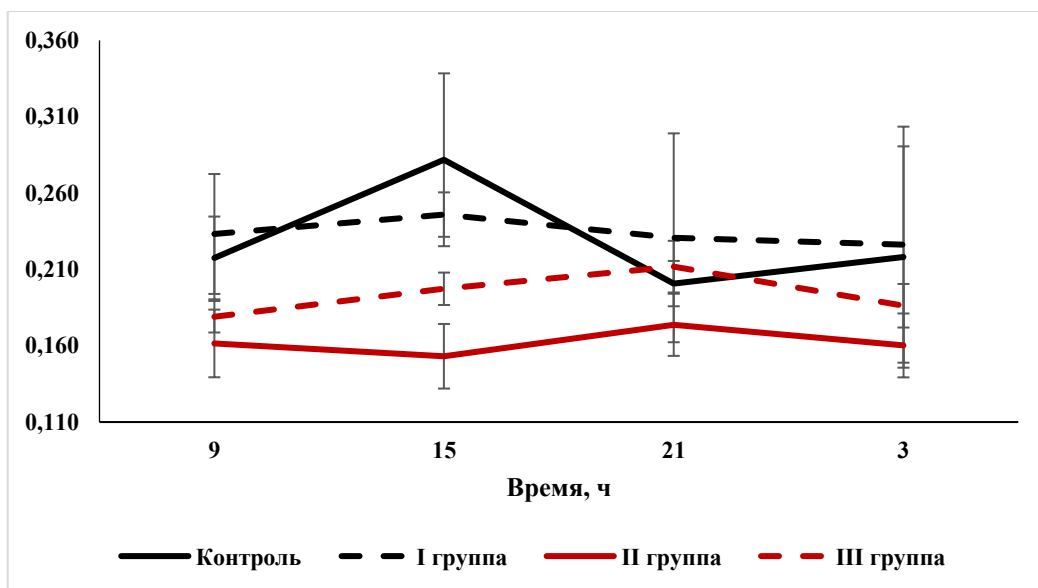


Рис. 30. Суточные колебания площади ЯЦО гепатоцитов крыс.

По результатам косинор-анализа достоверный ЦР ЯЦО гепатоцитов отмечен для контроля, с акрофазой в 14^{01} и амплитудой 0,033, а также только для третьей группы, в которой акрофаза отмечается в 19^{46} , а амплитуда составляет 0,017 (Рис. 31).

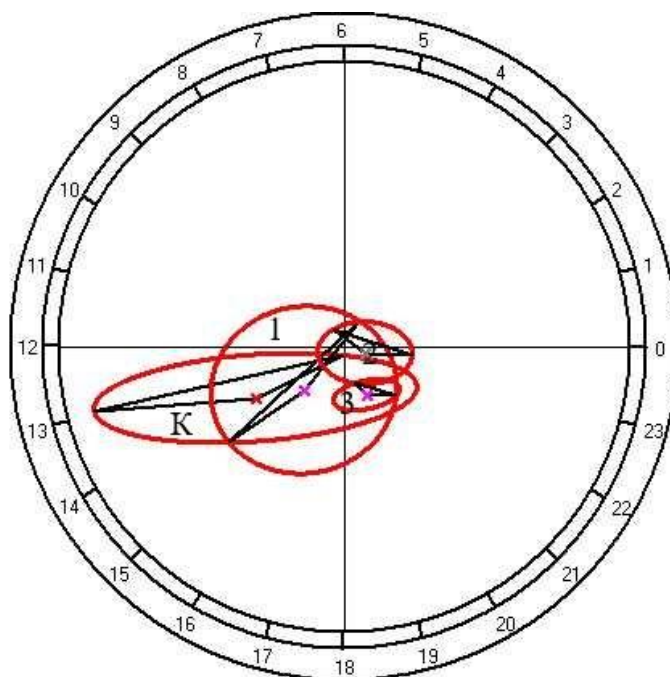


Рис. 31. Результаты косинор-анализа суточной динамики ЯЦО гепатоцитов.

К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 2 – вторая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 3 – третья экспериментальная группа (достоверный ЦР).

3.2.2. Влияние постоянного освещения и ХАИ на организацию циркадных ритмов липидов и гликогена в гепатоцитах.

Анализ суточной ритмичности содержания липидов в гепатоцитах крыс контрольной группы выявил минимальное содержание этих веществ в 9 часов, а максимальное – в 3 часа. У крыс первой экспериментальной группы максимум ритма был отмечен в 15 часов, а минимум в 21, во второй группе при максимуме в 3 часа минимальное содержание липидов пришлось на 15 часов. Хронограмма содержания липидов в печени животных третьей группы характеризовалась теми же экстремумами, что и вторая группа, но суточные колебания были значительно сглажены (Рис. 32). Косинор-анализ установил наличие достоверного ЦР этого параметра только у крыс контрольной группы (акрофаза ритма приходится на 23⁰¹ часа при амплитуде 0,02 ед. опт. плотности) и первой группы (акрофаза 12⁴⁰, амплитуда ритма составила 0,047 ед. опт. плотности) (Рис. 33).

В гепатоцитах крыс контрольной группы максимальное содержание гликогена было обнаружено в 21 час, минимальное – в 15. Хронограмма содержания гликогена в печени крыс первой группы характеризовалась максимумом в 9 часов и минимумом в 15, в то время как во второй группе содержание гликогена было минимально в 9 часов, а наиболее велико в 21 час, что справедливо и в отношении крыс третьей группы (Рис. 34). Однако косинор-анализ показал наличие достоверного ЦР с акрофазой в 9³⁵ и амплитудой 0,02 ед. опт. плотности только для показателей крыс контрольной группы (Рис. 35).

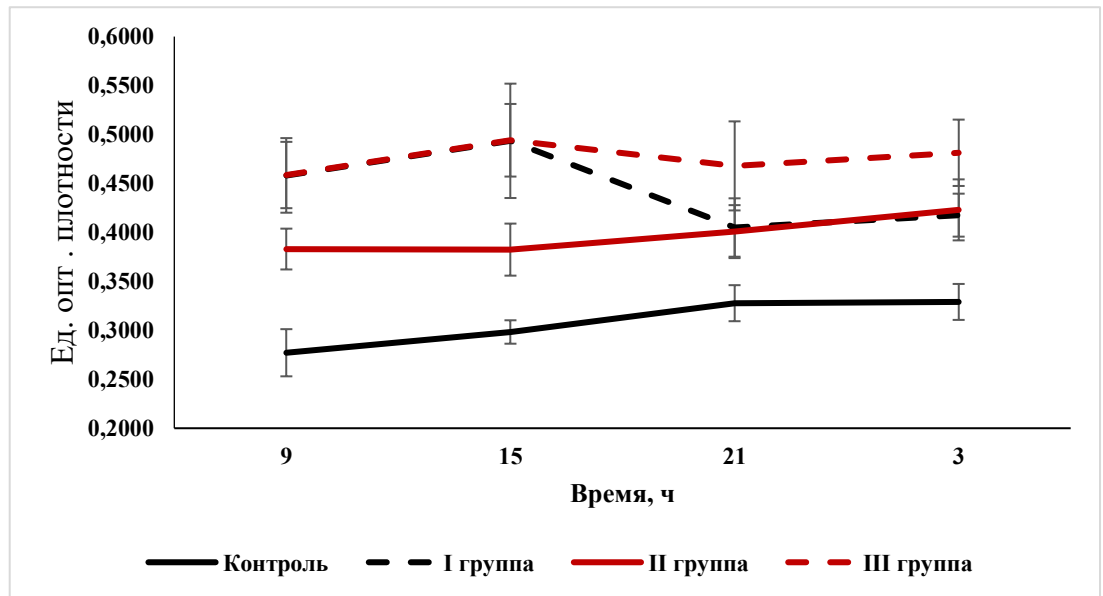


Рис. 32. Суточные колебания содержания липидов в гепатоцитах крыс.

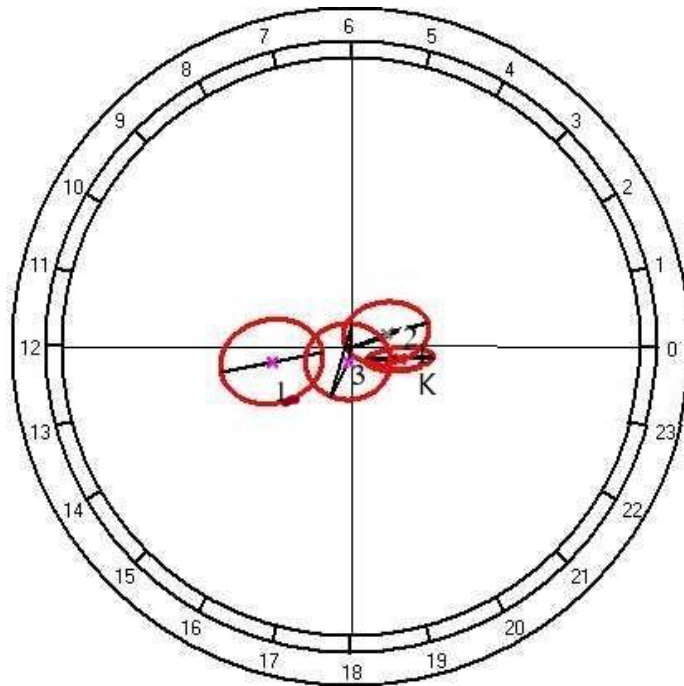


Рис. 33. Результаты косинор-анализа суточной динамики содержания липидов в гепатоцитах. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 2 – вторая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

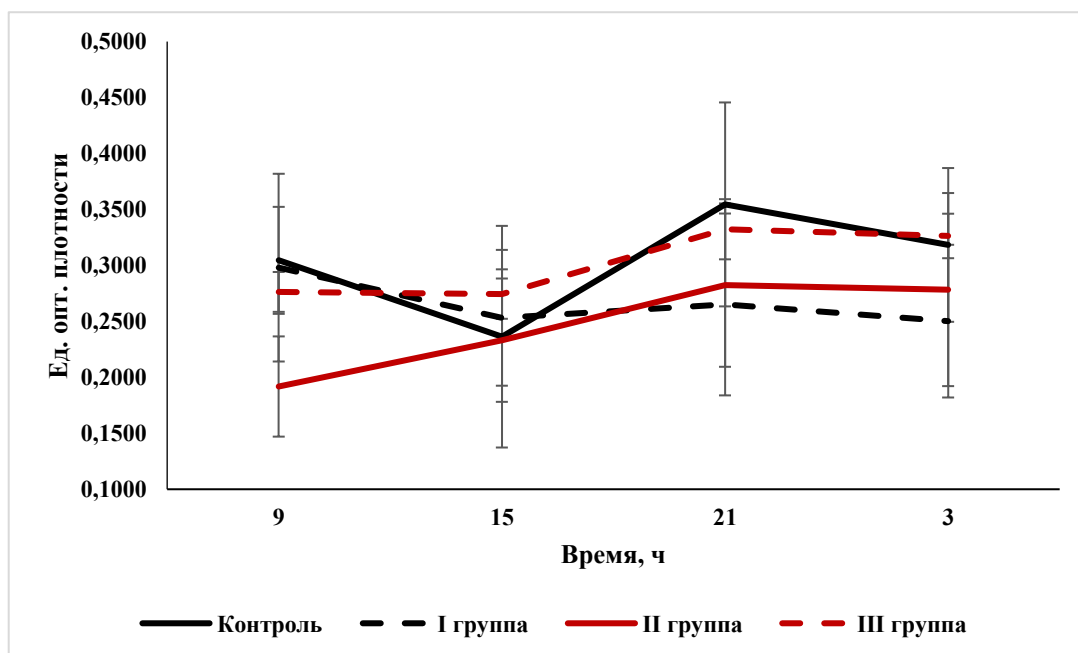


Рис. 34. Суточные колебания содержания гликогена в гепатоцитах крыс.

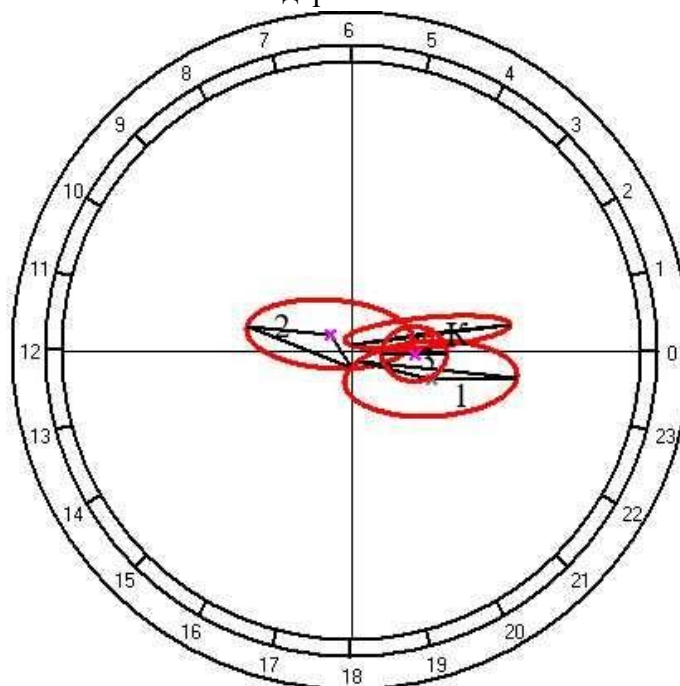


Рис. 35. Результаты косинор-анализа суточной динамики содержания гликогена в гепатоцитах.

К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 2 – вторая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

3.2.3. Влияние постоянного освещения и ХАИ на организацию циркадных ритмов некоторых биохимических показателей.

Максимальные значения суточной ритмики глюкозы в крови крыс контрольной группы были обнаружены в 15 часов, а минимальные – в 3 часа. У

животных первой группы при максимуме в 21 час сохранился тот же минимум, что и в контроле. Во второй группе на сглаженной хронограмме выделяются те же точки экстремума, что и в контроле, а у животных третьей группы максимум пришелся в 3 часа при минимуме в 21 час (Рис. 36). Результаты косинор-анализа свидетельствуют о наличии достоверного ЦР у животных всех групп (Рис. 37). При этом у животных контрольной группы акрофаза ритма была отмечена в 13^{08} , его амплитуда составила 1,5 ммоль/л. В первой группе акрофаза ритма сместилась на 14^{32} при амплитуде в 2,06 ммоль/л, во второй группе акрофаза была отмечена в 12^{06} , амплитуда ритма снизилась до 0,7 ммоль/л, и, наконец, в третьей группе акрофаза пришлась на 10^{01} , а амплитуда ритма уменьшилась до 0,45 ммоль/л.

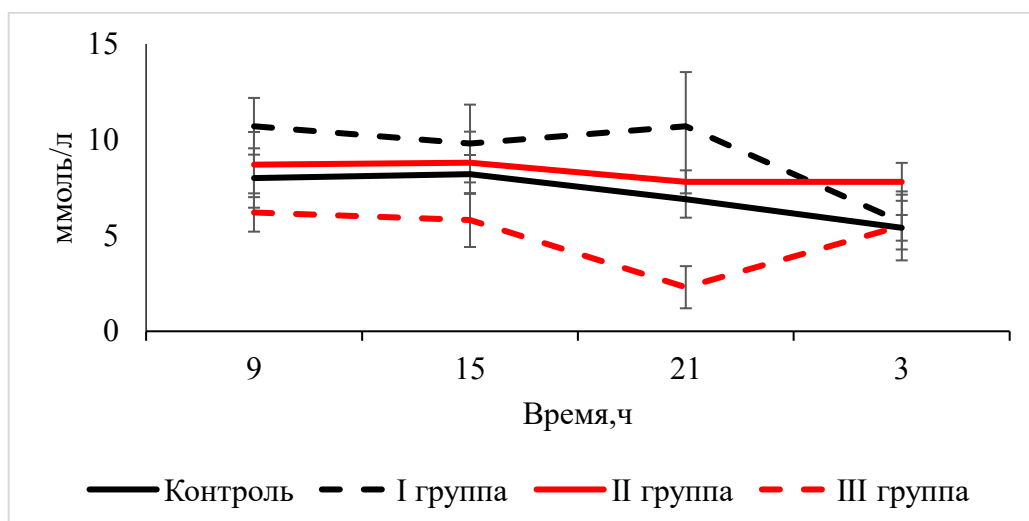


Рис. 36. Суточные колебания содержания глюкозы в крови крыс.

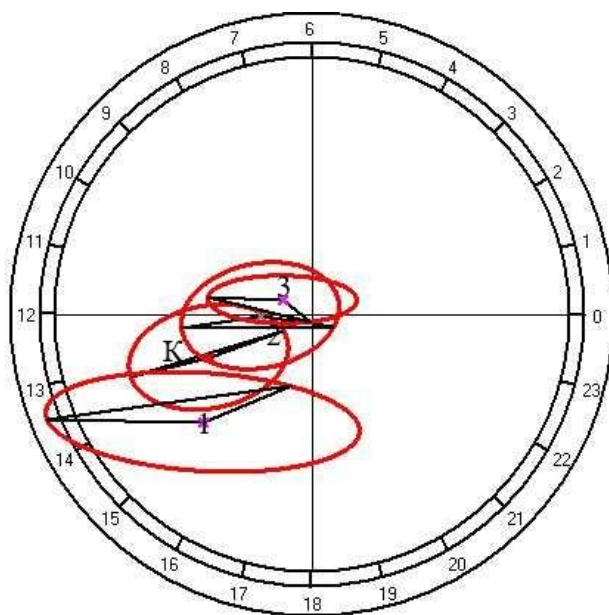


Рис. 37. Результаты косинор-анализа суточной динамики содержания глюкозы в крови крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 2 – вторая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 3 – третья экспериментальная группа (достоверный ЦР).

Суточный ритм АЛТ в сыворотке крови контрольных крыс имел максимум в 9 часов с минимумом в 3 часа. У животных первой группы минимальные значения сместились на 9, а максимальные – на 15 часов, во второй группе максимальные и минимальные значения АЛТ пришлись на те же точки, что и в контроле, однако ритм предельно сглажен и практически отсутствует. В крови крыс третьей группы максимум активности фермента отмечен в 15 часов, а наименее активен он в 9 часов (Рис. 38). Результаты косинор-анализа свидетельствуют о наличии достоверного ЦР активности АЛТ с акрофазой в 2^{08} и амплитудой 0,8 ед/л только у крыс контрольной группы (Рис. 39).

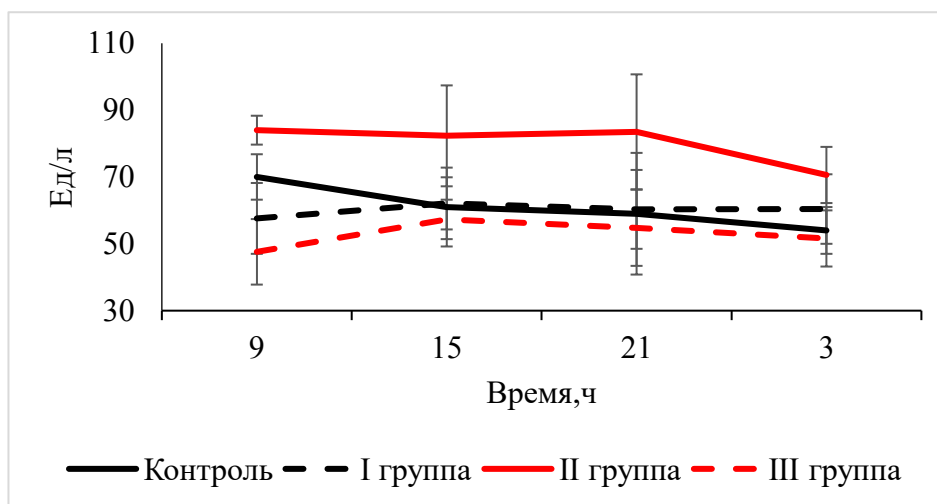


Рис. 38. Суточные колебания активности АЛТ в крови крыс.

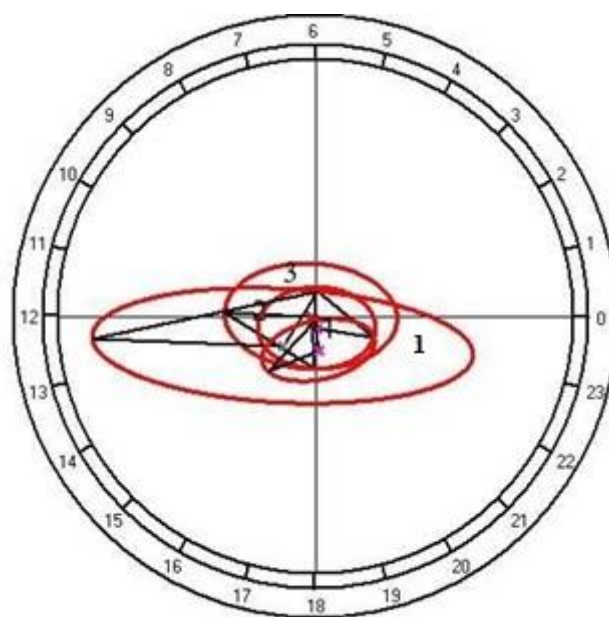


Рис. 39. Результаты косинор-анализа суточной динамики АЛТ в крови крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 2 – вторая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

Анализ суточной активности АСТ в крови крыс контрольной группы позволил установить наличие максимума в 15 часов при минимуме в 9 часов. В первой группе произошло смещение минимума ритма на 3 часа при максимальной активности в 15 часов, во второй группе при максимуме в 9 часов минимальные значения были отмечены в 21 час, а хронограмма третьей группы значительно сглажена (Рис. 40).

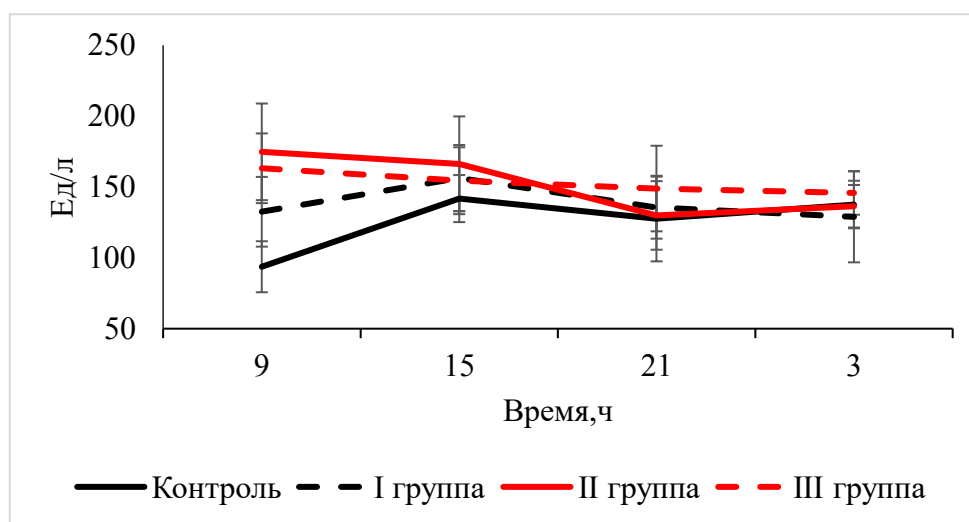


Рис. 40. Суточные колебания активности АСТ в крови крыс.

Косинор-анализ показал, что у крыс контрольной группы акрофаза ЦР АСТ пришлась на 15¹⁵, а его амплитуда составила 13,8 ед/л. У крыс первой группы акрофаза ритма сдвинулась на 11¹⁵, амплитуда ритма увеличилась до 26,9 ед/л. Во второй группе акрофаза ритма вновь сместилась и была отмечена в 22³¹ при амплитуде 17,15 ед/л. У животных третьей группы достоверный ЦР не обнаружен (Рис. 41). Максимальное содержание общего белка в сыворотке крови крыс контрольной группы было обнаружено нами в 15 часов, затем содержание белков снижалось до 3 часов. Под влиянием этанола при фиксированном освещении максимум содержания белка приходился на 15 часов при минимуме в 9, при постоянном освещении максимальный уровень белка был отмечен в 9 часа, минимальный – в 21. В крови крыс третьей группы наименьшее содержание белка было отмечено в 9 часов, максимальное – в 15 (Рис. 42).

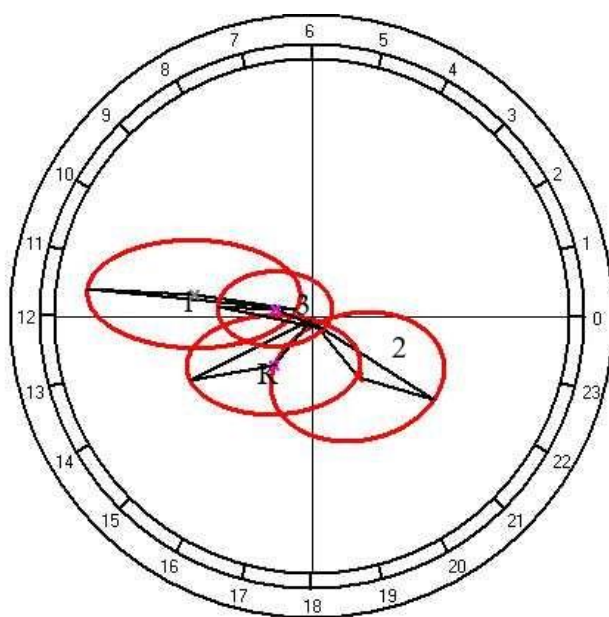


Рис. 41 Результаты косинор-анализа суточной динамики АСТ в крови крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 2 – вторая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

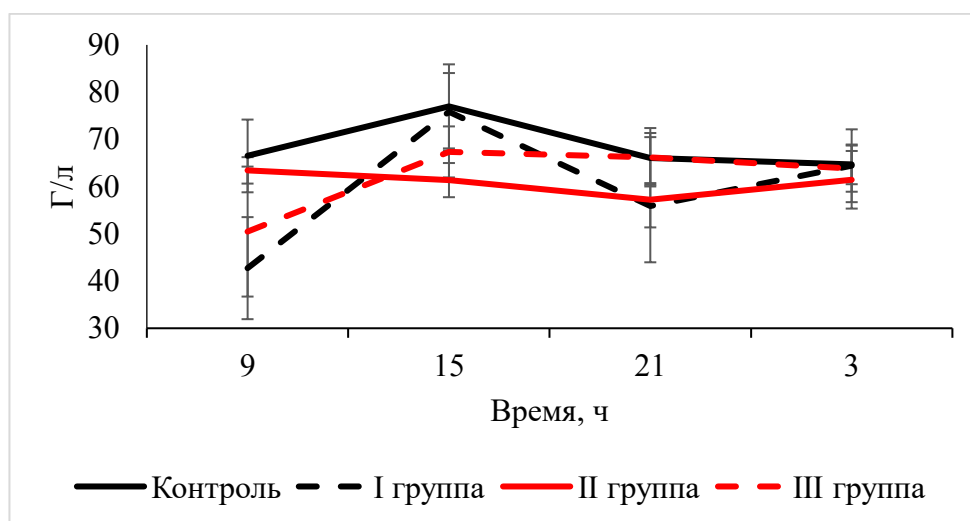


Рис. 42. Суточные колебания уровня общего белка в крови крыс.

По результатам косинор-анализа в контроле ЦР общего белка крови характеризовался акрофазой в 14^{48} и амплитудой в $6,14$ г/л. У крыс первой группы акрофаза сместилась на 18^{41} , амплитуда ритма увеличилась до $8,70$ г/л. Во второй группе для ЦР общего белка была отмечена акрофаза 10^{06} при амплитуде $8,06$ г/л. В третьей группе достоверного ЦР не обнаружено (Рис. 43).

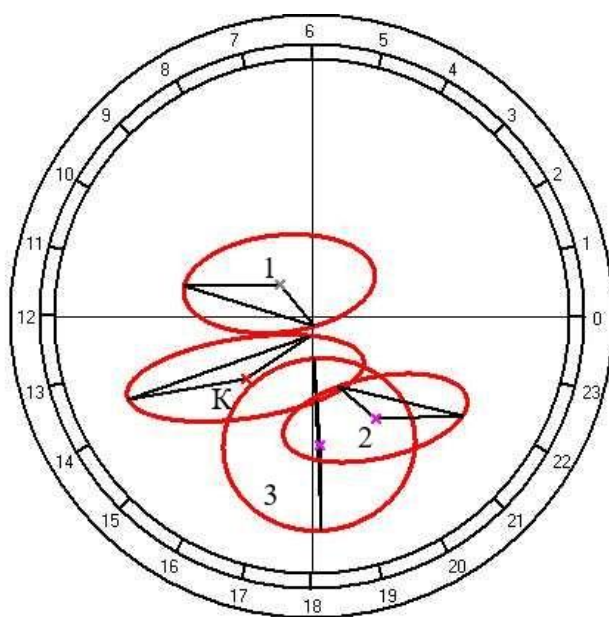


Рис. 43. Результаты косинор-анализа суточной динамики уровня общего белка в крови крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 2 – вторая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

Максимальное содержание альбумина в контроле отмечено в 15 часов, в дальнейшем оно снижалось до минимума, обнаруженного в 3 часа. У животных первой группы при том же максимуме минимальное содержание альбумина было обнаружено в 21 час, в то время как во второй группе минимальный уровень отмечен в 9 часов при максимуме в 3. В третьей группе при минимуме в 21 час количество этого белка значительно увеличивалось к 3 часам (Рис. 44).

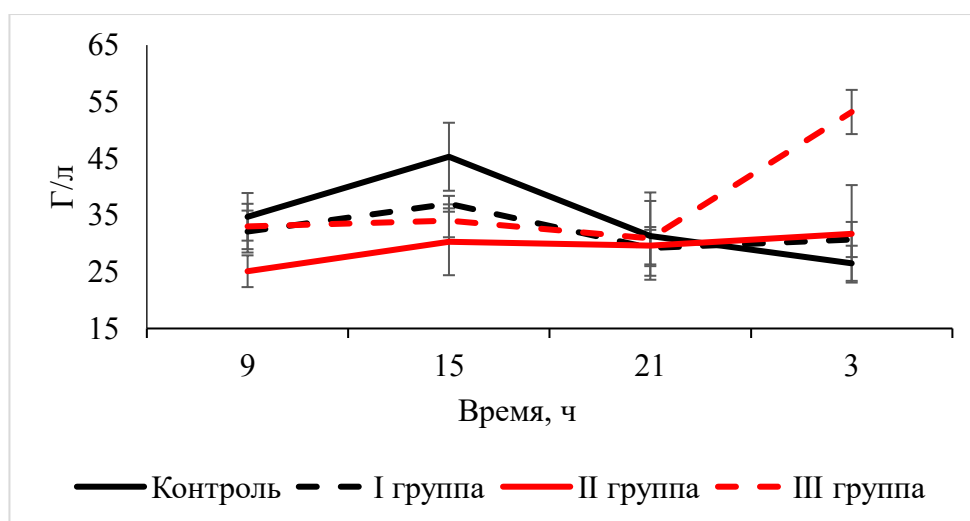


Рис. 44. Суточные колебания уровня альбумина в крови крыс.

В крови крыс контрольной группы акрофаза ЦР альбумина приходилась на 14¹⁶, амплитуда составляет 9,57 г/л. В крови крыс первой группы акрофаза была отмечена на 13¹⁹, амплитуда ритма снижена до 3,47 г/л. Во второй группе акрофаза этого ритма выявлена в 3²⁴, амплитуда составила 9,64 г/л. В третьей группе ЦР не обнаружен (Рис. 45).

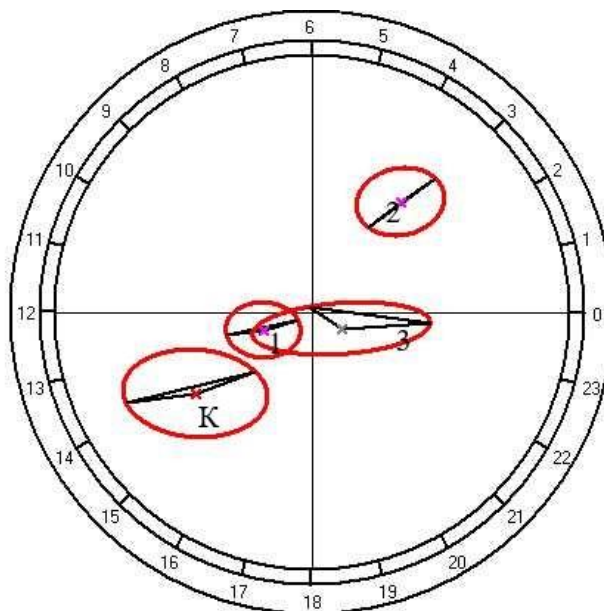


Рис. 45. Результаты косинор-анализа суточной динамики уровня альбумина в крови крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 2 – вторая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

Максимальное количество прямого билирубина в крови контрольных крыс обнаруживалось в 21 час, минимальное – в 9 часов. У крыс первой группы при максимуме в 15 часов снижение содержания билирубина до минимума происходило в 3 часа. У животных второй группы при том же минимуме наибольшее количество билирубина также отмечено в 15 часов, но у крыс третьей группы, наоборот, максимум приходится на 3 часа, а минимум – на 15 (Рис. 46).

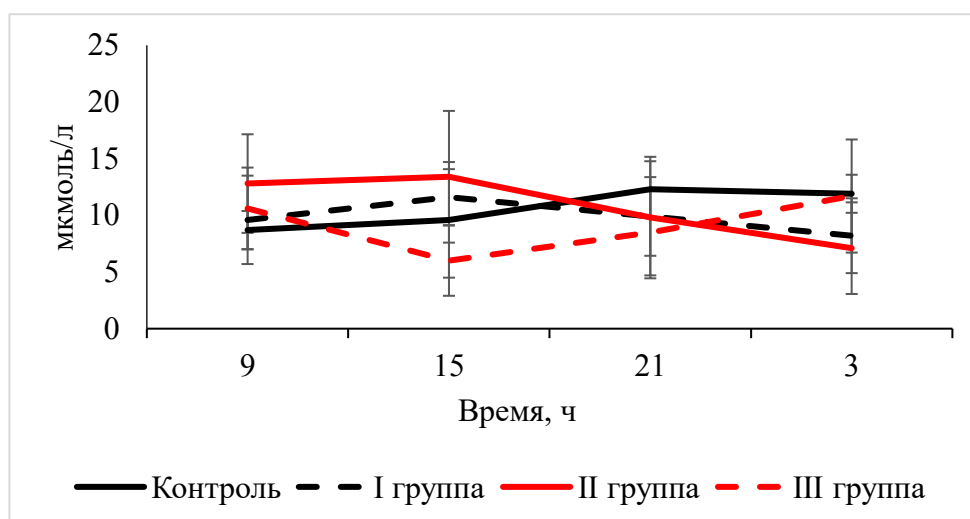


Рис. 46. Суточные колебания уровня прямого билирубина в крови крыс.

Результаты косинор-анализа позволили установить достоверный ЦР прямого билирубина с акрофазой в 1^{48} и амплитудой ритма в $3,48$ мкмоль/л только у крыс контрольной группы (Рис. 47).

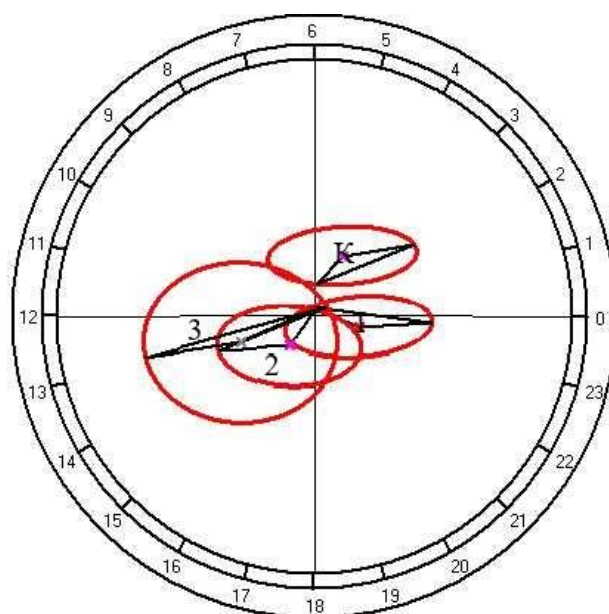


Рис. 47. Результаты косинор-анализа суточной динамики уровня прямого билирубина в крови крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 2 – вторая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

Суточные колебания уровня общего билирубина в крови крыс контрольной группы характеризовались минимумом в 9 часов и максимальными значениями в 3 часа. В первой и второй группе ритм значительно сглажен, в первом случае с максимумом в 15 часов и минимумом в 21, во втором случае максимум

отмечается в 21 час при минимуме в 9. В третьей группе максимальные значения уровня общего билирубина обнаруживаются в 3 часа, а минимальные – в 9 (Рис. 48).

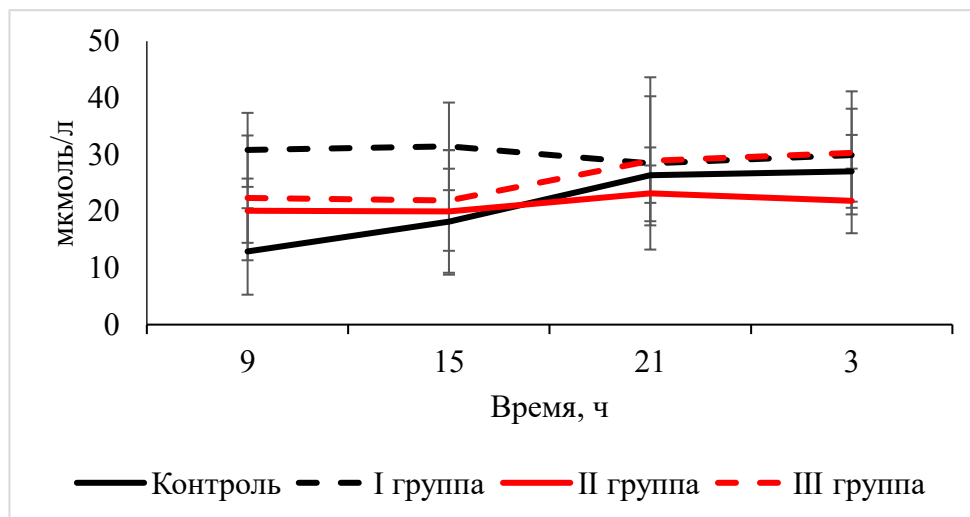


Рис. 48. Суточные колебания уровня общего билирубина в крови крыс.

По результатам косинор-анализа достоверный ЦР общего билирубина был отмечен только в контроле, ему присуща акрофаза в 23^{35} при амплитуде 8,1 мкмоль/л (Рис. 49).

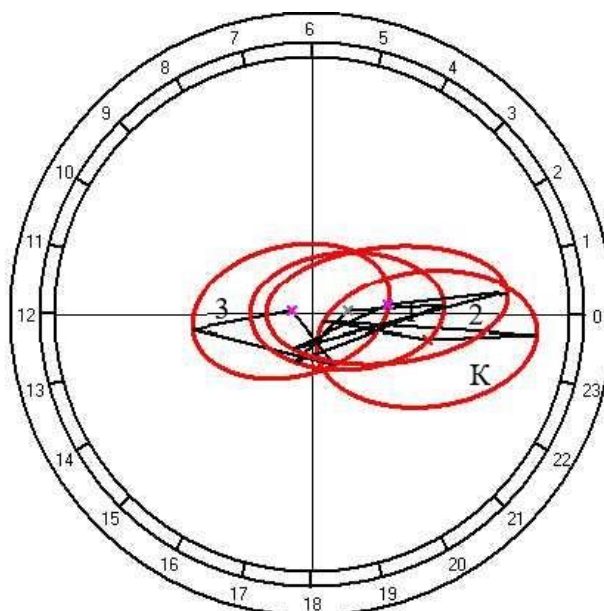


Рис. 49. Результаты косинор-анализа суточной динамики уровня общего билирубина в крови крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 2 – вторая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

3.2.4. Влияние постоянного освещения и ХАИ на организацию циркадных ритмов некоторых гематологических показателей.

Анализ суточной динамики гематокрита показал, что в контроле минимальные значения этого параметра отмечались в 9 часов и постепенно нарастали до максимума в 3 часа. В крови крыс первой группы максимальной величины гематокрит достигал в 9 часов, а точка минимума приходилась на 15 часов. У животных второй группы при минимуме в 21 час отмечался ярко выраженный пик максимума в 3 часа. У крыс третьей группы при максимуме в 21 час минимальное значение гематокрита было отмечено в 3 часа, при этом хронограмма значительно сглажена (Рис. 50).

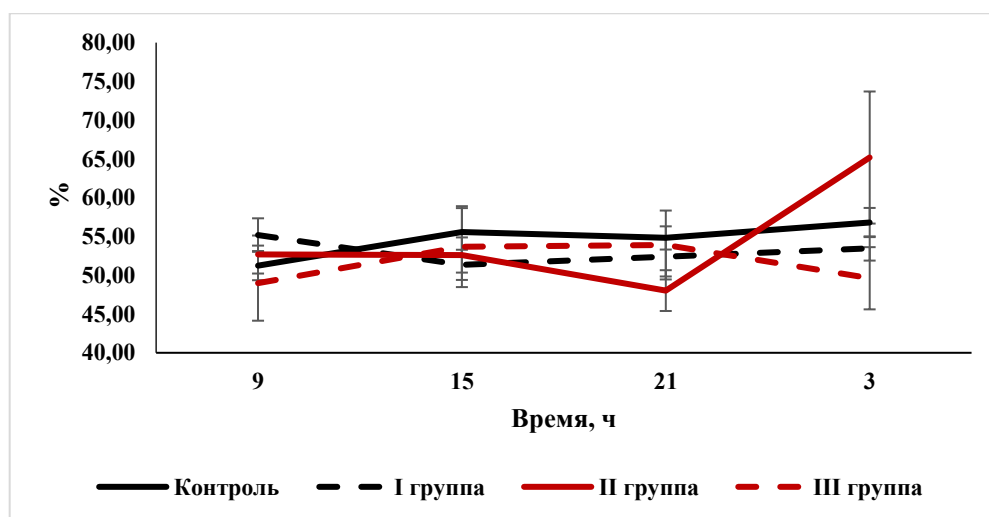


Рис. 50. Суточные колебания гематокрита в крови крыс.

Косинор-анализ позволил установить акрофазу ЦР гематокрита в контроле в 6^{33} с амплитудой 1,75 %. В первой группе акрофаза ритма гематокрита пришлась на 4^{19} , амплитуда возросла до 6,7%. Во второй группе акрофаза смещена на 18^{42} при амплитуде 3,19%. В третьей группе ЦР разрушен (Рис. 51).

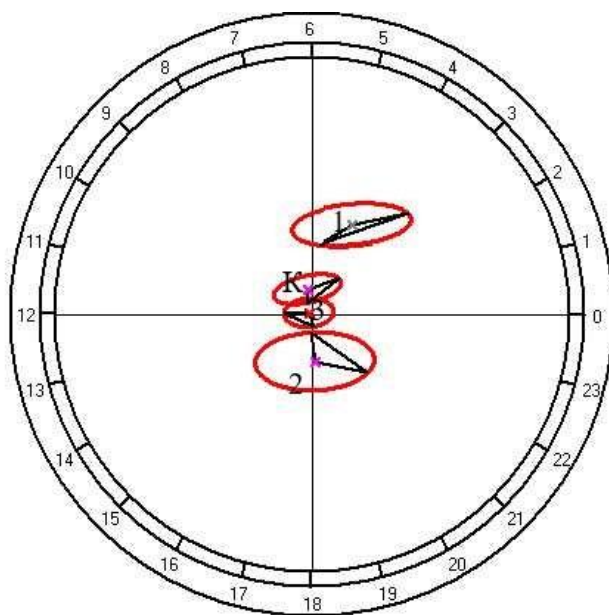


Рис. 51. Результаты косинор-анализа суточной динамики гематокрита в крови крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 2 – вторая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

Анализ содержания эритроцитов в крови контрольных животных позволил установить максимум в 9 часов, с точкой минимума в 21 час. У животных первой группы при том же максимуме минимальное содержание эритроцитов было отмечено в 15 часов, а у крыс второй группы максимум выявлен в 3 часа, ему предшествовала точка минимума, приходившаяся на 21 час. Для хронограммы содержания эритроцитов в крови крыс третьей группы характерен минимум в 9 часов при максимуме в 21 час (Рис. 52).

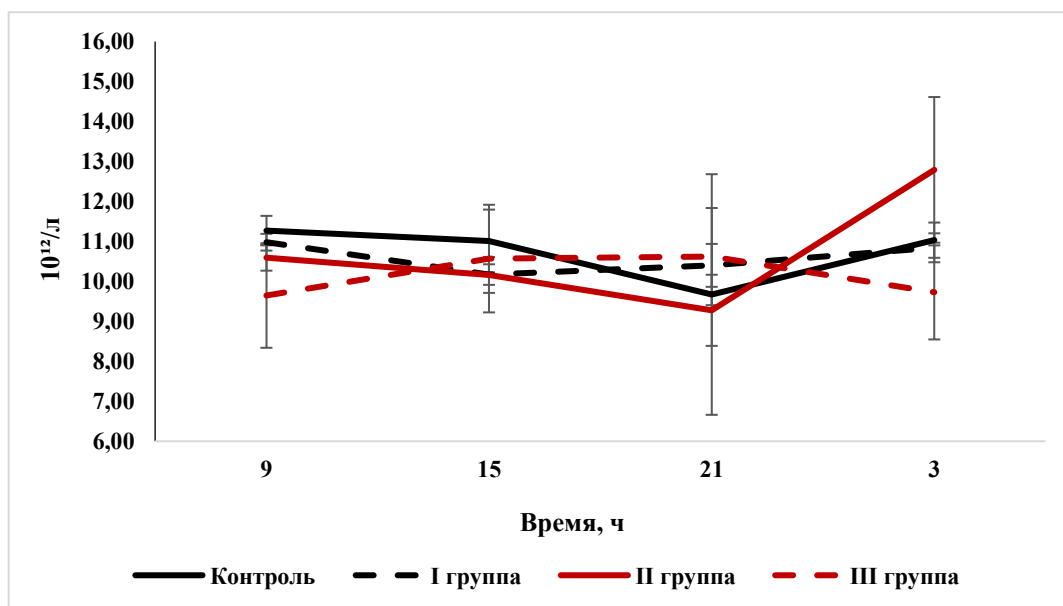


Рис. 52. Суточные колебания количества эритроцитов в крови крыс.

Косинор-анализ свидетельствовал о наличии достоверного ЦР количества эритроцитов в крови крыс всех групп. В контроле акрофаза ритма была отмечена в 8^{55} при амплитуде $0,8 \times 10^{12}/л$, в первой группе акрофаза ритма смещена на 5^{42} часа при амплитуде $0,44 \times 10^{12}/л$, во второй группе акрофаза отмечена в 4^{45} , а амплитуда возросла до $1,47 \times 10^{12}/л$. В последней группе крыс происходит сдвиг акрофазы ритма на 21^{39} при уменьшении амплитуды до $0,64 \times 10^{12}/л$ (Рис. 53).

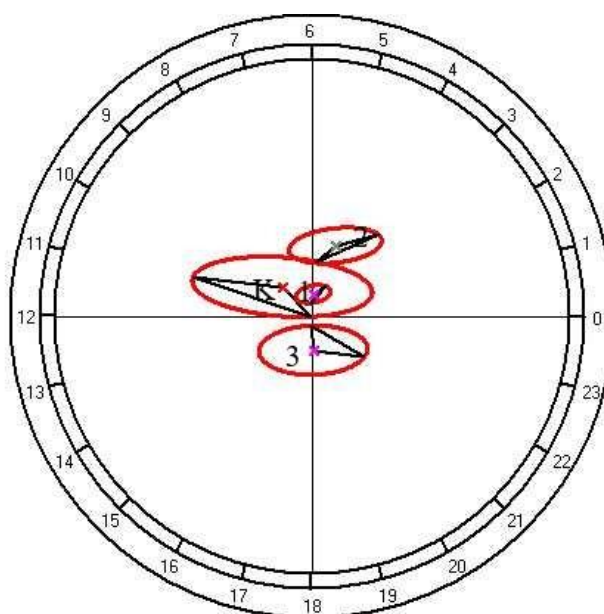


Рис. 53. Результаты косинор-анализа суточной динамики количества эритроцитов в крови крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (досто-

верный ЦР), 2 – вторая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 3 – третья экспериментальная группа (достоверный ЦР).

Содержание гемоглобина в крови крыс достигало максимума в 3 часа в контроле и было минимальным в 21 час. При ХАИ максимум приходился на 9 часов, минимальные значения были отмечены в 15 часов, хронограмма содержания гемоглобина у крыс второй группы повторяет форму таковой в контроле, а в третьей группе максимум пришелся на 15 часов при минимуме в 3 (Рис. 54).

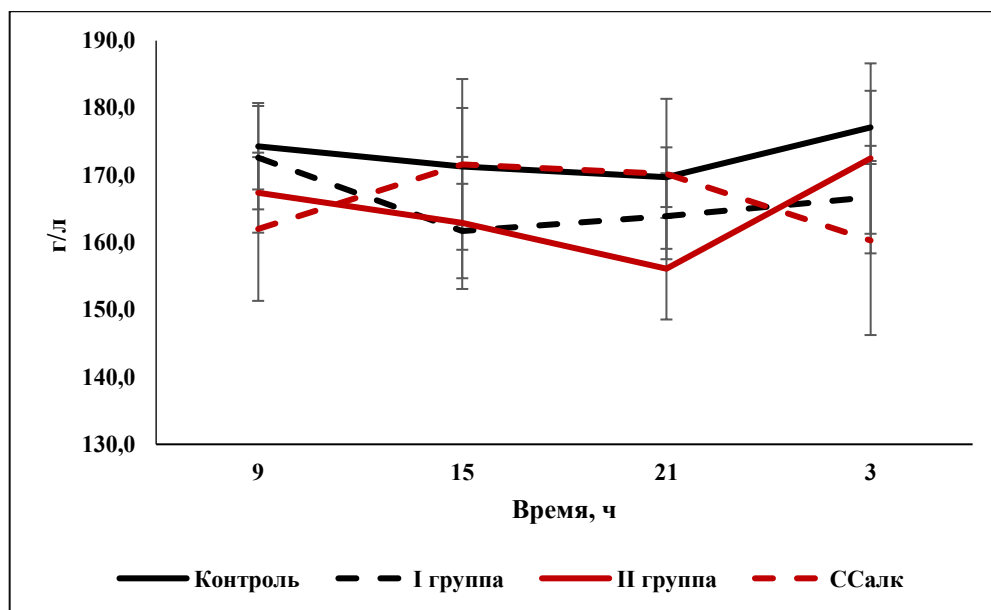


Рис. 54. Суточные колебания содержания гемоглобина в крови крыс.

По результатам косинор-анализа ЦР содержания гемоглобина обнаружен у животных всех групп. В контроле и двух первых экспериментальных группах акрофаза ритма приходилась на утренние часы – 5^{33} , 7^{00} и 2^{58} соответственно, при амплитудах 3,71 г/л, 5,08 г/л и 6,31 г/л. Акрофаза ритма в третьей группе сместилась на 17^{25} , амплитуда составляла 6,98 г/л (Рис. 55).

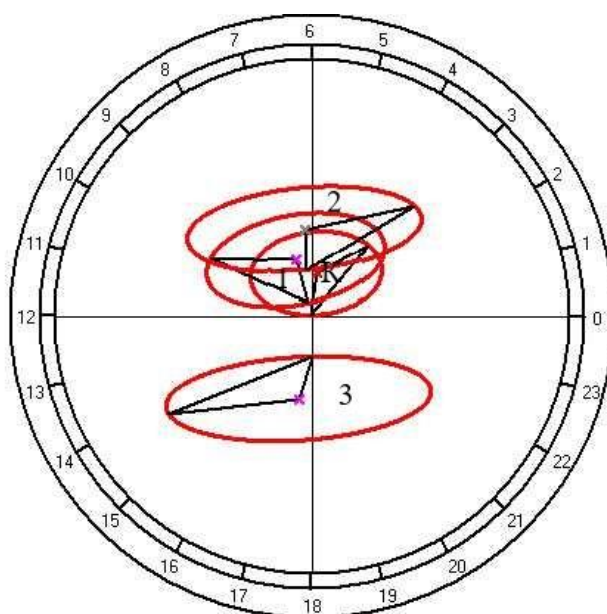


Рис. 55. Результаты косинор-анализа суточной динамики содержания гемоглобина в крови крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 2 – вторая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 3 – третья экспериментальная группа (достоверный ЦР).

Средний объем эритроцитов в контроле наиболее велик в 21 час, снижаясь до минимума в 9 часов, в первой группе при максимуме в 15 часов минимальные значения отмечены в 3 часа, хронограмма объема эритроцитов второй группы характеризовалась максимумом в 15 часов и минимумом в 9, а в третьей группе в 21 час отмечен максимум ритма, а в 15 – минимум (Рис. 56).

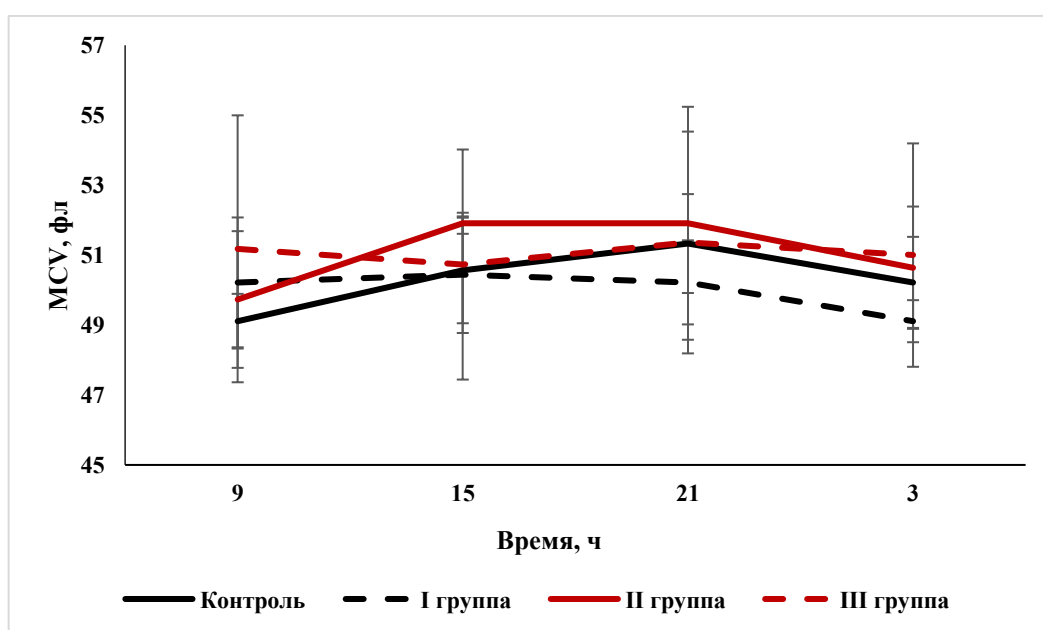


Рис. 56. Суточные колебания среднего объема эритроцита в крови крыс.

Косинор-анализ позволил установить достоверный ЦР среднего объема эритроцитов только в контроле и второй экспериментальной группе с акрофазами в 21^{36} и 15^{00} и амплитудами 1,13 фл и 0,67 фл соответственно (Рис. 57).

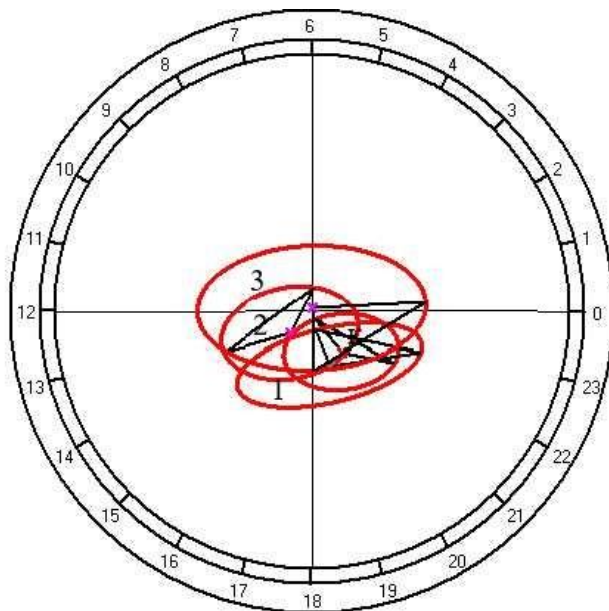


Рис. 57. Результаты косинор-анализа суточной динамики среднего объема эритроцита в крови крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 2 – вторая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

Среднее содержание гемоглобина в эритроцитах крыс контрольной группы наиболее велико в 3 часа, к 9 часам оно снизилось до минимума. В клетках животных второй группы максимум отмечен в 15 часов при минимуме в 3, на хронограмме животных второй группы максимальные значения приходятся на 21 час, минимальные на 3, а у крыс третьей группы максимум содержания гемоглобина наблюдается в 9 часов, минимум – в 21 час (Рис. 58).

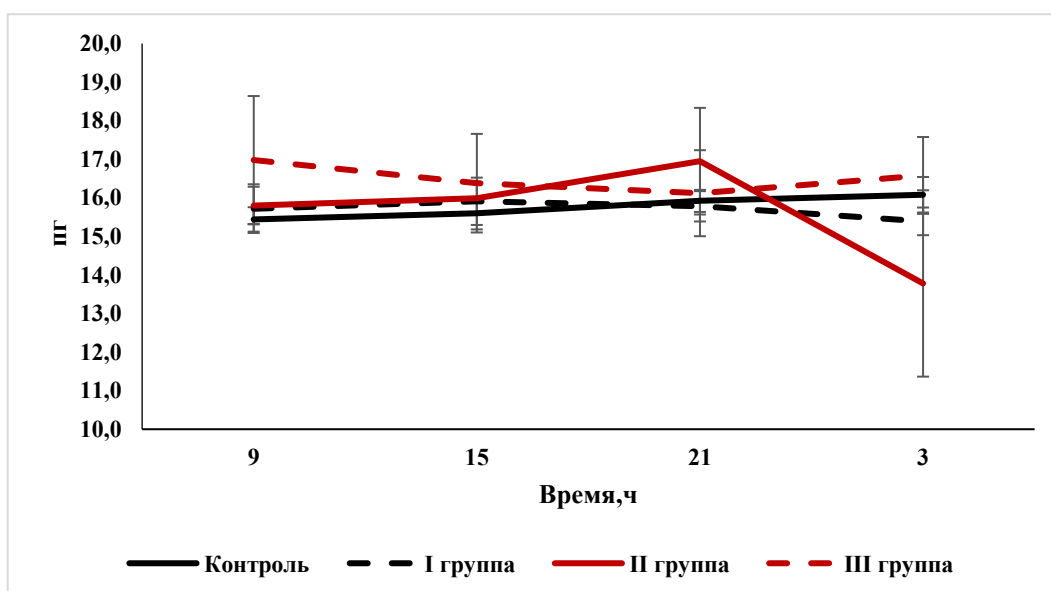


Рис. 58. Суточные колебания среднего содержания гемоглобина в эритроцитах в крови крыс

Достоверный ЦР среднего содержания гемоглобина в эритроцитах установлен только для контроля и второй экспериментальной группы. В первом случае ЦР характеризуется акрофазой в 24^{00} и амплитудой 0,34 г/л, во втором случае акрофаза приходится на 16^{48} , а амплитуда ритма возрастает до 1,25 г/л (Рис. 59).

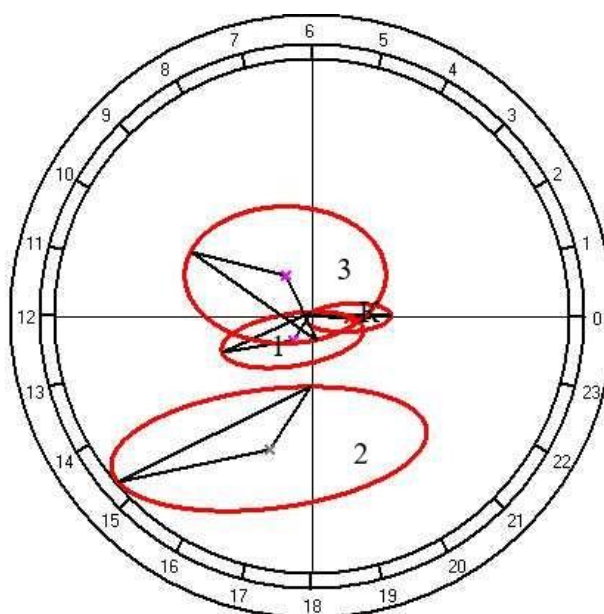


Рис. 59. Результаты косинор-анализа суточной динамики среднего содержания гемоглобина в эритроцитах в крови крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 2 – вторая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

Максимальная средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах в контроле отмечалась в 3 часа, при минимуме в 15. У крыс первой группы минимум отмечен в 3 часа, максимум в 15 час, во второй группе минимум приходится на 3 часа при максимуме в 21, а в третьей минимум отмечен в 21, а максимум – в 9 часов (Рис. 60).

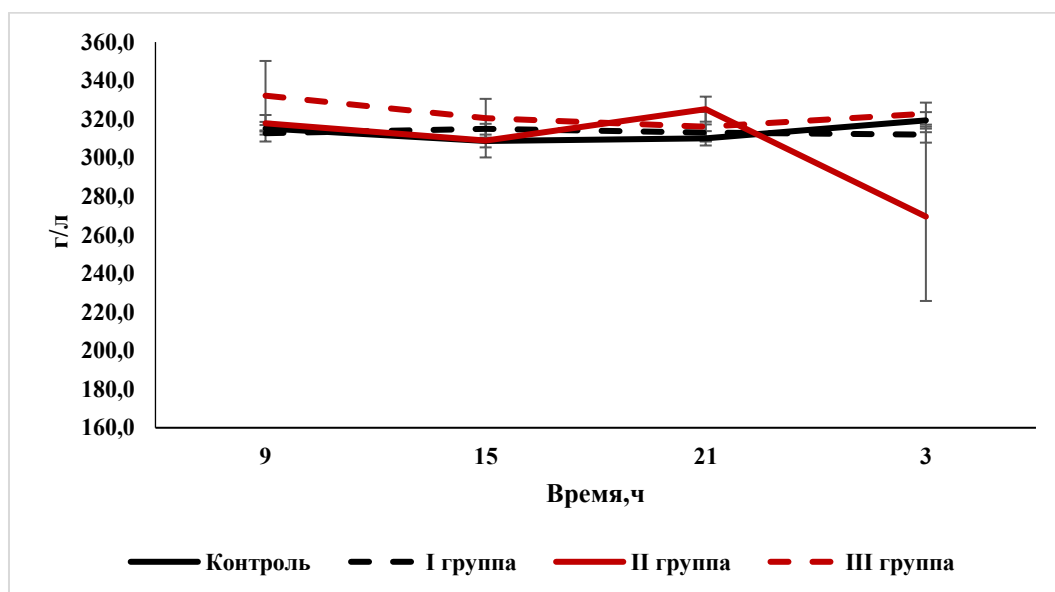


Рис. 60. Суточные колебания средней концентрации гемоглобина в эритроцитах в крови крыс

Для средней концентрации гемоглобина в эритроцитах в контроле обнаружен ЦР с акрофазой в 4^{41} и амплитудой ритма 5,98 г/л. В первой группе акрофаза сдвинута на 8^{24} , амплитуда ритма увеличилась до 8,13 г/л. Во второй группе акрофаза отмечена в 15^{42} , амплитуда увеличилась до 20,0 г/л. Для третьей группы достоверного ЦР этого параметра крови не обнаружено (Рис. 61).

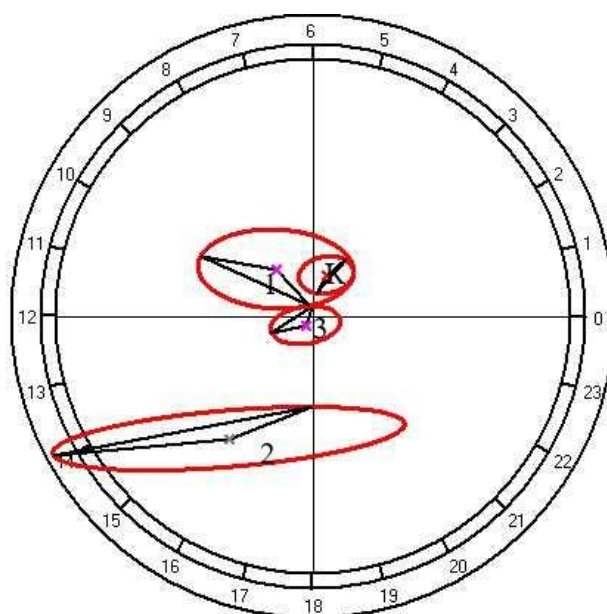


Рис. 61. Результаты косинор-анализа суточной динамики средней концентрации гемоглобина в эритроцитах в крови крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 2 – вторая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

Ширина распределения эритроцитов в контроле максимальна в 9 часов, минимальна в 21 час. В первой группе максимум отмечен в 21 час, минимум – в 15, во второй группе – в 3 и 9 часов соответственно, но в третьей максимум приходится на 3 часа, а минимум – на 21 час (Рис. 62).

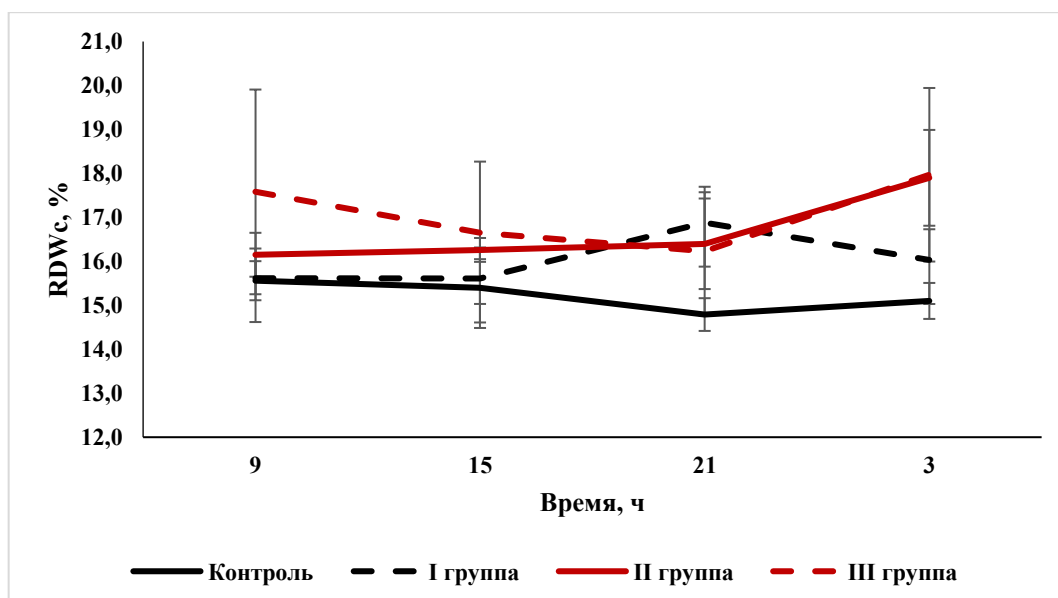


Рис. 62. Суточные колебания ширины распределения эритроцитов в крови крыс

Косинор-анализ выявил два достоверных ЦР ширины распределения эритроцитов: в контроле, с акрофазой в 10^{25} и амплитудой 0,41%, а также во второй группе – с акрофазой в 2^{25} и амплитудой 0,83% (Рис. 63).

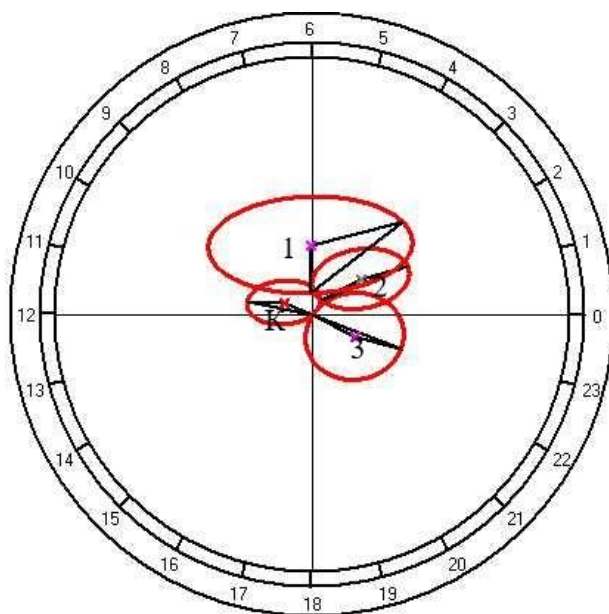


Рис. 63. Результаты косинор-анализа суточной динамики ширины распределения эритроцитов в крови крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 2 – вторая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

Протромбиновое время в контроле отказалось максимальным 21 час, снижаясь до минимума в 3 часа, в первой группе этот параметр наиболее велик в 15 часов при минимуме в 9 часов, во второй группе максимальные значения отмечены в 9 часов, минимальные – в 15, тогда как в третьей группе наоборот, максимум пришелся на 15 часов при минимуме в 9 часов (Рис. 64).

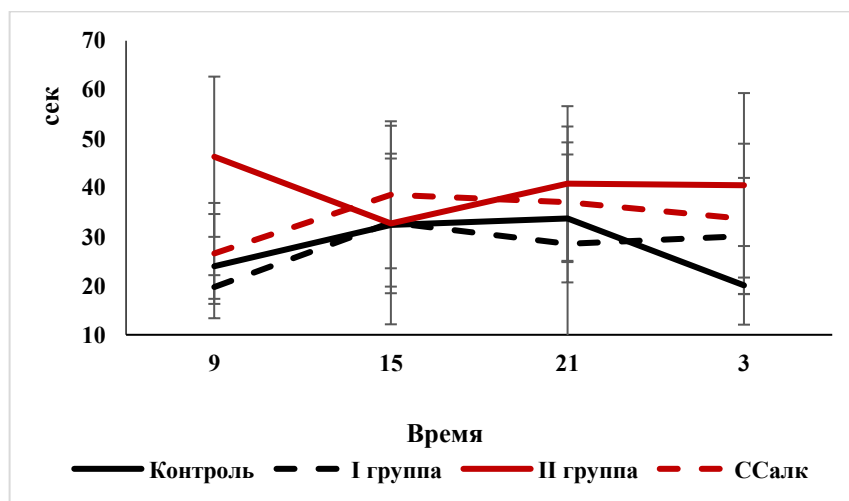


Рис. 64. Суточные колебания протромбинового времени у крыс

Косинор-анализ выявил ЦР протромбинового времени только у крыс контрольной группы. Акрофаза ритма приходилась на 17³³, амплитуда составила 7,84 сек (Рис. 65).

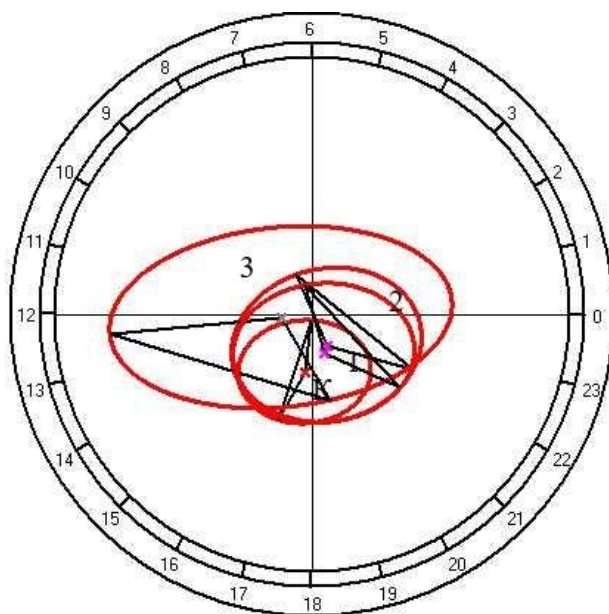


Рис. 65. Результаты косинор-анализа суточной динамики протромбинового времени у крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 2 – вторая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

3.2.5 Влияние постоянного освещения и ХАИ на организацию циркадного ритма температуры.

Суточная динамика температуры тела у крыс контрольной группы характеризовался максимальными значениями в 3 часа при минимуме в 15 часов. У животных первой экспериментальной группы максимум отмечен в 21 час при минимуме в 15 часов, а у крыс второй группы при максимуме в 9 часов минимальные значения отмечены в 21 час. В третьей экспериментальной группе ритм сглажен, максимум отмечен в 21 час, минимум – в 3 часа (Рис. 66).

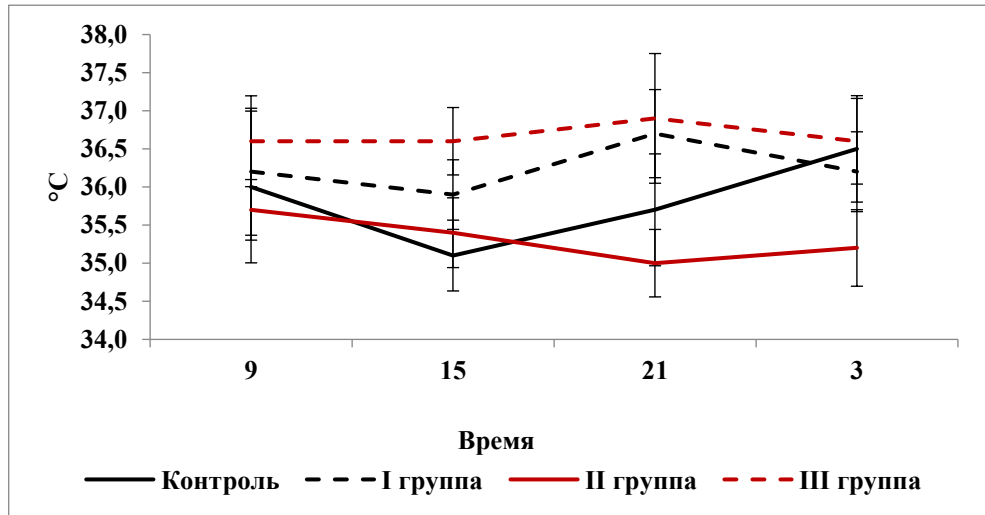


Рис. 66. Суточные колебания ректальной температуры у крыс.

Косинор-анализ позволил установить достоверный ЦР только у животных контрольной и второй группы при акрофазах 3^{53} и 9^{41} и амплитудах $0,70^{\circ}\text{C}$ и $0,40^{\circ}\text{C}$ соответственно (Рис. 67).

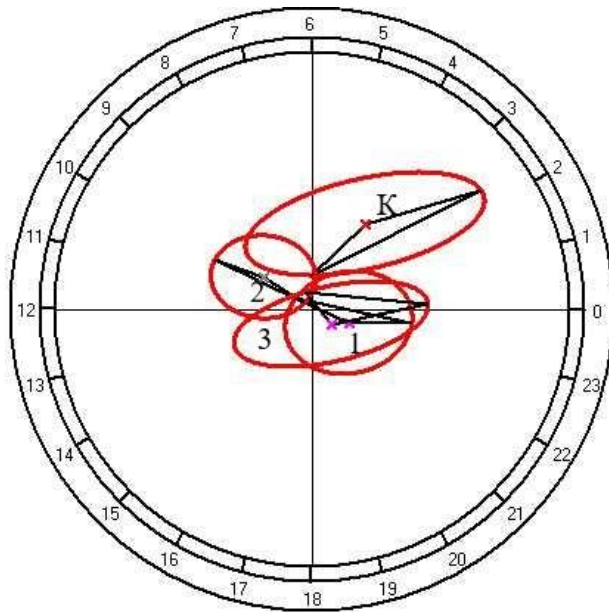


Рис. 67. Результаты косинор-анализа суточной динамики температуры у крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 2 – вторая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

3.2.6. Влияние постоянного освещения и ХАИ на организацию циркадных ритмов экспрессии исследованных генов.

При исследовании суточной динамики экспрессии *Ki-67* нами установлено, что в контроле максимальная экспрессия отмечается в ночные часы, ми-

нимальная – в дневные. В гепатоцитах крыс I экспериментальной группы максимум экспрессии отмечен в 9 часов, а минимум – в 21. У крыс второй группы, при том же максимуме, минимальные значения отмечены в 3 часа. В гепатоцитах животных третьей группы максимальная экспрессия *Ki-67* отмечена в 15 часов, минимальная – в 3 часа (Рис. 68).

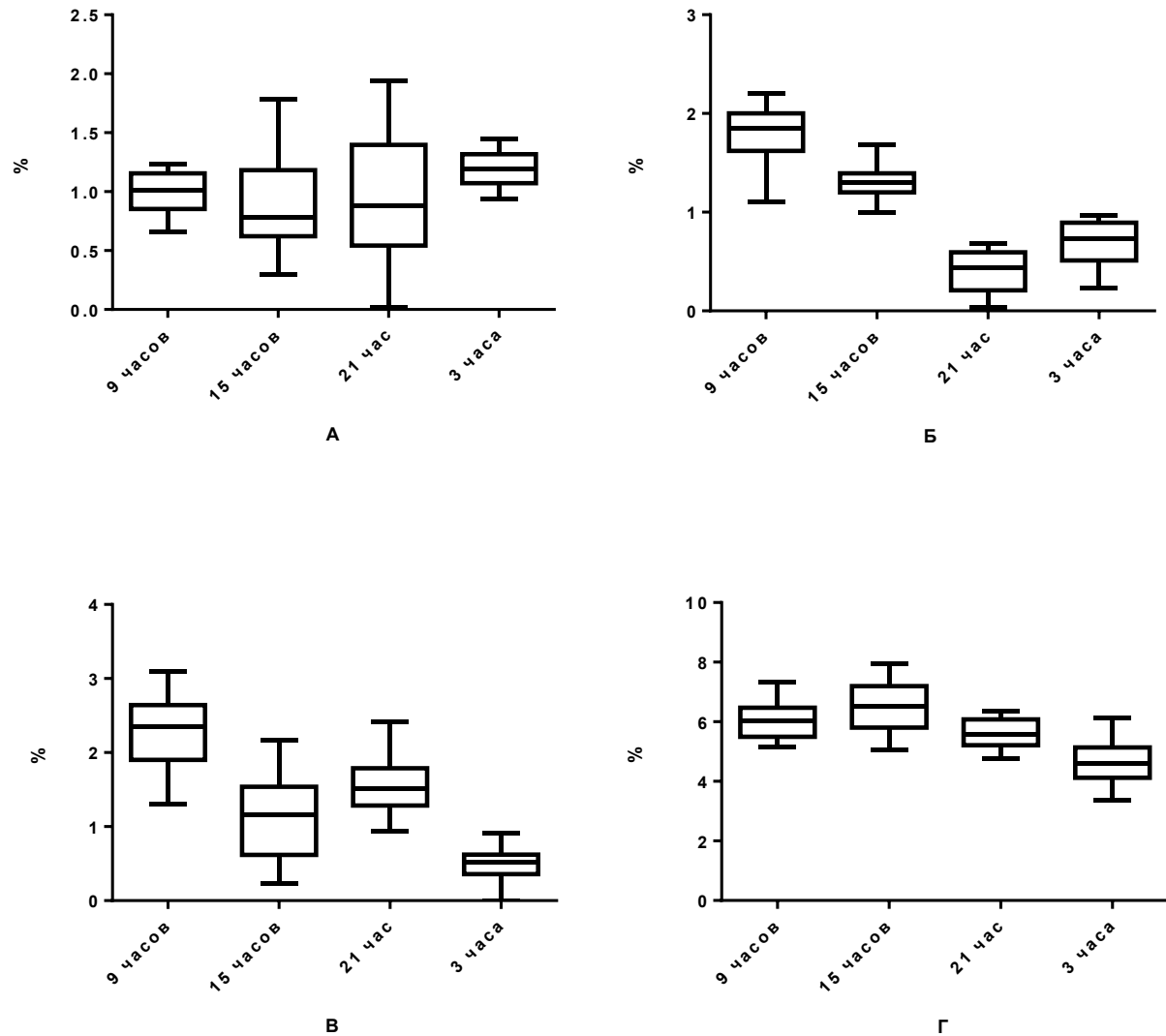


Рис. 68. Суточные колебания экспрессии *Ki-67* в гепатоцитах крыс: А – контрольной группы; Б – 1-й экспериментальной группы; В – 2-й экспериментальной группы; Г – 3-й экспериментальной группы.

Косинор-анализ позволил установить достоверный ЦР экспрессии *Ki-67* в гепатоцитах крыс контрольной группы (акрофаза в 22^{14} и амплитуда 1,0%) и в клетках крыс первой группы (акрофаза в 10^{42} и амплитуда 1,01 %) (Рис. 69).

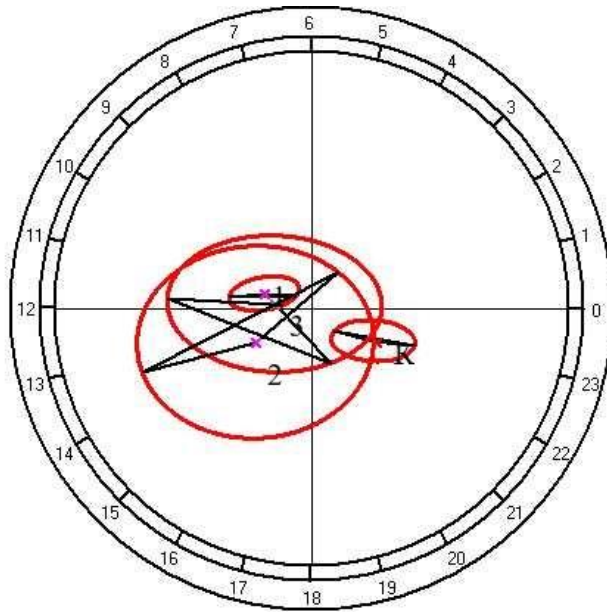


Рис. 69. Результаты косинор-анализа суточной динамики экспрессии *Ki-67* в гепатоцитах крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 2 – вторая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

При рассмотрении суточной динамики экспрессии *p53* в контроле и I экспериментальной группе обнаружен максимум экспрессии гена в 15 часов при минимуме в 9. У животных второй группы минимум сместился на 3 часа, а у крыс третьей группы при том же минимуме максимальные значения отмечены в 9 часов. Хронограммы в двух последних группах сглажены (Рис. 70).

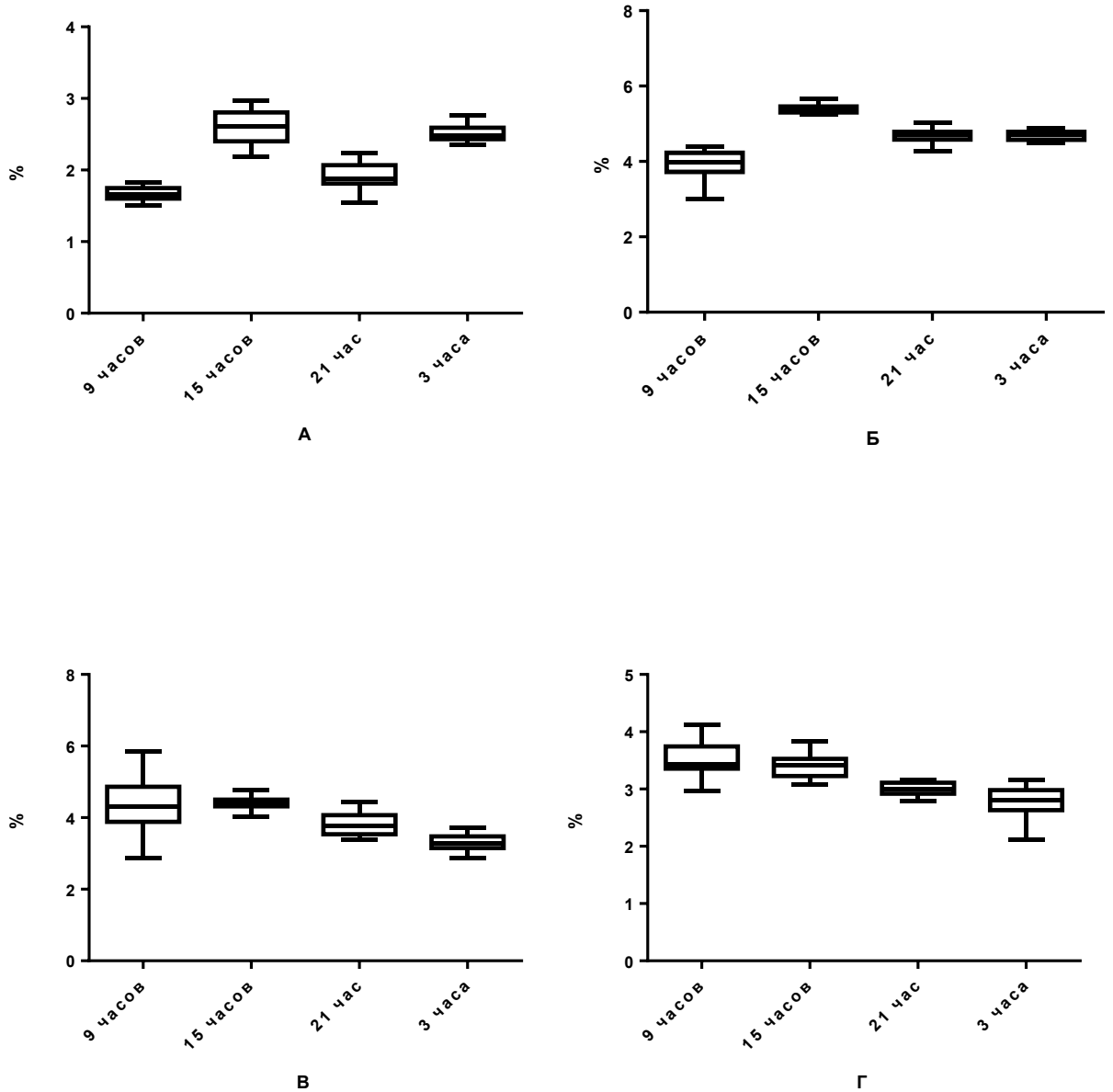


Рис. 70. Суточные колебания экспрессии *p53* в гепатоцитах крыс: А – контрольной группы; Б – 1-й экспериментальной группы; В – 2-й экспериментальной группы; Г – 3-й экспериментальной группы.

Проведенный косинор-анализ показал наличие достоверного ЦР экспрессии *p53* в печени крыс контрольной и первой групп с акрофазами в 20^{48} и 13^{42} и амплитудами 0,35% и 0,60% соответственно (Рис. 71).

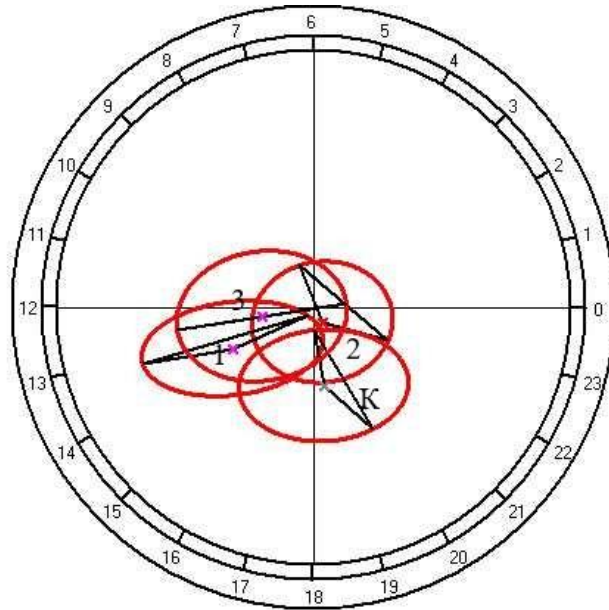


Рис. 71. Результаты косинор-анализа суточной динамики экспрессии *p53* в гепатоцитах крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 2 – вторая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

При рассмотрении суточной динамики экспрессии *Bmal1* в гепатоцитах крыс контрольной группы нами обнаружен пик максимума в 15 часов с минимумом в 3 часа. Та же динамика сохранилась и у животных первой и третьей экспериментальных групп, но в гепатоцитах крыс второй группы минимум сместился на 21 час (Рис. 72).

В то же время результаты косинор-анализа свидетельствуют о наличии достоверного ЦР только в гепатоцитах животных контрольной группы – акрофаза в 13³⁴ и амплитуда ритма 6,28%, и второй экспериментальной группы – с акрофазой в 9⁴⁸ и амплитудой ритма в 6,70% (Рис. 73).

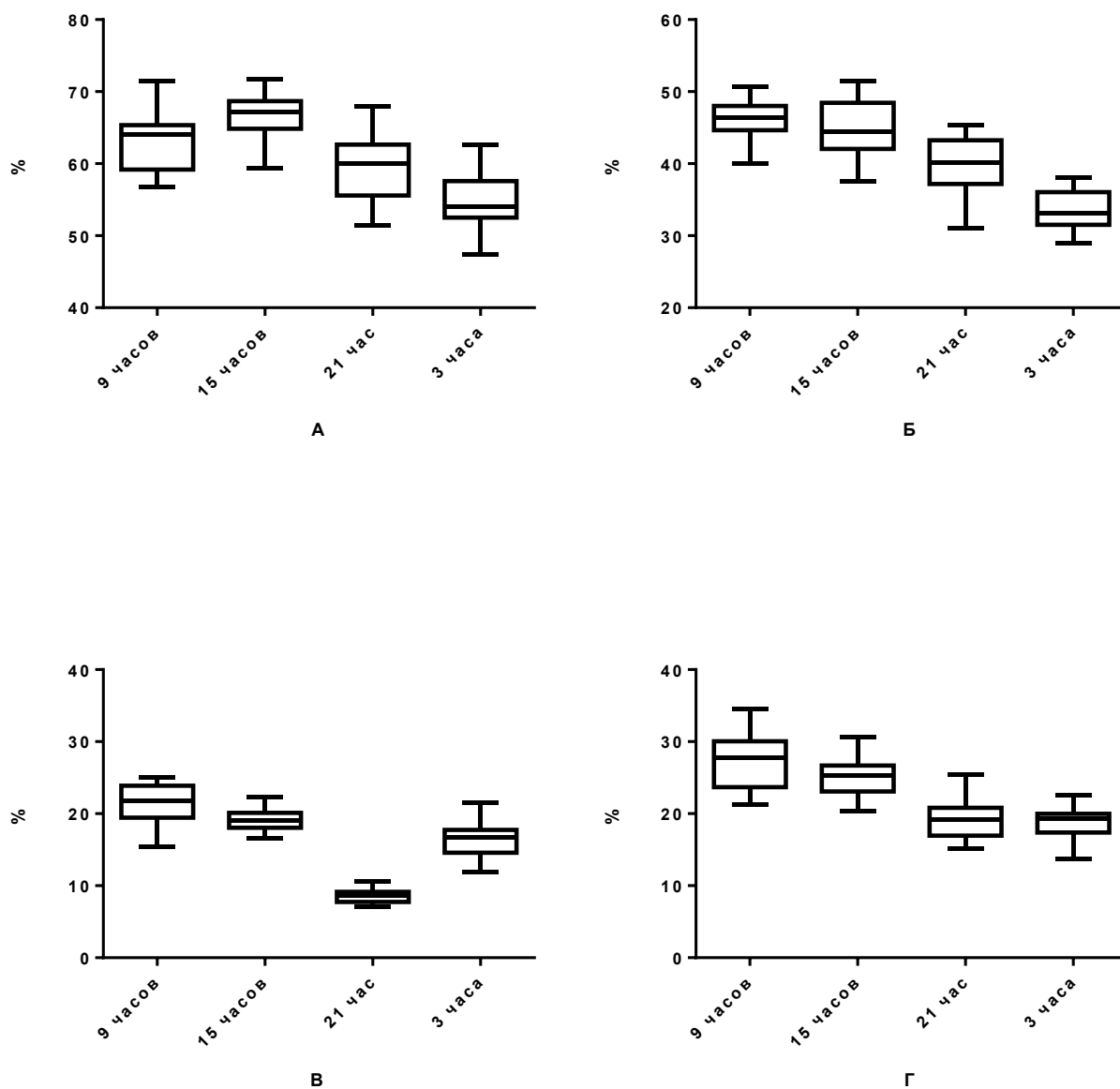


Рис. 72. Суточные колебания экспрессии *Bmal1* в гепатоцитах крыс: А – контрольной группы; Б – 1-й экспериментальной группы; В – 2-й экспериментальной группы; Г – 3-й экспериментальной группы.

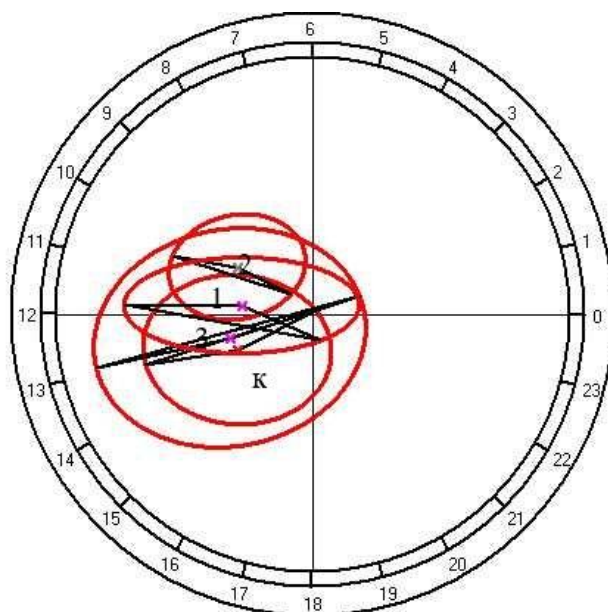


Рис. 73. Результаты косинор-анализа суточной динамики экспрессии *Bmal1* в гепатоцитах крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 2 – вторая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

Суточная ритмика экспрессии *Per2* в гепатоцитах интактных животных характеризовалась максимумом в 3 часа при минимуме в 15. В печени крыс первой экспериментальной группы максимум сместился на 21 час, а минимум экспрессии отмечен в 9 часов. У животных второй группы при максимуме в 15 часов минимум смещен на 3 часа, а в третьей группе при сглаженности ритмики максимум отмечен в 3 часа, минимум в 21 (Рис. 74).

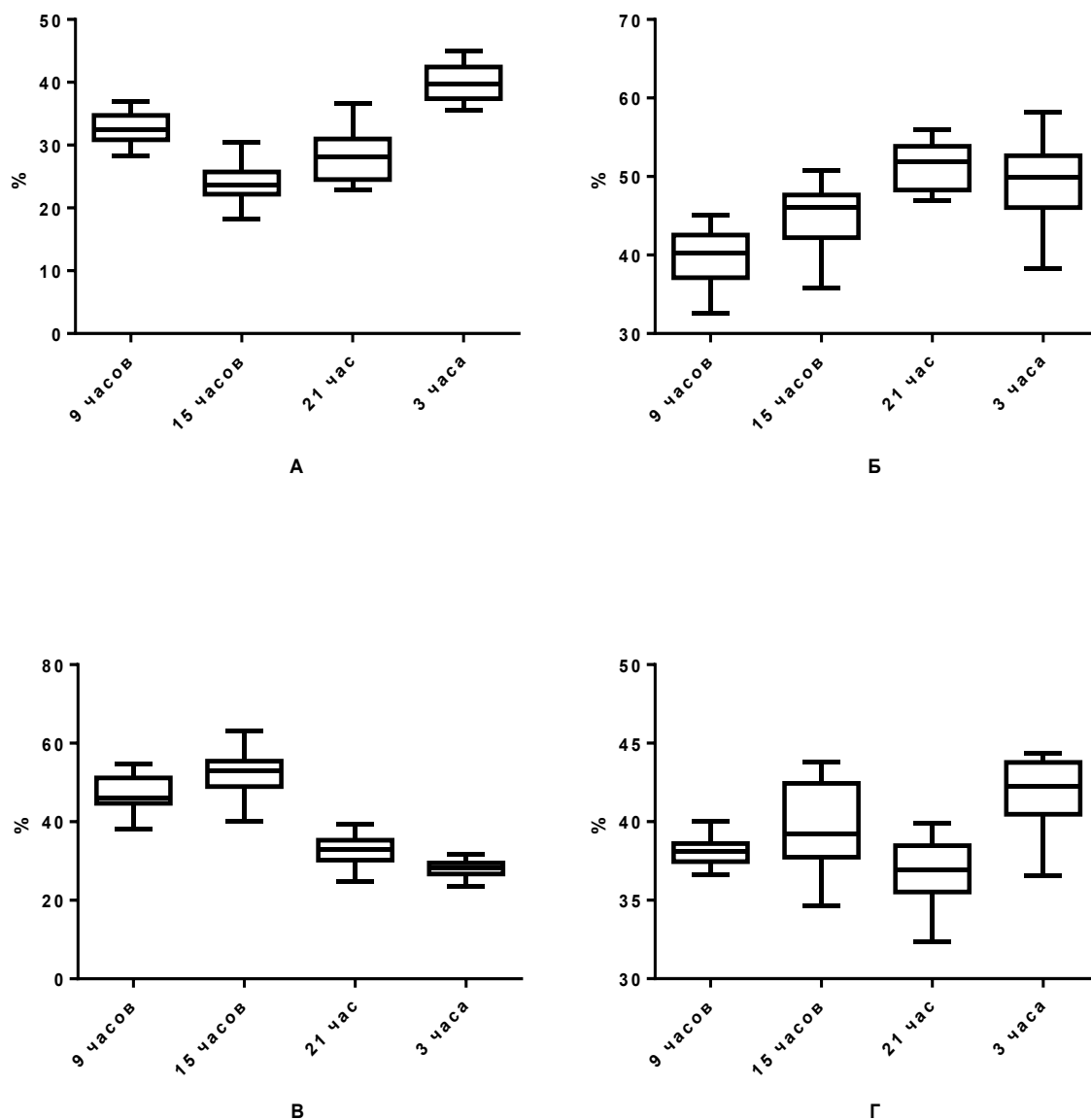


Рис. 74. Суточные колебания экспрессии *Per2* в гепатоцитах крыс: А – контрольной группы; Б – 1-й экспериментальной группы; В – 2-й экспериментальной группы; Г – 3-й экспериментальной группы.

Косинор-анализ показал наличие достоверного ЦР экспрессии *Per2* в контроле и у животных второй экспериментальной группы с акрофазами в 4^{02} и 13^{04} и амплитудами 8,04% и 14,06% соответственно (Рис. 75).

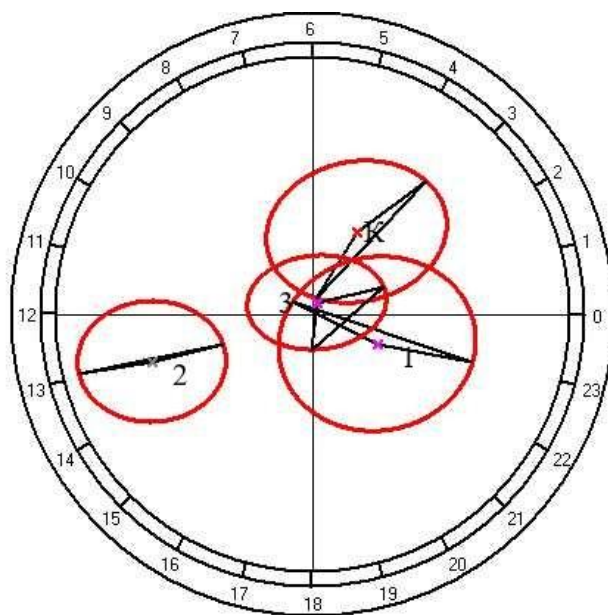


Рис. 75. Результаты косинор-анализа суточной динамики экспрессии *Per2* в гепатоцитах крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 2 – вторая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 3 – третья экспериментальная группа (ЦР разрушен).

В гепатоцитах крыс контрольной и второй экспериментальной групп максимальной экспрессия *Adh5* обнаружена в 9 часов с минимумом в 3, при этом суточные колебания слабо выражены. У крыс первой экспериментальной группы максимум отмечен в 3 часа, минимум – в 15 часов, у животных третьей группы картина противоположна (Рис. 76).

По данным косинор-анализа ЦР экспрессии *Adh5* в контроле характеризовалась акрофазой в 9¹³ часа и амплитудой 1,19%. В первой экспериментальной группе акрофаза ритма смещена на 3²⁴, амплитуда ритма возрастает до 9,65%. В гепатоцитах крыс второй группы ритм разрушился, а в третьей акрофаза отмечена в 2¹⁴, амплитуда равна 8,68% (Рис. 77).

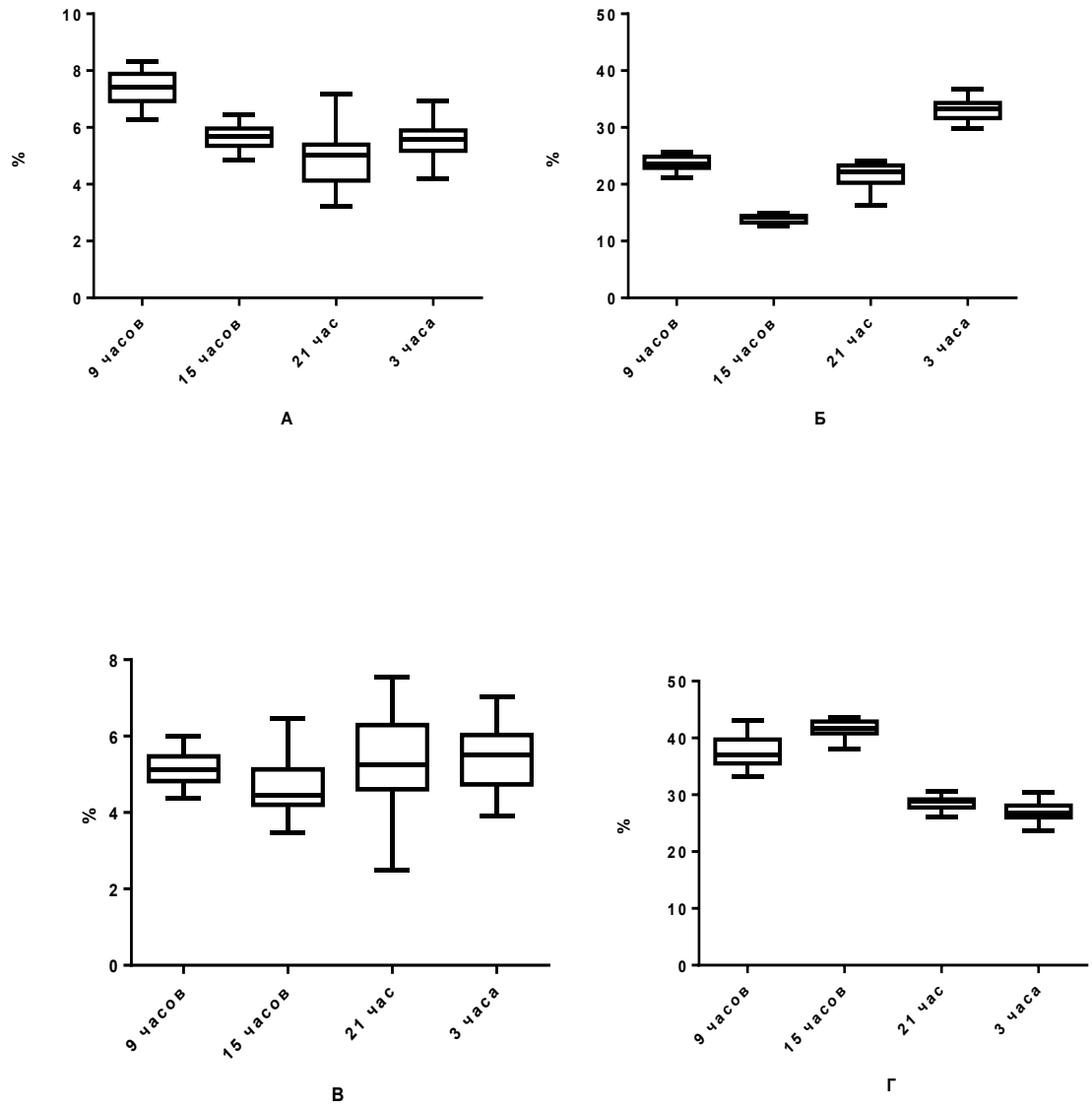


Рис. 76. Суточные колебания экспрессии *Adh5* в гепатоцитах крыс: А – контрольной группы; Б – 1-й экспериментальной группы; В – 2-й экспериментальной группы; Г – 3-й экспериментальной группы.

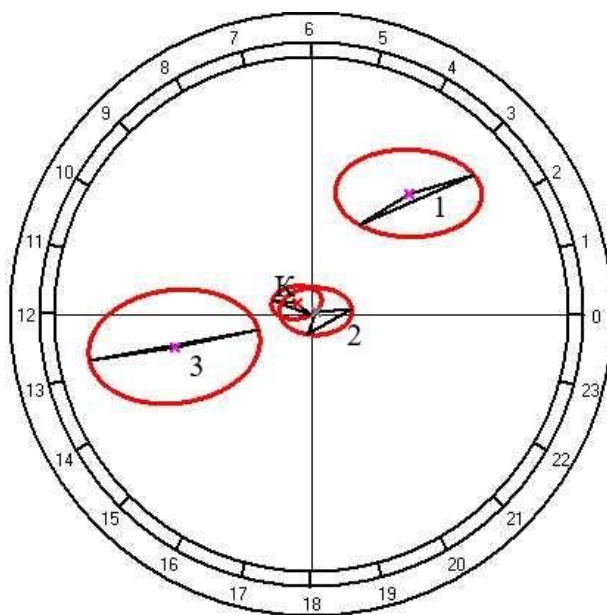


Рис. 77. Результаты косинор-анализа суточной динамики экспрессии *Adh5* в гепатоцитах крыс. К – контроль (достоверный ЦР), 1 – первая экспериментальная группа (достоверный ЦР), 2 – вторая экспериментальная группа (ЦР разрушен), 3 – третья экспериментальная группа (достоверный ЦР).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.

Термин «хронобиология» был введен в современную науку Францем Халбергом в 1969 году. Статья, опубликованная в «Годовом обзоре физиологии», так и называлась – «Хронобиология». В ней были сформулированы понятия о циркадных ритмах, а также было дано современное на тот момент представление о временной координации функций организма (Halberg F., 1969). Почти сразу же одним из основных объектов исследования в хронобиологии стала печень. Это обусловлено тем, что на протяжении длительного времени печень, являясь одним из ведущих органов обеспечения гомеостаза, привлекает внимание исследователей, но до сих пор вопросы развития, строения, функций, а также, что особенно важно, механизмов компенсаторно-приспособительных реакций этого органа остаются не решенными в полной мере. Кроме того, до сих пор не исследован полностью вопрос о регенераторных свойствах и механизмах поддержания тканевого гомеостаза печени (Шифф Ю.Р. с соавт., 2011; Мяделец О. Д., Лебедева Е. И., 2018).

В свою очередь, за два последних десятилетия был получен обширный фактический материал, позволяющий утверждать о ведущей роли хронодеструкторов (нарушение режима освещения, пребывание в условиях постоянного освещения или темноты, влияние биологически активных веществ, в том числе и алкоголя) в развитии различных заболеваний печени. Однако при этом, как и в хронобиологии в целом, преимущественно рассматриваются физиологические и молекулярно-биологические проявления воздействия хронодеструкторов, и традиционно крайне мало внимания уделяется морфологическому аспекту изменений, происходящих в органе в исследуемых условиях. Кроме того, при исследовании влияния алкоголя на печень, в особенности в хронобиологическом контексте, как правило рассматривается период стойко сформировавшейся алкогольной болезни, но вопросы начального этапа воздействия алкоголя как на хроноструктуру организма млекопитающих, так и на строение органов, функции которых её обеспечивают, изучены слабо.

Проведенное исследование позволяет рассмотреть влияние постоянного освещения, хронического воздействия этанола и их совместного действия на структурные и функциональные особенности печени млекопитающих именно на модели начальной стадии алкогольной болезни.

Анализ динамики массы тела животных показал достоверное снижение этого показателя у крыс II группы в течение всех трех недель эксперимента, у животных III группы – на 1-й и 2-й неделе исследования. При этом у крыс второй группы масса тела на третьей неделе исследования оказалась выше, чем на второй.

Согласно литературным данным, это объясняется тем, что в течение первых 14 дней при постоянном освещении на фоне выраженного увеличения продолжительности периода физической активности отмечается выраженная дислипидотеинемия, сопровождающаяся снижением массы тела, а к концу эксперимента (21 дню темновой депривации) происходит адаптация к новым условиям освещения (Соболевская И. С. с соавт., 2021; Andersen M.L. et al., 2009; Alvarenga T.A. et al., 2012; Bahrami M. et al, 2019).

Изменение количественного состава липидов сыворотки крови происходит за счет усиления перекисного окисления липидов в ответ на уменьшение поглотительной способности мелатонина в отношении свободных радикалов; за счет снижения гепатопротекторной функции, что, в свою очередь, вызывает усиленную перекисидацию в печени; из-за подавления синтеза мелатонина, которое приводит к увеличению инсулинорезистентности, адипогенеза и, в результате, массы тела; а также из-за возрастания потребности в стероидных гормонах и активизации прямого транспорта холестерина при стрессе (Соболевская И. С. с соавт., 2020).

Также установлено увеличение абсолютной и относительной массы печени у животных второй и третьей групп, что является результатом процесса адаптации к новым условиям внешней среды, а у крыс третьей группы – еще и

результатом развития гепатита вследствие влияния этаноловой интоксикации (Белых Е.А. с соавт., 2017; Литвиненко А. Н. с соавт., 2018).

Нами установлено, что трехнедельная ХАИ вызывает 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 вызывает значительные изменения в морфофункциональном состоянии печени, в частности, проявляющиеся в развитии гепатита.

Возникновение жировой дистрофии в печени крыс первой экспериментальной группы объяснимо влиянием ХАИ, поскольку под влиянием этанола происходят: усиление высвобождения липидов из жировых депо, увеличение биосинтеза жирных кислот в гепатоцитах, активация образования из жирных кислот триацилглицеролов, подавление окисления жирных кислот, уменьшение биосинтеза и высвобождения липопротеинов и уменьшение проницаемости плазмолеммы гепатоцита в связи с усилением синтеза и накоплением холестерина (Киселева Я. В. с соавт., 2020).

Появление жировой дистрофии в печени крыс второй экспериментальной группы связано со снижением уровня мелатонина в крови этих животных. Как известно, печень в жировом обмене участвует через воздействие желчи на жиры в кишечнике, а также непосредственно путем синтеза холестерина, и на оба эти процесса в норме влияет мелатонин. Установлено, что введение мелатонина животным, содержащимся на высокожировой диете, ослабляет процессы стеатоза печени при одновременном снижении уровня АЛТ, АСТ, общего холестерина и триглицеридов в печени (Pan M. et al., 2006; Owino S. et al., 2016). При том, однако, существует мнение, что мелатонин не оказывает влияния на алкогольиндуцированную экспрессию липогенных генов (Hu S. et al., 2009). Кроме того, развитие мелкокапельной жировой дистрофии в гепатоцитах при стрессе, каковым является подверженность постоянному освещению, коррелирует с

продолжительностью стрессорного воздействия (Lang F., 2007; Corona-Pérez A. et al., 2015), ассоциируется с повышением уровня гормонов коры надпочечников, в первую очередь глюкокортикоидов, что вызывает усиление экспрессии серотониновых рецепторов 5-HT_{2A} и 5-HT_{2B}, триптофангидроксилазы 1 и синтеза серотонина (Vásquez B. et al., 2014). Накопление гепатоцитами липидных капель при стрессе сопровождается усилением экспрессии генов липолиза и β -окисления жирных кислот (Konstandi M. et al., 2013; Fu J. et al., 2016).

Результаты гистохимических исследований свидетельствуют о накоплении липидов, уровень содержания которых достоверно выше контрольного, в гепатоцитах крыс всех экспериментальных групп, что объясняется развитием жировой дистрофии.

Развитие гепатита в печени крыс третьей группы, исходя из вышеизложенного, вызвано как влиянием этанола, так и отсутствием гепатопротекторного действия мелатонина.

Хроническое употребление алкоголя приводит к накоплению эндотоксинов в печени. Эти эндотоксины активируют клетки Купфера, продуцирующие активные формы кислорода и различные растворимые факторы и цитокины (например, TNF- α), что приводит к повреждению печени (Uesugi et al., 2002). Мелатонин может блокировать этот прогресс, ослабляя окислительный стресс и воспалительную реакцию, ингибируя синтез активных форм кислорода, TNF- α из клеток Купфера.

Предполагается, что воспалительные реакции, связанные с алкогольным повреждением печени, являются следствием вызванного алкоголем увеличения абсорбции эндотоксинов, полученных из кишечника, вызывающих активацию клеток Купфера и высвобождение провоспалительных цитокинов и хемокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-8 и др.), оксида азота (NO) (Vidali M. et al., 2008), что в итоге приводит к апоптозу или некрозу гепатоцитов. Мелатонин не только снижал экспрессию белка и сигнальной РНК некоторых провоспалительных цитокинов и хемокинов, но и подавлял инфильтрацию нейтрофилов (Hu S. et al., 2009).

Мелатонин также обладает противофиброзным действием, существенно ограничивая дифференцировочный потенциал клеток Ито в сторону миофибробластов с последующим ограничением аккумуляции фибронектина в перисинусоидальном пространстве печени (Налобин Д.С. с соавт., 2016; Hong R.T. et al., 2009).

Нами установлено, что хроническая алкогольная интоксикация не вызывает изменений исследованных микроморфометрических параметров гепатоцитов. В то же время в гепатоцитах крыс второй группы увеличивается отношение объема ядра к его площади, возрастают его кратчайший и средний диаметры, снижается индекс удлиненности. При том увеличивается как площадь поперечного сечения клетки, так и ее объем, и снижается ЯЦО. Также происходит снижение средней плоидности гепатоцитов этой группы и уменьшается доля двуядерных клеток. Согласно литературным данным, в отдельных случаях это наблюдается при снижении интенсивности пролиферативных процессов (Miyaoaka Y. et al., 2012). Темновая депривация также сопровождается девиацией многих невоспалительных мелатонин-ассоциированных эффектов. Если в условиях стандартного светового режима мелатонин обладает способностью активировать пролиферацию гепатоцитов за счет ингибирования IKK α , JNK1 и cJUN (c-Jun N-terminal kinases), угнетающих митотическую и апоптическую активность (Abbasoglu O. et al., 1995), то в отсутствие эпифизарного мелатонина наблюдается их резкое снижение (Liang R. et al., 2009). Известно, что одним из эффектов мелатонина является увеличение плоидности и доли двуядерных гепатоцитов (Березовский В.А. с соавт., 2012; Yanko R., 2018), а пинеалэктомия снижает интенсивность пролиферации в печени после её частичной резекции (Abbasoglu O. et al., 1995). Увеличение площади и объёма гепатоцитов обычно связывают с повышением уровня гормонов стресса. Стимуляция $\alpha 1$ -адренорецепторов увеличивает ядерный объем гепатоцитов и плотность ядрышек за счет высвобождения внутриклеточного Ca²⁺ и последующей активации ДНК-полимеразы. Помимо этого, эндотоксины и TNF α увеличивают объем ге-

патоцитов за счет активации сигнальных путей и задержки Na^+ и воды (Kobayashi T. et al., 2012; Wilkinson P.D., Duncan A.W., 2020).

Набухание гепатоцитов увеличивает экскрецию желчи и имеет гепатопротективный эффект (Häussinger D. et al., 2001), вызывает анаболический ответ, считается своеобразным триггером, запускающим подавление пролиферации при регенерации клеток печени (Bardeck N. et al., 2021).

В печени крыс третьей группы отмечается снижение линейных размеров ядер гепатоцитов, а также V/A-отношения при росте коэффициента формы ядра, снижении индекса контура и ЯЦО.

Увеличение среднего диаметра ядер при одновременном уменьшении их индекса удлинённости и тенденции к увеличению размеров свидетельствует о развитии паранекроза (Schott M.B. et al., 2017; Rodrigues F.M. et al., 2019).

Согласно одним источникам, гипертрофия гепатоцитов сопровождается полиплоидизацией ядер и образованием двуядерных клеток (Ельчанинов А.В., Большакова Г.Б., 2011), однако в печени крыс второй группы происходит как уменьшение плоидности, так и снижение доли двуядерных гепатоцитов. В то же время, способами восстановления функций печени в стрессогенных условиях являются и увеличение плоидности ядер, образование двуядерных клеток и компенсаторная гипертрофия клеток (Lazzeri E. et al., 2019). Так, в частности, показано, что при токсическом воздействии на печень регенерация органа может осуществляться за счет гипертрофии клеток при резко подавленном синтезе ДНК (Nagy P. et al., 2001). Имеются данные о том, что при регенерации диплоидные гепатоциты пролиферируют быстрее, чем полиплоиды, снижая общую плоидность клеток печени. Было предположено, что полиплоидное состояние функционирует как супрессор роста, ограничивая пролиферацию большинства клеток (Zhou D. et al., 2016). В свою очередь, снижение количества двуядерных гепатоцитов свидетельствует о депрессии пролиферативных процессов. Учитывая литературные данные, свидетельствующие о том, что на начальных этапах адаптации к патогенному воздействию печень реагирует именно внутриклеточ-

ной регенерацией путем гипертрофии гепатоцитов без их пролиферации (Miyaoaka Y. et al., 2012), можно предположить, что в клетках крыс второй группы адаптация осуществляется преимущественно за счет гипертрофии гепатоцитов вследствие внутриклеточной регенерации, что создает предпосылки для дальнейшего изучения проблемы на внутриклеточном уровне. Уменьшение средней ploидности гепатоцитов и доли двуядерных клеток при этом свидетельствует о снижении регенеративных возможностей органа животных этой группы (Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х., 2020). Такого рода изменения вызваны тем, что в условиях постоянной освещенности практически прекращается выработка эпифизарного мелатонина, демонстрирующего многочисленные гепатопротекторные эффекты при ряде патологий (Mathes A. M., 2010; Chojnacki C. et al., 2014; Esteban-Zubero E. et al., 2016).

В гепатоцитах крыс третьей экспериментальной группы отклонения величин исследованных кариометрических параметров (уменьшение площади поперечного сечения, периметра и объема ядра, снижение ЯЦО, а также отношения объема ядра к площади, рост доли двуядерных гепатоцитов) от показателей контроля носят более выраженный характер. Вместе с тем снижение индекса контура на фоне возросшего коэффициента формы очевидно свидетельствует о большей выраженности альтеративных процессов вследствие кумуляции токсического воздействия этанола и его метаболитов в результате девиации мелатонин-ассоциированных эффектов (Tsomaia K. et al., 2020).

Эти данные свидетельствуют о том, что совместное воздействие двух стрессогенных факторов приводит к интенсификации пролиферативного процесса. Отсутствие снижения средней ploидности гепатоцитов при этом, вероятно, объясняется их amitотическим делением. Вместе с тем снижение индекса контура на фоне возросшего коэффициента формы свидетельствует о протекающих процессах распада ядра, более выраженных, чем в предыдущих группах, что позволяет выявить их описанными методами световой микроскопии (Tsomaia K. et al., 2020). Это подтверждается также фактом значительного уве-

личения экспрессии *Ki-67* – маркера пролиферации в гепатоцитах крыс третьей группы. В свою очередь, усиление экспрессии *p53* в гепатоцитах крыс всех экспериментальных групп свидетельствует об увеличении апоптической активности в гепатоцитах под влиянием исследуемых факторов (Tobari M. et al., 2007).

Снижение экспрессии *Bmal1* и увеличение экспрессии его антагониста *Per2* служат подтверждением хронодеструктивного действия как постоянного освещения, так и этанола.

Естественно, экспрессия *Adh5* была выше в гепатоцитах крыс, потреблявших этанол.

Содержание гликогена в клетках паренхимы печени достоверно уменьшается относительно контроля только в печени крыс второй группы, что связано с удлинением периода двигательной активности и повышением тревожно-фобического статуса в условиях постоянного освещения в течение первых 3-х недель с последующим снижением этих показателей (Осиков М. В. С соавт., 2015; Зарубина Е.Г., Грибанов И.А., 2020).

Таким образом, ХАИ в условиях постоянного освещения вызывает более выраженные патологические изменения в печени, нежели при нормальном световом режиме.

Хроническая алкогольная интоксикация вызывает комплекс метаболических нарушений, осложняющих и усугубляющих токсическое действие алкоголя. В свою очередь, темновая депривация является значительным стрессирующим фактором, также отражающимся на обмене веществ.

Так, обнаруженная нами гипергликемия у животных первой и второй экспериментальных групп объясняется в первом случае известным эффектом ХАИ, которая может вызывать как нарушения обмена углеводов, проявляющиеся как в гипер- (чаще), так и в гипогликемии (Idrovo J.P. et al., 2019; Lin Y. et al., 2020), а во втором случае – ответной реакцией на стрессогенное воздействие. В то же время существенное снижение уровня этого метаболита в крови крыс третьей группы вызвано нарушением адаптационного процесса.

В крови крыс первой группы уровень трансаминаз не отличался от контроля, во второй группе нами отмечено увеличение активности как АЛТ, так и АСТ, но в третьей группе повышена только активность АСТ. Изменение уровня активности ферментов во второй группе может быть связано с разрушением гепатоцитов в условиях постоянного освещения, а картина в третьей группе объясняется сочетанным действием обоих факторов, причем изолированное повышение АСТ может быть связано с часто развивающимся при ХАИ дефицитом пиридоксина (витамина В₆), вследствие чего снижается активность АЛТ в гепатоцитах; кроме того, алкоголь способствует высвобождению митохондриальной АСТ из гепатоцитов без явных повреждений последних (Абдуллаев С.М., Мухин Н.А., 2009).

В крови крыс всех экспериментальных групп отмечено снижение уровня общего белка. Гипопротеинемия является хорошо известным явлением при нарушении морфофункциональной целостности печени (Рослый И.М., Водлажская М.Г., 2020). Примечательно, что снижение уровня альбумина происходит только у крыс второй экспериментальной группы, что говорит о том, что постоянное освещение вызывает значительные нарушения белоксинтезирующей функции печени.

Повышение уровня прямого билирубина в крови крыс первой и третьей экспериментальных групп является хорошо известным эффектом ХАИ (Рослый И.М. с соавт., 2004).

Анализ исследованных гематологических параметров позволил установить наличие их общих изменений. В частности, в крови животных всех групп происходит снижение общего количества эритроцитов, гемоглобина и увеличение широты распределения эритроцитов по величине (RDWc), то есть развитие анизоцитоза. При этом у животных третьей группы происходит рост среднего содержания гемоглобина в эритроците (МСН) и снижение гематокрита. Таким образом, в крови всех экспериментальных животных происходит существенное

снижение её кислородтранспортных свойств, а в случае животных третьей группы можно говорить о выраженной анемии.

Анемия при заболеваниях печени характеризуется сложным патогенезом и обусловлена комплексными нарушениями эритропоэза. Показано, что при болезнях печени повышается продукция провоспалительных цитокинов, обладающих способностью изменять обмен железа, выработку эритропоэтина и укорачивать продолжительность жизни эритроцитов, стимулировать продукцию свободных радикалов, оказывая тем самым прямое токсическое действие на эритроциты (Сафонова М.В. с соавт., 2011; Зюзина А.А., Волкова Ю.Р., 2018). Кроме того, показано, что десинхроноз также может вызывать анемию (Asterholm I. W., Scherer P. E., 2012).

Одной из важных функций печени является её участие в гемостазе. Она принимает участие в синтезе коагуляционных факторов, антикоагулянтных протеинов, компонентов системы фибринолиза и стимуляторов тромбоцитопоэза. Печень синтезирует фибриноген, факторы свертывания II, V, VII, IX, XI, XII и XIII. Большинство факторов являются витамин-К-зависимыми, среди них – VII фактор, наиболее чувствительный маркер печеночного повреждения. Среди основных патогенетических механизмов нарушения гемостаза при поражении печени выделяют: тромбоцитопению как проявление синдрома гиперпленизма; повреждение сосудистого эндотелия; нарушение белково-синтетической функции органа.

Увеличение протромбинового времени, обнаруженное для крови животных второй и третьей экспериментальных групп, ассоциировано с нарушением структуры печени, т.к. при заболеваниях печени происходит снижение количества факторов протромбинового комплекса, синтезируемых в гепатоцитах.

Соответственно, гипотермия у крыс второй группы вызвана развившимся десинхронозом, а повышение температуры тела крыс третьей группы – влияние ХАИ в условиях темновой депривации.

В результате проведенного исследования нами установлено влияние как алкогольной интоксикации, так и постоянного освещения на структуру исследованных ритмов.

Для всех исследованных показателей контрольной группы нами был обнаружен достоверный циркадный ритм.

ХАИ как при фиксированном световом режиме, так и при постоянном освещении вызывает 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 (Vuhr E.D. et al., 2010).

В то же время при анализе суточного ритма микроморфометрических параметров нами установлено, что поломка ЦР площади ядра отмечается 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.

Известно, что размер ядер гепатоцитов и самих клеток имеет суточную ритмичность и управляется циклами кормления и сменой света и темноты, он зависит от значительного количества факторов, в том числе и от цикличности функционирования других систем, поэтому как алкогольная интоксикация, так и темновая депривация не могли не вызвать изменений ЦР этих параметров (Sinturel F. et al., 2017). Механизмы нарушения суточной ритмичности размеров клеток и ядер гепатоцитов нуждаются в дальнейшем изучении, хотя высказываются предположения о том, что размеры ядра зависят от степени его функциональной активности, а размеры гепатоцитов связывают с интенсивностью синтеза белка и нарушениями структуры цитоскелета (Uchiyama Y., 1990; Scheving L. A., 2000).

Примечательно, что ЦР *p53* и *Ki-67* отмечаются только в контроле и у животных первой группы, хоть и в перестроенном ритме. Таким образом, в разрушении этих ЦР ведущая роль принадлежит постоянному освещению. В то же время ЦР часовых генов обнаруживаются в контроле и второй экспериментальной группе, что вызвано ведущей ролью этанола в деструкции ритмов.

Ритм *Adh5* разрушается 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 первой группы сохраняется ЦР содержания липидов в печени, но у всех животных разрушается 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.

Ритмы метаболизма глюкозы определяются суточными вариациями множества метаболических путей, включая периферическую чувствительность к инсулину, чувствительность β -клеток, клиренс инсулина, цикл сон-бодрствование и др. (Poggiogalle E. et al., 2018). Также показано существование различных циркадных фенотипов у людей (Chua E.C.P. et al., 2013), что позволяет предположить их наличие и у грызунов.

Разрушение ритма гликогена коррелирует с данными, полученными при исследовании влияния этанола на ритмичность гликогена, и может быть объяснено рассогласованием ритмов нескольких процессов, участвующих в гликогенезе (Udoh U. S. et al., 2015; Bailey S. M., 2018). Нарушение ритмичности липидов при постоянном освещении вызывается ранее описанными повышением количества потребляемой пищи и изменением обмена липидов и угле-

водов, а также рассогласованием гормональных сигналов, регулирующих обмен веществ (Knutson K., Van Cauter E., 2018).

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

Примечательно, что как ЦР общего белка сыворотки крови, так и ЦР альбумина, перестраиваясь у животных первой и второй экспериментальной группы, разрушаются 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 сохраняются, хотя и претерпевают изменения фазово-амплитудных характеристик. В большей степени эти изменения проявляются в крови крыс 3 группы.

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

Показано, что этанол вызывает значительные изменения в структуре ЦР системы крови, так же, как и постоянное освещение (Pritchett D., Reddy A.V., 2015). В частности, при постоянном освещении значительная часть биоритмов гематологических показателей перестраивает циркадную ритмичность к 16-17 дню темновой депривации (Ikononov O. S. et al., 1985), что, собственно, и подтверждается нашими исследованиями. В свою очередь, ХАИ вызывает поломку

3-х исследованных ритмов гематологических параметров из 7 изученных, а в крови крыс третьей группы разрушаются ритмы 5 параметров из 7, что также служит подтверждением более выраженного хронодеструктивного эффекта совместного воздействия ХАИ и постоянного освещения.

ЦР протромбинового времени обнаружен только в крови крыс контрольной группы. Разрушение этого ритма может быть связано как с нарушением функционирования печени, так и с разрушением ритмичности секреции мелатонина, т.к. эпифиз играет значительную роль в регуляции свертывания крови (Мадатова М.В., 2020; Мадатова В. М. с соавт., 2020).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило установить особенности влияния каждого из использованных 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), изменяется интенсивность экспрессии исследованных часовых генов; увеличение экспрессии *p53*, общее для всех экспериментальных групп, свидетельствует об интенсификации апоптоза; отмечались 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 разрушается 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, вызывает изменение микроморфометрических показателей гепатоцитов. В то же время темновая депривация так же, как и ХАИ, вызывает существенные изменения исследованных биохимических и гематологических параметров. Однако у животных 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 вызывает наиболее сильные изменения морфофункционального состояния исследованного органа. Это проявляется в развитии в печени 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 сохраняются (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 (Рис. 78).

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Данные, полученные в исследовании, расширяют представления о ритмостазе организма млекопитающих как в норме, так и под действием изученных факторов. Они могут быть применены как в научно-практической деятельности, так и при разработке стратегий профилактики и лечения дизрегуляторных патологий такого рода у людей, вынужденных пребывать в неблагоприятных условиях окружающей среды. Наличие сведений о перестройке ритмов в исследованных условиях позволяет осуществлять лечение больных на разных стадиях алкогольной болезни в соответствии с принципами хронотерапии. Данные, свидетельствующие о более выраженном гепатодеструктивном действии этанола при отсутствии выработки эпифизарного мелатонина, которая естественным образом провоцируется длительной темновой депривацией, позволяют предположить возможность коррекции установленных в исследовании нарушений морфофункционального гомеостаза и ритмостаза печени с помощью искус-

ственного введения препаратов этого гормона, и открывают широкую перспективу для дальнейших исследований в этой области.

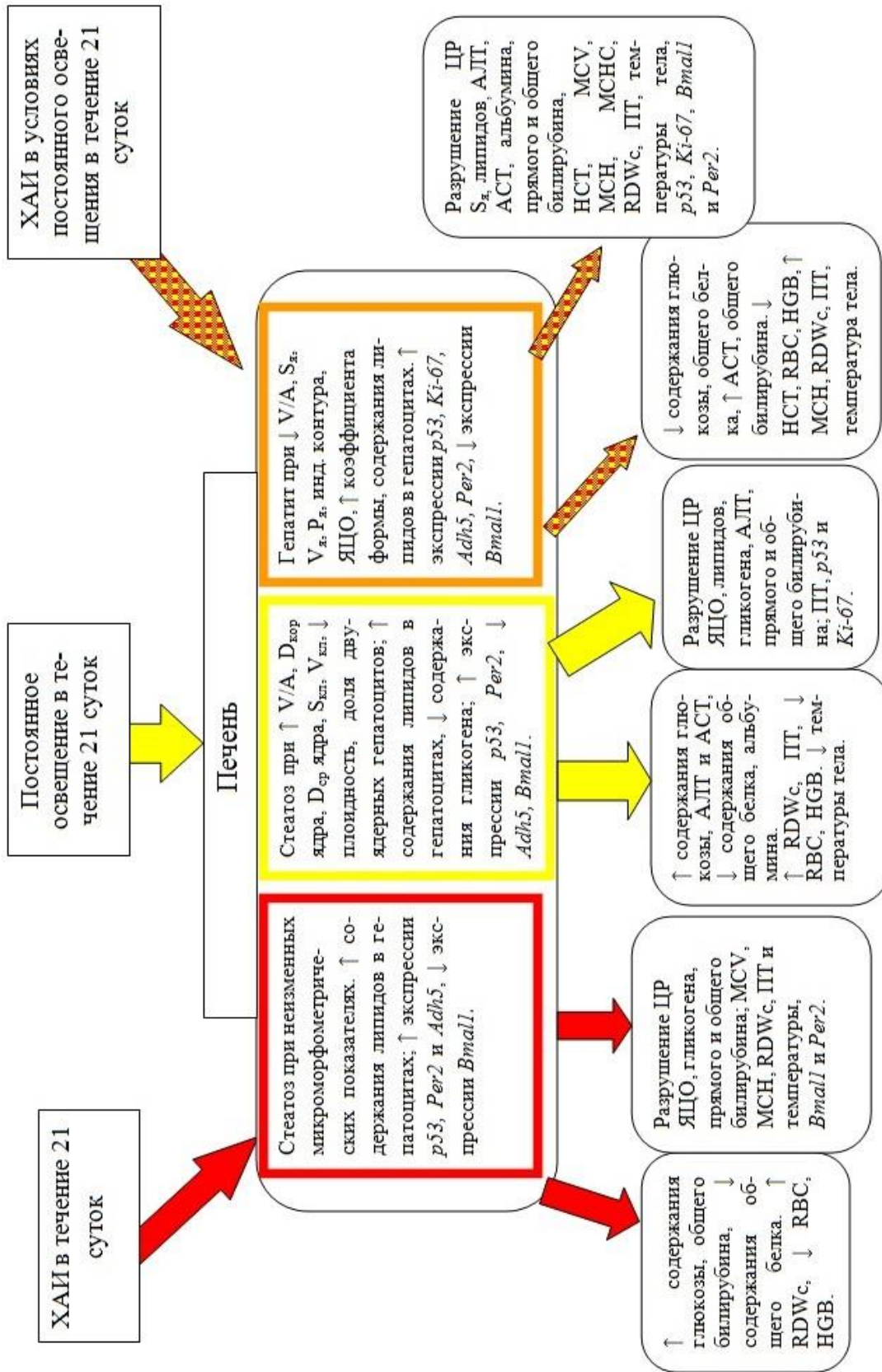


Рис. 78. Морфологические, функциональные и хронобиологические изменения печени при ХАИ, постоянном освещении и их совместном действии.

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 *Bmall* 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 *Bmall* 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 раз-

рушение ритмов RDWс, 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 СОКРАЩЕНИЙ

- АА – ацетальдегид
- АБП – алкогольная болезнь печени
- АЛТ – аланинаминотрансфераза
- АСТ – аспартатаминотрансфераза
- АФК – активные формы кислорода
- ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
- ИУ – индекс удлиненности ядра
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- НАЖБП – неалкогольная жировая болезнь печени
- НАСГ – неалкогольный стеатогепатит
- СЖК – свободные жирные кислоты
- 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)
- HGB – hemoglobin (гемоглобин)
- MCH – mean corpuscular hemoglobin (среднее содержание гемоглобина в эритроците)
- MCHC – 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)
- TNF- α – фактор некроза опухоли альфа

ЛИТЕРАТУРА.

1. Абдуллаев С. М. Справочник по гепатологии / С. М. Абдуллаев, Н. А. Мухин. – М: Литтерра. – 2009. – 399 с.
2. Абдурахманов Д. Т. Алкогольная болезнь печени / Д. Т. Абдурахманов // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2007. – Т. 17. – №. 6. – С. 1-11.
3. Автандилов Г. Г. Диагностическая медицинская плоидометрия / Г.Г. Автандилов. – М: Медицина, 2006. – 192 с.
4. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии / Г.Г. Автандилов. – М: Медицина, 2002. – 240 с.
5. Агроскин, Л.С. Цитоморфометрия / Л.С. Агроскин, Т.В. Папаян – Л.: Наука, 1977. – 295 с.
6. Анипченко А. В. Хронобиология при злоупотреблении алкоголем: в фокусе – мелатонин / А. В. Анипченко, Ю. В. Быков, М. Э. Григорьев // Consilium medicum. – 2012. – Т. 14. – №. 9. – С. 74-78.
7. Арушанян Э. Б. Основы хрономедицины и хронофармакологии. / Э. Б. Арушанян, В. А. Батурин, К. Б. Ованесов – Ставрополь: Ставропольский государственный медицинский университет, 2016. – 148 с.
8. Арушанян Э. Б. Сравнительная оценка антистрессорной активности эпифизарного гормона мелатонина и диазепам / Э. Б. Арушанян, Э. В. Бейер, А. С. Булгакова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2007. – Т. 70. – №. 6. – С. 9-12.
9. Арушанян Э. Б. Современные представления о роли супрахиазматических ядер гипоталамуса в организации суточного периодизма физиологических функций / Э. Б. Арушанян, А. В. Попов // Успехи физиологических наук. – 2011. – Т. 42. – №. 4. – С. 39-58.
10. Арушанян Э. Б. О реципрокных отношениях между супрахиазматическими ядрами гипоталамуса и эпифизом в процессе перестройки циркадной подвижности крыс при изменении светового режима / Э. Б. Арушанян, В.

- А. Батурин, А. В. Попов // Журн. высш. нервн. деят. 1993. Т. 43. № 1. С. 69–75.
11. Балканов А. С. Состояние эндотелия капилляров перитуморальной зоны после адьювантной лучевой терапии глиобластомы головного мозга / А. С. Балканов, И. Д. Розанов, А. В. Голанов [и др.] // Научно-практический рецензируемый журнал Клиническая и экспериментальная морфология. – 2021. – Т. 10. – №. 1. – С. 33-40.
 12. Безбородкина Н. Н. Сравнительный анализ метаболизма гликогена в гепатоцитах нормальной и цирротической печени: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.25 / Безбородкина Наталья Николаевна. – Санкт-Петербург, 2006. – 26 с.
 13. Белых А. Е. Морфология печени крыс в условиях хронического эмоционально-болевого стресса на фоне введения дельта-сон индуцирующего пептида / А. Е. Белых, И. И. Бобынцев, В. Т. Дудка [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – №. 1. – С. 49-57.
 14. Березовский В. А. Реактивность паренхимы печени крыс после введения экзогенного мелатонина / Березовский В.А., Янко Р.В., Литовка И.Г. [и др.] // Український морфологічний альманах. – 2012. – №. 10, № 4. – С. 178-181.
 15. Бобков П. С. Строение веноулярного отдела микроциркуляторного русла и синусоидов печени в норме и при длительной алкогольной интоксикации: дисс. канд. мед. наук: 14.03.01 / Бобков Павел Сергеевич. – Санкт-Петербург, 2012. – 136 с.
 16. Боровина Н.И. Патоморфологические изменения эпифиза при хроническом алкоголизме / Н.И. Боровина, Л.М. Насташинская // Врачебное дело. – 1990. – Т. 8. – С. 80-83.
 17. Бредер В. В. Факторы риска развития гепатоцеллюлярного рака в онкологической практике. Опыт российского онкологического научного центра

- им. Н.Н. Блохина / В. В. Бредер // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2016. – №. 4 (128). – С. 4-12.
18. Губин Д. Г. Молекулярные механизмы циркадных ритмов и принципы развития десинхроноза / Д. Г. Губин // Успехи физиологических наук. – 2013. – Т. 44. – №. 4. – С. 65-87.
19. Делоне Г. В. Анализ постнатального роста печени мыши на основе учета числа гепатоцитов, их массы и плоидности / Г. В. Делоне, И. В. Урываева, В. Ф. Корецкий [и др.] // Онтогенез. – 1987. – Т. 18. – №. 3. – С. 304-307.
20. Джандарова Т. И. Суточная динамика трансаминаз в крови в условиях обычного и измененного светового режима под влиянием слабоалкогольных напитков / Т. И. Джандарова, С. С. Шабанова // Наука. Инновации. Технологии. – 2016. – №. 1. – С. 167-172.
21. Дробленков А. В. Центроацинарная направленность капилляризации и перисинусоидального фиброза печени при алкогольном стеатозе у человека / А. В. Дробленков, П. С. Бобков, Н. Р. Карелина // Астраханский медицинский журнал. – 2013. – Т. 8. – №. 1. – С. 74-77.
22. Ельчанинов А. В. Размер гепатоцитов и их ядер в регенерирующей фетальной печени крыс / А. В. Ельчанинов, Г. Б. Большакова // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2011. – №. 2. – 4 с.
23. Ельчанинов А. В. Регенерация печени млекопитающих: Межклеточные взаимодействия / А. В. Ельчанинов, Т. Х. Фатхудинов. – М: «Наука» – 2020. – 126 с.
24. Зарубина Е. Г. Роль светового десинхроноза в развитии метаболических нарушений у крыс породы Wistar в эксперименте / Е. Г. Зарубина, И. А. Грибанов // Вестник медицинского института «Реавиз»: реабилитация, врач и здоровье. – 2020. – №. 1 (43). – С. 107-110.

25. Зворыгина П. Д. Физиология «биологических часов» / П. Д. Зворыгина // *Фундаментальные и прикладные научные исследования: актуальные вопросы, достижения и инновации.* – 2020. – С. 201-203.
26. Зюзина А. А. Клинико-морфологическая характеристика стадий повреждения печени при злоупотреблении алкоголем / А. А. Зюзина, Ю. Р. Волкова // *Известия Российской Военно-медицинской академии.* – 2018. – Т. 37. – №. 1 S1. – С. 237-239.
27. Ивашкин В. Т. Клинические рекомендации Российского общества по изучению печени по ведению взрослых пациентов с алкогольной болезнью печени / В. Т. Ивашкин, М. В. Маевская, Ч. С. Павлов [и др.] // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* – 2017. – Т. 27. – №. 6. – С. 20-40.
28. Ирьянов Ю. М. Переносной аппаратно-программный комплекс и возможности его применения в гистологических исследованиях / Ю. М. Ирьянов, Т. А. Силантьева, Е.Н. Горбач [и др.] // *Гений ортопедии.* – 2004. – №3. – С.96-98.
29. Калько, Е. А., Дроговоз, С. М., Иванцик, Л. Б. [и др.] Влияние циркадианных и сезонных биоритмов на активность ферментов цитолиза у интактных крыс / Е. А. Калько, С. М. Дроговоз, Л. Б. Иванцик [и др.] // *Фармакологія та лікарська токсикологія.* – 2015. – №. 1. – С. 43-47.
30. Киселева Я. В. Молекулярные аспекты прогрессирования фиброза печени алкогольной этиологии / Я. В. Киселева, Ю. О. Жариков, Р. В. Масленников [и др.] // *Медицинский вестник Северного Кавказа.* – 2020. – Т. 15. – №. 2. – С. 288-293.
31. Кравченко Е. В. Особенности реорганизации циркадных ритмов поведенческой активности стрессированных инбредных мышей BALB/C при разных режимах освещения красным светом / Е. В. Кравченко, Ю. В. Асташко // *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук.* – 2012. – № 1. – С. 91-95.

32. Кудрявцева Г. А. Типологические особенности циркадной организации интегральных показателей функционального состояния организма и метаболизма печени у морских свинок / Г.А. Кудрявцева, В.В. Новочадов, М.В. Постнова [и др.] // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – №. 1-2. – С. 292-298.
33. Литвиненко А. Н. Морфологические и морфометрические параметры ткани печени лабораторных животных после моделирования хронического стресса / А. Н. Литвиненко, Д. А. Зиновкин, Т. С. Угольник // *Проблемы здоровья и экологии*. – 2018. – №. 4 (58).
34. Мадатова В. М. Влияние эпифиза на регуляцию функционального состояния системы свертывания крови и фибринолиза в течении дня / В. М. Мадатова // *Евразийский Союз Ученых*. – 2020. – №. 9-3 (78). – С. 27-30.
35. Мадатова В. М. Влияние эпифиза на гемокоагуляцию облученных животных / В. М. Мадатова, Р. Ю. Бабаева, Н. Т. Мамедова // *Вестник науки и образования*. – 2020. – №. 13-1 (91). – С. 19-22.
36. Маевская М. В. Цитокины в патогенезе алкогольного гепатита и возможности терапии / М. В. Маевская, А. О. Буеверов // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. – 2009. – Т. 19. – №. 2. – С. 14-19.
37. Михеева О. М. Цирроз печени / О. М. Михеева, Е. Д. Ли, Г. Б. Селеванова [и др.] // *Клиническая геронтология*. – 2010. – Т. 16. – №. 1-2. – С. 39-47.
38. Мяделец О. Д. Функциональная морфология и элементы общей патологии печени / О. Д. Мяделец, Е. И. Лебедева. – Витебск: Витебский государственный медицинский университет, 2018. – 339 с.
39. Налобин Д. С. Влияние мелатонина на дифференцировочный потенциал клеток Ито при индуцированном фиброзе печени мыши / Д. С. Налобин, Е. А. Супруненко, В. А. Голиченков // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2016. – Т. 161. – №. 6. – С. 807-811.

40. Осиков М. В. Этологический статус и когнитивная функция при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения / М. В. Осиков, О. И. Огнева, О. А. Гизингер [и др.] // *Фундаментальные исследования*. – 2015. – №. 1-7. – С. 1392-1396.
41. Паначев И. В. Системный десинхроноз—объект и субъект формирования алкогольной зависимости / И. В. Паначев, Д. Б. Виноградов, М. М. Денисламов // *Актуальные проблемы возрастной наркологии и профилактики аддиктивных состояний*. – 2015. – С. 85-89.
42. Панченко, А. В. Роль циркадных ритмов и «клеточных часов» в старении и развитии онкологических заболеваний / А. В. Панченко, Е. А. Губарева, В. Н. Анисимов // *Успехи геронтологии*. – 2016. – Т. 29. – №. 1. – С. 29-37.
43. Пауков В.С. Структурно-функциональные основы алкогольной болезни / В.С. Пауков, Т. М. Воронина, Ю.А. Кириллов, Малышева [и др.] // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. – 2018. – Т. 28. – №. 5. – С. 7-17.
44. Писарев И. В. Влияние микробиоты кишечника и ее метаболитов на центральные и периферические циркадные часы / И. В. Писарев, В. В. Варницына // *Хрономедицинский журнал*. – 2021. – Т. 23. – №. 1. – С. 16-21.
45. Подколотный Н. А. Анализ циркадного ритма биологических процессов в печени и почках мыши / Н. А. Подколотный, Н. Н. Твердохлеб, О. А. Подколотная // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. – 2017. – Т. 21. – №. 8. – С. 903-910.
46. Пятницкая И. Н. Диагностическое значение нарушений физиологических ритмов при токсикоманиях / И. Н. Пятницкая, В. И. Иванов // *Журн. неврологии и психиатрии им. СС Корсакова*. – 1981. – С. 102-4.
47. Рапопорт С. И. Хронобиология и хрономедицина: история и перспективы / С. И. Рапопорт, С. М. Чибисов // *Хронобиология и хрономедицина*. – 2018. – С. 9-38.

48. Рослый И. М. Биохимия и алкоголизм (I): метаболические процессы при алкоголизме / И. М. Рослый, С. В. Абрамов, В. Р. Агаронов [и др.] // Вопросы наркологии. – 2004. – №. 2. – С. 70-77.
49. Рослый И. М. Правила чтения биохимического анализа / И. М. Рослый, М. Г. Водолажская. – М: "Медицинское информационное агентство", 2020. – 112 с.
50. Сафонова М. В. Анемия при хронических диффузных заболеваниях печени / М. В. Сафонова, И. В. Козлова, А. Г. Новосельцев // Казанский медицинский журнал. – 2011. – Т. 92. – №. 6. – С. 883-887.
51. Семак И. В. Физиологические и биохимические механизмы регуляции циркадных ритмов / И. В. Семак, В. А. Кульчицкий // Труды белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2007. – Т. 2. – №1. – С.17-37.
52. Соболевская И. С. Влияние мелатонина и льняного масла на состояние липидного обмена крыс при десинхронозе / И. С. Соболевская, О. Д. Мяделец, Н. Н. Яроцкая // Журнал медико-биологических исследований. – 2021. – Т. 9. – №. 1.
53. Соболевская И. С. Динамика показателей липидного обмена у крыс при темновой депривации в эксперименте / И. С. Соболевская, О. Д. Мяделец, Н. Н. Яроцкая // Экспериментальна медицина і морфологія. – 2020. – Т. 5. – №3(25). – С. 145-150.
54. Солонский А. В. Морфологические закономерности ранних стадий развития головного мозга в условиях пренатальной алкоголизации: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук: 03.00.25, 14.00.45 / Солонский Анатолий Владимирович – Томск, 2008. – 38 с.
55. Ульяновская С.А. Влияние фотопериодики Севера на организм человека (обзор литературы) / С.А. Ульяновская, Д. В. Баженов, В.Г. Шестакова [и др.] // Материалы Международной научно-практической конференции

- "Бородинские чтения", посвященной 90-летию академика РАН Юрия Ивановича Бородина, Новосибирск, 22 марта 2019 года / ИПЦ НГМУ. – Новосибирск: Новосибирский государственный медицинский университет, 2019. – С. 346-352.
56. Усанова А. А. Современные неинвазивные методы диагностики алкогольной болезни печени / А. А. Усанова, Э. К. Новикова, Ф. М. Кузма [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – №. 4. – С. 147-147.
57. Фрисс С. А. Эволюция алкогольной болезни печени / С. А. Фрисс, Н. Ю. Дрожжилова, Е. Ф. Костин // Проблемы экспертизы в медицине. – 2010. – Т. 10. – №. 1-2.
58. Чибисов С. М. Хронобиология и хрономедицина / С. М. Чибисов, С. И. Рапопорт, М. Л. Благоднарова. – М.: Изд-во РУДН, 2018. – 828 с.
59. Шифф Ю. Р. Болезни печени по Шиффу. Введение в гепатологию / Ю. Р. Шифф, М. Ф. Соррел, У. С. Мэддрей; пер. с англ. под ред. В. Т. Ивашкина, А.О. Буеверова, М.В. Маевской. – М: «ГЭОТАР-медиа» – 2011. – 704 с.
60. Шуркевич Н. П. Прогностическая значимость нарушений хронотипа суточного ритма артериального давления у нормотензивных лиц в условиях вахты на Крайнем Севере / Н. П. Шуркевич, А. С. Ветошкин, С. М. Дьячков [и др.] // Артериальная гипертензия. – 2017. – Т. 23. – №. 1.
61. Южакова А. Е. Факторы риска нарушений углеводного обмена с позиций хронобиологии / А. Е. Южакова, А. А. Нелаева, Ю. В. Хасанова [и др.] // Вопросы питания. – 2020. – Т. 89. – №. 6. – С. 23-30.
62. Abbasoglu O. The effect of the pineal gland on liver regeneration in rats / O. Abbasoglu, M. Berker, A. Ayhan [et al.] // Journal of Hepatology. – 1995. – №23(5). – P. 578-581.

63. Åberg F. Drinking and obesity: Alcoholic liver disease/nonalcoholic fatty liver disease interactions / F. Åberg, M. Färkkilä // *Seminars in liver disease*. –2020. – V. 40. – №. 02. – P. 154-162.
64. Aho V. Prolonged sleep restriction induces changes in pathways involved in cholesterol metabolism and inflammatory responses / V. Aho, H. M. Ollila, E. Kronholm [et al.] // *Scientific reports*. – 2016. – V. 6. – №. 1. – P. 1-14.
65. Ait-Daoud N. Women and addiction: an update / N. Ait-Daoud, D. Blevins, S. Khanna [et al.] // *Medical Clinics*. – 2019. – V. 103. – №. 4. – P. 699-711.
66. Alvarenga T. A. Influence of food restriction on lipid profile and spontaneous glucose levels in male rats subjected to paradoxical sleep deprivation / T. A. Alvarenga, S. Tufik, G. N. Pires [et al.] // *Clinics*. – 2012. – V. 67. – № (4). – P. 375-380.
67. An L. Cytokines in alcoholic liver disease / L. An, X. Wang, A. I. Cederbaum // *Arch. Toxicol.* – 2012. – №86. – P. 1337–1348.
68. Andersen M. L. Differential effects of sleep loss and chronic stressors on lipid metabolism / M. L. Andersen, J. C. Perry, M. Bignott [et al.] // *Sleep Science*. – 2009. – V.2. – №3. – P. 135-140.
69. Angarita G. A. Sleep abnormalities associated with alcohol, cannabis, cocaine, and opiate use: a comprehensive review / G. A. Angarita, N. Emadi, S. Hodges [et al.] // *Addiction science & clinical practice*. – 2016. – V. 11. – №. 1. – P. 1-17.
70. Anisimov V. N. Light desynchronization and health / V. N. Anisimov // *Light & Engineering*. – 2019. – V. 27. – №. 3. – P. 14-25.
71. Asterholm I. W. Metabolic jet lag when the fat clock is out of sync / I. W. Asterholm, P. E. Scherer // *Nature medicine*. – 2012. – V. 18. – №. 12. – P. 1738-1740.
72. Bahrami M. The role of melatonin supplement in metabolic syndrome / M. Bahrami, M. Cheraghpour, S. Jafarirad [et al.] // *Nutrition & Food Science*. – 2019). – Vol. 49. – №5. – P. 965-977.

73. Bailey S. M. Emerging role of circadian clock disruption in alcohol-induced liver disease / S. M. Bailey // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2018. – V. 315. – №. 3. – P. G364-G373.
74. Baillie M. *The Morbid Anatomy of Some of the Most Important Parts of the Human Body* / M. Baillie. – London: Johnson & Nicol, 1793. – 360 p.
75. Balsalobre A. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling / A. Balsalobre, S.A. Brown, L. Marcacci [et al.] // *Science*. – 2000. – №289. – P. 2344–2347.
76. Bardeck N. Liver cell swelling leads to upregulation of miR-141-3p in perfused rat liver and primary rat hepatocytes / N. Bardeck, M. Paluschinski, M. Castoldi [et al.] // *Zeitschrift für Gastroenterologie*. – 2021. – V.59. – №01. – P. 1-16.
77. Bass J. Circadian topology of metabolism / J. Bass // *Nature*. – 2012. – №491. – P. 348–356.
78. Bechtold D. A. Energy-responsive timekeeping / D. A. Bechtold // *Journal of genetics*. – 2008. – V. 87. – №5. – P. 447-458.
79. Brager A.J. Acute ethanol disrupts photic and serotonergic circadian clock phase-resetting in the mouse / A. J. Brager, C. L. Ruby, R. A. Prosser [et al.] // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2011. – №35. – P. 1467–1474.
80. Brager A.J. Chronic ethanol disrupts circadian photic entrainment and daily locomotor activity in the mouse/ A. J. Brager, C. L. Ruby, R. A. Prosser [et al.] // *Alcohol Clin. Exp. Res.* – 2010. – №34. – P. 1266–1273.
81. Broeke J. *Image processing with ImageJ* / J. Broeke, J. M. M. Pérez, J. Pascau – Birmingham: Packt Publishing Ltd, 2015. – 256 p.
82. Brown S.A. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks / S. A. Brown, G. Zumbrunn, F. Fleury-Olela [et al.] // *Curr Biol*. – 2002. – №12. – P.1574–1583.

83. Bruyneel M. Sleep disturbances in patients with liver cirrhosis: prevalence, impact, and management challenges / M. Bruyneel, T. Sersté // *Nature and science of sleep*. – 2018. – V. 10. – P. 369-375.
84. Buhr E. D. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators / E. D. Buhr, S.-H. Yoo, J. S. Takahashi // *Science*. – 2010. – V. 330. – №6002. – P. 379-385.
85. Caro A. A. Oxidative Stress, Toxicology, and Pharmacology of Cyp2e1/ A. A. Caro, A. I. Cederbaum // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. – 2004. – №44. – P. 27–42.
86. Cederbaum A. I. CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells / A. I. Cederbaum, D. Wu, M. Mari [et al.] // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2001. – V. 31. – №12. – P. 1539-1543.
87. Chaix A. The circadian coordination of cell biology / A. Chaix, A. Zarrinpar, S. Panda // *J Cell Biol*. – 2016. – №215. – P. 15-25.
88. Chaix A. Time-restricted feeding prevents obesity and metabolic syndrome in mice lacking a circadian clock / A. Chaix, T. Lin, H. D. Le [et al.] // *Cell metabolism*. – 2019. – V. 29. – №2. – P. 303-319.
89. Chen L. Pinealectomy or light exposure exacerbates biliary damage and liver fibrosis in cholestatic rats through decreased melatonin synthesis / L. Chen, T. Zhou, N. Wu [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. – 2019. – V. 1865. – №.6. – P. 1525-1539.
90. Chen P. Loss of clock gene *mPer2* promotes liver fibrosis induced by carbon tetrachloride / P. Chen, Z. Han, P. Yang [et al.] // *Hepatology Research*. – 2010. – V. 40. – №. 11. – P. 1117-1127.
91. Chojnacki C. Protective role of melatonin in liver damage / C. Chojnacki, E. Walecka-Kapica, M. Romanowski [et al.] // *Current pharmaceutical design*. – 2014. – V. 20. – №. 30. – P. 4828-4833.
92. Chua E. C.-P. Extensive diversity in circadian regulation of plasma lipids and evidence for different circadian metabolic phenotypes in humans / E. C.-P.

- Chua, G. Shui, I. T.-G. Lee [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – V. 110. – №. 35. – P. 14468-14473.
93. Cornelissen G. Cosinor-based rhythmometry / G. Cornelissen // Theoretical Biology and Medical Modelling. – 2014. – V. 11. – №. 1. – P. 1-24.
94. Corona-Pérez A. High sucrose intake ameliorates the accumulation of hepatic triacylglycerol promoted by restraint stress in young rats / A. Corona-Pérez, M. Díaz-Muñoz, I. S. Rodríguez [et al.] // Lipids. – 2015. – V.50. – №11. – P. 1103-1113.
95. Crawford J. M. Histologic findings in alcoholic liver disease / J. M. Crawford // Clinics in liver disease. – 2012. – V. 16. – №. 4. – P. 699-716.
96. Cruz A. Melatonin prevents experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats / A. Cruz, F. J. Padillo, E. Torres [et al.] // Journal of pineal research. – 2005. – V. 39. – №. 2. – P. 143-150.
97. Damiola F. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus / F. Damiola, N. Le Minh, N. Preitner [et al.] // Genes & development. – 2000. – V. 14. – №. 23. – P. 2950-2961.
98. Danel T. Chronobiology of alcohol: from chronokinetics to alcohol-related alterations of the circadian system / T. Danel, Y. Touitou // Chronobiology International. – 2004. – V. 21. – №. 6. – P. 923-935.
99. Danel T. Temporal pattern in consumption of the first drink of the day in alcohol-dependent persons / T. Danel, R. Jeanson, Y. Touitou // Chronobiology International. – 2003. – V. 20. – №. 6. – P. 1093-1102.
100. Davis 4th B. T. CREB protein mediates alcohol-induced circadian disruption and intestinal permeability / B. T Davis 4th, R. M. Voigt, M. Shaikh [et al.] // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. – 2017. – V. 41. – №. 12. – P. 2007-2014.

101. Davis 4th B.T. Circadian mechanisms in alcohol use disorder and tissue injury / B. T. Davis 4th, R. M. Voigt, M. Shaikh [et al.] // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. – 2018. – V. 42. – №. 4. – P. 668-677.
102. De Cruz S. Sleep disorders in chronic liver disease / S. De Cruz, J. R. Espiritu, M. Zeidler [et al.] // *Seminars in respiratory and critical care medicine*. – 2012. – V. 33. – №. 01. – P. 26-35.
103. Delco F. Dose adjustment in patients with liver disease / F. Delco, L. Tchambaz, R. Schlienger [et al.] // *Drug safety*. – 2005. – V. 28. – №. 6. – P. 529-545.
104. Diallo A. B. For whom the clock ticks: clinical chronobiology for infectious diseases / A. B. Diallo, B. Coiffard, M. Leone [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – V. 11. – P. 1457.
105. Dinis-Oliveira J. Oxidative and non-oxidative metabolomics of ethanol / J. Dinis-Oliveira // *Current drug metabolism*. – 2016. – V. 17. – №. 4. – P. 327-335.
106. Dolganiuc A. Autophagy in alcohol-induced liver diseases / A. Dolganiuc, P. G. Thomes, W. X. Ding [et al.] // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* – 2012. – №36. – P. 1301–1308.
107. Eckel-Mahan K. Metabolism, and the circadian clock converge / K. Eckel-Mahan, P. Sassone-Corsi // *Physiological reviews*. – 2013. – V. 93. – №. 1. – P. 107-135.
108. Engin A. B. Circadian rhythms in diet-induced obesity. In: *Obesity and lipotoxicity* / A. B. Engin, A. Engin (ed.). – Cham: Springer, 2017. – V. 960. – P. 19-52.
109. Enomoto N. Kupffer cell sensitization by alcohol involves increased permeability to gut-derived endotoxin / N. Enomoto, K. Ikejima, S. Yamashina [et al.] // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. – 2001. – V. 25. – P. 51S-54S.

110. Esteban-Zubero E. Melatonin's role in preventing toxin-related and sepsis-mediated hepatic damage: a review / E. Esteban-Zubero, M. A. Alatorre-Jiménez, L. López-Pingarrón [et al.] // *Pharmacological Research*. – 2016. – V. 105. – P. 108-120.
111. Fárková E. Weight loss in conservative treatment of obesity in women is associated with physical activity and circadian phenotype: a longitudinal observational study / E. Fárková, J. Schneider, M. Šmotek [et al.] // *BioPsycho-Social medicine*. – 2019. – V. 13. – №. 1. – P. 1-10.
112. Farnell Y. Z. Neonatal alcohol exposure differentially alters clock gene oscillations within the suprachiasmatic nucleus, cerebellum, and liver of adult rats / Y. Z. Farnell, G. C. Allen, S. S. Nahm [et al.] // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. – 2008. – V. 32. – №. 3. – P. 544-552.
113. Feillet C. Coupling between the circadian clock and cell cycle oscillators: implication for healthy cells and malignant growth / C. Feillet, G. T. van der Horst, F. Levi [et al.] // *Frontiers in neurology*. – 2015. – V. 6. – P. 96.
114. Feillet C. Phase locking and multiple oscillating attractors for the coupled mammalian clock and cell cycle / C. Feillet, P. Krusche, F. Tamanini // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – V. 111. – №. 27. – P. 9828-9833.
115. Feng D. Clocks, metabolism, and the epigenome / D. Feng, M. A. Lazar // *Molecular cell*. – 2012. – V. 47. – №. 2. – P. 158-167.
116. Filiano A. N. Chronic ethanol consumption disrupts the core molecular clock and diurnal rhythms of metabolic genes in the liver without affecting the suprachiasmatic nucleus / A. N. Filiano, T. Millender-Swain, R. Johnson [et al.] // *PloS one*. – 2013. – V. 8. – №. 8. – P. e71684.
117. Filipski E. Circadian disruption accelerates liver carcinogenesis in mice / E. Filipski, P. Subramanian, J. Carriere, [et al.] // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. – 2009. – V. 680. – №. 1-2. – P. 95-105.

118. Fonken L. K. Light at night increases body mass by shifting the time of food intake / L. K. Fonken, J. L. Workman, J. C. Walton [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – V. 107. – №. 43. – P. 18664-18669.
119. Fonzi S. Melatonin and cortisol circadian secretion during ethanol withdrawal in chronic alcoholics / S. Fonzi, G. P. Solinas, P. Costelli [et al.] // *Chronobiologia*. – 1994. – V. 21. – №. 1-2. – P. 109-112.
120. Forger D. B. Biological clocks, rhythms, and oscillations: the theory of biological timekeeping / D. B. Forger. – Cambridge: MIT Press, 2017. – 368 P.
121. Forsyth C. B. Role for intestinal CYP2E1 in alcohol-induced circadian gene-mediated intestinal hyperpermeability / C. B. Forsyth, R. M. Voigt, M. Shaikh [et al.] // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2013. – V. 305. – №. 2. – P. G185-G195.
122. Foster R. G. Human responses to the geophysical daily, annual and lunar cycles / R. G. Foster, T. Roenneberg // *Current biology*. – 2008. – V. 18. – №. 17. – P. R784-R794.
123. Frazier K. Intersection of the gut microbiome and circadian rhythms in metabolism / K. Frazier, E. B. Chang // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. – 2020. – V. 31. – №. 1. – P. 25-36.
124. Friedmann S. L. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies / S. L. Friedmann, B. A. Neuschwander-Tetri, M. Rinella [et al.] // *Nature medicine*. – 2018. – V. 24. – №. 7. – P. 908-922.
125. Fu J. Long-term stress with hyperglucocorticoidemia-induced hepatic steatosis with VLDL overproduction is dependent on both 5-HT₂ receptor and 5-HT synthesis in liver / J. Fu, S. Ma, X. Li [et al.] // *International Journal of Biological Sciences*. – 2016. – V. 12. – №. 2. – P. 219-234.
126. Gorman M. R. Temporal organization of pineal melatonin signaling in mammals / M. R. Gorman // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2020. – V. 503. – P. 110687.

127. Grimaldi B. PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPAR γ / B. Grimaldi, M. M. Bellet, S. Katada [et al.] // Cell metabolism. – 2010. – V. 12. – №. 5. – P. 509-520.
128. Guerrero-Vargas N. N. Shift work in rats results in increased inflammatory response after lipopolysaccharide administration: a role for food consumption / N. N. Guerrero-Vargas, M. Guzman-Ruiz, R. Fuentes [et al.] // Journal of biological rhythms. – 2015. – V. 30. – №. 4. – P. 318-330.
129. Guilding C. A riot of rhythms: neuronal and glial circadian oscillators in the mediobasal hypothalamus / C. Guilding, A. T. Hughes, T. M. Brown [et al.]. // Molecular brain. – 2009. – V. 2. – №. 1. – P. 1-19.
130. Haas S. Disruption of rhythms of molecular clocks in primary synovial fibroblasts of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis, role of IL-1 β /TNF / S. Haas, R. H Straub // Arthritis research & therapy. – 2012. – V. 14. – №. 3. – P. 1-12.
131. Halberg F. Chronobiology / F. Halberg // Annual review of physiology. – 1969. – V. 31. – №. 1. – P. 675-726.
132. Hammer S.B. Environmental modulation of alcohol intake in hamsters: effects of wheel running and constant light exposure / S. B. Hammer, C. L. Ruby, A. J. Brager [et al.] // Alcoholism: Clinical and Experimental Research. – 2010. – V. 34. – №. 9. – P. 1651-1658.
133. Hasler B.P. Sleep and circadian contributions to adolescent alcohol use disorder / B. P. Hasler, A. M. Soehner, D. B. Clark // Alcohol. – 2015. – V. 49. – №. 4. – P. 377-387.
134. Häussinger D. Glutamine and cell signaling in liver / D. Häussinger, D. Graf, O. H. Weiergräber // The Journal of nutrition. – 2001. – V. 131. – №. 9. – P. 2509S-2514S.
135. Hong R. T. Melatonin ameliorates experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats / R. T. Hong, J. M. Xu, Q. Mei // World journal of gastroenterology: WJG. – 2009. – V. 15. – №. 12. – P. 1452-1458.

136. Honma S. Development of the mammalian circadian clock / S. Honma // *European Journal of Neuroscience*. – 2020. – V. 51. – №. 1. – P. 182-193.
137. Honma S. The mammalian circadian system: a hierarchical multi-oscillator structure for generating circadian rhythm / S. Honma // *The Journal of Physiological Sciences*. – 2018. – V. 68. – №. 3. – P. 207-219.
138. Hu C. Protective role of melatonin in early-stage and end-stage liver cirrhosis / C. Hu, L. Zhao, J. Tao [et al.] // *Journal of cellular and molecular medicine*. – 2019. – V. 23. – №. 11. – P. 7151-7162.
139. Hu S. Melatonin protects against alcoholic liver injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis / S. Hu, S. Yin, X. Jiang [et al.] // *European journal of pharmacology*. – 2009. – V. 616. – №. 1-3. – P. 287-292.
140. Huang M. C. Reduced expression of circadian clock genes in male alcoholic patients / M. C. Huang, C. W. Ho, C. H. Chen [et al.] // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. – 2010. – V. 34. – №. 11. – P. 1899-1904.
141. Idrovo J. P. Alcohol intoxication and the postburn gastrointestinal hormonal response / J. P. Idrovo, J. A. Shults, B. J. Curtis [et al.] // *Journal of Burn Care & Research*. – 2019. – V. 40. – №. 6. – P. 785-791.
142. Ikonomov O. C. Effect of constant light and darkness on the circadian rhythms in rats. II. Plasma renin activity and insulin concentration / O. C. Ikonomov, A. G. Stoynev, A. C. Shisheva [et al.] // *Acta physiologica et pharmacologica Bulgarica*. – 1985. – V. 11. – №. 1. – P. 55-61.
143. Jasser S. A. Light during darkness and cancer: relationships in circadian photoreception and tumor biology / S. A. Jasser, D. E. Blask, G. C. Brainard // *Cancer Causes & Control*. – 2006. – V. 17. – №. 4. – P. 515-523.
144. Jiang W. The circadian clock gene *Bmal1* acts as a potential anti-oncogene in pancreatic cancer by activating the p53 tumor suppressor pathway / W. Jiang, S. Zhao, X. Jiang et al. // *Cancer letters*. – 2016. – V. 371. – №. 2. – P. 314-325.

145. Joshi K. Alcoholic liver disease: high risk or low risk for developing hepatocellular carcinoma? / K. Joshi, A. Kohli, R. Manch [et al.] // Clinics in liver disease. – 2016. – V. 20. – №. 3. – P. 563-580.
146. Kalsbeek A. A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo–pituitary–adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V1Antagonist / A. Kalsbeek, J. J. Vanheerikhuize, J. Wortel [et al.] // Journal of Neuroscience. – 1996. – V. 16. – №. 17. – P. 5555-5565.
147. Kalsbeek A. Circadian control of glucose metabolism / A. Kalsbeek, S. LaFleur, E. Fliers // Mol Metab. – 2014. – №3. – P. 372–383.
148. Kawaratani H. The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease / H. Kawaratani, T. Tsujimoto, A. Douhara [et al.] // Mediators of inflammation. – 2013. – V. 2013. – 11 p.
149. Kelleher F. C. Circadian molecular clocks and cancer / F. C. Kelleher, A. Rao, A. Maguire // Cancer letters. – 2014. – V. 342. – №. 1. – P. 9-18.
150. Keshavarzian A. Leaky gut in alcoholic cirrhosis: a possible mechanism for alcohol-induced liver damage / A. Keshavarzian, E. W. Holmes, M. Patel [et al.] // The American journal of gastroenterology. – 1999. – V. 94. – №. 1. – P. 200-207.
151. Kettner N. M. Circadian homeostasis of liver metabolism suppresses hepatocarcinogenesis / N. M. Kettner, H. Voicu, M. J. Finegold [et al.] // Cancer cell. – 2016. – V. 30. – №. 6. – P. 909-924.
152. Kiessling S. Enhancing circadian clock function in cancer cells inhibits tumor growth / S. Kiessling, L. Beaulieu-Laroche, I. D. Blum et al. // BMC biology. – 2017. – V. 15. – №. 1. – P. 1-18.
153. Kim P. Coupling the circadian clock to homeostasis: The role of period in timing physiology / P. Kim, H. Oster, H. Lehnert [et al.] // Endocrine reviews. – 2019. – V. 40. – №. 1. – P. 66-95.

154. Kobayashi T. Effect of aging on norepinephrine-related proliferative response in primary cultured periportal and perivenous hepatocytes / T. Kobayashi, Y. Saito, Y. Ohtake [et al.] // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2012. – V. 303. – №. 7. – P. G861-G869.
155. Konishi M. Role of microsomal enzymes in development of alcoholic liver diseases / M. Konishi, H. Ishii // *Journal of gastroenterology and hepatology*. – 2007. – V. 22. – P. S7-S10.
156. Konstandi M. Role of PPAR α and HNF4 α in stress-mediated alterations in lipid homeostasis / M. Konstandi, Y.M. Shah, T. Matsubara [et al.] // *PloS one*. – 2013. – V. 8. – №. 8. – P. e70675.
157. Koronowski K. B. Defining the independence of the liver circadian clock / K. B. Koronowski, K. Kinouchi, P. S. Welz [et al.] // *Cell*. – 2019. – V. 177. – №. 6. – P. 1448-1462.
158. Lackner C. Histological parameters and alcohol abstinence determine long-term prognosis in patients with alcoholic liver disease / C. Lackner, W. Spindelboeck, J. Haybaeck [et al.] // *Journal of hepatology*. – 2017. – V. 66. – №. 3. – P. 610-618.
159. Lackner C. Fibrosis and alcohol-related liver disease / C. Lackner, D. Tiniakos // *Journal of Hepatology*. – 2019. – №70(2). – P. 294-304.
160. Lamia K. A. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock / K. A. Lamia, K. F. Storch, C. J. Weitz // *Proceedings of the national academy of sciences*. – 2008. – V. 105. – №. 39. – P. 15172-15177.
161. Lang F. Mechanisms and significance of cell volume regulation / F. Lang // *Journal of the American college of nutrition*. – 2007. – V. 26. – №. sup5. – P. 613S-623S.
162. Lavery D. J. Circadian transcription of the cholesterol 7 α hydroxylase gene may involve the liver-enriched bZIP protein DBP / D. J. Lavery, U. Schibler // *Genes & development*. – 1993. – V. 7. – №. 10. – P. 1871-1884.

163. Lazzeri E. Surviving acute organ failure: cell polyploidization and progenitor proliferation / E. Lazzeri, M. L. Angelotti, C. Conte [et al.] // Trends in molecular medicine. – 2019. – V. 25. – №. 5. – P. 366-381.
164. Lefkowitz J. H. Morphology of alcoholic liver disease / J. H. Lefkowitz // Clinics in liver disease. – 2005. – V. 9. – №. 1. – P. 37-53.
165. LeGates T. A. Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect / T. A. LeGates, D. C. Fernandez, S. Hattar // Nature Reviews Neuroscience. – 2014. – V. 15. – №. 7. – P. 443-454.
166. Leng Y. Association between circadian rhythms and neurodegenerative diseases / Y. Leng, E. S. Musiek, K. Hu [et al.] // The Lancet Neurology. – 2019. – V. 18. – №. 3. – P. 307-318.
167. Leung J. M. Circadian Rhythms in Environmental Health Sciences / J. M. Leung, M. E. Martinez // Current environmental health reports. – 2020. – P. 1-10.
168. Li H. Endogenous circadian time genes expressions in the liver of mice under constant darkness / H. Li, S. Zhang, W. Zhang [et al.] // BMC genomics. – 2020. – V. 21. – №. 1. – P. 1-12.
169. Liang R. Melatonin protects from hepatic reperfusion injury through inhibition of IKK and JNK pathways and modification of cell proliferation / R. Liang, A. Nickkholgh, K. Hoffmann [et al.] // J Pineal Res. – 2009. – V. 46. – P. 8-14.
170. Lin Y. Association between alcohol consumption and metabolic syndrome among Chinese adults / Y. Lin, Y. Y. Ying, S. X. Li [et al.] // Public Health Nutrition. – 2020. – P. 1-23.
171. Lin Y. M. Disturbance of circadian gene expression in hepatocellular carcinoma / Y. M. Lin, J. H. Chang, K. T. Yeh [et al.] // Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center. – 2008. – V. 47. – №. 12. – P. 925-933.

172. LoConte N. K. Alcohol and cancer: a statement of the American Society of Clinical Oncology / N. K. LoConte, A. M. Brewster, J. S. Kaur [et al.] // *J Clin Oncol.* – 2018. – V. 36. – №. 1. – P. 83-93.
173. Logan R. W. Circadian wheel-running activity during withdrawal from chronic intermittent ethanol exposure in mice / R. W. Logan, J.A. Seggio, S.L. Robinson, [et al.] // *Alcohol.* – 2010. – V. 44. – №. 3. – P. 239-244.
174. Lopez M. Tumor necrosis factor and transforming growth factor β regulate clock genes by controlling the expression of the cold inducible RNA-binding protein (CIRBP) / M. Lopez, D. Meier, A. Muller [et al.] // *Journal of Biological Chemistry.* – 2014. – V. 289. – №. 5. – P. 2736-2744.
175. Ma D. Circadian autophagy rhythm: a link between clock and metabolism? / D. Ma, S. Li, M.M. Molusky [et al.] // *Trends in Endocrinology & Metabolism.* – 2012. – V. 23. – №. 7. – P. 319-325.
176. Ma K. Circadian dysregulation disrupts bile acid homeostasis / K. Ma, R. Xiao, H. T. Tseng [et al.] // *PloS one.* – 2009. – V. 4. – №. 8. – P. e6843.
177. Mahli A. Alcohol and obesity: a dangerous association for fatty liver disease / A. Mahli, C. Hellerbrand // *Digestive diseases.* – 2016. – V. 34. – №. Suppl. 1. – P. 32-39.
178. Malone S. K. Social jetlag, circadian disruption, and cardiometabolic disease risk. In: *Sleep and Health* / S. K. Malone, M. A. Mendoza, F. Patterson – Cambridge: Academic Press, 2019. – P. 227-240.
179. Martínez-Salvador J. Morphologic variations in the pineal gland of the albino rat after a chronic alcoholisation process / J. Martínez-Salvador, A. Ruiz-Torner, A. Blasco-Serra [et al.] // *Tissue and Cell.* – 2018. – V. 51. – P. 24-31.
180. Masri S. The emerging link between cancer, metabolism, and circadian rhythms / S. Masri, P. Sassone-Corsi // *Nature medicine.* – 2018. – V. 24. – №. 12. – P. 1795-1803.

181. Mathes A. M. Hepatoprotective actions of melatonin: possible mediation by melatonin receptors / A. M. Mathes // *World journal of gastroenterology: WJG.* – 2010. – V. 16. – №. 48. – P. 6087.
182. Matsuo T. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo / T. Matsuo, S. Yamaguchi, S. Mitsui [et al.] // *Science.* – 2003. – V. 302. – №. 5643. – P. 255-259.
183. Mauvoisin D. Circadian clock-dependent and-independent rhythmic proteomes implement distinct diurnal functions in mouse liver / D. Mauvoisin, J. Wang, C. Jouffe [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2014. – V. 111. – №. 1. – P. 167-172.
184. McKenna H. Clinical chronobiology: a timely consideration in critical care medicine / H. McKenna, G. T. J. van der Horst, I. Reiss [et al.] // *Critical Care.* – 2018. – Vol. 22. – Article No. 124. – 10 p.
185. Méndez-Hernández R. Suprachiasmatic Nucleus–Arcuate Nucleus Axis: Interaction Between Time and Metabolism Essential for Health / R. Méndez-Hernández, C. Escobar, R. M. Buijs // *Obesity.* – 2020. – V. 28. – P. S10-S17.
186. Meng Q. J. Entrainment of disrupted circadian behavior through inhibition of casein kinase 1 (CK1) enzymes / Q. J. Meng, E. S. Maywood, D. A. Bechtold [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2010. – V. 107. – №. 34. – P. 15240-15245.
187. Michel S. From clock to functional pacemaker / S. Michel, J. H. Meijer // *European Journal of Neuroscience.* – 2020. – V. 51. – №. 1. – P. 482-493.
188. Miyaoka Y. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration / Y. Miyaoka, K. Ebato, H. Kato [et al.] // *Current Biology.* – 2012. – V. 22. – №. 13. – P. 1166-1175.
189. Montagnese S. Sleep-wake abnormalities in patients with cirrhosis / S. Montagnese, C. De Pittà, M. De Rui [et al.] // *Hepatology.* – 2014. – V. 59. – №. 2. – P. 705-712.

190. Morikawa Y. The effect of age on the relationships between work-related factors and heavy drinking / Y. Morikawa, K. Nakamura, M. Sakurai [et al.] // *Journal of occupational health*. – 2014. – P. 141-149.
191. Mota M. C. Social jetlag and metabolic control in non-communicable chronic diseases: a study addressing different obesity statuses / M. C. Mota, C. M. Silva, L. C. T. Balieiro [et al.] // *Scientific reports*. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 1-8.
192. Mueller S. Does pressure cause liver cirrhosis? The sinusoidal pressure hypothesis / S. Mueller // *World journal of gastroenterology*. – 2016. – V. 22. – №. 48. – P. 10482.
193. Mukherji A. Perturbation of the circadian clock and pathogenesis of NAFLD / A. Mukherji, M. Dachraoui, T. F. Baumert // *Metabolism*. – 2020. – P. 154337.
194. Mukherji A. The circadian clock and liver function in health and disease / A. Mukherji, S. Bailey, B. Staels [et al.] // *Journal of hepatology*. – 2019. – V. 71. – №. 1. – P. 200-211.
195. Nagy P. Reconstitution of liver mass via cellular hypertrophy in the rat / P. Nagy, T. Teramoto, V. M. Factor [et al.] // *Hepatology*. – 2001. – V. 33. – №. 2. – P. 339-345.
196. Narváez-Rojas A. R. Physiology of the Pineal Gland. In: *Pineal Neurosurgery* / A. R. Narváez-Rojas, L. R. Moscote-Salazar, A. A. Dolachee [et al.] – Cham: Springer, 2020. – P. 21-29.
197. Neuman M. G. Alcoholic liver disease: clinical and translational research / M.G. Neuman, S. Malnick, Y. Maor [et al.] // *Experimental and molecular pathology*. – 2015. – V. 99. – №. 3. – P. 596-610.
198. Owino S. Melatonin signaling controls the daily rhythm in blood glucose levels independent of peripheral clocks / S. Owino, S. Contreras-Alcantara, K. Baba [et al.] // *PloS one*. – 2016. – V. 11. – №. 1. – P. e0148214.

199. Ozburn A. R. The role of clock in ethanol-related behaviors / A. R. Ozburn, E. Falcon, S. Mukherjee [et al.] // *Neuropsychopharmacology*. – 2013. – V. 38. – №. 12. – P. 2393-2400.
200. Paik Y. H. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells / Y. H. Paik, R. F. Schwabe, R. Bataller [et al.] // *Hepatology*. – 2003. – V. 37. – №. 5. – P. 1043-1055.
201. Pan M. Melatonin ameliorates nonalcoholic fatty liver induced by high-fat diet in rats / M. Pan, Y. L. Song, J. M. Xu [et al.] // *Journal of pineal research*. – 2006. – V. 41. – №. 1. – P. 79-84.
202. Panda S. Circadian physiology of metabolism / S. Panda // *Science*. – 2016. – V. 354. – №. 6315. – P. 1008-1015.
203. Parker R. Alcohol, adipose tissue and liver disease: mechanistic links and clinical considerations / R. Parker, S. J. Kim, B. Gao // *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. – 2018. – V. 15. – №. 1. – P. 50-59.
204. Paschos G. K. Obesity in mice with adipocyte-specific deletion of clock component Arntl / G. K. Paschos, S. Ibrahim, W.-L. Song [et al.] // *Nature medicine*. – 2012. – V. 18. – №. 12. – P. 1768-1777.
205. Peccerella T. Chronic ethanol consumption and generation of etheno-DNA adducts in cancer-prone tissues. In: *Alcohol and Cancer* / T. Peccerella, T. Arslan-Schmitt, S. Mueller [et al.] – Cham: Springer, 2018. – P. 81-92.
206. Perreau-Lenz S. Inhibition of the casein-kinase-1-epsilon/delta prevents relapse-like alcohol drinking / S. Perreau-Lenz, V. Vengeliene, H. R. Noori [et al.] // *Neuropsychopharmacology*. – 2012. – V. 37. – №. 9. – P. 2121-2131.
207. Perreau-Lenz S. Clock genes × stress × reward interactions in alcohol and substance use disorders / S. Perreau-Lenz, R. Spanagel // *Alcohol*. – 2015. – V. 49. – №. 4. – P. 351-357.

208. Poggiogalle E. Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans / E. Poggiogalle, H. Jamshed, C. M. Peterson // *Metabolism*. – 2018. – V. 84. – P. 11-27.
209. Pritchett D. Circadian clocks in the hematologic system / D. Pritchett, A. B. Reddy // *Journal of biological rhythms*. – 2015. – V. 30. – №. 5. – P. 374-388.
210. Pronko P. Effect of chronic alcohol consumption on the ethanol-and acetaldehyde-metabolizing systems in the rat gastrointestinal tract / P. Pronko, L. Bardina, V. Satanovskaya [et al.] // *Alcohol and Alcoholism*. – 2002. – V. 37. – №. 3. – P. 229-235.
211. Prosser R. A. Acute ethanol modulates glutamatergic and serotonergic phase shifts of the mouse circadian clock *in vitro* / R. A. Prosser, C. A. Mangrum, J. D. Glass, // *Neuroscience*. – 2008. – V. 152. – №. 3. – P. 837-848.
212. Purohit V. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver / V. Purohit, B. Gao, B.-J. Song // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. – 2009. – V. 33. – №. 2. – P. 191-205.
213. Rajput S. Light pollution: hidden perils in light and links to cancer / S. Rajput, M. Naithani, K. Meena [et al.] // *Sleep and Vigilance*. – 2021. – P. 1-12.
214. Reghunandanan V. Vasopressin in circadian function of SCN / V. Reghunandanan // *Journal of biosciences*. – 2020. – V. 45. – №. 1. – P. 1-11.
215. Rehm J. The risks associated with alcohol use and alcoholism / J. Rehm // *Alcohol Research & Health*. – 2011. – V. 34. – №. 2. – P. 135.
216. Robles M. S. In-vivo quantitative proteomics reveals a key contribution of post-transcriptional mechanisms to the circadian regulation of liver metabolism / M. S. Robles, J. Cox, M. Mann // *PLoS genetics*. – 2014. – V. 10. – №. 1. – P. e1004047.
217. Rodrigues F. M. Physical exercise alters hepatic morphology of low-density lipoprotein receptor knockout ovariectomized mice / F. M. Rodrigues,

- J. I. Adélio, V. O. Santana [et al.] // *Medical molecular morphology*. – 2019. – V. 52. – №. 1. – P. 15-22.
218. Roenneberg T. The circadian clock and human health / T. Roenneberg, M. Merrow // *Current biology*. – 2016. – V. 26. – №. 10. – P. R432-R443.
219. Rosenwasser A. M. Chronobiology of ethanol: animal models / A. M. Rosenwasser // *Alcohol*. – 2015. – V. 49. – №. 4. – P. 311-319.
220. Rosenwasser A. M. Effects of repeated light–dark phase shifts on voluntary ethanol and water intake in male and female Fischer and Lewis rats / A. M. Rosenwasser, J. W. Clark, M. C. Fixaris [et al.] // *Alcohol*. – 2010. – V. 44. – №. 3. – P. 229-237.
221. Rudic R. D. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis / R. D. Rudic, P. McNamara, A. M. Curtis [et al.] // *PLoS biology*. – 2004. – V. 2. – №. 11. – P. e377.
222. Sabath E. Food entrains clock genes but not metabolic genes in the liver of suprachiasmatic nucleus lesioned rats / E. Sabath, R. Salgado-Delgado, N. N. Guerrero-Vargas [et al.] // *FEBS letters*. – 2014. – V. 588. – №. 17. – P. 3104-3110.
223. Sakhuja P. Pathology of alcoholic liver disease, can it be differentiated from nonalcoholic steatohepatitis? / P. Sakhuja // *World Journal of Gastroenterology: WJG*. – 2014. – V. 20. – №. 44. – P. 16474.
224. Samuel V.T. Nonalcoholic fatty liver disease as a nexus of metabolic and hepatic diseases / V. T. Samuel, G. I. Shulman // *Cell metabolism*. – 2018. – V. 27. – №. 1. – P. 22-41.
225. Saran A. R. Circadian rhythms in the pathogenesis and treatment of fatty liver disease / A. R. Saran, S. Dave, A. Zarrinpar // *Gastroenterology*. – 2020. – V. 158. – №. 7. – P. 1948-1966.
226. Scheving L. A. Biological clocks and the digestive system / L. A. Scheving // *Gastroenterology*. – 2000. – V. 119. – №. 2. – P. 536-549.

227. Schluter P. J. Long working hours and alcohol risk among Australian and New Zealand nurses and midwives: a cross-sectional study / P. J. Schluter, C. Turner, C. Benefer // *International journal of nursing studies*. – 2012. – V. 49. – №. 6. – P. 701-709.
228. Schmidt C. Chronobiological research for cognitive science: A multifaceted view / C. Schmidt, Y. Bao // *PsyCh journal*. – 2017. – V. 6. – P. 249-252.
229. Schott M. B. β -Adrenergic induction of lipolysis in hepatocytes is inhibited by ethanol exposure / M. B. Schott, K. Rasineni, S. G. Weller [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2017. – V. 292. – №. 28. – P. 11815-11828.
230. Schwartz W. J. Circadian neurobiology and the physiologic regulation of sleep and wakefulness / W. J. Schwartz, E. B. Klerman // *Neurologic clinics*. – 2019. – V. 37. – №. 3. – P. 475-486.
231. Scocciati C. European Code against Cancer 4th Edition: Alcohol drinking and cancer / C. Scocciati, M. Cecchini, A. S. Anderson [et al.] // *Cancer epidemiology*. – 2016. – V. 45. – P. 181-188.
232. Sherlock S. Alcoholic liver disease / S. Sherlock // *The Lancet*. – 1995. – V. 345. – №. 8944. – P. 227-229.
233. Sherman H. Caffeine alters circadian rhythms and expression of disease and metabolic markers / H. Sherman, R. Gutman, N. Chapnik [et al.] // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2011. – V. 43. – №. 5. – P. 829-838.
234. Sherman H. Long-term restricted feeding alters circadian expression and reduces the level of inflammatory and disease markers / H. Sherman, I. Frumin, R. Gutman [et al.] // *Journal of cellular and molecular medicine*. – 2011. – V. 15. – №. 12. – P. 2745-2759.
235. Shetty, A., Hsu, J.W., Manka, P.P. et al. Role of the circadian clock in the metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease / A. Shetty, J.W. Hsu, P.P. Manka [et al.] // *Digestive diseases and sciences*. – 2018. – V. 63. – №. 12. – P. 3187-3206.

236. Shi D. Circadian clock genes in the metabolism of non-alcoholic fatty liver disease / D. Shi, J. Chen, J. Wang [et al.] // *Frontiers in physiology*. – 2019. – V. 10. – P. 423.
237. Shostak A. Circadian clock, cell division, and cancer: from molecules to organism / A. Shostak // *International journal of molecular sciences*. – 2017. – V. 18. – №. 4. – P. 873.
238. Shouval D. The impact of chronic hepatitis C infection on the circadian clock and sleep / D. Shouval // *Journal of Hepatology*. – 2014. – V. 60. – №. 4. – P. 685-686.
239. Sinturel F. Circadian hepatocyte clocks keep synchrony in the absence of a master pacemaker in the suprachiasmatic nucleus or other extrahepatic clocks / F. Sinturel, P. Gos, V. Petrenko [et al.] // *Genes & development*. – 2021. – V. 35. – №. 5-6. – P. 329-334.
240. Sinturel F. Diurnal oscillations in liver mass and cell size accompany ribosome assembly cycles / F. Sinturel, A. Gerber, D. Mauvoisin [et al.] // *Cell*. – 2017. – V. 169. – №. 4. – P. 651-663.
241. Slevin E. Kupffer cells: Inflammation pathways and cell-cell interactions in alcohol-associated liver disease / E. Slevin, L. Baiocchi, N. Wu [et al.] // *The American Journal of Pathology*. – 2020. – V. 190. – №. 11. – P. 2185-2193.
242. Smitha T. Morphometry of the basal cell layer of oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma using computer-aided image analysis / T. Smitha, P. Sharada, H. Girish // *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*. – 2011. – V. 15. – №. 1. – P. 26.
243. Sorkin T. Sudden unexplained death in alcohol misuse (SUDAM) patients have different characteristics to those who died from sudden arrhythmic death syndrome (SADS) / T. Sorkin, M. N. Sheppard // *Forensic Science, Medicine and Pathology*. – 2017. – V. 13. – №. 3. – P. 278-283.

244. Spanagel R. Alcohol consumption and the body's biological clock / R. Spanagel, A. M. Rosenwasser, G. Schumann [et al.] // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. – 2005. – V. 29. – №. 8. – P. 1550-1557.
245. Stevens R. G. Alcohol consumption and urinary concentration of 6-sulfatoxymelatonin in healthy women / R.G. Stevens, S. Davis, D. K. Mirick [et al.] // *Epidemiology*. – 2000. – P. 660-665.
246. Stickel F. Alcoholic cirrhosis and hepatocellular carcinoma / F. Stickel // *Adv Exp Med Biol*. – 2015. – №815. – P. 113-130.
247. Stickel F. Pathophysiology and management of alcoholic liver disease: update 2016 / F. Stickel, C. Datz, J. Hampe [et al.] // *Gut and liver*. – 2017. – V. 11. – №. 2. – P. 173.
248. Summa K. C. Disruption of the circadian clock in mice increases intestinal permeability and promotes alcohol-induced hepatic pathology and inflammation / K. C. Summa, R. M. Voigt, C. B. Forsyth [et al.] // *PloS one*. – 2013. – V. 8. – №. 6. – P. e67102.
249. Swanson G. R. Night workers with circadian misalignment are susceptible to alcohol-induced intestinal hyperpermeability with social drinking / G. R. Swanson, A. Gorenz, M. Shaikh [et al.] // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2016. – V. 311. – №. 1. – P. G192-G201.
250. Swanson G. Role of intestinal circadian genes in alcohol-induced gut leakiness / G. Swanson, C. B. Forsyth, Y. Tang [et al.] // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. – 2011. – V. 35. – №. 7. – P. 1305-1314.
251. Tahara Y. Circadian rhythms of liver physiology and disease: experimental and clinical evidence / Y. Tahara, S. Shibata // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. – 2016. – V. 13. – №. 4. – P. 217.
252. Tähkämö L. Systematic review of light exposure impact on human circadian rhythm / L. Tähkämö, T. Partonen, A. K. Pesonen // *Chronobiology international*. – 2019. – V. 36. – №. 2. – P. 151-170.

253. Takahashi J. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock / J. Takahashi // *Nature Reviews Genetics*. – 2017. – V. 18. – №. 3. – P. 164-179.
254. Teschke R. Alcoholic liver disease: alcohol metabolism, cascade of molecular mechanisms, cellular targets, and clinical aspects / R. Terschke // *Biomedicines*. – 2018. – V. 6. – №. 4. – P. 106.
255. Theise N. D. Histopathology of alcoholic liver disease / N. D. Theise // *Clinical Liver Disease*. – 2013. – V. 2. – №. 2. – P. 64.
256. Tobari M. Gender-specific clinicopathological features in nonalcoholic steatohepatitis / M. Tobari, E. Hashimoto, A. Kabutake [et al.] // *Gastroenterology*. – 2007. – V. 132. – №. 4. – P. A815-A815.
257. Tsomaia K. Liver structural transformation after partial hepatectomy and repeated partial hepatectomy in rats: A renewed view on liver regeneration / K. Tsomaia, L. Patarashvili, N. Karumidze [et al.] // *World Journal of Gastroenterology*. – 2020. – V. 26. – №. 27. – P. 3899-3916.
258. Tsuchida T. Mechanisms of hepatic stellate cell activation / T. Tsuchida, S. L. Friedman // *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. – 2017. – V. 14. – №. 7. – P. 397-411.
259. Turek F. W. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice / F. W. Turek, C. Joshu, A. Kohsaka [et al.] // *Science*. – 2005. – V. 308. – №. 5724. – P. 1043-1045.
260. Uchiyama Y. Rhythms in morphology and function of hepatocytes / Y. Uchiyama // *Journal of gastroenterology and hepatology*. – 1990. – V. 5. – №. 3. – P. 321-333.
261. Udoh U. S. Chronic ethanol consumption disrupts diurnal rhythms of hepatic glycogen metabolism in mice / U. S. Udoh, T. M. Swain, A. N. Filiano [et al.] // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2015. – V. 308. – №. 11. – P. G964-G974.

262. Udoh U. S. The molecular circadian clock and alcohol-induced liver injury / U. S. Udoh, J. A. Valcin, K. L. Gamble [et al.] // *Biomolecules*. – 2015. – V. 5. – №. 4. – P. 2504-2537.
263. Uesugi T. Role of lipopolysaccharide-binding protein in early alcohol-induced liver injury in mice / T. Uesugi, M. Froh, G. E. Arteel [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2002. – V. 168. – №. 6. – P. 2963-2969.
264. Vásquez B. Effects of early and late adverse experiences on morphological characteristics of Sprague-Dawley rat liver subjected to stress during adulthood / B. Vásquez, C. Sandoval, R. L. Smith [et al.] // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. – 2014. – V. 7. – №. 8. – P. 4627-4635.
265. Verlande A. Circadian clocks and cancer: timekeeping governs cellular metabolism / A. Verlande, S. Masri // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. – 2019. – V. 30. – №. 7. – P. 445-458.
266. Vidali M. Interplay between oxidative stress and immunity in the progression of alcohol-mediated liver injury / M. Vidali, S. F. Stewart, E. Albano // *Trends in molecular medicine*. – 2008. – V. 14. – №. 2. – P. 63-71.
267. Virtanen M. Long working hours and alcohol use: systematic review and meta-analysis of published studies and unpublished individual participant data / M. Virtanen, M. Jokela, S. T. Nyberg [et al.] // *Bmj*. – 2015. – V. 350. – P. g7772.
268. Walker W. H. Circadian rhythm disruption and mental health / W. H. Walker, J. C. Walton, A. C. DeVries [et al.] // *Translational psychiatry*. – 2020. – V. 10. – №. 1. – P. 1-13.
269. Wang H. Melatonin ameliorates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in rats via inhibition of oxidative stress / H. Wang, W. Wei, N. P. Wang [et al.] // *Life sciences*. – 2005. – V. 77. – №. 15. – P. 1902-1915.
270. Wang J. Nuclear proteomics uncovers diurnal regulatory landscapes in mouse liver / J. Wang, D. Mauvoisin, E. Martin [et al.] // *Cell metabolism*. – 2017. – V. 25. – №. 1. – P. 102-117.

271. Wang S. A mechanistic review of cell death in alcohol-induced liver injury / S. Wang, P. Pacher, R. C. De Lisle [et al.] // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. – 2016. – V. 40. – №. 6. – P. 1215-1223.
272. Wasielewski J. A. Alcohol's interactions with circadian rhythms: A focus on body temperature / J. A. Wasielewski, F. A. Holloway // *Alcohol Research & Health*. – 2001. – V. 25. – №. 2. – P. 94-100.
273. Wei Y. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene / Y. Wei, C. Neuveut, P. Tiollais [et al.] // *Pathologie Biologie*. – 2010. – V. 58. – №. 4. – P. 267-272.
274. Westerterp-Plantenga M.S. Challenging energy balance-during sensitivity to food reward and modulatory factors implying a risk for overweight-during body weight management including dietary restraint and medium-high protein diets / M.S. Westerterp-Plantenga // *Physiology & Behavior*. – 2020. – P. 112879.
275. Wetterberg L. Age, alcoholism and depression are associated with low levels of urinary melatonin / L. Wetterberg, B. Aperia, D. A. Gorelik [et al.] // *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. – 1992. – V. 17. – №. 5. – P. 215.
276. Wilkinson P. D. Differential roles for diploid and polyploid hepatocytes in acute and chronic liver injury / P. D. Wilkinson, A.W. Duncan // *Seminars in Liver Disease*. – 2021. – V. 41. – №. 01. – P. 042-049.
277. Wu N. Prolonged darkness reduces liver fibrosis in a mouse model of primary sclerosing cholangitis by miR-200b down-regulation / N. Wu, F. Meng, T. Zhou [et al.] // *The FASEB Journal*. – 2017. – V. 31. – №. 10. – P. 4305-4324.
278. Yalçın M. Analysis of the Circadian Regulation of Cancer Hallmarks by a Cross-Platform Study of Colorectal Cancer Time-Series Data Reveals an Association with Genes Involved in Huntington's Disease / M. Yalçın, R. El-Athman, K. Ouk [et al.] // *Cancers*. – 2020. – V. 12. – №. 4. – P. 963.

279. Yanko R. The combined influence of the intermittent normobaric hypoxia and melatonin on morphofunctional activity of the rat's liver parenchyma / R. Yanko // *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv-Problems of Physiological Functions Regulation*. – 2018. – V. 25. – №2. – P. 36-40.
280. Yi C. X. Glucocorticoid signaling in the arcuate nucleus modulates hepatic insulin sensitivity / C. X. Yi, E. Foppen, W. Abplanalp [et al.] // *Diabetes*. – 2012. – V. 61. – №. 2. – P. 339-345.
281. Yip W. W. Alcoholic liver disease / W. W. Yip, A. D. Burt // *Seminars in diagnostic pathology*. – 2006. – V. 23. – №. 3-4. – P. 149-160.
282. Yoo S. H. PERIOD2:: LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues / S. H. Yoo, S. Yamazaki, P. L. Lowrey [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – V. 101. – №. 15. – P. 5339-5346.
283. You M. The role of AMP-activated protein kinase in the action of ethanol in the liver / M. You, M. Matsumoto, C. M. Pacold [et al.] // *Gastroenterology*. – 2004. – V. 127. – №. 6. – P. 1798-1808.
284. Younossi Z. Contribution of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease to the burden of liver-related morbidity and mortality / Z. Younossi, L. Henry // *Gastroenterology*. – 2016. – V. 150. – №. 8. – P. 1778-1785.
285. Yu H. S. Melatonin: biosynthesis, physiological effects, and clinical applications / H. S. Yu, R. J. Reiter – Boca Raton: cRC Press, 2020. – 560 p.
286. Zawilska J. B. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms / J. B. Zawilska, D. J. Skene, J. Arendt // *Pharmacological reports*. – 2009. – V. 61. – №. 3. – P. 383-410.
287. Zhang Y. Integration of peripheral circadian clock and energy metabolism in metabolic tissues / Y. Zhang, W. Zhang, C. Liu // *Journal of Molecular Cell Biology*. – 2019. – №12(7). – P. 481–485

288. Zhao B. A functional polymorphism in PER 3 gene is associated with prognosis in hepatocellular carcinoma / B. Zhao, J. Lu, J. Yin [et al.] // *Liver International*. – 2012. – V. 32. – №. 9. – P. 1451-1459.
289. Zhou D. Evolving roles of circadian rhythms in liver homeostasis and pathology / D. Zhou, Y. Wang, L. Chen [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – V. 7. – №. 8. – P. 8625-8639.
290. Zhou P. Disturbances in the murine hepatic circadian clock in alcohol-induced hepatic steatosis / P. Zhou, R. A. Ross, C. M. Pywell [et al.] // *Scientific reports*. – 2014. – V. 4. – №. 1. – P. 1-11.
291. Zhu C. C. Evidence for regression of alcoholic cirrhosis with abstinence / C. C. Zhu, P. Li, L. Zhu [et al.] // *Arch Pathol Lab Med*. – 2004. – V. 2. – P. 183.
292. Zimmet P. The Circadian Syndrome: is the Metabolic Syndrome and much more! / P. Zimmet, K. Alberti, N. Stern [et al.] // *Journal of internal medicine*. – 2019. – V. 286. – №. 2. – P. 181-191.
293. Zou Y. Four waves of hepatocyte proliferation linked with three waves of hepatic fat accumulation during partial hepatectomy-induced liver regeneration / Y. Zou, Q. Bao, S. Kumar [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – №. 2. – P. e30675.