

Особенности циркадного ритма размеров митохондрий гепатоцитов крыс в условиях темновой депривации и хронической алкогольной интоксикации

Д.А. Арешидзе

Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына
Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Циркадные ритмы функций и процессов в организме в норме строго согласованы между собой и с факторами внешней среды, что обеспечивает поддержание функционирования органов и систем на оптимальном уровне. В ранее проведенных исследованиях показано, что темновая депривация и хроническая алкогольная интоксикация, действуя как по отдельности, так и совместно, вызывают существенные нарушения в циркадном ритмостазе. Однако исследований, посвященных изучению циркадных ритмов органоидов гепатоцитов в экспериментальных условиях, нами не обнаружено.

Цель исследования — изучение суточной динамики площади поперечного сечения митохондрий гепатоцитов у крыс обоего пола в условиях темновой депривации, хронической алкогольной интоксикации и совместного действия этих факторов.

Материалы и методы. Работа выполнена на 80 самцах и 80 самках крыс аутбредного стока Вистар в возрасте 6 мес, разделенных на 4 группы каждого пола: 1-я группа содержалась при фиксированном световом режиме; 2-я группа — в условиях темновой депривации 24 ч в сутки; 3-я группа — в тех же условиях, что и животные контрольной группы, но подвергалась хронической алкогольной интоксикации; 4-я группа — в условиях темновой депривации и хронической алкогольной интоксикации. Длительность эксперимента составляла 3 нед. Образцы печени после фиксации и проводки традиционными методами анализировали при помощи просвечивающего электронного микроскопа. Для оценки митохондриального аппарата гепатоцитов применяли микроморфометрические методы. Построение графиков и статистическую обработку результатов выполняли в программе GraphPad Prism v. 8.41. Хронобиологическую обработку результатов осуществляли с использованием программы CosinorEllipse2006-1.1.

Результаты. В гепатоцитах крыс экспериментальных групп обоего пола обнаружен циркадный ритм площади поперечного сечения митохондрий со сходными параметрами. Темновая депривация и хроническая алкогольная интоксикация, действуя как отдельно, так и совместно, вызывают перестройку циркадных ритмов размеров митохондрий, в большей степени выраженную у самцов.

Заключение. Проведенное исследование свидетельствует о том, что циркадный ритм размеров митохондрий оказывается зависим от режима освещения и токсического действия этанола и его метаболитов. Циркадный ритм размеров митохондрий гепатоцитов самок по сравнению с самцами более устойчив к действию темновой депривации и алкогольной интоксикации.

Ключевые слова: гепатоцит; митохондрия; морфометрия; циркадный ритм.

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Арешидзе Д.А. Особенности циркадного ритма размеров митохондрий гепатоцитов крыс в условиях темновой депривации и хронической алкогольной интоксикации // Морфология. 2023. Т. 161, № 4. С. XX–XX. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.630117>

Рукопись получена: 08.04.2024 Рукопись одобрена: 16.05.2024 Опубликовано online: 11.06.2024

Статья доступна по лицензии CC BY-NC-ND 4.0 International
© Эко-Вектор, 2023

Features of the circadian rhythm in the size of mitochondria of rat hepatocytes under conditions of dark deprivation and chronic alcohol intoxication

David A. Areshidze

Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Circadian rhythms of functions and processes in the body are normally strictly coordinated with each other and with environmental factors, which ensures the maintenance of the functioning of the organs and systems of the body at an optimal level. However, we have not found any studies devoted to the study of circadian rhythms of hepatocyte organelles under experimental conditions.

AIM: Study of the daily dynamics of the cross-sectional area of hepatocyte mitochondria in rats under conditions of dark deprivation, chronic alcohol intoxication and the combined effect of these factors.

MATERIALS AND METHODS: The work was performed on 80 males and 80 females Wistar rats, divided into 4 groups of each sex: 1st group was kept under a fixed light regime; the 2nd group was kept under conditions of dark deprivation; the 3rd group was kept in the same conditions as the animals of the control group, but were subjected to chronic alcohol intoxication; 4th group was kept in conditions of dark deprivation and subjected to chronic alcohol intoxication. Liver samples, after fixation and wiring, were analyzed using a transmission electron microscope. Micromorphometric methods were used to assess the mitochondrial apparatus of hepatocytes.

RESULTS: In hepatocytes of rats from experimental groups of both sexes, circadian rhythm of the cross-sectional area of mitochondria with similar parameters was detected. Dark deprivation and chronic alcohol intoxication, acting both separately and together, cause a restructuring of the mitochondrial size distribution, which is more pronounced in males.

CONCLUSION: The study indicates that the circadian rhythm of mitochondrial size is dependent on the lighting regime and the toxic effect of ethanol and its metabolites. The size ranges of mitochondria in hepatocytes of females, compared to males, are more resistant to the effects of dark deprivation and alcohol intoxication.

Keywords: hepatocyte; mitochondria; morphometry; circadian rhythm.

TO CITE THIS ARTICLE:

Areshidze DA. Features of the circadian rhythm in the size of mitochondria of rat hepatocytes under conditions of dark deprivation and chronic alcohol intoxication. *Morphology*. 2023;161(4):XX-XX. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.630117>

Received: 08.04.2024 Accepted: 16.05.2024 Published: 11.06.2024

Article can be used under the CC BY-NC-ND 4.0 International License
© Eco-Vector, 2023

ОБОСНОВАНИЕ

Одним из фундаментальных свойств живого является ритмичность протекания биологических процессов на разных уровнях организации [1, 2]. Среди множества биоритмов с различным периодом колебания наиболее важны для млекопитающих циркадианные (циркадные) ритмы (ЦР). Эти ритмы, связанные с периодической сменой дня и ночи, сформировались в процессе адаптации к условиям суточного светового цикла [3,4].

К настоящему времени в организме млекопитающих охарактеризовано более 500 различных функций и процессов, протекающих в зависимости от циркадианных ритмов. ЦР функций и процессов в организме, отличающиеся друг от друга амплитудой и фазой, в норме строго согласованы между собой и с факторами внешней среды, что обеспечивает поддержание функционирования органов и систем организма на оптимальном уровне [5–8]. К настоящему

времени хорошо известно, что практически всем физиологическим процессам, обладающим циркадианной ритмичностью, свойственны половые различия [9, 10].

Циркадные ритмы организма млекопитающих могут проявлять автономность, что обусловлено наличием в клетках «часовых генов», образующих молекулярно-генетическое звено биологических часов. Оно 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, а также другие, обеспечивающими системе дополнительную надёжность [11–13]. Однако ЦР чаще всего модулируются влиянием факторов внешней и внутренней среды [14], что обеспечивает адаптацию организма. Чередование периодов света и темноты – наиболее важный регулятор разнообразных физиологических ритмов для млекопитающих, включая человека. Смена света и темноты оказывает влияние на период и амплитуду ЦР, экспрессию генов и согласование всего комплекса суточных ритмов между собой [15, 16].

К настоящему времени большая часть исследователей считает основным водителем ЦР в многоосцилляционной системе млекопитающих парное супрахиазматическое ядро гипоталамуса (СХЯ) (англ. nucleus suprachiasmaticus). Ритмоорганизующая функция СХЯ модулируется извне датчиками времени, наиболее значимым из которых является свет. Важнейшим участником ансамбля, регулирующего структуру ЦР у млекопитающих, служит шишковидная железа. Эта железа связана с СХЯ, от которых она получает информацию об освещённости, от чего и зависит сама выработка ею мелатонина и её ритмичность [17].

К одним из наиболее значимых факторов дезорганизации биоритмов в современном мире относят нарушение режима света-темноты, в частности световое загрязнение (темновую депривацию) — воздействие света в ночное время, нарушающее эндогенный ЦР, а также подавляющее ночную секрецию мелатонина [18]. Последнее имеет следствием ускоренное старение, развитие онкологических и обменных патологий, а также заболеваний органов желудочно-кишечного тракта и сердечно-сосудистой системы [19, 20]. Ещё одним хронодеструктором является алкоголь, действие которого которое может проявиться как на уровне часовых генов, так и на иерархически более высоких уровнях системы регуляции циркадианной ритмичности организма млекопитающих [21, 22].

Большая часть исследований, посвящённых изучению ЦР, рассматривает проявления суточной периодичности физиологических, биохимических, молекулярно-генетических процессов, и лишь небольшой ряд работ посвящён ЦР морфологических параметров, и уж совсем небольшая часть — изучению морфологических проявлений суточной ритмичности на клеточном и органоидном уровне в норме и при патологии. В частности, для клеточного ядра описаны суточная динамика полиплоидии, архитектуры хроматина, размеров самого ядра [23–25]. Обнаружены суточные ритмы количества и морфологических параметров митохондрий [26], эндоплазматической сети [27, 28] и лизосом [29].

Одной из традиционных моделей изучения биоритмов на органном и клеточном уровне является печень. В ранее проведённых исследованиях нами показано, что темновая депривация и хроническая алкогольная интоксикация, действуя как по отдельности, так и совместно, вызывают ряд неблагоприятных структурных изменений в гепатоцитах крыс, а также существенные нарушения в циркадном ритмостазе печени [30, 31]. Однако исследований, посвящённых ЦР органоидов гепатоцитов в экспериментальных условиях, нами не обнаружено.

Цель исследования — изучение суточной динамики площади поперечного сечения митохондрий гепатоцитов у крыс обоего пола в условиях темновой депривации (дефицита эпифизарного мелатонина), хронической алкогольной интоксикации и совместного действия этих факторов. Выбор площади поперечного сечения митохондрий в качестве исследуемого параметра обусловлен тем, что этот показатель является одним из наиболее информативных параметров, отражающих функциональное состояние органоида, а кроме того, описано наличие суточной динамики размеров митохондрий в норме [32].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено экспериментальное, одноцентровое, проспективное, выборочное, рандомизированное, контролируемое исследование.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 80 самцах и 80 самках крыс аутбредного стока Вистар в возрасте 6 мес (масса тела — 350±15 г). Животные были получены из питомника ФГБУН НЦБМТ ФМБА

России «Столбовая». Все крысы содержались в пластиковых клетках при температуре 20–22 °С и относительной влажности воздуха 60–70%; первоначально животных содержали при естественном освещении. Крысы имели свободный доступ к питьевой воде и брикетированному корму ПК-120-1 (ООО «Лабораторснаб», сертификат соответствия № РОССТУ.нО81.В00113, ГОСТ Р50258-92). Содержание животных и эксперименты выполнены в соответствии с Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в других научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). На проведение исследования получено разрешение биоэтического комитета ФГБНУ НИИМЧ им. А.П. Авцына, протокол № 34(10) от 14.03.2021.

Крысы были случайным образом разделены на 8 групп:

- 1-я группа (контроль, самцы, $n=20$) содержалась при фиксированном световом режиме (свет:темнота/10:14 ч с включением света в 8:00 и выключением в 18:00 ч);
- 2-я группа (самцы, $n=20$) содержалась в условиях темновой депривации 24 ч в сутки;
- 3-я группа (самцы, $n=20$) содержалась в тех же условиях, что и животные контрольной группы, но эти крысы получали в качестве питья 15% раствор этанола *ad libitum* вместо воды, т.е. подвергались хронической алкогольной интоксикации;
- 4-я группа (самцы, $n=20$) также содержалась в условиях темновой депривации, животные получали в качестве питья 15% раствор этанола *ad libitum*;
- 5-я группа (контроль, самки, $n=20$) содержалась при фиксированном световом режиме (свет:темнота/10:14 ч с включением света в 8:00 и выключением в 18:00 ч);
- 6-я группа (самки, $n=20$) содержалась в условиях темновой депривации 24 ч в сутки;
- 7-я группа (самки, $n=20$) содержалась в тех же условиях, что и контроль, но животные получали в качестве питья 15% водный раствор этанола *ad libitum* вместо воды, т.е. подвергались хронической алкогольной интоксикации;
- 8-я группа (самки, $n=20$) также содержалась в условиях темновой депривации, животные получали в качестве питья 15% раствор этанола *ad libitum*.

Выбор крыс, являющихся ночными животными, в качестве моделей для исследования обусловлен тем, что рядом работ подтверждено наличие общей для млекопитающих регуляторной системы циркадной ритмичности организма, что позволяет экстраполировать полученные на крысах данные на млекопитающих других видов, в том числе и на человека, за исключением исследований, связанных с двигательной активностью и изучением пищевого времязадатчика [33].

Отбор самок крыс в экспериментальные группы осуществлялся после определения фазы эстрального цикла по кольпоцитогамме таким образом, чтобы в эксперимент вошли животные в фазе диэструса.

Критерием отбора крыс в исследование наряду с отсутствием видимых отклонений поведения и внешнего вида животного (состояние шерстного покрова, глаз, конечностей) было исходное предпочтение алкоголя (15% раствор этилового спирта) водопроводной воде. Для этого провели предварительный эксперимент: в течение 3 сут крыс содержали в индивидуальных клетках со свободным доступом к обеим жидкостям. В течение эксперимента ежедневно определяли объём выпитого раствора этанола, затем вычисляли массу спирта на 1 кг массы тела. В среднем животные обоего пола выпивали $15,48 \pm 1,28$ мл/сут, что в пересчёте на абсолютный этанол составляет 7 г/кг массы тела.

Длительность эксперимента составляла 3 недели.

Выведение крыс из эксперимента осуществляли в углекислотной камере, оборудованной устройством для верхней подачи газа (100% CO₂) в 9:00, 15:00, 21:00 и 3:00. Предварительно у животных измеряли ректальную температуру. Заполнение объёма камеры газом производили со скоростью 20% в минуту во избежание возникновения у животных диспноэ и боли. Под действием газа животные засыпали, после чего у них выполняли забор крови для гематологических и биохимических исследований, также осуществляли эвисцерацию печени.

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Образцы печени размером 2 мм³ фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида на фосфатном буфере (pH=7,4), затем дофиксировали в 1% растворе оксида осмия (OsO₄), обезвоживали в этаноле, в процессе обезвоживания контрастировали 1% уранилацетатом на

70% этаноле и проводили заливку в смесь эпон–аралдит по стандартной методике [34]. От каждого животного забирали по 4 образца.

Ультратонкие срезы, полученные на ультратоме LKB III (LKB Produkter, Швеция), дополнительно контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу и просматривали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-100CX (JEOL, Япония). Фотофиксацию препаратов осуществляли с помощью камеры Gatan ES500W Erlangshen (Model 782) (Gatan Inc., США).

Для микроморфометрической оценки митохондриального аппарата гепатоцитов в каждом препарате анализировали 20 непересекающихся полей зрения при $\times 20\,000$. С целью стандартизации результатов исследования на полутонких срезах, окрашенных толудиновым синим, для анализа выбирали однотипные участки — промежуточную зону печёночных долек [35]. При помощи программы ImageJ определяли площадь сечения одной митохондрии.

МЕТОДЫ СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ.

Построение графиков, иллюстрирующих суточную динамику исследуемого параметра, и статистическую обработку результатов выполняли в программе Prism v. 8.41 (GraphPad, США).

Для статистического расчёта амплитуды и акрофазы ЦР осуществляли косинор-анализ — международный, общепризнанный метод 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. Определялось наличие достоверного ЦР, а также его акрофаза и амплитуда. Выходной информацией косинор-анализа являются основные параметры ритмов: мезор, т.е. величина среднего уровня синусоиды (h), амплитуда синусоиды (A) и акрофаза (Φ), т.е. 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.

Затем осуществляется построение эллипса ошибок, необходимого для определения достоверности существования ритмов на принятом доверительном уровне (в данном исследовании — на уровне 0,95). Синусоида изображается на плоскости точкой, полярные координаты которой — 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. ЦР считается статистически значимым при выполнении двух условий: усреднённая аппроксимирующая хронограмма синусоида (изображённая крестиком) должна входить в эллипс, а сам эллипс не должен проходить через центр координат (так как в данном случае акрофаза будет приходиться на весь 24-часовой период) [36, 37].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведённое исследование показало, что площадь поперечного сечения митохондрий гепатоцитов как самцов, так и самок контрольной группы в норме характеризуются суточной динамикой с максимумом в 15 ч и снижением до минимума к 3 ч (рис. 1). По результатам косинор-анализа фазово-амплитудные характеристики обнаруженного ЦР также характеризуются сходными параметрами: в гепатоцитах самцов акрофаза ритма поперечного сечения отмечается в 14:27, амплитуда его составляет $0,083 \text{ мкм}^2$, у самок акрофаза ритма отмечена в 14:19 при амплитуде $0,057 \text{ мкм}^2$ (рис. 2).

Под влиянием темновой депривации суточная динамика площади поперечного сечения митохондрий гепатоцитов самцов практически не изменяется, ЦР присутствует и характеризуется акрофазой, сместившейся на 13:16, и значительным уменьшением амплитуды ритма, составившей $0,048 \text{ мкм}^2$. В тех же условиях в гепатоцитах самок максимальных размеров митохондрии достигают в утренние часы при сохранившемся минимуме в 3 ч. По данным косино-анализа, акрофаза ритма смещается на 12:07 при амплитуде $0,063 \text{ мкм}^2$.

Хроническая алкогольная интоксикация вызывает значительные изменения суточной динамики размеров митохондрий в гепатоцитах самцов. Максимум ритма смещается на вечерние часы при сохраняющемся минимуме в 21 ч. При этом акрофаза ЦР мигрирует на 13:21, амплитуда его составляет $0,075 \text{ мкм}^2$. В гепатоцитах самок параметры суточной динамики ритма

характеризуются максимумом в 9 ч при сохраняющемся минимуме в 3 ч, а косинор-анализ показывает акрофазу в 11:58 при амплитуде 0,084 мкм².

Совместное действие этанола и темновой депривации также вызывает изменение суточной динамики исследуемого параметра у самцов. В этом случае при максимуме площади поперечного сечения митохондрий в 9 ч минимальные значения составляют 21 ч, а акрофаза ритма смещается на 8:19 с амплитудой 0,076 мкм². У самок в тех же условиях форма хронограммы практически совпадает с таковой у животных 2-й группы; акрофаза ритма, приходящаяся на 11:41, также практически совпадает с показателями самок 2-й группы, но амплитуда ритма увеличивается до 0,106 мкм².

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведённое исследование позволило установить наличие чёткого и статистически значимого ЦР размеров митохондрий в гепатоцитах крыс контрольных групп обоего пола. Примечательно, что в условиях фиксированного светового режима как форма хронограммы, так и характеристики самого ЦР не продемонстрировали значимых межполовых различий. Согласно литературным данным, предполагается, что в поддержании циркадной ритмичности размеров митохондрий в норме ведущая роль принадлежит гену *bmal1*, а также сопряжённым с ним генам [38, 39].

Однако не менее важными факторами, определяющими циркадную ритмичность морфологических и функциональных характеристик митохондрий, являются как тканеспецифичность ритма, так и влияние факторов внешней и внутренней среды (двигательная активность, режим питания, митотическая активность клеток, их дифференцировка) [40–42].

Темновая депривация и хроническая алкогольная интоксикация, действуя и как монофактор, и совместно, вызывают перестройку циркадной ритмичности размеров митохондрий гепатоцитов. Примечательно, что у животных всех групп ЦР перестраиваются, ни в одной группе не наблюдается разрушений ритма. Ранее проведённые нами исследования [16, 30, 31] свидетельствуют о том, что совместное влияние постоянного освещения приводит к разрушению в гепатоцитах ЦР экспрессии основных генов, регулирующих ЦР на клеточном уровне (*per2*, *clock*, *bmal1*), а у самцов аналогичный эффект оказывает и темновая депривация как монофактор. Таким образом, в данном случае можно предположить, что в поддержании исследованного ЦР площади поперечного сечения митохондрии регуляторные часовые гены принимают как минимум неосновное участие.

В то же время в тех же исследованиях нами показано, что из ЦР всего спектра исследованных параметров наименее лабильным оказывается ЦР содержания глюкозы в крови. При сопоставлении параметров этого ритма с ритмом площади митохондрий обнаруживается, что у животных контрольных групп совпадают по времени акрофазы ритмов глюкозы и площади митохондрий, при этом акрофаза глюкозы отмечается на 1 ч раньше.

В дальнейшем под влиянием хронической алкогольной интоксикации и темновой депривации ритм глюкозы у самцов характеризовался акрофазой, «мигрирующей» в диапазоне от 11:36 до 15:05, но синхронизации его с ЦР площади митохондрий не отмечено. У самок в тех же условиях акрофаза ритма располагалась в диапазоне от 12:40 до 13:11, всегда опережая акрофазу ЦР площади митохондрий не более чем на 90 мин. Взаимосвязь между функциональным состоянием клетки и морфологическими изменениями митохондрий в настоящее время является предметом активного изучения. Предполагается, что ведущая роль в изменениях размеров митохондрий принадлежит динамике ряда белков: миофилина1/2, митофилина, ChChd3, ChChd6, OPA1, Sam50 [43–45], меняющейся в зависимости от функциональных потребностей клетки. С учётом данных о том, что увеличение размеров митохондрий отражает усиление продукции в них АТФ [46, 47], можно предположить, что в печени ведущим времяздатчиком в отношении митохондрий оказывается режим питания.

Кроме того, проведённое исследование показывает, что ЦР размеров митохондрий гепатоцитов самок по сравнению с самцами оказываются более устойчивыми к действию темновой депривации и алкогольной интоксикации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые установлено, что размеры митохондрий гепатоцитов самцов и самок крыс в норме характеризуются сходными характеристиками циркадного ритма. Показано, что как отдельно, так и совместно действующие факторы — темновая депривация и хроническая алкогольная интоксикация — вызывают перестройку исследованных циркадных ритмов, при этом ритм

размеров митохондрий у самок оказывается менее пластичным, чем у самцов. Вопрос о существовании этого различия, а также о механизмах перестройки ритмов и роли в этом процессе внешних и внутренних времязадатчиков остаётся открытым и требует дальнейшего изучения.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках государственного задания Научно-исследовательского института морфологии человека имени академика А.П. Авцына Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского № 122030200535-1.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. The study was carried out within the framework of the state assignment of the Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Petrovsky National Research Centre of Surgery N 122030200535-1.

Competing interests. The authors declares the he has no competing interests.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чиби́сов С.М., Раппопорт С.И., Благонравов М.Л. Хронобиология и хрономедицина. Москва: Издательство РУДН, 2018. 828 с.
2. Forger D.B. Biological clocks, rhythms, and oscillations: the theory of biological timekeeping. Cambridge (MA): MIT Press, 2017.
3. McKenna H., van der Horst G.T.J., Reiss I., Martin D. Clinical chronobiology: a timely consideration in critical care medicine // *Crit Care*. 2018. Vol. 22, N 1. P. 124. doi: 10.1186/s13054-018-2041-x
4. Walker W.H. 2nd, Bumgarner J.R., Walton J.C., et al. Light pollution and cancer // *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21, N 24. P. 9360. doi: 10.3390/ijms21249360
5. Chaix A., Lin T., Le H.D., et al. Time-restricted feeding prevents obesity and metabolic syndrome in mice lacking a circadian clock // *Cell Metab*. 2019. Vol. 29, N 2. P. 303–319. doi: 10.1016/j.cmet.2018.08.004
6. Panda S., Poirier G.G., Kay S.A. teJ defines a role for poly(ADP-ribosyl)ation in establishing period length of the arabidopsis circadian oscillator // *Dev Cell*. 2002. Vol. 3, N 1. P. 51–61. doi: 10.1016/s1534-5807(02)00200-9
7. Roenneberg T., Merrow M. The circadian clock and human health // *Curr Biol*. 2016. Vol. 26, N 10. P. R432–R443. doi: 10.1016/j.cub.2016.04.011
8. Zimmet P., Alberti K.G.M.M., Stern N., et al. The circadian syndrome: is the metabolic syndrome and much more! // *J Intern Med*. 2019. Vol. 286, N 2. P. 181–191. doi: 10.1111/joim.12924
9. Nicolaidis N.C., Chrousos G.P. Sex differences in circadian endocrine rhythms: clinical implications // *Eur J Neurosci*. 2020. Vol. 52, N 1. P. 2575–2585. doi: 10.1111/ejn.14692
10. Walton J.C., Bumgarner J.R., Nelson R.J. Sex differences in circadian rhythms // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2022. Vol. 14, N 7. P. a039107. doi: 10.1101/cshperspect.a039107
11. Kim P., Oster H., Lehnert H., et al. Coupling the circadian clock to homeostasis: the role of period in timing physiology // *Endocr Rev*. 2019. Vol. 40, N 1. P. 66–95. doi: 10.1210/er.2018-00049
12. Shi D., Chen J., Wang J., et al. Circadian clock genes in the metabolism of non-alcoholic fatty liver disease // *Front Physiol*. 2019. Vol. 10. P. 423. doi: 10.3389/fphys.2019.00423

13. de Assis L.V.M., Demir M., Oster H. The role of the circadian clock in the development, progression, and treatment of non-alcoholic fatty liver disease // *Acta Physiol (Oxf)*. 2023. Vol. 237, N 3. P. e13915. doi: 10.1111/apha.13915
14. Michel S., Meijer J.H. From clock to functional pacemaker // *Eur J Neurosci*. 2020. Vol. 51, N 1. P. 482–493. doi: 10.1111/ejn.14388
15. Li H., Zhang S., Zhang W., et al. Endogenous circadian time genes expressions in the liver of mice under constant darkness // *BMC Genomics*. 2020. Vol. 21, N 1. P. 224. doi: 10.1186/s12864-020-6639-4
16. Areshidze D.A., Kozlova M.A., Makartseva L.A., et al. Influence of constant lightning on liver health: an experimental study // *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022. Vol. 29, N 55. P. 83686–83697. doi: 10.1007/s11356-022-21655-3
17. Sato K., Meng F., Francis H., et al. Melatonin and circadian rhythms in liver diseases: Functional roles and potential therapies // *J Pineal Res*. 2020. Vol. 68, N 3. P. e12639. doi: 10.1111/jpi.12639
18. Stevens R.G., Davis S., Mirick D.K., et al. Alcohol consumption and urinary concentration of 6-sulfatoxymelatonin in healthy women // *Epidemiology*. 2000. Vol. 11, N 6. P. 660–665. doi: 10.1097/00001648-200011000-00008
19. Audebrand A., Désaubry L., Nebigil C.G. Targeting GPCRs against cardiotoxicity induced by anticancer treatments // *Front Cardiovasc Med*. 2020. Vol. 6. P. 194. doi: 10.3389/fcvm.2019.00194
20. Talib W.H., Alsayed A.R., Abuawad A., et al. Melatonin in cancer treatment: current knowledge and future opportunities // *Molecules*. 2021. Vol. 26, N 9. P. 2506. doi: 10.3390/molecules26092506
21. Voigt R.M., Forsyth C.B., Keshavarzian A. Circadian rhythms: a regulator of gastrointestinal health and dysfunction // *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019. Vol. 13, N 5. P. 411–424. doi: 10.1080/17474124.2019.1595588
22. Huang M.C., Ho C.W., Chen C.H., et al. Reduced expression of circadian clock genes in male alcoholic patients // *Alcohol Clin Exp Res*. 2010. Vol. 34, N 11. P. 1899–1904. doi: 10.1111/j.1530-0277.2010.01278.x
23. Aviram R., Adamovich Y., Asher G. Circadian organelles: rhythms at all scales // *Cells*. 2021. Vol. 10, N 9. P. 2447. doi: 10.3390/cells10092447
24. Wang J., Mauvoisin D., Martin E., et al. Nuclear proteomics uncovers diurnal regulatory landscapes in mouse liver // *Cell Metab*. 2017. Vol. 25, N 1. P. 102–117. doi: 10.1016/j.cmet.2016.10.003
25. Yeung J., Naef F. Rhythms of the genome: circadian dynamics from chromatin topology, tissue-specific gene expression, to behavior // *Trends Genet*. 2018. Vol. 34, N 12. P. 915–926. doi: 10.1016/j.tig.2018.09.005
26. Wai T., Langer T. Mitochondrial dynamics and metabolic regulation // *Trends Endocrinol Metab*. 2016. Vol. 27, N 2. P. 105–117. doi: 10.1016/j.tem.2015.12.001
27. Braakman I., Balleid N.J. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum // *Annu Rev Biochem*. 2011. Vol. 80. P. 71–99. doi: 10.1146/annurev-biochem-062209-093836
28. Chedid A., Nair V. Diurnal rhythm in endoplasmic reticulum of rat liver: electron microscopic study // *Science*. 1972. Vol. 175, N 4018. P. 176–179. doi: 10.1126/science.175.4018.176
29. Ma D., Panda S., Lin J.D. Temporal orchestration of circadian autophagy rhythm by C/EBP β // *EMBO J*. 2011. Vol. 30, N 22. P. 4642–4651. doi: 10.1038/emboj.2011.322

30. Kozlova M.A., Kirillov Y.A., Makartseva L.A., et al. Morphofunctional state and circadian rhythms of the liver under the influence of chronic alcohol intoxication and constant lighting // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, N 23. P. 13007. doi: 10.3390/ijms222313007
31. Areshidze D.A., Kozlova M.A. Morphofunctional state and circadian rhythms of the liver of female rats under the influence of chronic alcohol intoxication and constant lighting // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23, N 18. P. 10744. doi: 10.3390/ijms231810744
32. Степанов А.В., Байдюк Е.В., Сакута Г.А. Характеристики митохондрий кардиомиоцитов крыс с хронической сердечной недостаточностью // *Цитология*. 2016. Т. 58, № 11. С. 875–882. EDN: XXRUJH
33. Tsang A.H., Astiz M., Leinweber B., Oster H. Rodent models for the analysis of tissue clock function in metabolic rhythms research // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017. Vol. 8. P. 27. doi: 10.3389/fendo.2017.00027
34. Балканов А.С., Розанов И.Д., Голанов А.В., и др. Состояние эндотелия капилляров перитуморальной зоны после адьювантной лучевой терапии глиобластомы головного мозга // *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2021. Т. 10, № 1. С. 33–40. EDN: KOULJY doi: 10.31088/CEM2021.10.1.33-40
35. Курбат М.Н., Кравчук Р.И., Островская О.Б. Влияние мелатонина на морфологию митохондрий и других клеточных компонентов гепатоцита // *Гепатология и гастроэнтерология*. 2018. Т. 2, № 2. С. 138–142. EDN: TTCMUQ
36. Otsuka K., Watanabe H. Experimental and clinical chronocardiology // *Chronobiologia*. 1990. Vol. 17, N 2. P. 135–163.
37. Cornelissen G. Cosinor-based rhythmometry // *Theor Biol Med Model*. 2014. Vol. 11. P. 16. doi: 10.1186/1742-4682-11-16
38. Jacobi D., Liu S., Burkewitz K., et al. Hepatic Bmal1 regulates rhythmic mitochondrial dynamics and promotes metabolic fitness // *Cell Metab*. 2015. Vol. 22, N 4. P. 709–720. doi: 10.1016/j.cmet.2015.08.006
39. Oliva-Ramírez J., Moreno-Altamirano M.M., Pineda-Olvera B., et al. Crosstalk between circadian rhythmicity, mitochondrial dynamics and macrophage bactericidal activity // *Immunology*. 2014. Vol. 143, N 3. P. 490–497. doi: 10.1111/imm.12329
40. Jornayvaz F.R., Shulman G.I. Regulation of mitochondrial biogenesis // *Essays Biochem*. 2010. Vol. 47. P. 69–84. doi: 10.1042/bse0470069
41. de Goede Goede P., Wefers J., Brombacher E.C., et al. Circadian rhythms in mitochondrial respiration // *J Mol Endocrinol*. 2018. Vol. 60, N 3. P. R115–R130. doi: 10.1530/JME-17-0196
42. Manella G., Asher G. The circadian nature of mitochondrial biology // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016. Vol. 7. P. 162. doi: 10.3389/fendo.2016.00162
43. Darshi M., Mendiola V.L., Mackey M.R., et al. ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function // *J Biol Chem*. 2011. Vol. 286, N 4. P. 2918–2932. doi: 10.1074/jbc.M110.171975
44. Vue Z., Garza-Lopez E., Neikirk K., et al. 3D reconstruction of murine mitochondria reveals changes in structure during aging linked to the MICOS complex // *Aging Cell*. 2023. Vol. 22, N 12. P. e14009. doi: 10.1111/accel.14009
45. Mizuno M., Kuno A., Yano T., et al. Empagliflozin normalizes the size and number of mitochondria and prevents reduction in mitochondrial size after myocardial infarction in diabetic hearts // *Physiol Rep*. 2018. Vol. 6, N 12. P. e13741. doi: 10.14814/phy2.13741
46. Mazure N.M., Brahim-Horn M.C., Pouyssegur J. Hypoxic mitochondria: accomplices in resistance // *Bull Cancer*. 2011. Vol. 98, N 5. P. 40–46. doi: 10.1684/bdc.2011.1360

47. Zhuang Y., Jiang W., Zhao Z., et al. Ion channel-mediated mitochondrial volume regulation and its relationship with mitochondrial dynamics // *Channels (Austin)*. 2024. Vol. 18, N 1. P. 2335467. doi: 10.1080/19336950.2024.2335467

REFERENCES

1. Chibisov SM, Rappoport SI, Blagonravov ML. *Chronobiology and chronomedicine*. Moscow: Izd-vo RUDN; 2018. 828 p. (In Russ).
2. Forger DB. *Biological clocks, rhythms, and oscillations: the theory of biological timekeeping*. Cambridge (MA): MIT Press; 2017.
3. McKenna H, van der Horst GTJ, Reiss I, Martin D. Clinical chronobiology: a timely consideration in critical care medicine. *Crit Care*. 2018;22(1):124. doi: 10.1186/s13054-018-2041-x
4. Walker WH 2nd, Bumgarner JR, Walton JC, et al. Light pollution and cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):9360. doi: 10.3390/ijms21249360
5. Chaix A, Lin T, Le HD, et al. Time-restricted feeding prevents obesity and metabolic syndrome in mice lacking a circadian clock. *Cell Metab*. 2019;29(2):303–319.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2018.08.004
6. Panda S, Poirier GG, Kay SA. *tef* defines a role for poly(ADP-ribosyl)ation in establishing period length of the arabidopsis circadian oscillator. *Dev Cell*. 2002;3(1):51–61. doi: 10.1016/s1534-5807(02)00200-9
7. Roenneberg T, Merrow M. The circadian clock and human health. *Curr Biol*. 2016;26(10):R432-R443. doi: 10.1016/j.cub.2016.04.011
8. Zimmet P, Alberti KGMM, Stern N, et al. The circadian syndrome: is the metabolic syndrome and much more! *J Intern Med*. 2019;286(2):181–191. doi: 10.1111/joim.12924
9. Nicolaides NC, Chrousos GP. Sex differences in circadian endocrine rhythms: clinical implications. *Eur J Neurosci*. 2020;52(1):2575–2585. doi: 10.1111/ejn.14692
10. Walton JC, Bumgarner JR, Nelson RJ. Sex differences in circadian rhythms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2022;14(7):a039107. doi: 10.1101/cshperspect.a039107
11. Kim P, Oster H, Lehnert H, et al. Coupling the circadian clock to homeostasis: the role of period in timing physiology. *Endocr Rev*. 2019;40(1):66–95. doi: 10.1210/er.2018-00049
12. Shi D, Chen J, Wang J, et al. Circadian clock genes in the metabolism of non-alcoholic fatty liver disease. *Front Physiol*. 2019;10:423. doi: 10.3389/fphys.2019.00423
13. de Assis LVM, Demir M, Oster H. The role of the circadian clock in the development, progression, and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Acta Physiol (Oxf)*. 2023;237(3):e13915. doi: 10.1111/apha.13915
14. Michel S, Meijer JH. From clock to functional pacemaker. *Eur J Neurosci*. 2020;51(1):482–493. doi: 10.1111/ejn.14388
15. Li H, Zhang S, Zhang W, et al. Endogenous circadian time genes expressions in the liver of mice under constant darkness. *BMC Genomics*. 2020;21(1):224. doi: 10.1186/s12864-020-6639-4
16. Areshidze DA, Kozlova MA, Makartseva LA, et al. Influence of constant lightning on liver health: an experimental study. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022;29(55):83686–83697. doi: 10.1007/s11356-022-21655-3
17. Sato K, Meng F, Francis H, et al. Melatonin and circadian rhythms in liver diseases: Functional roles and potential therapies. *J Pineal Res*. 2020;68(3):e12639. doi: 10.1111/jpi.12639
18. Stevens RG, Davis S, Mirick DK, et al. Alcohol consumption and urinary concentration of 6-sulfatoxymelatonin in healthy women. *Epidemiology*. 2000;11(6):660–665. doi: 10.1097/00001648-200011000-00008

19. Audebrand A, Désaubry L, Nebigil CG. Targeting GPCRs against cardiotoxicity induced by anticancer treatments. *Front Cardiovasc Med*. 2020;6:194. doi: 10.3389/fcvm.2019.00194
20. Talib WH, Alsayed AR, Abuawad A, et al. Melatonin in cancer treatment: current knowledge and future opportunities. *Molecules*. 2021;26(9):2506. doi: 10.3390/molecules26092506
21. Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A. Circadian rhythms: a regulator of gastrointestinal health and dysfunction. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;13(5):411–424. doi: 10.1080/17474124.2019.1595588
22. Huang MC, Ho CW, Chen CH, et al. Reduced expression of circadian clock genes in male alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010;34(11):1899–1904. doi: 10.1111/j.1530-0277.2010.01278.x
23. Aviram R, Adamovich Y, Asher G. Circadian organelles: rhythms at all scales. *Cells*. 2021;10(9):2447. doi: 10.3390/cells10092447
24. Wang J, Mauvoisin D, Martin E, et al. Nuclear proteomics uncovers diurnal regulatory landscapes in mouse liver. *Cell Metab*. 2017;25(1):102–117. doi: 10.1016/j.cmet.2016.10.003
25. Yeung J, Naef F. Rhythms of the genome: circadian dynamics from chromatin topology, tissue-specific gene expression, to behavior. *Trends Genet*. 2018;34(12):915–926. doi: 10.1016/j.tig.2018.09.005
26. Wai T, Langer T. Mitochondrial dynamics and metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27(2):105–117. doi: 10.1016/j.tem.2015.12.001
27. Braakman I, Bulleid NJ. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*. 2011;80:71–99. doi: 10.1146/annurev-biochem-062209-093836
28. Chedid A, Nair V. Diurnal rhythm in endoplasmic reticulum of rat liver: electron microscopic study. *Science*. 1972;175(4018):176–179. doi: 10.1126/science.175.4018.176
29. Ma D, Panda S, Lin JD. Temporal orchestration of circadian autophagy rhythm by C/EBP β . *EMBO J*. 2011;30(22):4642–4651. doi: 10.1038/emboj.2011.322
30. Kozlova MA, Kirillov YA, Makartseva LA, et al. Morphofunctional state and circadian rhythms of the liver under the influence of chronic alcohol intoxication and constant lighting. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23):13007. doi: 10.3390/ijms222313007
31. Areshidze DA, Kozlova MA. Morphofunctional state and circadian rhythms of the liver of female rats under the influence of chronic alcohol intoxication and constant lighting. *Int J Mol Sci*. 2022;23(18):10744. doi: 10.3390/ijms231810744
32. Stepanov AV, Baidyuk EV, Sakuta GA. The features of mitochondria of cardiomyocytes from rats with chronic heart failure. *Cell and Tissue Biology*. 2017;11(6):458–465. EDN: XXNPXV doi: 10.1134/S1990519X17060086
33. Tsang AH, Astiz M, Leinweber B, Oster H. rodent models for the analysis of tissue clock function in metabolic rhythms research. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:27. doi: 10.3389/fendo.2017.00027
34. Balkanov AS, Rozanov ID, Golanov AV, et al. Endothelium changes of peritumoral zone capillaries after brain glioblastoma adjuvant radiation therapy. *Clinical and Experimental Morphology*. 2021;10(1):33–40. EDN: KOULJY doi: 10.31088/CEM2021.10.1.33-40
35. Kurbat MN, Kravchuk RI, Ostrovskaya OB. Effect of melatonin on the morphology of mitochondria and other cellular components of the hepatocyte. *Hepatology and Gastroenterology*. 2018;2(2):138–142. EDN: TTCMUQ
36. Otsuka K, Watanabe H. Experimental and clinical chronocardiology. *Chronobiologia*. 1990;17(2):135–163.
37. Cornelissen G. Cosinor-based rhythmometry. *Theor Biol Med Model*. 2014;11:16. doi: 10.1186/1742-4682-11-16

38. Jacobi D, Liu S, Burkewitz K, et al. Hepatic bmal1 regulates rhythmic mitochondrial dynamics and promotes metabolic fitness. *Cell Metab.* 2015;22(4):709–720. doi: 10.1016/j.cmet.2015.08.006
39. Oliva-Ramírez J, Moreno-Altamirano MM, Pineda-Olvera B, et al. Crosstalk between circadian rhythmicity, mitochondrial dynamics and macrophage bactericidal activity. *Immunology.* 2014;143(3):490–497. doi: 10.1111/imm.12329
40. Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* 2010;47:69–84. doi: 10.1042/bse0470069
41. de Goede P, Wefers J, Brombacher EC, et al. Circadian rhythms in mitochondrial respiration. *J Mol Endocrinol.* 2018;60(3):R115–R130. doi: 10.1530/JME-17-0196
42. Manella G, Asher G. The circadian nature of mitochondrial biology. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7:162. doi: 10.3389/fendo.2016.00162
43. Darshi M, Mendiola VL, Mackey MR, et al. ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function. *J Biol Chem.* 2011;286(4):2918–2932. doi: 10.1074/jbc.M110.171975
44. Vue Z, Garza-Lopez E, Neikirk K, et al. 3D reconstruction of murine mitochondria reveals changes in structure during aging linked to the MICOS complex. *Aging Cell.* 2023;22(12):e14009. doi: 10.1111/acel.14009
45. Mizuno M, Kuno A, Yano T, et al. Empagliflozin normalizes the size and number of mitochondria and prevents reduction in mitochondrial size after myocardial infarction in diabetic hearts. *Physiol Rep.* 2018;6(12):e13741. doi: 10.14814/phy2.13741
46. Mazure NM, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Hypoxic mitochondria: accomplices in resistance. *Bull Cancer.* 2011;98(5):40–46. doi: 10.1684/bdc.2011.1360
47. Zhuang Y, Jiang W, Zhao Z, et al. Ion channel-mediated mitochondrial volume regulation and its relationship with mitochondrial dynamics. *Channels (Austin).* 2024;18(1):2335467. doi: 10.1080/19336950.2024.2335467

ОБ АВТОРЕ AUTHOR'S INFO

Арешидзе Давид Александрович , канд. биол. наук; адрес: Россия, 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3; ORCID: 0000-0003-3006-6281; eLibrary SPIN: 4348-6781; e-mail: labcelpat@mail.ru	David A. Areshidze , Cand. Sci. (Biology); address: 3 Tsyurupy street, 117418 Moscow, Russia; ORCID: 0000-0003-3006-6281; eLibrary SPIN: 4348-6781; e-mail: labcelpat@mail.ru
--	--

РИСУНКИ

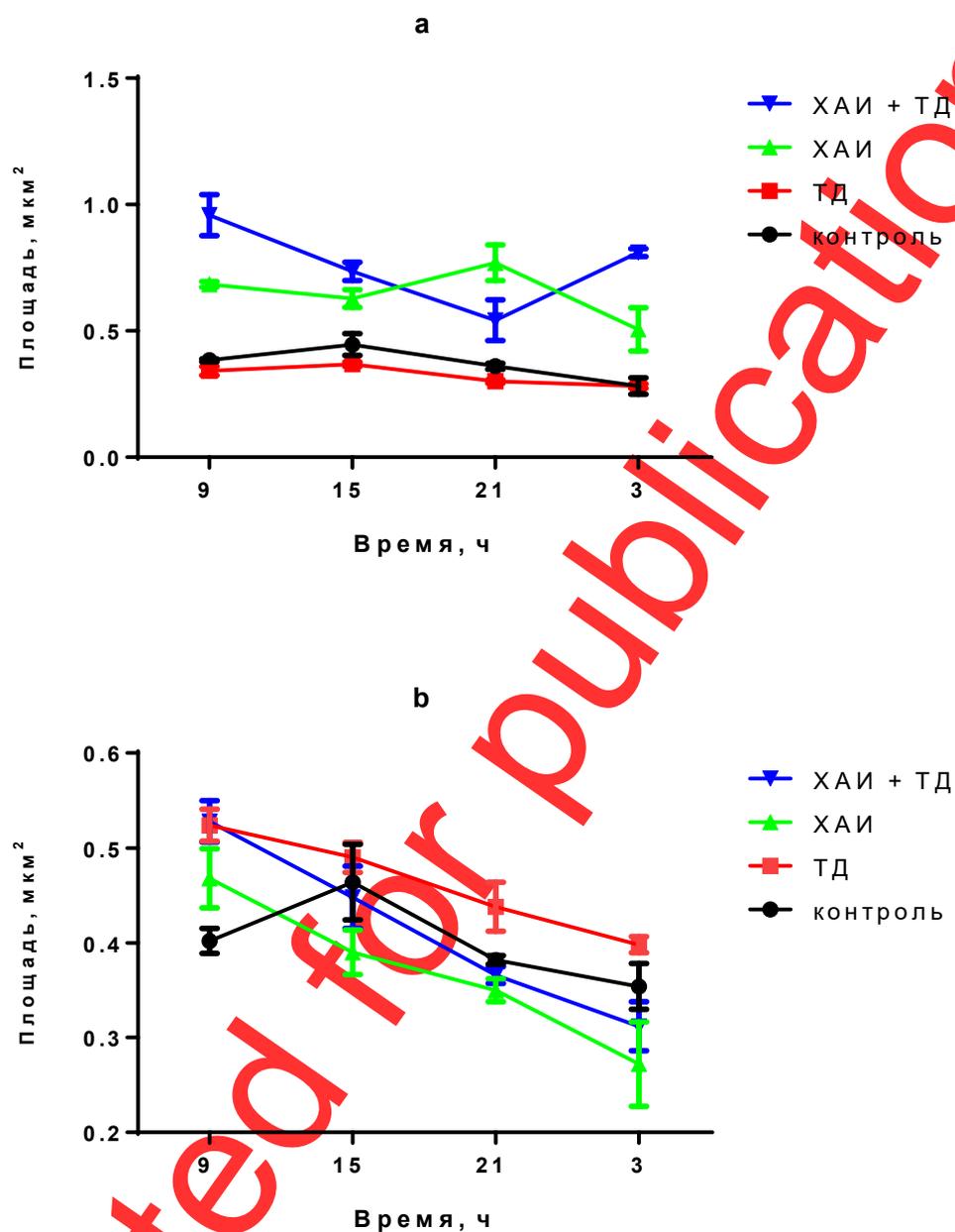
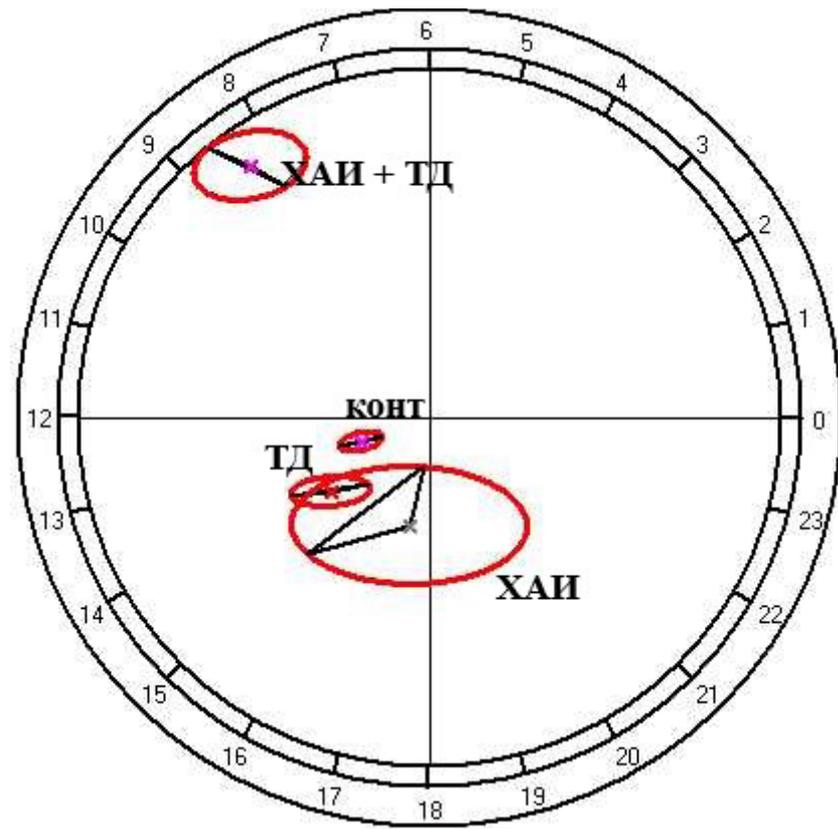
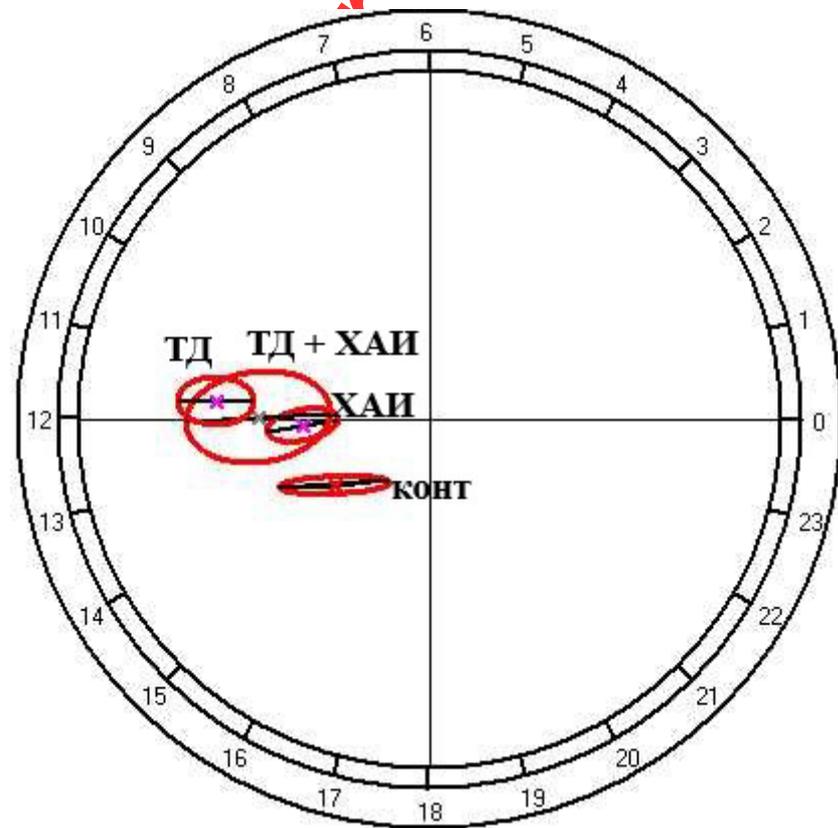


Рис. 1. Суточная динамика площади поперечного сечения митохондрий гепатоцитов: *a* — самцы, *b* — самки. ТД — темновая депривация, ХАИ — хроническая алкогольная интоксикация.

Fig. 1. Daily dynamics of the cross-sectional area of hepatocyte mitochondria: *a* — males, *b* — females. ТД — dark deprivation, ХАИ — chronic alcohol intoxication.



a



b

Рис. 2. Результаты косинор-анализа суточного ритма площади поперечного сечения митохондрий гепатоцитов: а — самцы, b — самки. ТД — темновая депривация, ХАИ — хроническая алкогольная интоксикация.

ACS

Fig. 2. Results of cosinor analysis of the daily rhythm of the cross-sectional area of hepatocyte mitochondria: *a* — males, *b* — females. ТД — dark deprivation, ХАИ — chronic alcohol intoxication.

Accepted for publication